

## Changements des propriétés du sol et des paramètres physiologiques et biochimiques foliaires de jeunes plants d'olivier inoculés par des champignons mycorhiziens à arbuscules en réponse à l'application des eaux usées du moulin d'olive

Abderrahmane YAAKOUBI<sup>1\*</sup>, Badia AGANCHICH<sup>1</sup>, Yasamine JAOUAD<sup>2</sup> et Said WAHBI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Département de Biologie, Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétale, BP 2390, Marrakech, Maroc

<sup>2</sup> University Cadi Ayyad, Faculty of Sciences Semlalia, Biology Department, Laboratory of Water Biodiversity and Climate Change (WaterBioDiCc), BP 2390, Marrakech, Maroc

(Reçu le 15 Décembre 2021 ; Accepté le 03 Mars 2022)

\* Correspondance, courriel : [elyaakoubiya@gmail.com](mailto:elyaakoubiya@gmail.com)

### Résumé

La présente étude consiste à valoriser les rejets liquides « margines », appelés aussi « Olive Mill Wastewater (OMW) », du moulin à huile comme biofertilisants pour améliorer la croissance des plantes et les propriétés du sol. Nous avons étudié des jeunes plants d'olivier (*Olea europea L.*), inoculés par le champignon mycorhizien arbusculaire (CMA), soumis à l'application de OMW à deux doses modérées (50 et 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup>) dans des conditions de serre. Nos résultats ont montré que la dose 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> favorise davantage la croissance des plants d'olivier plus que la dose 50 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> après 180 jours d'incubation. En effet, une augmentation significative de la matière organique, du P et du K échangeable du sol a été enregistré. Les deux doses de OMW appliquées favorisent également la mycorhization des racines par le CMA. La réponse des plants sur le plan physiologique et biochimique a permis de souligner que l'application des OMW à des doses de 50 et 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> induit une augmentation significative de la conductance stomatique, des sucres solubles foliaire et des teneurs en éléments nutritifs foliaires (N, P et K). Par conséquent, sur le plan pratique, la valorisation des margines par épandage direct peut être préconisée aux doses de 50 et 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> afin d'éviter tout risque d'abus d'emploi et de surdosage.

**Mots-clés :** margines, *Olea europea L.*, champignon mycorhizien arbusculaire, croissance des plants, épandage.

### Abstract

**Changes in soil properties and the leaf physiological and biochemical parameters of young olive trees plants inoculated by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in response to olive mill wastewater (OMW) application**

The present study involves the valorization of Olive Mill Wastewater (OMW) as biofertilizers to improve plant growth and soil properties. We studied young olive trees plants (*Olea europea L.*), inoculated with the

arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), subjected to OMW application at two moderate doses (50 and 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup>) under greenhouse conditions. Our results showed that the 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> dose favored the growth of olive plants more than the 50 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> dose after 180 days of incubation. Indeed, a significant increase in soil organic matter, extractable P and exchangeable K was recorded. The two doses of OMW applied also promoted root mycorrhization by AMF. The physiological and biochemical response of the seedlings highlighted that the application of OMW at doses of 50 and 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> induced a significant increase in stomatal conductance, foliar soluble sugars and foliar nutrient contents (N, P and K). Therefore, from a practical point of view, the use of OMW by direct application can be recommended at doses of 50 and 100 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> in order to avoid any risk of overuse and overdosing.

**Keywords :** *olive Mill Wastewater, Olea europea L., arbuscular mycorrhizal fungi, spreading, plant growth.*

## 1. Introduction

Le procédé d'extraction d'huile d'olive (système continu à 3 phases) génère une grande quantité des rejets liquides « margines », appelés aussi « Olive Mill Wastewater (OMW) », qui est un sous-produit de l'huile d'olive. Lors de la production de l'huile d'olive, une quantité importante de OMW, estimée à environ 580 000 m<sup>3</sup> et 30 millions de m<sup>3</sup> est générée respectivement au Maroc et dans le monde [1]. Elles sont caractérisées par leur charge organique polluante et leurs propriétés phytotoxiques, ce qui constituent de sérieux problèmes pour leur évacuation dans le milieu naturel [2, 3]. Les propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes de OMW ont fait l'objet de nombreuses recherches et sont associés à la présence de composés phénoliques, de pH acide, de salinité élevée et d'acides gras libres [4, 5]. Malgré leur nature polluante, la richesse des OMW en eau (83-94 %), en matière organique (4-15 %) et en matière minérale (0,4-2,5 %), fait de ces déchets un engrais pour le sol à faible coût, ainsi qu'une source d'eau d'irrigation dans les pays méditerranéens souffrant d'un déficit en eau et de la dégradation des sols [1, 3, 6]. Ainsi, les constituants inorganiques dans les OMW ne sont pas toxiques ; bien au contraire, ils peuvent potentiellement servir de bonnes sources d'éléments nutritifs pour les plantes, ce qui rend cet effluent potentiellement approprié pour le recyclage comme amendement du sol [7]. Ainsi, de nombreux chercheurs ont conclu que l'épandage des OMW sur les sols agricoles pourrait être une approche réussie de la valorisation des OMW si l'épandage est effectué dans des conditions contrôlées et avec des doses appropriées [3, 6, 8 - 10]. En effet, le stockage des OMW dans un bassin, sur une longue période de temps, produit une augmentation du pH et une réduction de la DBO<sub>5</sub> [8], puis peut être utilisé pour l'irrigation, considérant que la décomposition des composés organiques dans les OMW épandues sur le sol est attribuable aux bactéries qu'il contient. Les OMW d'olives peuvent être utilisées comme biofertilisant organique jusqu'à 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> sur un sol alcalin toutes les deux à trois années [1, 5, 11]. De plus, les composés phénoliques apportés par les OMW lors de l'épandage ont été dégradés au cours du deuxième mois après l'épandage, sauf dans le cas d'épandage massif (300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) contre indiqué pour la nutrition des plantes [12]. L'apport de OMW induit également une amélioration intéressante de la microflore du sol suite à l'enrichissement de celle-ci en matière organique et en sel minéraux, et elle devient capable de décomposer les éléments phytotoxiques tels que les polyphénols [12]. En outre, La margine, si elle est diluée, peut être considérée comme un engrais valable et une solution écologique et économique intéressante dans les pépinières d'oliviers [13]. D'autres études sur la valorisation des margines ont montré également que l'utilisation des margines a des effets bénéfiques à la fois pour les cultures et pour les sols d'accueil [8, 14]: Un apport modéré de 50 à 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ne semble pas présenter de risques de pollution du milieu, mais se traduit au contraire, par une amélioration de la fertilité du sol, de la croissance et de la production des végétaux (accroissements de 30 à 90 %). D'un autre côté, l'addition de OMW au sol pourrait entraîner une

augmentation de la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), ce qui stimule la croissance et l'absorption des nutriments de nombreuses plantes hôtes [15]. Les oliviers sont connus par leur pouvoir d'héberger les CMA et peuvent être colonisés par différentes espèces, notamment *Glomus monosporum*, et *rhizophagus irregularis* [16]. La mycorhize peut améliorer l'absorption de plusieurs éléments nutritifs par les plantes, notamment le P, N et K [17]. En échange de la translocation des nutriments minéraux du sol à la plante hôte, les CMA reçoivent du carbone de leur plante hôte [18]. La détermination du taux de colonisation des racines de l'hôte par les CMA peut être estimée par des mesures microscopiques. Nous avons utilisé cette approche pour comprendre l'effet de l'épandage des OMW sur la colonisation des racines des oliviers par les CMA. Par conséquent, l'utilisation des OMW comme amendement organique du sol constitue donc une alternative prometteuse pour améliorer la fertilité du sol et le développement végétatif [19 - 22]. Bien que certains chercheurs notaient une amélioration de la microflore du sol et un effet favorable sur la croissance des plantes lors de l'épandage des margines, une réticence envers l'épandage, demeure jusqu'à nos jours, pour des craintes d'éventuelles incidences microbiologiques négatives sur le sol et phytotoxiques. Dans le but de contribuer à soulever l'ambiguïté qui a dû résulter des avis souvent controversés envers la valorisation agricole des margines, et de déterminer les niveaux seuils pour l'application des OMW en agriculture, ce travail a été mené au niveau des pots sous serre. En comparaison avec un sol témoin, les effets de l'épandage de OMW à 50 et 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> sur les propriétés du sol, la colonisation des racines par les CMA, ainsi que certains paramètres physiologiques (nutriments foliaires, conductance stomatique) et biochimiques (sucres solubles totaux) des plants de l'olivier (*Olea europea. L.*) ont été étudiés, après 180 jours d'incubation en serre, au niveau des pots remplis d'un sol homogène. Cette étude consiste à mettre en évidence la réaction des plants d'olivier (*Olea europea L.*) visa à vis de margines appliquées.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Origine et caractérisation des margines utilisées pour l'épandage

Les échantillons de OMW ont été prélevés à partir du bassin de stockage d'une huilerie d'olive (système continu à 3 phases, variété picholine marocaine), située dans la ville d'El Attaouia, province région Marrakech-Safi, Maroc, en pleine campagne oléicole (2018-2019). Les OMW prélevées ont subi un prétraitement naturel au sein de ce bassin de stockage (temps de séjour : 30 jours). Les caractéristiques physico-chimiques des OMW sont : pH : 4,74 ; conductivité électrique (CE) : 18,1 mS cm<sup>-1</sup> à 20°C ; la demande chimique en oxygène (DCO) : 74 g l<sup>-1</sup> ; N : 0,43 g l<sup>-1</sup> ; P : 0,63 g l<sup>-1</sup> ; K : 5,97 g l<sup>-1</sup> ; polyphénols totaux (PPT) : 0,4 g l<sup>-1</sup> et huile résiduelle (HR) : 0,3 %. Le pH a été mesuré au moyen d'un pH mètre de type HANNA modèle HI 2209. La CE a été mesuré à l'aide d'un conductimètre de type HANNA modèle EC 215. La DCO a été déterminée par la méthode de dichromate de potassium. L'huile résiduelle (HR) contenue dans la matière sèche des OMW a été déterminée par l'hexane à une température de 40 à 60 °C au moyen d'un appareil de Soxhlet. La teneur de OMW en azote total (NT) se fait par la méthode de Kjeldhal. Le P : Les OMW ont été minéralisées par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur de minéralisation K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. le dosage est effectué en suivant le protocole AFNOR, 1983 (T90-023). L'élément minéral (K) a été extrait avec un acide nitrique dans des cendres de matière sèche après calcination pendant 4 h à 550°C, en utilisant un spectrophotométrie d'émission de flamme (appareil type JENWAY PFP7). Les PPT ont été déterminés selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [23].

### 2-2. Eau du puit utilisée

L'eau du puit utilisée est caractérisée par un pH légèrement alcalin (7,58), une conductivité électrique faible (1,27 mS/cm) et une salinité faible (0,889 g/L).

### 2-3. Origine, échantillonnage et caractérisation du sol

Le sol utilisé a été prélevé à partir d'un terrain agricole situé à 10 km de la ville de Marrakech. Il fait partie de la commune Essada, Région de Marrakech, Maroc. Pour le prélèvement de sol destiné aux analyses, nous avons opté pour 5 prélèvements au même site dans la couche entre 10 et 30 cm. Les échantillons de sol ont été séchés à l'air libre, homogénéisés, tamisés à 2 mm et ensachés pour analyses. Les caractéristiques physico-chimiques du sol de ce site étaient les suivantes : pH (H<sub>2</sub>O) : 7,95 ; CE : 0,63 mS cm<sup>-1</sup> ; matière organique (MO) : 0,42 % ; N : 161 mg Kg<sup>-1</sup> ; P Olsen : 58 mg Kg<sup>-1</sup> ; K échangeable : 152 mg Kg<sup>-1</sup>. Les analyses granulométrie du sol étudié sont les suivantes : Argile : 66,56 % ; Sable : 20,00 % ; Limon : 13,44 %. Le pH et la CE ont été mesurés sur un mélange sol/eau (1:2.5 et 1:5 respectivement). La MO du sol a été analysée selon la méthode de Walkley-Black. La teneur en azote total a été déterminée par la méthode Kjeldahl. Le phosphore disponible a été analysé selon la méthode d'Olsen et Sommers. Le K disponible, a d'abord été extrait avec de l'acétate d'ammonium à pH 7. Ensuite, le K a été mesuré par photométrie de flamme.

### 2-4. Matériel végétal utilisé

Notre étude portait sur des plants de l'olivier (*Olea europaea L.*) de la variété locale certifiée "picholine marocaine" fournie par la pépinière Benchakroun. Des plants d'olivier de deux ans ont été cultivés dans des pots plastiques cylindriques renfermant 4 kg de sol dont le diamètre est de l'ordre de 30 cm et la hauteur de 30 cm. Au moment du repiquage, 20 plants ont été inoculés avec 5g de l'inoculum (*Rhizophagus irregularis*), qui a été déposé directement sous la racine des plants d'olivier. Préalablement, les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) ont été multipliés par culture au piège dans des pots utilisant *Zea mays L* comme plante hôte dans des conditions contrôlées dans la serre pendant 3 mois. L'inoculum du CMA est constitué d'un mélange du sol rhizosphérique provenant de la culture au piège contenant des spores, des hyphes et des fragments de racines mycorhiziennes. Afin de garantir l'uniformité du développement des plants, tous les plants ont été bien arrosés en irriguant les pots pendant un an avant le début des traitements, par la suite, les plants de taille homogène ont été soumis aux différents traitements par les margines.

### 2-5. Essai agronomique

Deux doses de OMW ont été testées, respectivement : 50 et 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>. Les quantités de OMW sont calculées sur la base de la surface des pots (surface de la base du pot = 700 cm<sup>2</sup>). Les quantités de OMW ajoutées correspondent à 350 mL pot<sup>-1</sup> et 700 mL pot<sup>-1</sup>, respectivement, pour les deux doses mentionnées ci-dessus (**Tableau 1**). La OMW a été suffisamment homogénéisée et ensuite ajoutée au sol déjà préparé dans les pots. Cet amendement a été réalisé en Mars 2019 en une seule application. L'étude a été réalisée dans une serre en plastique à la Faculté des Sciences Semlalia Marrakech et dans des conditions ambiantes.

**Tableau 1 : Quantités de margines utilisées**

Traitements	OMW (ml pot <sup>-1</sup> )	Eau du puits ajoutée (ml pot <sup>-1</sup> )	OMW %	Equivalent de OMW en m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>
Sc (Témoin)	0	700 ml	0	0
S50	350	350	50	50
S100	700	0	100	100

### 2-6. Détermination du taux de colonisation racinaire par le CMA

Nous avons prélevé les racines d'olivier de chaque plant (5 plants par traitements) à la fin de l'essai. Elles sont triées selon le diamètre inférieur à 0,5 mm avec le pied à coulisse afin d'isoler les plus fines responsables

de l'absorption racinaire. La coloration des racines a été effectuée selon la méthode de [24]. Cinq fragments de racines de chaque plant sont montés et écrasés entre lame et lamelle dans du glycérol et sont observés au microscope optique (G 400x) pour l'estimation du taux de colonisation des racines par CAM selon la méthode utilisée par [25]. Trois passages équidistants ont été réalisés sur chaque segment de racine, lorsque ce dernier traverse le champ optique de microscope et qu'il renferme une infection en arbuscule ; vésicule ; hyphe mycélien ou bien spores, on lui donne la valeur (1). Le nombre de point colonisés compté sur le nombre total de points observés donne le rapport qui peut être ensuite converti en pourcentage calculé selon la **Formule** suivante :

$$\% \text{ de mycorhization} = \frac{\text{Nombre de points colonisés}}{\text{Nombre de points observés}} \quad (1)$$

## **2-7. Analyse des éléments minéral foliaires (N, P et K)**

Afin de déterminer le contenu minéral des feuilles, les échantillons de plants d'olivier ont été séchés à 70 °C pendant 48 heures, puis broyés en une poudre fine. Une masse représentative de 1 g de l'échantillon en poudre fine a été mis dans un four à moufle à 450 °C pendant 6 heures. Puis, les cendres ont été dissoutes dans HNO<sub>3</sub>. Le N a été analysé en utilisant la méthode de Kjeldahl. Le K, a été déterminé par spectrophotométrie d'émission atomique (JENWAY PFP7, Milan, Italie). Le P a été déterminé avec un Spectrophotomètre UV JENWAY 6405 (Milan, Italie).

## **2-8. Conductance stomatique (Gs)**

La mesure de la (Gs) a été faite sur des feuilles bien développées du même rang pour les différents traitements à l'aide d'un poromètre à diffusion (Leaf porometer, model SC1). Les mesures ont été effectuées sur la face inférieure de 5 feuilles par plant, entre 10h et 12h. La conductance stomatique est déterminée sous une température de 28 °C et une humidité relative d'environ 60 % et elle est exprimée en mmol de H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## **2-9. Teneur en sucres solubles**

Les mesures sont effectuées à la fin de l'essai sur l'avant dernière feuille. Trois mesures, en unité arbitraire, sont prises par plantule. Les sucres solubles totaux ont été estimés par la méthode de l'acide sulfurique phénolique [26]. Les mesures d'absorbances sont effectuées par spectrophotomètre à ultra-violet visible (UV) à une longueur d'ondes de 485 nm.

## **2-10. Analyse statistique**

Les données mesurées ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur de classification, à l'aide d'un logiciel statistique XLSTAT (version 2019). Puis, si nécessaire, un classement des moyennes a été effectué à l'aide du test Tukey HSD. Ce test permet de compléter l'interprétation et d'identifier les groupes de moyennes homogènes. On considère que les résultats sont significatifs quand  $P \leq 0,05$ .

# **3. Résultats et discussion**

## **3-1. Caractérisation des OMW utilisées**

Les margines utilisées sont caractérisées par un pH acide (4,74), une CE (8,1 mS cm<sup>-1</sup>) assez faible et une charge organique exprimé en DCO assez importante (74 g l<sup>-1</sup>). Ainsi, ces OMW sont riches en éléments minéral (0,43 g l<sup>-1</sup> ; 0,63 g l<sup>-1</sup> et 5,97 g l<sup>-1</sup> respectivement pour NTK, PT et K). Leur teneur en polyphénols est assez

faible ( $0,4 \text{ g l}^{-1}$ ) et également en huile résiduelle (HR : 0,3 %). En effet, ces résultats montrent que ces OMW utilisées sont caractérisées par des valeurs assez faibles par rapport aux OMW fraîches car ces dernières proviennent des bassins de stockage (temps de séjour : 30 jours) après le processus de la trituration. Les composés phénoliques ont subi des dégradations au cours de leurs stockage et par conséquent diminution de leur teneur ce qui explique nos résultats. La teneur faible en huile résiduelle (HR) présente dans les margines est due au processus de centrifugation que subit la OMW à la fin du procédé d'extraction d'huile d'olive. D'où, les OMW utilisées ne présentent aucun risque phytotoxique du fait qu'elles ont subi un traitement préalable au niveau du bassin de stockage.

### 3-2. Changement des propriétés chimiques du sol amendé par les OMW après 180 jours

Aucun changement significatif du pH de sol n'a eu lieu avec les différents traitements (*Tableau 2*). Ce qui indique que le pH du sol n'a pas été affecté par l'ajout de OMW. La CE du sol amendé avec 50 et 100  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$  était significativement plus élevé que celui du sol témoin. L'application de 100 et 50  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$  a provoqué également une augmentation significative de la matière organique. Les concentrations de N, P et k (échangeable) étaient significativement plus élevées dans le sol recevant de OMW que le sol témoin pour les deux traitements (*Tableau 2*). L'augmentation de la matière organique et des éléments nutritifs (NPK) du sol après un délai de 180 jours de l'application des OMW peut être attribuée à un apport direct de OMW du fait que les margines utilisées sont caractérisées par une charge organique et inorganique importante.

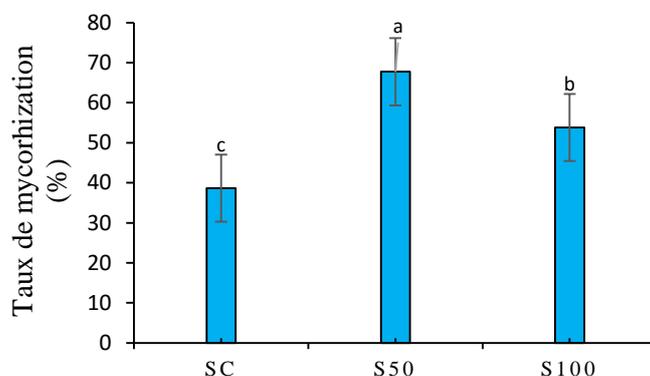
**Tableau 2 :** Propriétés du sol témoin et du sol amendé aux OMW après 180 jours d'application agronomique des OMW. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. Des lettres différentes représentent des différences significatives à  $P \leq 0,05$

Propriété	Témoin (Sc)	Application agronomique des OMW ( $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$ )	
		S50	S100
pH	$7,95 \pm 0,03\text{a}$	$8,12 \pm 0,05\text{a}$	$7,95 \pm 0,04\text{a}$
CE ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	$0,63 \pm 0,05\text{c}$	$1,69 \pm 0,02\text{b}$	$1,82 \pm 0,07\text{a}$
MO (%)	$0,42 \pm 0,01\text{b}$	$0,91 \pm 0,01\text{a}$	$1,02 \pm 0,03\text{a}$
N ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ MS}$ )	$161 \pm 0,2\text{c}$	$210 \pm 0,05\text{b}$	$273 \pm 0,07\text{a}$
P ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ MS}$ )	$58,6 \pm 0,05\text{c}$	$72,2 \pm 0,05\text{b}$	$77,3 \pm 0,05\text{a}$
K ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ MS}$ )	$152 \pm 0,05\text{c}$	$350 \pm 1,34\text{b}$	$550 \pm 2,85\text{a}$

### 3-3. Taux de mycorhization

Après observation des fragments racinaires à l'aide du microscope optique, les résultats montrent que le taux d'infection par le CMA est de l'ordre de 67,75 % et de 53,82 % respectivement pour les doses 50 et 100  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de OMW contre 38,65 % chez les fragments racinaires non traité (Sc) (*Figure 1*). Ce qui montre clairement que le taux de colonisation chez les plants d'oliviers traités avec 50 et 100  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$  OMW a connu une augmentation significative par rapport à celui des plants d'oliviers témoin (Sc). Ainsi, la dose 50 favorisent davantage la mycorhization de CMA que la dose 100  $\text{m}^3/\text{ha}$  OMW. En outre, l'observation des fragments des plants témoin (Sc) montre que le CMA colonise exclusivement l'extrémité des fragments racinaire mais ne pénètre pas dans le cylindre central. Alors que l'observation des fragments racinaires des plants traités avec les doses 50 et 100  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de OMW révèle que le CMA colonise même le cylindre central. L'apport de OMW en matière organique et inorganiques favorisent la mycorhization des CMA. Ce résultat est confirmé par certains auteurs [14] qui démontrent qu'il y a une forte présence de micro-organismes dans la couche traitée avec les doses 100 et 200  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$ . Cette richesse découle de l'apport de nutriments nécessaires pour la vie des champignons et des bactéries déminéralisant la matière organique. Ils ont montré également qu'avec la dose

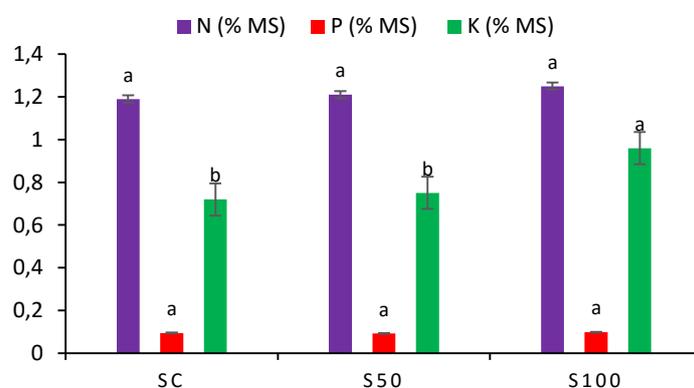
200 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup>, une régression des polyphénols est observée et découle d'une forte colonisation du sol par les micro-organismes (champignons et bactéries). De plus, les auteurs [14, 15] ont montré aussi que les valeurs élevées du quotient champignons/bactéries observées dans le sol amendé avec les OMW suggèrent que la présence de OMW a provoqué un changement entre les proportions de champignons et de bactéries ; avec une plus grande proportion de champignons dans le sol amendé, surtout au taux de OMW le plus élevé, ce qui indique que la OMW constitue un substrat adéquat pour le développement des champignons.



**Figure 1 :** Effet de l'application des OMW sur le taux de mycorrhization des racines des plants d'olivier (*Olea europea L*) cultivés en pots après 180 jours d'incubation. Des lettres différentes représentent des différences significatives à  $P \leq 0,05$

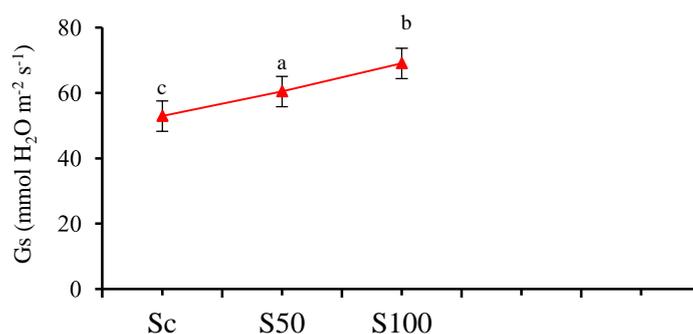
### 3-4. Partie foliaire

L'évolution de la teneur en azote des feuilles a présenté la même tendance pour les différents traitements (**Figure 2**). La teneur en phosphore foliaire varie de 0,094 à 0,098 % de la MS. Donc pour N et P, il n'y a pas un changement considérable par rapport au témoin. Par contre, la teneur en K augmente d'une façon significative avec l'augmentation de la quantité des OMW ; elle atteint sa valeur maximale (0,96 % MS) à 100 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> (**Figure 2**); ce qui montre que l'accumulation de potassium s'est produite au niveau des feuilles des plants qui ont reçu la plus haute dose. Ces résultats impliquent que l'application des OMW n'entrave par l'absorption et la translocation des éléments minéraux vers la partie foliaire des plants d'olivier, au contraire, elles activent leur absorption et surtout le potassium (K).



**Figure 2 :** Effet de l'application des OMW sur la teneur en (azote (N), phosphore (P) et en potassium (K) foliaire des plants d'olivier (*Olea europea L*) cultivés en pots après 180 jours d'incubation. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. Des lettres différentes représentent des différences significatives à  $P \leq 0,05$

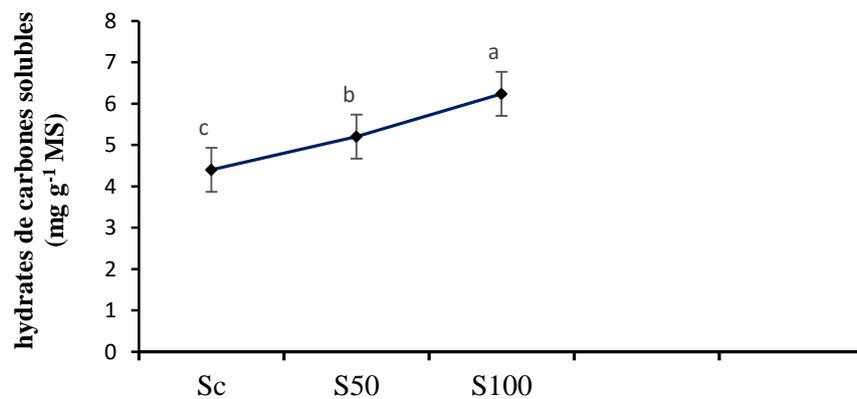
L'azote est considéré comme le nutriment le plus couramment appliqué dans les oliveraies [27]. Au cours de cette expérience, les teneurs en azote foliaire enregistrées ont été suffisantes pour la croissance puisque la concentration de N dans les feuilles se situait entre 1,1 et 2 % de la MS [4]. Ces résultats sont en accord avec plusieurs rapports antérieurs [28]. Au cours de cette expérience, l'application agronomique des OMW n'a pas induit de différences significatives entre les plants traités par les différentes doses d'OMW et les plants non traité (contrôle). En effet, [29] n'ont pas affirmé que la dose élevée de OMW ( $252 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ), affectait la concentration d'azote dans les feuilles après deux années successives d'application. Cependant, [30] ont observé une amélioration de la teneur en azote foliaire après l'application des OMW brutes et ont expliqué cette augmentation par la disponibilité de l'azote dans la solution du sol. En ce qui concerne le phosphore, toutes les concentrations de P se situaient dans la fourchette normale à sur-suffisante (0,07-0,14 % de la MS) mentionnée par [31], et aucune concentration déficiente en P n'a été enregistrée. Ceci est en accord avec [4] qui ont montré que la teneur en P n'a pas été affectée de manière significative par les trois doses d'OMW (50, 100 et  $200 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de OMW) expérimentées au cours des deux campagnes. La concentration en potassium (K) des feuilles a fluctué au cours de la période expérimentale et n'est pas descendue en dessous de 0,7 % de la MS pour la croissance optimale de l'olivier [31]. Les analyses statistiques ont montré une différence significative entre la teneur en K du témoin et celle de traitement avec  $100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de OMW appliqués pendant la période expérimentale ( $p < 0,05$ ). Cependant, aucune différence significative n'a été notée entre le contrôle et le traitement  $50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de OMW. Par conséquent, dans l'oliveraie, l'épandage de  $100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  de OMW pourraient affecter la nutrition foliaire en K pendant 180 jours. Ces résultats seraient attribués à l'amélioration de la teneur en K du sol après l'application des OMW [32] et qui se répercutera positivement sur l'assimilation du potassium par les plantes. La valeur la plus basse de la conductance stomatique ( $G_s$ ) a été détectées dans les plants de contrôle ( $52,93 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); par contre, la conductance stomatique était significativement plus élevée dans les feuilles des plants traités avec les dose 50 et  $100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  que celle du Sc (**Figure 3**). Avec l'augmentation de la concentration de OMW, on a observé une augmentation linéaire des valeurs de la conductance stomatique. La  $G_s$  atteint sa valeur maximale ( $69,05 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) à  $100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , dont le taux d'augmentation est de l'ordre de 23,34 %.



**Figure 3 :** Effet des OMW sur la conductance stomatique ( $G_s$ ) (A,) des plants de l'olivier (*Olea europea. L*) après 180 jours d'incubation. (Des lettres différentes représentent des différences significatives à  $P \leq 0,05$ )

L'augmentation de la conductance stomatique pourrait être due à la teneur élevée en potassium au niveau de la feuille. Ceci est en accord avec [13] qui ont montré que l'augmentation significative de la conductance stomatique ( $G_s$ ) à 50 et  $100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  pourrait être expliquée par le contenu foliaire élevé en potassium (K), c'est-à-dire que la teneur élevée en potassium foliaire pourrait être responsable du degré plus élevé de

conductance stomatique. Ils rapportent aussi que le potassium (K) est impliqué dans le processus d'ouverture et de fermeture du stomate. En effet, l'ouverture et la fermeture des cellules de garde est essentiellement une réponse à l'agitation médiée par des changements dans la concentration de solutés et le soluté majeur impliqué dans les mouvements stomatiques est le K. Dans les feuilles de nombreuses plantes, de très grandes quantités de K se sont accumulées, jusqu'à 60 % du poids sec. Cela se produit par une combinaison du taux de transpiration élevés et d'un manque de connexion du ploème qui permettrait la retranslocation des ions en excès. En comparaison avec témoins, les deux doses de OMW appliquées ont provoqué une augmentation significative de la concentration en hydrates de carbone solubles totaux dans les feuilles (**Figure 4**). La concentration des sucres solubles atteint sa valeur maximale (6240 mg kg<sup>-1</sup> MS) à 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de OMW dont le taux d'augmentation est de 32,05 % ; ce qui montre que la plante accumule plus d'hydrates de carbone lorsque la quantité de OMW est assez élevée.



**Figure 4 :** Effet des OMW sur la teneur en hydrates de carbones solubles (sucres solubles) foliaire des plants de l'olivier (*Olea europea L*) après 180 jours d'incubation. (Des lettres différentes représentent des différences significatives à  $P \leq 0,05$ )

L'augmentation des sucres solubles foliaires peut être expliquée par la richesse du sol en composés organiques apportés par les OMW, essentiellement des glucides [21] qui enrichissent le sol en ces composés et qui ont un effet positif sur la composition des feuilles de la plante. Nos résultats concordent avec les résultats des auteurs [21] qui ont démontré également la même évolution de la teneur en sucres solubles en fonction des doses de OMW. De plus, les mécanismes physiologiques de croissance et de développement qui permettent à une espèce végétale de tolérer les effets toxiques peuvent impliquer de nombreux attributs. En effet, nos résultats suggèrent que le facteur majeur de la tolérance d'*Olea europea L* aux OMW concentrées (100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) est la capacité de produire des solutés protecteurs, tels que la proline et des sucres solubles [22] pour réduire l'effet toxique des métaux lourds des OMW accumulés dans les tissus végétatif [22, 33]. Il est signalé que les hydrate de carbones sont les principaux solutés contribuant au potentiel osmotique des plantes [34]. Les plantes utilisent plusieurs stratégies à base de sucre pour s'adapter aux stress environnementaux [22, 34, 35]. Il a également été suggéré que la proline joue de multiples rôles dans la tolérance au stress des plantes, elle agit comme un médiateur de l'ajustement osmotique, protège les macromolécules pendant la déshydratation et sert d'épurateur de radicaux hydroxyles [22, 34]. Par conséquent, la proline et les sucres solubles sont des substances qualifiées de stress des principaux organes végétatifs (feuilles, tige et racines). Ces substances sont généralement libérés et stockés dans les cellules des organes végétatifs des plantes supérieures en réponse aux différents contraintes et stress environnementales. Elles ont tendance à s'accumuler dans la partie aérienne plutôt que la partie sous terrain [11, 22].

## 5. Conclusion

Nos résultats ont montré que la dose  $100 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}$  de OMW favorise davantage la croissance des plants d'olivier plus que la dose  $50 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}$  de OMW après 180 jours d'incubation. En effet, les deux doses de OMW appliquées améliorent la fertilité du sol en augmentant sa teneur en matière organique et en éléments minéraux nutritifs (NPK) dont la plante aura besoin, et elles favorisent également la colonisation des racines par le champignon mycorhizien arbusculaire ; ce qui se répercutera positivement sur la croissance des plants. En outre, la réponse des plants sur le plan physiologique et biochimique a permis de souligner que l'application des OMW (surtout à  $100 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}$ ) induit une augmentation significative de la conductance stomatique, des sucres solubles foliaire et des teneurs en éléments nutritifs foliaires (N, P et K). L'épandage des margines sur les terres agricoles pourrait constituer une solution pratique envisageable aussi bien pour se débarrasser de cet effluent que pour améliorer la fertilité du sol. L'apport de marge induit une amélioration intéressante des champignons mycorhiziens (surtout à  $50 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}$ ) du sol suite à l'enrichissement de celui-ci en matière organique humifiée et à la dégradation des polyphénols. De plus, il a été observé que la plante a la capacité de synthétiser des sucres solubles pour réduire l'effet toxique des métaux lourds accumulés dans les tissus végétatif de la plante suite à un apport de OMW concentrée. Par conséquent, un apport modéré de 50 à  $100 \text{ m}^3\text{ha}^{-1}$  ne semble pas présenter de risques phytotoxique, mais se traduit au contraire, par une amélioration de la fertilité du sol et de la croissance et développement de la plante. L'application des margines sur les terres agricoles est dorénavant considérée une solution adéquate pour un précieux recyclage de la matière organique contenue dans ces effluents. Toutefois, l'opération d'épandage doit être contrôlée afin d'éviter des éventuels problèmes environnementaux.

## Références

- [1] - T. CHATZISTATHIS and T. KOUTSOS, *Agricultural Water Management.*, 190 (2017) 55 - 64
- [2] - A. MEKKI, F. ALOUI, A. DHOUIB and S. SAYADI, *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 3 (2012) 1 - 8
- [3] - S. MAGDICH, W. ABID, M. BOUKHRIS, B. BEN ROUINA and E. AMMAR, *Ecolog Engin.*, 97 (2016) 122 - 129
- [4] - S. MAGDICH, C. BEN AHMED, M. BOUKHRIS, B. BEN ROUINA and E. AMMAR, *International Journal of Agronomy and Agricultural Research.*, 6 (2015) 56 - 67
- [5] - L. BARBARA, D. S. MARIA GABRIELLA and D. G. LUCIANO, *Soil Sci. Plant Anal.*, 48 (20) (2017) 2420 - 2433
- [6] - L. CHAARI, N. ELLOUMI, S. MMSIEDDI, K. GARGOUGRI and B. BEN ROUINA, *J Agricul Chem and Environ* 4 (2015) 1 - 13
- [7] - M. RINALDI, G. RANA and M. INTRONA., *Field Crop Research* 84 (2003) 319 - 326
- [8] - A. ESMAIL, H. ABED, M. FIRDAOUS, N. CHAHBOUN, Z. MENNANE, E.H. BERNY et M. OUHSSINE, *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (1) (2014) 121 - 126
- [9] - J. M. RUSAN MUNIR, A. ALBALASMEH AMMAR, I. MALKAWI HANAN, *Wat. Air Soil. Pollut.*, 227 (2016) 135 - 43
- [10] - H. AL IMOOR, I. RAED, H. Z. HUSAM, Z. ODAY and Z. MOTASEM, *Chem and Mat Res.*, 9 (2017) 10
- [11] - A. MEKKI, A. ALOUI, Z. GUERGUEB, and M. BRAHAM, *Clean, Soil, Air, Water*, 100 (2018) 1 - 9
- [12] - H. SAHRAOUI, *Afrique Science*, 08 (1) (2012) 97 - 106
- [13] - G. GULLO, A. DATTOLA, G. LIGUORI, V. VONELLA, R. ZAPPIA and P. INGLESE, *Global Science Books*, (2010) 84 - 90
- [14] - B. BEN ROUINA, S. BEDBABIS, M. BOUKHRIS and G. FERRARA, *Journal of Environmental Management*, 133 (2014) 45 - 50

- [15] - A. MEDDICH, M. AIT EL MOKHTAR, S. WAHBI, A. BOUMEZZOUGH, *Cahiers Agricultures*, 26 (2017) 45012 - 49
- [16] - C. CARUSO, C. MAUCIERI, V. CAVALLARO, M. BORIN and A. C. BARBERA, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64 (14) (2018) 2060 - 2074
- [17] - B. MECHRI, A G. MANGA, M. TEKAYA, F. ATTIA, H. CHEHEB, F B. MERIEM, B. MOHAMED, B. DALANDA, M. HAMMAMI, *Appl Soil Ecol.*, 75 (2014) 124 - 133
- [18] - A. PORRAS-SORIANO, I. MARCILLA-GOLDARACENA, M L. SORIANO-MARTÍN, A. PORRAS-PIEDRA, *J Agr Sci*
- [19] - M. RUSCITTI M, M. ARANGO, J. AND BELTRANO, *Theor Exp Plant Physiol*, 1 (2017) 37 - 49
- [20] - M. ABICHOU, K. GARGOURI, A. RHOUMA and H. KHATTELI, *Agric. Sci. Engine. Technol. Res.*, 1 (2014) 16 - 25
- [21] - S. G. JAWAHER, L. BARGOUGUI and M. CHAIEB, *Water. Sci. Technol.*, 80 (2019) 1295 - 1303
- [22] - F. TAJINI, A. OUERGI and K. HOSNI, *J. New Sci. Agric. Biotech.*, 66 (6) (2019) 4193 - 4203
- [23] - E. DE MARCO, M. SAVARESE, A. PADUANO and R. SACCHI, *Food Chem*, 104 (2007) 858 - 867
- [24] - J M. PHILLIPS, D S. HAYMAN, *Trans Br Mycol Soc.* 1(1970) 158 - 161
- [25] - A. CHAFI, Z. FORTAS, *Bois et forêts des Tropiques*, 262 (4) (1999) 77 - 79
- [26] - L. DI GIOVACCHINO, *Olivae*, 104 (2005) 55 - 63
- [27] - I. THERIOS, *Wallingford, UK: CABI Publishing*, (2009) pp. 409
- [28] - A. FABBRI, C. BENELLI, *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 75 (2000) 131 - 141
- [29] - K. CHARTZOULAKIS, G. PSARRAS, M. MOUTSOPOULOU, E. STEFANOUDAKI, *Agric. Ecosyst. Environ.*, 138 (2010) 293 - 298
- [30] - F. J. LÓPEZ-ESCUADERO, M A. BLANCO-LÓPEZ, C D R. RINCÓN, J M C. REIG, *Hort Science*, 2 (2007) 294 - 298
- [31] - L. PANAGIOTOPOULOS, *Agric. Cattle-raising* 3 (2001) 36 - 44
- [32] - S. MAGDICH, C. BEN AHMED, R. JARBOUI, B. BEN ROUINA, M. BOUKHRIS AND E. AMMAR, *Chemosphere*. 93 (2013) 1896 - 1903
- [33] - A. MEKKI, *Journal of Water Science and Engineering*, 1(5) (2019) 1 - 10
- [34] - G. ZELALEM, H. AZAMAL, F. MASRESHA and Y. GIETAHUN, *Ethiopian J. Agric. Sci.*, 14 (2015) 188 - 202
- [35] - L. BARGOUGUI, Z. GUERGUEB, M. CHAIEB, M. BRAHAM and A. MEKKI, *Agricul. Wat. Manag.*, 212 (2018) 60 - 7