

VALORISATION DE LA COQUILLE DU CABOSSE (*THEOBROMA CACAO L.*) ET DES BOUES AGRO-INDUSTRIELLES COMME SUPPORT DANS LA FABRICATION DES INOCULA POUR LÉGUMINEUSES

Fabián Robles-Martinez*, Ana Belem Piña-Guzman** et Gabriel Leyva-Ruelas**

* Laepsi Insa de Lyon - ** Departamento de Industrias Agrícolas, Universidad Autónoma Chapingo (Mexique)

Dans ce travail nous avons testé la survie de la souche *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* en utilisant comme support de culture un résidu agro-industriel et un déchet agricole. La coquille de cabosse, les boues de Fermex (Fermentaciones Mexicanas S.A. de C.V.), et leur mélange avec la tourbe mexicaine ont été comparés avec les résultats des témoins utilisés : tourbe importée (origine : Espagne) et tourbe mexicaine.

Tous les supports ont subi deux autoclavages successifs d'une heure à 120 °C. Après stérilisation, les supports ont été imprégnés avec une solution contenant une population rhizobienne de 2×10^9 cellules/ml. A la suite d'une homogénéisation des supports imprégnés, on a placé chaque essai dans des sacs en polyéthylène, lesquels ont été cachetés et stockés pendant six mois à 4 °C.

Le nombre de cellules viables de *Rhizobium* dans les supports a été déterminé après 1, 30, 63, 141 et 176 jours de stockage. La survie de *Rhizobium* a été remarquable dans le support préparé avec un mélange de coquilles de cabosse et de tourbe mexicaine, la concentration cellulaire au bout des six mois de stockage étant de $2,75 \times 10^9$ cel/g de support. Les résultats de cet essai sont comparables à ceux obtenus avec la tourbe espagnole (premier support témoin) qui montrent une population rhizobienne de $3,87 \times 10^9$ cel/g à la fin de la période de stockage. La concentration cellulaire en fin d'essai dans le support préparé à base de boues Fermex a été de $1,93 \times 10^9$ cel/g d'inoculum, ce qui représente un bon résultat. La tourbe mexicaine (deuxième support témoin) a présenté une population de $5,33 \times 10^8$ cel/g d'inoculum, concentration plus faible à celle recommandée pour un inoculum pour légumineuses, qui doit être de $1,0 \times 10^9$ cel/g d'inoculum. Aucune survie n'a été observée à la fin du stockage sur les supports préparés avec les coquilles de cabosse seules, les coquilles de cabosse mélangées aux boues Fermex, et les boues Fermex mélangées à de la tourbe mexicaine.

INTRODUCTION

Pendant les dernières décennies, après la « révolution verte », l'agriculture intensive a été caractérisée par l'utilisation de grandes quantités de fertilisants azotés afin d'obtenir une production maximale, car l'azote et l'eau sont les principaux facteurs limitants dans l'activité agricole.

This study evaluated the survival of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* strain in agro-industrial and agricultural waste carriers. Shells of cacao pod, Fermex (Fermentaciones Mexicanas S.A. de C.V.) waste sludges, and their combinations with Mexican peat were compared with Mexican peat and imported peat. All carriers sterilized by two successive autoclavings at 120°C for 1 hour before being inoculated. Broth culture of *rhizobia* with a total count of 2×10^9 cells/ml was added to the milled supports. After thorough mixing the carriers were packed into sealed polyethylene bags. The bags were stored at 4°C for six months.

Plate counts of viable cells of *rhizobia* were determined in the carrier materials at 1, 30, 63, 141 and 176 days. Survival of *rhizobia* was found to be very good in the carrier made of the combination of cacao pod shells and Mexican peat. After six months, viable cell concentration in this combination was comparable to that found in the imported peat (around $3,8 \times 10^9$ cells/g). Survival in Fermex waste mud was also good (around 2×10^9 cells/gram). The Mexican peat showed a fair survival which only $5,3 \times 10^8$ cells/g, below the recommended population of $1,0 \times 10^9$. The other carrier tested (cacao pod shells alone, shells plus Fermex sludge, and Mexican peat plus Fermex sludge) did not show any viable cells after six months.

Le développement durable des activités agricoles nécessite d'éviter la dégradation du patrimoine sol^[1] et des ressources en eau. Cependant au Mexique (comme dans de nombreux pays) l'application de doses excessives de fertilisants azotés a occasionné de sérieux problèmes de pollution des eaux superficielles et souterraines. A l'inverse, d'autres agriculteurs

n'ont pas la possibilité économique ou l'instruction nécessaire pour en appliquer les doses optimales, affectant ainsi le rendement agricole. En outre, l'utilisation de fertilisants synthétiques présente deux inconvénients importants : a) la production de fertilisants est un processus qui consomme une grande quantité d'énergie, ce qui est coûteux ; et b) ces fertilisants présentent des effets négatifs quand ils sont utilisés d'une façon démesurée [3].

L'utilisation d'inocula de micro-organismes fixateurs d'azote est une bonne méthode alternative à la fertilisation azotée, un moyen « bon marché » de fertiliser et un procédé plus respectueux de l'environnement. Les inocula sont composés de deux parties, a) un milieu organique qui sert de support, et b) les bactéries du genre *Rhizobium* qui travaillent en symbiose avec les plantes légumineuses pour fixer l'azote atmosphérique -source inépuisable d'azote-.

L'inoculum pour légumineuses est un concentré de bactéries du genre *Rhizobium*, qui doit avoir une concentration de 1×10^9 cellules par gramme de produit. Les souches utilisées doivent être sélectionnées, afin d'optimiser leur activité dans le terrain [5].

Il existe plusieurs types d'inocula pour légumineuses, dans lesquels on peut trouver :

- a) inocula en poudre (c'est le type plus répandu sur le marché)
- b) inocula granulés
- c) inocula liquides
- d) inocula en agar
- e) graines pre-inoculées

Dans le cadre de ce travail, les inocula en poudre ont été étudiés. À l'heure actuelle plusieurs supports ont été testés [4], par exemple : du sol, du compost, du charbon, de la sciure, de la farine de soja, de la cellulose, etc. Cependant le support le plus utilisé est la tourbe qui est un matériau poreux et léger d'origine marécageuse et très riche en matière organique, qui résulte de la décomposition de végétaux à l'abri de l'air. Mais malgré toutes les qualités de cette matière, sa disponibilité est très restreinte et dans plusieurs pays -en particulier dans les régions tropicales- sa rareté augmente le coût de production d'inocula.

Face à la nécessité de trouver un matériau succédané de la tourbe habituellement utilisée, cette étude a pour objet la valorisation des coquilles de cabosse¹ ainsi que des boues d'une industrie mexicaine de fermentations (Fermex). Ce sont des matériaux largement disponibles et pour lesquels il n'existe aucune utilisation jusqu'à présent.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les supports solides utilisés ont été : des tourbes nationales et en provenance d'Espagne, la coquille de cabosse provenant d'une région de Tabasco (Sud-est du Mexique) et les boues de l'industrie Fermex dont la composition chimique est montrée dans le tableau 1.

Afin de réaliser une étude comparative pour la valorisation des matériaux testés, il a fallu les conditionner pour parvenir

Paramètres	Boues sortie process	Boues épaissies ¹
pH	2,5	1,98
Densité (g/cm ³)	1,035	1,201
Solides totaux (% p/p)	7,6	44,11
Résidu par ignition (%)	0,56	3,25
Sucre total (%)	0,84	4,89
Sucre réducteur (%)	0,79	4,61
Azote total (%)	0,64	4,02
Azote amoniacal (%)	0,54	3,16
Azote organique (%)	0,15	0,86
Protéines	0,93	5,38
L-lisina HCL (%)	0,06	0,38
Mg (ppm)	206	1196,39
Na (ppm)	271	1574,77
Ca (ppm)	50	291,89
Mn (ppm)	46	266,66
K (ppm)	673	3697,29
Zn (ppm)	0,43	2,52
Cu (ppm)	0,25	1,44
P (ppm)	3,97	23,06
Sulfate (ppm)	2,11	12,24
Solides en suspension (%)	1,01	
(ppm)	31622	
conductivité (µmho/cm)	115000	

nir à avoir des supports en poudre approchant les caractéristiques physiques des supports témoin (tourbes).

Conditionnement des supports

La consistance des boues agro-industrielles, au moment où celles-ci nous sont parvenues, était déjà poudreuse mais dans le cas des coquilles de cabosse, la première étape du conditionnement a été le séchage à une température de 70 °C pendant 24 h pour faciliter leur mouture dans un broyeur à marteaux. La poudre produite a été tamisée à une granulométrie comprise entre 10 µ et 40 µ. La nature des différents supports utilisés dans les essais est indiquée au tableau 2.

Essai	Matériaux utilisés
T1	Tourbe Importée* (T.I.)
T2	Tourbe Mexicaine (T.M.)
T3	Coquille de cabosse (C.C.)
T4	Boues Fermex (B.F)
T5	50 % de C.C. + 50 % de B.F.
T6	50 % de C.C + 50 % de T.M.
T7	50 % de T.M + 50 % de B.F.

* origine : Espagne

La teneur en eau, ainsi que la capacité de rétention d'eau de chaque support, ont été mesurées (voir tableau 3) afin de déterminer la quantité exacte d'inoculum que chaque matériau pouvait retenir tout en restant meuble et sans former de grumeaux.

Le pH de chaque support a été ajusté à 6.8 par ajout de CaCO₃ ou de NaOH et en mélangeant les matériaux afin

Tableau 3 : Volume d'inoculum utilisé dans chaque essai

Essai	Matériau	Inoculum (ml)	Nombre de cellules apportées
T1	Tourbe Importée	25,0	50 x 10 ⁹
T2	Tourbe Mexicaine	26,0	52 x 10 ⁹
T3	Coquille de Cabosse	25,0	50 x 10 ⁹
T4	B.F.	18,5	37 x 10 ⁹
T5	C.C. + B.F.	24,0	48 x 10 ⁹
T6	C.C. + T.M.	30,0	60 x 10 ⁹
T7	T.M. + B.F.	21,5	43 x 10 ⁹

d'assurer la bonne homogénéisation de l'agent neutralisant ajouté. Ensuite, les supports ont été stérilisés par deux autoclavages successifs d'une heure à 120 °C réalisés à 24 heures d'intervalle.

Finalement les supports ont été conditionnés stérilement dans des sacs en polyéthylène qui ont été cachetés immédiatement^[2].

Préparation de la suspension bactérienne

Tableau 4 : Composition du milieu de culture utilisé pour la croissance de *Rhizobium leguminosarum*

Composant	g/l
NaCl	0,1
MgSO ₄	0,2
K ₂ HPO ₄	0,5
Mannitol	10,0
Extract de levure	1,0

On a utilisé la souche de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, laquelle a été conservée sur milieu gélosé dont la composition est donnée au tableau 4.

La souche a été cultivée en bouillon de culture à base d'extrait de levure et mannitol à 28 °C sous aération pendant 18 h. Cette durée a été déterminée à partir

d'une étude préalable de cinétique de croissance de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* dans les mêmes conditions. A la fin du processus une suspension bactérienne a été obtenue avec une concentration de 2x10⁹ cel/ml.

Inoculation des essais

Une fois la suspension bactérienne prête, l'inoculation des supports a été faite au moyen d'une seringue. Les volumes d'inoculum injectés dans chaque support l'ont été en fonction de leur capacité de rétention d'eau (voir tableau 3).

Incubation

Après inoculation et homogénéisation manuelle des supports, ceux-ci ont été incubés pendant 24 h à 28 °C. Cette opération a pour objectif « l'affinage » ou la maturation des inocula permettant la colonisation des supports par la souche inoculée.

Les supports sont alors analysés microbiologiquement pour dénombrer la population bactérienne et détecter la présence éventuelle de micro-organismes contaminants.

Les supports ainsi inoculés et conditionnés ont été stockés à 4 °C pendant six mois. La survie de *Rhizobium* a été évaluée tous les mois pendant la période de stockage^[2].

RÉSULTATS

Du fait qu'un inoculum doit maintenir sa qualité pendant les conditions de stockage, la survie de *Rhizobium* a été prise comme le critère principal pour évaluer l'aptitude des matériaux testés comme supports par comparaison avec les supports témoin. Les variations d'humidité et de pH ont également été considérées.

Survie de *Rhizobium*

Les résultats (figure 1) révèlent que seuls trois des supports testés (T1, tourbe espagnole ; T4, boues Fermex ; et T6, mélange de coquille de cabosse et tourbe mexicaine) ont permis la survie de *Rhizobium* à un niveau supérieur à 1x10⁹ cel/gr (concentration cellulaire minimale^[5]). Parmi ces trois essais, il faut remarquer d'abord que l'essai T1 -tourbe espagnole servant de témoin- dont on connaissait déjà la bonne qualité en tant que support, a permis au bout de six mois d'avoir la plus forte concentration bactérienne à la fin de l'essai (figure 1).

On observe cependant que le support T6, un mélange à 50 % de tourbe mexicaine et de coquille de cabosse, a développé une population de *Rhizobium* quasiment égale à celle du témoin T1 pendant les six mois de stockage. Bien que la tourbe mexicaine (essai T2) et les coquilles de cabosse (essai T3) aient séparément donné des résultats décevants, le mélange de ces deux matériaux, c'est-à-dire l'essai T6 a donné de bons résultats. Cela peut être expliqué par une probable amélioration de la texture, de la porosité, et de la capacité de rétention d'eau de ce support, ce qui a permis, d'une part, de démarrer le stockage avec une population rhizobienne plus importante, et d'autre part de montrer que la porosité pourrait favoriser la circulation naturelle de l'air à l'intérieur du support.

La population bactérienne dans les boues Fermex (essai T4), malgré une légère diminution durant le premier mois, a considérablement augmenté (figure 1) et à la fin de l'expérience la concentration bactérienne a atteint un niveau de 1,93x10⁹ cel/g, ce qui représente presque le double de la population bactérienne requise dans un inoculum. Pour l'essai T4 préparé à partir de boues Fermex (qui n'est pas

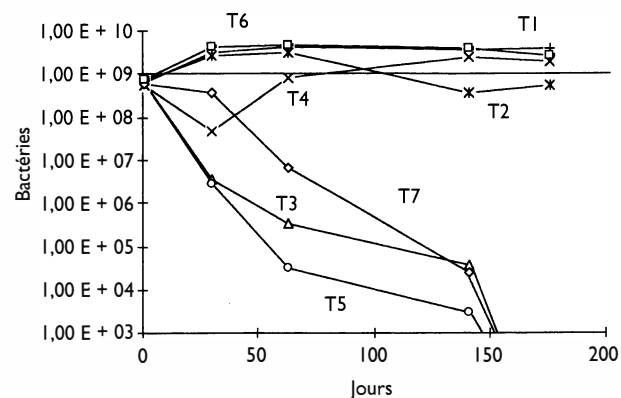


Figure 1 : Courbe de survie de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* dans les différents essais

d'aussi bonnes qualités que la tourbe espagnole, quant à la concentration finale de cellules de *Rhizobium* vivantes) il a été observé un niveau de survie supérieur au taux recommandé de 1×10^9 cel/g.

Dans le deuxième essai témoin T2 (tourbe mexicaine.), la population microbienne finale s'est située en-dessous du chiffre recommandé bien qu'elle ait montré une augmentation considérable et comparable à celle présentée par les traitements T1 et T6 pendant les premiers mois. Finalement, une diminution accélérée de la concentration cellulaire s'est révélée depuis les premiers jours, et jusqu'à la fin de l'expérience dans les essais T3, T5 et T7, ce qui indique que les matériaux utilisés dans ces essais ne peuvent pas être retenus comme supports d'inoculum.

Teneur en eau

Le tableau 5 montre que pendant la période de stockage, le taux d'humidité a subi une diminution de l'ordre de 2,8 à 3,9 % en fonction des essais. On considère que cette diminution relativement faible du taux d'humidité des supports n'a pas influencé négativement la survie de *Rhizobium* car l'humidité finale est demeurée suffisante dans tous les essais. Cependant les essais T1, T2 et T6 ont été avantagés par leurs niveaux d'humidité supérieurs à ceux des autres essais. Dans ces trois essais, les pourcentages d'humidité ont été respectivement de 37,5 ; 36,8 et 42 % et sont aussi toujours restés proches de l'intervalle optimum d'humidité de 40-50 %^[6]. En revanche, l'humidité finale de l'essai T4 (32,2 %) s'est approchée du niveau minimum recommandé de 30 %, niveau au-dessous duquel la survie de *Rhizobium* peut être menacée.

Variation du pH

Le pH a été mesuré en début et en fin d'essai à l'aide d'un pHmètre. Puisqu'il s'agit d'une souche de croissance rapide, le milieu de culture de *Rhizobium leguminosarum* ou le support qui le contient a une tendance à l'acidification au bout d'un certain temps en raison de l'activité métabolique^[4].

Les résultats obtenus montrent en fait que seuls les essais T3 et T5 se sont acidifiés, tandis que dans les autres essais le pH a subi une augmentation (tableau 5).

Ce phénomène peut s'expliquer par une mauvaise distribution de l'agent neutralisant dans le support (étant donné la

consistance poudreuse des supports et des substances neutralisantes employées), susceptible de biaiser les mesures de pH effectuées.

CONCLUSION

Les résultats de ce travail montrent que la coquille de cabosse peut être utilisée pour améliorer la qualité de la tourbe mexicaine qui s'est révélée d'une qualité inférieure à celle de la tourbe étrangère, en tant que support d'inoculum pour légumineuses. Car le support composé avec une combinaison (50 %/50%) de coquille de cabosse et de tourbe mexicaine a permis une très bonne survie des bactéries *Rhizobium* pendant six mois, alors que trois mois seulement sont généralement nécessaires entre la production de l'inoculum et son application agricole.

La possibilité d'utilisation, quant à elle, repose sur la disponibilité du matériau et la coquille de cabosse est un résidu agricole qui est facilement disponible dans plusieurs régions ou pays tropicaux où il est relativement difficile de trouver des tourbes de bonne qualité.

Le support préparé à partir de boues de Fermex, qui est un résidu d'un processus de fermentation, a donné également de bons résultats. Il pourrait être utilisé aussi comme support d'inoculum mais des analyses complémentaires seraient nécessaires pour déceler la présence éventuelle de certains polluants dans ces boues.

Le support préparé exclusivement avec la coquille de cabosse a montré des résultats moins intéressants, malgré sa teneur en humidité et sa composition chimique qui paraissent favorables à la survie de *Rhizobium*.

* Fabián Robles-Martínez,

Laepsi, Bâtiment 404, 1^{er} étage - Insa de Lyon - 20, avenue Albert Einstein - 69621 Villeurbanne cedex

** Ana Belem Piña-Guzman et Gabriel Leyva-Ruelas,

Departamento de Industrias Agrícolas - Universidad Autónoma Chapingo - Estado de México (Mexique)

Note :

I. Cabosse : résidu du fruit du cacaoyer.

Bibliographie

- [1] Mustin, M. *Le compost, gestion de la matière organique*. Éditions François Dubusc, Paris. 1987.
- [2] Piña-Guzman, Ana B., Robles-Martínez, Fabian et Leyva-Ruelas, Gabriel. *Utilización de la cascara de mazorca de cacao (Theobroma cacao L.) y lodos residuales Fermex como soportes en la fabricación de inoculantes para leguminosas*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agroindustrial, Departamento de Industrias Agrícolas, Universidad Autónoma Chapingo, México. 1994. 87 p.
- [3] Rocha Sosa, M., et De las Peñas Nava, A. *La fijación del nitrógeno*, ICYT, Información Científica y Tecnológica, Vol. 12, num 166/67, México. 1990. p 78-82.
- [4] Stewart Smith, R. *Production and quality control inoculants*. In : Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Edited by Gerald H. Elkan ; U.S.A. 1987.
- [5] Trujillo González, G. *Producción y estado actual de los inoculantes para leguminosas en México*. Simposium « La fijación biológica del nitrógeno en frijol común (Phaseolus vulgaris) », 20 Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Zacatecas, Zac., México. 1987.
- [6] Vincent, J.M. Root. *Nodule symbioses with Rhizobium (Chapter 9)*. In the biology of nitrogen fixation, Edited by A. Quispel. Frontiers of Biology, Volume 33. Editors : A. Neuberger and E.L. Tatum. State University, Leydon, The Netherlands. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 1974.

Tableau 5 : Variation de la teneur en eau et du pH de chaque essai

Essai	Hum. initiale (%)	Hum. finale (%)	Variation d'hum. (%)	pH initial	pH final	Variation (unités pH)
T1	40,65	37,45	- 3,2	6,83	6,92	+0,12
T2	40,66	36,76	- 3,9	6,83	7,42	+0,59
T3	37,98	35,16	- 2,82	6,83	6,53	-0,30
T4	35,80	32,25	- 3,6	6,83	7,97	+1,14
T5	38,43	35,53	- 2,9	6,83	6,10	-0,73
T6	45,11	42,01	- 3,1	6,83	8,22	+1,39
T7	37,85	34,40	- 3,45	6,83	7,30	+0,47