

12

**DEMANDE DE CERTIFICAT D'UTILITE**

**A3**

22 Date de dépôt : 15.11.21.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 19.05.23 Bulletin 23/20.

56 Les certificats d'utilité ne sont pas soumis à la procédure de rapport de recherche.

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : *BESNARD Olivier* — FR et *BES Claude* — FR.

72 Inventeur(s) : *BESNARD Olivier*.

73 Titulaire(s) : *BESNARD Olivier*, *BES Claude*.

74 Mandataire(s) : *BES Claude*.

54 Procédé de prélèvement, d'isolement, de sélection, de multiplication et d'inoculation de populations microbiennes indigènes des sols.

57 Procédé de prélèvement, d'isolement, de sélection, de multiplication et d'inoculation de populations microbiennes indigènes des sols

La présente invention concerne un procédé destiné à accroître la quantité et la qualité des végétaux en améliorant les capacités biologiques indigènes des sols par l'obtention d'isolats fongiques, plus particulièrement ceux connus pour être bénéfiques pour la revitalisation des sols et des végétaux, essentiellement choisis dans le genre *Trichoderma*.

Ledit procédé se caractérise essentiellement en ce qu'il met en œuvre l'ensemble des étapes suivantes : une phase de prélèvement dans les sols de plusieurs carottages ; des phases d'isolement et de purification des champignons *Trichoderma* spp ; la sélection des souches les plus performantes pour plusieurs propriétés agronomiquement intéressantes ; l'optimisation de la production quantitative et qualitative de spores de chacun des clones sélectionnés ; la formulation des inocula obtenus avec des compléments nutritionnels et une méthode d'inoculation des dites formules par épandages ou/et enfouissement dans les sols afin de restituer les populations indigènes multipliées ; le contrôle post-implantatoire du bon développement des populations réintroduites, notamment par des méthodes de méta-géno-

mique, garantissant une exacte traçabilité de la mise en état maximal de colonisation des sols.

FR 3 129 060 - A3



## Description

### **Titre de l'invention : Procédé de prélèvement, d'isolement, de sélection, de multiplication et d'inoculation de populations microbiennes indigènes des sols**

#### **Domaine technique**

[0001] La présente invention concerne le domaine de l'obtention d'isolats fongiques plus particulièrement sélectionnés pour être bénéfiques à la revitalisation des sols et des végétaux.

#### **Technique antérieure**

[0002] A ce jour, aucun procédé complet, similaire à celui de la présente invention, n'a été expérimenté et mis au point. Il consiste à effectuer des prélèvements dans le sol d'une même parcelle, l'isolement de populations fongiques « bénéfiques » des sols, la sélection en laboratoire des clones les plus performants pour leurs propriétés agronomiques, la multiplication par fermentation en milieu solide, et la restitution par inoculation aux parcelles à traiter dans le but d'accroître les rendements des cultures en améliorant les capacités biologiques indigènes des sols.

#### **Résumé de l'invention**

[0003] Adressé aux agriculteurs, responsables d'exploitations végétales ou toute personne chargée de l'entretien de végétaux, le procédé proposé a pour objectif d'accroître la quantité et la qualité des végétaux en améliorant les capacités biologiques indigènes des sols.

[0004] Le principe dudit procédé consiste en l'obtention d'isolats fongiques, plus particulièrement ceux connus pour être bénéfiques pour la revitalisation des sols et des végétaux, essentiellement choisis dans la famille des moisissures et plus particulièrement dans le genre *Trichoderma*.

[0005] Il se caractérise en ce qu'il consiste à la mise en œuvre de l'ensemble de étapes suivantes :

[0006] a) une phase de prélèvement, dans les sols et tous types de supports de culture de végétaux, de plusieurs carottages ;

[0007] b) des phases d'isolement et de purification des moisissures du genre *Trichoderma spp*, sur milieux sélectifs en laboratoire, dans le but de générer une « mycothèque » de différents clones ;

[0008] c) la sélection des souches les plus performantes pour plusieurs propriétés agronomiquement intéressantes, notamment pour la stimulation de croissance racinaire, la libération du phosphore organique et la solubilisation du phosphore minéral, l'aptitude à la dégradation de la matière organique, le mycoparasitisme, la résistance aux

- fongicides du sol ainsi que l'induction des défenses naturelles des plantes ;
- [0009] d) l'optimisation de la production quantitative et qualitative de spores de chaque clone sélectionné par un procédé de fermentation en milieu solide, sur résidus ou produits végétaux, notamment par des démarches de contrôle qualité stériles ;
- [0010] e) la formulation des inocula obtenus avec des compléments nutritionnels de conservation et de multiplication dans les milieux à coloniser,
- [0011] f) une méthode d'inoculation des dites formules par, injections, épandages ou/et enfouissements dans les sols, afin de restituer les populations indigènes multipliées ;
- [0012] g) le contrôle post-implantatoire du bon développement des populations réintroduites, notamment par des méthodes de méta-génomique, garantissant une exacte traçabilité de la mise en état maximal de colonisation des sols.

### **Description des modes de réalisation**

- [0013] Le procédé selon l'invention a pour objectif d'obtenir des souches de *Trichoderma* montrant des propriétés agronomiques intéressantes, permettant :
- [0014] - une croissance rapide afin qu'elles puissent coloniser tous types de sol ou supports de cultures, dans lequel elles seront enfouies ;
- [0015] - une capacité à métaboliser des phytohormones impliquées dans la multiplication des cellules racinaires (notamment les auxines), induisant une plus grande surface d'adsorption possible des éléments nutritifs du sol ;
- [0016] - des propriétés de solubilisation de l'élément phosphore incorporé dans les minéraux d'engrais résiduels ou de la roche mère (phosphatase) ;
- [0017] - une aptitude à la colonisation saprophytique mesurable par divers procédés, et qui traduisent la possibilité d'une bonne dégradation de la matière organique de tous types de propriétés, permettant la libération des éléments phosphorés ou azotés, incorporés dans la matière organique morte (phytases, cellulases, chitinase) : ces formes de phosphore et d'azote étant rendues alors comme mobiles et absorbables par la plante ;
- [0018] - un pouvoir mycoparasitique dont l'estimation consiste à sélectionner des souches vis à vis de différents organites (sclérotés, acervicules, pycnides, etc....) de différents pathogènes ;
- [0019] - une capacité à résister aux divers pesticides (fongicides, herbicides et insecticides du sol), afin de ne pas être détruits par la co-utilisation de molécules de synthèse, ainsi qu'à l'éventuelle métabolisation de celles-ci par dégradation desdits métabolites ;
- [0020] - la production de sidérophores, molécules capables de chélater les cations notamment ferriques et autres oligo-éléments ;
- [0021] - la capacité à stimuler les défenses des plantes que l'on souhaite traiter, notamment en mesurant dans celles-ci les activités augmentées de peroxydasiques, phenylammonialiasés, etc.....

- [0022] - les stimulations des activités enzymatiques de dégradation des molécules récalcitrantes concentrées dans les sols, notamment les résidus d'herbicides, insecticides et fongicides, les métaux lourds, les hydrocarbures (HAP), les plastiques (PE et PET, etc....) ou autre molécules bromées, chlorées, etc....
- [0023] Dans chacun des cas spécifiques, dans le but d'obtenir les souches présentant les meilleures croissances et productions possibles des dites molécules impliquées, différents tests sont effectués pour évaluer les performances de chaque souche, dans l'objectif de sélectionner les plus aptes à se développer le mieux sur des milieux pauvres ou riches, humides ou secs, et à des températures basses ou hautes. Les souches ainsi sélectionnées seront ensuite pré-cultivées, en milieux gélosés en boîtes de Pétri pour obtenir un inoculum de base, puis multipliées massivement par fermentation en milieu solide sur résidus végétaux. C'est un procédé de culture en conditions stériles des souches de *Trichoderma* permettant la production quantitative et qualitative des spores par fermentation sur un milieu solide (FMS). La formulation des inocula obtenus avec des compléments nutritionnels et une méthode d'inoculation des dites formules par épandages ou/et enfouissement dans les sols afin de restituer les populations indigènes multipliées. Enfin est mis en œuvre le contrôle post-implantatoire du bon développement des populations réintroduites, notamment par des méthodes de méta-génomique, garantissant une exacte traçabilité de la bonne implantation et colonisation des sols.
- [0024] Etape N°1 : Prélèvements agronomiques et isolement des échantillons :
- [0025] Les prélèvements s'effectuent dans un sol humide (sols engazonnés, maraîchers, viticole, arboricole ou des grandes cultures, etc.) sur la base d'échantillons de dimensions 1 à 3 cm de diamètre, préférentiellement 2 cm, et 1 à 10 cm de profondeur, préférentiellement 5 cm, par parcelle à diagnostiquer, dont le nombre minimal est de 16 échantillons répartis sur toute la surface de la parcelle à analyser. Les échantillons sont regroupés dans un même sachet.
- [0026] Les 3 compartiments (sol, plante et eau) sont séparés. La technique d'isolement utilisée est celle de l'incorporation directe du sol dans un milieu sélectif d'isolement et dans le cas des matières organiques du sol, la technique d'isolement utilisée est celle des suspensions dilutions. Les cultures sont alors mises en incubation pendant plusieurs jours. On procède alors à l'examen, à l'isolement des colonies.
- [0027] Etape N°2 : Isolements des *Trichoderma* :
- [0028] Pour l'isolement des populations en *Trichoderma* on procède à la purification des isolements, c'est à dire à l'obtention d'échantillons ne contenant qu'une seule spore, unique garantie d'un même patrimoine génétique de chacune. On réalise une culture séparée pour chaque spore dissociée sur un milieu gélosé riche tel le PDA ou flocons d'avoines en boîte de Pétri. Par la suite, l'aspect cultural de ces souches est à identifier

afin de déterminer le classement sommaire des souches isolées.

- [0029] Dès la réception de l'échantillon, une partie de la terre est mise à l'étuve pour déterminer son taux d'humidité. Les parties végétales et la terre sont mis dans de l'eau stérile avec du Twinn, pour détacher les spores. Après observation au microscope et comptage à la cellule de Malassez le nombre de spores totales/ml de solution est déterminé. La dilution nécessaire pour obtenir environ 100 spores est ainsi calculée.
- [0030] Une faible quantité de terre est saupoudrée et immédiatement dispersée dans un milieu sélectif d'isolement « généraliste » étant coulé et maintenu en surfusion en boîtes de Pétri (37 à 40°C) par agitation jusqu'à solidification. Dans le cas des matières organiques du sol, la technique des suspensions dilutions employée est la suivante : Après tamisage et broyage en présence d'eau stérile, différentes dilutions successives de la suspension obtenue sont incorporées dans le milieu d'isolement. Pour ce faire, 10 ml de chacune des dilutions sont versés dans un erlenmeyer contenant 90 ml de milieu sélectif d'isolement maintenu en surfusion au bain-marie (entre 37°C et 40°C). Après homogénéisation, les 100 ml sont répartis dans des boîtes de pétri placées dans les conditions optimales d'isolement des *Trichoderma*. Après un temps d'incubation de 3 à 7 jours, on repère la dilution présentant un nombre de colonies suffisant mais sans confluence. La dilution étant choisie, on peut procéder à l'isolement des colonies. Les milieux nutritifs spécifiques sont :
- [0031] - *Milieu TME de Papavizas (1982)* : un mélange de glucose (1g), gélose (20 g) et d'eau distillée (800 ml) est autoclavé. On ajoute 200 ml de V-8, le pH doit être compris entre 3,8 et 4. Au milieu encore tiède, on ajoute alors du sulfate de néomycine (100 mg), de la bacitracine (100 mg), de la pénicilline G (100 mg), du chloronèbe (100 mg), de la nystatine (20 mg), de la chlortétracycline HCl (25 mg), du propionate de sodium (500 mg).
- [0032] - *Milieu TSM d'Elad et al. (1981)* : Ce milieu est constitué de MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (0,2 g); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,9 g); KCl (150 mg); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1 g); glucose (3 g); Chloramphénicol (250 mg); Fénaminosulf (300 mg); quintonzène (200 mg); rose bengale (150 mg); gélose (20 g); eau distillée (1000 ml).
- [0033] - *Milieu de Davet (1979)* : Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1g) ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (1 g) ; KNO<sub>3</sub> (250 mg) ; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (250 mg) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (125 mg) ; saccharose (2 g) ; acide citrique (50 mg) ; gélose (25 g); eau distillée (1000 ml). Après autoclavage, le pH est ajusté à 4,5 avec du HCl 1N et on ajoute au milieu tiède du sulfate de streptomycine (30 mg), de la vinchlozoline (2,5 mg) et de l'alcool allylique (0,5 ml).
- [0034] Au final, quel que soit le milieu utilisé (en fonction de l'objectif recherché), 4 boîtes de Pétri sont utilisées, permettant une mise en culture :
- [0035] - Des parties végétales
- [0036] - De la terre

- [0037] - De la suspension destinée à dénombrer les spores
- [0038] - De la suspension diluée pour obtenir 100 spores.
- [0039] L'isolement des populations en *Trichoderma* prélevés, est réalisé après croissance des colonies de population de *Trichoderma* en boîte de Pétri à 24°C, à la lumière pendant 3 à 7 jours, on procède à la purification par isolement monosporal de chacune des colonies.
- [0040] Pour cela, pour chaque colonie, les spores de couleur verte sont prélevées, puis mises en suspension dans l'eau stérile afin de les dissocier. On réalise une culture séparée pour chaque spore dissociée (au microscope) sur un milieu gélosé riche tel le PDA ou flocons d'avoines en boîte de Pétri. Par la suite, l'aspect cultural de ces souches est à identifier afin de déterminer le classement sommaire des souches isolées. Les caractéristiques sont l'évolution de la couleur des colonies leur aspect morphologique, (agrégats, revers, forme du mycélium etc.). L'observation microscopique à faible grossissement révèle le type d'arborescences et leurs formes. A plus fort grossissement, l'organisation des structures conidiogènes est étudiée (ramifications, conidiophore, phialides, conidiospores). La température de croissance optimale des clones de *Trichoderma* est déterminée sur milieux classiques comme le malt-agar, le PDA, pulpe de betterave, flocons d'avoine, avec un pH compris entre 4 et 7.
- [0041] Etape N°3 : Sélection des clones fertilisants :
- [0042] Libération Phosphore organique :
- [0043] La technique de détermination de la capacité des *Trichoderma* à solubiliser différentes formes de Phosphore consiste à utiliser un milieu totalement synthétique et d'utiliser la forme de Phosphore à étudier comme unique source de cet élément. Le milieu NBRIP (30g/l Agar Bactériologique Européen, 10g/l Dextrose, 5g/L MgCL<sub>2</sub>, 0.25g/l MgSO<sub>4</sub>, 0.2g/l KCl, 0.1g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.6g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) est ainsi modifié, en remplaçant le K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> par la source de P à étudier : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (superphosphate utilisé dans la plupart des engrais à 2.29g/l), Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Phosphore minéral insoluble incorporé à raison de 5g/l), ou encore C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub> (phosphore organique, phytates, ajouté à 3,55g/l).
- [0044] Les spores des souches ayant poussé sur le PDA sont récupérées sur dans de l'eau stérile et inoculées sur le milieu sélectif solubilisation Phosphore puis mises à l'étuve afin d'observer et comparer les vitesses de croissance. Si une souche n'est pas capable de solubiliser la forme de P en question, le mycélium ne s'étend pas et ne forme pas de nouvelles spores.
- [0045] Etape N° 4 : L'activité antipathogénique des *Trichoderma* :
- [0046] 4-1 : Sélection directe en boîte de Pétri :
- [0047] En boîtes de Pétri, il est facile d'observer le champignon pur et son mode de colonisation. Dans celles-ci remplies avec une solution de type PDA, sont implantés une souche de *Trichoderma* et une de pathogène. Les repiquages sont réalisés avec des

emporte-pièces de 0,8 cm de diamètre. Sur le fond de la boîte de Pétri, un diamètre est tracé, et les morceaux de gélose contenant des spores du champignon choisi sont déposés à 1 cm du bord de la boîte. La progression de la croissance est observée, mais seul le résultat au bout d'un mois donne le verdict.

[0048] Les *Trichoderma* sont ensuite répartis en trois classes :

[0049] - surpassant le pathogène quand *Trichoderma* prend le dessus sur le pathogène et sporule sur son mycélium,

[0050] - stoppant la croissance dudit pathogène, quand on n'observe pas de supériorité entre les antagonistes,

[0051] - surpassé par le pathogène quand on observe le mycélium de *pathogène* passer au-dessus de celui de *Trichoderma*.

[0052] 4-2 : Estimation de l'activité parasitaire :

[0053] Nous utilisons la collection des isolements monosporaux de *Trichoderma*, obtenue précédemment. L'inoculum nécessaire aux essais est préparé dans des fioles de Roux (200 g de sable, 6 g de farine d'avoine, 30 ml d'eau distillée ; 2 autoclavages à 24 h d'intervalle). Les fioles sont placées dans une étuve à 28 °C durant 2 semaines ; pendant cette période, elles sont secouées manuellement le 9<sup>e</sup> j pour améliorer la colonisation du milieu : elles sont maintenues 2 autres semaines à la température du laboratoire et à la lumière du jour. Leur contenu est alors séché à l'air, dans des conditions aseptiques, pendant 3 jours. Après homogénéisation, un échantillon des poudres ainsi obtenues est prélevé pour déterminer leur teneur en propagules (DAVET, 1979). Le reste est stocké à 5 °C dans des boîtes étanches et constitue l'inoculum.

[0054] Champignons pathogènes ciblés:

[0055] Les souches de pathogènes (ex : *Sclerotinia homeocarpa*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium nivale*, etc.....) auront été isolées sur gazon. Les pathogènes sont ensemencés sur milieu PDA en boîtes de Petri et cultivé à 24 °C. Les organites de conservation (scérotes, pycnides, acervicules, etc....) sont recueillis par grattage de la surface lorsque le milieu de culture est desséché, après 5 ou 6 semaines d'incubation. Ils sont conservés au sec, à la température du laboratoire.

[0056] Le sol : la terre provient des échantillons. C'est un sol sablo-limoneux de pH (Ca C)21 = 6,7, contenant 1,94 p. 100 de carbone organique. La quantité nécessaire aux essais est tamisée, puis stockée au laboratoire dans un sac en polyéthylène fermé.

[0057] Confrontations entre les sclérotes et les antagonistes :

[0058] Dans les essais comprenant toute la collection, on mélange, à 200 ml de terre, un inoculum constitué de 10 ml de sable ensemencé séché.

[0059] Dans d'autres essais, réalisés avec des échantillons réduits de 12 clones, l'inoculum est ajusté de façon à avoir exactement une proportion de 150 propagules par g de terre. Cette concentration représente, pour la plupart des clones, un volume analogue au

précédent ; pour certains cependant, le volume nécessaire est nettement différent (de 2 à 60 ml). On ajoute à ce mélange 150 mg de pathogène. L'ensemble est homogénéisé, humidifié à 70 % de la capacité de rétention et introduit dans un sac de polyéthylène scellé d'un ruban adhésif. Les sacs sont maintenus à 22 ou à 28 °C pendant 3 semaines.

[0060] Le contenu des sacs est tamisé sous un courant d'eau. On recueille 100 organites de pathogène par sac (tamis à mailles de 250 µm). Lorsqu'ils sont percés, les organites sont considérés comme détruits et comptabilisés d'emblée, car des essais préliminaires nous ont montré qu'ils étaient, dans ce cas, complètement parasités et incapables de germer. Les autres organites sont mis en culture sur milieu PDA acidifié (100 mg/l d'acide citrique), après désinfection superficielle à l'hypochlorite de sodium à 5 p. 100 pendant 3 mn. Les cultures sont observées après 5 jours d'incubation à l'étuve à 28 °C et 2 jours à la lumière du jour, à la température du laboratoire. Seuls sont considérés comme attaqués les organites qui fournissent exclusivement une colonie de *Trichoderma* sp. Les organites qui sont colonisés mais qui parviennent à germer ne sont pas pris en compte. Chaque essai est répété au moins 3 fois.

[0061] Notations :

[0062] On calcule pour chaque clone un « taux de destruction des pathogènes » =  $\frac{n_1}{n_1 + n_2} \times 100$ , où  $n_1$  est le N nombre de pathogènes envahis,  $n_2$  le nombre de colonies pures de *Trichoderma* sp. et N le nombre total de pathogènes comptés. Les analyses de variance sont faites après transformation des pourcentages en arc sinus et les moyennes sont comparées par la méthode de NEWMAN & KEULS. Les corrélations entre classements sont calculées par la méthode de SPEARMAN.

[0063] 4-3 : Hydrolyse de la carboxyméthylcellulose

[0064] Les cultures en milieu liquide sont filtrées sur de la mousseline, puis sur du papier filtre, et le filtrat est immédiatement utilisé. L'activité enzymatique est appréciée par la méthode colorimétrique de NELSON & IMGOY (THOMAS & EDNORY, M 1958). Le milieu réactionnel est constitué de 1 ml de filtrat et de 1 ml de solution de carboxyméthylcellulose à 1,2 % dans un tampon citrate 0,05 M à pH = 4. Le dosage du glucose libéré est réalisé après 6 h d'incubation à 38 °C. Chaque analyse est répétée au moins 4 fois.

[0065] Calculs

[0066] Les analyses de corrélation sont faites par la méthode des corrélations de rangs de SPEARMAN

[0067] Etape N°5: L'Aptitude à la Colonisation de la matière organique du sol par les *Trichoderma* :

[0068] Colonisation saprophytique de la paille

[0069] L'inoculum est mélangé à la terre tamisée à raison de 0,1 p. 100 (vol./vol.). En pratique, cette proportion est obtenue par pesée, en tenant compte des densités ap-

parentes de la terre et de l'inoculum. Le mélange est homogénéisé à sec pendant 8 mn dans un homogénéiseur mécanique (Turbula). A 200 ml de sol ainsi inoculé, on ajoute 2 g de paille de blé hachée en fragments de 2 cm environ, puis de l'eau de façon à atteindre 60 à 70 % de la capacité de rétention. Après brassage à l'aide d'une cuillère, l'ensemble est introduit dans un sac de polyéthylène dont l'ouverture est scellée avec un ruban adhésif. Les sacs sont mis en incubation à l'étuve à 28°C, à l'obscurité.

- [0070] Quatre jours plus tard, la paille est recueillie, lavée sous un courant d'eau, désinfectée superficiellement à l'hypochlorite de sodium pendant 2 mn, rincée et découpée en fragments de 5 mm de long. Pour chaque sac, 100 de ces fragments sont mis en culture sur un milieu sélectif pour les *Trichoderma* (DAVET 1979). Après une semaine d'incubation à 28°C, on compte le nombre de fragments de paille colonisés. Pour chaque clone, il est fait au moins 4 répétitions.
- [0071] Estimation du développement des *Trichoderma* en compétition par la méthode des pastilles gélosées.
- [0072] Cette méthode consiste à mélanger des proportions croissantes d'inoculum à de la terre. Un échantillon de 12 g de chaque mélange est réparti au fond d'une boîte de Pétri. On verse par-dessus 20 ml d'eau gélosée en surfusion et l'on imprime à la boîte un mouvement circulaire rapide de façon à bien homogénéiser l'ensemble. Après refroidissement et solidification, des pastilles de 8 mm de diamètre sont découpées à l'emporte-pièce et déposées sur du milieu PDA, à raison de 4, disposées en croix, par boîte de Petri. Les boîtes sont mises en incubation à l'obscurité à 22 ou
- [0073] 28 °C pendant 5 j puis restent 2 j à la lumière à la température du laboratoire avant d'être notées. Cinq boîtes de 4 pastilles sontensemencées pour chaque traitement. Les essais sont répétés 2 à 5 fois, selon les séries.
- [0074] Gammes de concentrations : Dans une série d'essais portant sur toute la collection de *Trichoderma* à disposition, on mélange à la terre des quantités d'inoculum identiques quels que soient les clones, dans des proportions de 6, 24 et 90 p. 100 en poids, sans tenir compte de leur richesse réelle en propagules. Dans une 2e série, on évalue d'abord la teneur en propagules de chaque inoculum, selon la technique de DAVET (1979), puis on mélange à la terre des quantités ajustées de façon à avoir les mêmes teneurs en propagules pour chaque clone.
- [0075] Notation : Chaque pastille est notée de 0 (aucun développement) à 4 (toute la surface autour de la pastille est colonisée par le *Trichoderma*). Les notes des 20 pastilles correspondant à chaque traitement sont ensuite additionnées, la note maximum étant donc 80. Il est alors possible de calculer la proportion théorique d'inoculum (ou la quantité de propagules/g de sol) nécessaire pour obtenir la note 40, moitié de la note maximum. Ces valeurs, appelées C 40, peuvent être déterminées graphiquement, en construisant les courbes représentant les notes obtenues en fonction des concentrations. On peut

aussi linéariser les courbes, après avoir exprimé les concentrations en logarithmes et obtenir par le calcul les valeurs recherchées. Dans les 2 cas, on aboutit à un classement des clones, les plus compétitifs étant ceux dont la valeur de C 40 est la plus basse. On peut encore classer les clones d'une 3e manière, en attribuant à chacun d'eux une note égale au total des différentes notes obtenues pour chacune des concentrations essayées.

- [0076] Estimation du développement saprophytique par la méthode des pièges de papier filtre.
- [0077] La méthode a été décrite en détail antérieurement (CAMPOROTA, 1983). Elle consiste à enfouir dans le sol, humidifié à 70 p. 100 de sa capacité de rétention, des pièges constitués de rondelles de papier filtre de 10 mm de diamètre, imprégnées de milieu de RICHARDS (pour 1 l : 4KP z0H' 1 g ; M,4gS0 7 02H, 0,5 g ; F,4eS0 7 02H, 5 mg ; Z,4nS0 5 mg ; M,2nC1 2 mg ; galactose, 20 g ; glyocolle, 2,25 g) additionné de fongicides (rose bengale, 100 mg ; sulfate de streptomycine, 100 mg ; bénomyl, 5 mg ; sulfate de cuivre, 5 mg ; prothiocarbe, 50 mg ; pentachloronitrobenzène, 50 mg). Pour chacune des concentrations, on remplit 4 boîtes de Petri de 90 mm de diamètre avec une quantité constante de mélange dans lequel, après humidification, on place verticalement 10 pièges par boîte, espacés de 20 mm en tous sens. Après une incubation de 5 j à 25 °C, ces pièges sont rincés, essorés et déposés sur le milieu sélectif de DAVET (1979). La colonisation des pièges par les *Trichoderma* est notée après 48 h d'incubation à 25 °C.
- [0078] Quantification : Le sol analysé est dilué par mélange avec de la terre de serre désinfectée à 3 reprises à 100 °C, de façon à avoir des concentrations de 100, 10, 1, 0,1 et 0,01 p. 100. On calcule la droite de régression liant le pourcentage de colonisation des pièges et les concentrations correspondantes. On résout ensuite l'équation de la droite pour une colonisation de 50 p. 100 : ceci permet de déterminer le poids de sol nécessaire pour que 50 p. 100 des pièges soient colonisés dans les conditions du test. Ce poids est appelé « Unité de Colonisation 50 » (UC 50) que l'on exprime, afin de pouvoir comparer différents échantillons de sol entre eux, en nombre d'UC 50/g de terre.
- [0079] Protocole expérimental : On compare le comportement saprophytique, dans le sol à tester, de 10 des clones de la collection. Deux dates d'analyse sont retenues : au moment de l'introduction de l'inoculum dans le sol (J 0) et après 30 j d'incubation du sol inoculé (J 30). La richesse en propagules de l'inoculum produit sur sable est déterminée ici après étalement de 10 mg dans 10 boîtes de Petri contenant du milieu au malt gélosé, en 4 répétitions. Le sol est inoculé à raison de 15 « grains fertiles »/g et constitue le stock initial qui sera ensuite dilué avec de la terre stérile. Après humidification, chaque lot est divisé en 2 parties : l'une est analysée aussitôt, l'autre est conservée à 28 °C dans un cristalliseur fermé par un film plastique perforé pour être

analysée après 30 j.

- [0080] Etape N° 6 : Procédé de Fermentation en milieu solide des *Trichoderma* :
- [0081] Ce procédé est caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver d'une part lesdites souches de *Trichoderma sp* sélectionnés, par une méthode de culture en masse réalisée sur milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar) à 39 g/l d'eau distillée, mélangés dans des flacons Pyrex de 500 ml dans l'autoclave. Autoclavage à la température de 121°C pendant 30 minutes. Une fois le milieu refroidit ajout de l'acide citrique (concentration de 0.2g/l) et antibiotiques adéquats (Triton et alcool allylique). Inoculation dans la masse encore liquide d'une faible quantité d'eau stérile contenant l'inocula de *Trichoderma* puis mélanger et couler en boîte de Pétri. Une fois solidifiées, on laisse incuber à l'étuve les dites boîtes, dans des conditions de températures, aération et humidités contrôlées. Ces dernières sont incubées à 25°C durant 3 à 4 jours, et pendant cette période, des tests visuels de vitesse de croissance sont effectués.
- [0082] La mise en œuvre du procédé nécessite l'utilisation d'un bioréacteur statique fermé à l'intérieur duquel est inséré un support solide absorbant constitué par différents résidus végétaux ligno-cellulosiques choisis en fonctions des circonstances agronomiques (pulpe de betterave, paille de blé, graines de maïs, etc...), finement broyée (taille inférieure à 0,5 mm) puis le mélange est homogénéisé et autoclavé à 120 °C pendant 1 h imprégnés d'une solution nutritive (100 g de matière sèche contient : (NH<sub>4</sub>),SO<sub>4</sub>, 9,75 g ; urée, 2,38 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>5</sub>, 5,0 g ; Eau distillée, 100 ml ; pH de la solution obtenue, ajusté à 4,2.) et de l'inoculum (issus des boîtes de Pétri fermentées) du ou des champignons filamenteux choisis en fonction du produit final recherché. L'humidité du produit ainsi obtenu est ramenée à 70 %. On introduit 20 g de ce produit dans chacun des incubateurs qui sont placés dans un bain-marie 29° C : de l'air comprimé saturé en eau assure l'aération du milieu de culture avec un débit de 7 l/h. La fermentation est déclenchée et contrôlée par un dispositif de mesure en temps réel des conditions environnementales (T°C, humidité, débit d'air et CO<sub>2</sub>) et d'analyse en continu de la croissance du micro-organisme, sa respiration, le nombre et la germination des spores. Ce dispositif est contrôlé, notamment par la maîtrise de la durée d'application du stress hydrique, par injection d'air plus ou moins sec dans le bio-réacteur à un moment précis de la culture du microorganisme afin d'induire la phase de conidiogénèse. Le débit d'air sec appliqué à la fin du procédé permet d'obtenir un produit fermenté sec, contenant la biomasse du champignon essentiellement sous forme de conidiospores pouvant être conservés plusieurs mois sans perte de viabilité dans des conditions d'asepsie parfaitement bien contrôlées. L'arrêt et la récupération s'effectue lorsque le taux d'humidité du support est en dessous de 9 %. Ces spores peuvent être utilisées directement sous forme solide ou après lavage et filtration sous forme liquide, comme agent biologique.

- [0083] Le contrôle du taux d'humidité est effectué par pesage d'échantillons avant et après passage au micro-onde. Le comptage du nombre de spores est effectué par comptages à la cellule de Malassez, de solutions successivement diluées.
- [0084] On en déduit les concentrations en nombre de spores par gramme de support sec. Le comptage du nombre de spores et le contrôle du taux d'humidité sont effectués tous les 2 jours. Les résultats obtenus sont archivés dans un classeur, sur des fiches de contrôles et des courbes de croissance sont effectuées.
- [0085] Le contrôle du pouvoir germinatif est une mesure du taux de germination de chaque ferment. Il s'effectue par étalement de quantités connues de nombre de spores par boîte de Pétri contenant du PDA, et d'observation à la loupe quelques heures après, du nombre de démarrage de germination. On en déduit le ratio spores germées/spores totales introduites.
- [0086] La formulation est le plus souvent demandée sous forme liquide. Le support est donc lavé à l'eau chaude + Twinn pour détacher les spores, puis filtrée à travers plusieurs tamis jusqu'à 100µm. Des acides humiques sont ajoutés à raison de 2.5g/L.
- [0087] La formulation de *Trichoderma* aux propriétés agronomiques intéressantes pour le client parmi les souches qu'il a dans son terrain peut ensuite être ré-inoculée à raison de 20-25L/Ha à une concentration de  $5 \times 10^8$  spores/mL.
- [0088] Etape N°7 : Procédé de caractérisation et de suivi des populations de *Trichoderma*
- [0089] En parallèle, la souche de *Trichoderma* sélectionnée est caractérisée moléculairement. Pour ce faire la souche est cultivée en milieu liquide Potato Dextrose (200g de pommes de terres dans 1L porté à ébullition, puis filtrés sur coton cardé, puis complémenté de 20g de glucose. Ajustement à 1L puis autoglavage 20min à 120°C) dans des erlenmeyers de 100mL : 20mL de Potato Dextrose sont introduits dans l'erlenmeyer, ainsi qu'un implant de 5mm de diamètre issu de la souche ayant poussé sur PDA. Après 48h d'incubation à 20°C et agitation 120rpm, le mycélium est récolté par filtration sur Miracloth stérile, séché et congelé à -80°C avec de l'azote liquide pour conservation jusqu'à utilisation. Un broyat en poudre fine permet d'extraire l'ADN génomique par la méthode de Atoui et al (2012). L'ADN est ensuite amplifié par PCR avec pour amorces ITS1 et EF1 suivant le protocole décrit par Al-Sadi et al (2015). La séquence du produit de PCR est ensuite mise dans le plasmide pGEM-T Easy selon les recommandations du fournisseur, et liés par la méthode du choc thermique dans des cellules bactériennes thermocompétentes de la souche DH5a d' *Escherichia coli* sélectionnées sur boîtes de Pétri de milieu LBA : Luria Bertani Agar. L'ADN plasmidique est ensuite envoyé pour séquençage à des sociétés spécialisés dans ce domaine.
- [0090] Méthode comptage classique et moléculaire :
- [0091] Tout échantillonnage est opéré de la même manière que précédemment (exemple

1&2), à différentes dates après l'inoculation, permettant de mesurer les dynamiques des populations de *Trichoderma* dans le temps.

[0092] Celles-ci sont à nouveau mises en culture, isolé, purifié et amplifié par PCR, mis sous plasmide et séquencé. De cette manière en comparant les séquences d'ADN de la souche qui a fermenté pour multiplication et l'ADN de *Trichoderma* majoritaire dans le sol, il est possible de démontrer que la souche de *Trichoderma* à haute densité dans le sol après inoculation provient bien de la Trichodynamisation.

[0093] Bien entendu, l'homme de métier sera apte à réaliser l'invention telle que décrite et représentée en appliquant et en adaptant des moyens connus sans qu'il soit nécessaire de les décrire.

[0094] Il pourra également prévoir d'autres variantes sans pour cela sortir du cadre de l'invention tel que déterminé par la teneur des revendications.

## Revendications

[Revendication 1]

La présente invention concerne un procédé destiné à accroître la quantité et la qualité des végétaux en améliorant les capacités biologiques indigènes des sols par l'obtention d'isolats fongiques, plus particulièrement ceux connus pour être bénéfiques pour la revitalisation des sols et des végétaux, essentiellement choisis dans le genre *Trichoderma*, ledit procédé se caractérisant en ce qu'il met en œuvre l'ensemble des étapes suivantes :

- a) une phase de prélèvement, dans les sols et tous types de supports de culture de végétaux, de plusieurs carottages ;
- b) des phases d'isolement et de purification des moisissures du genre *Trichoderma spp*, sur milieux sélectifs en laboratoire, dans le but de générer une « mycothèque » de différents clones ;
- c) la sélection des souches les plus performantes pour plusieurs propriétés agronomiquement intéressantes, notamment pour la stimulation de croissance racinaire, la libération du phosphore organique et la solubilisation du phosphore minéral, l'aptitude à la dégradation de la matière organique, le mycoparasitisme, la résistance aux fongicides du sol ainsi que l'induction des défenses naturelles des plantes ;
- d) l'optimisation de la production quantitative et qualitative de spores de chacun des clones sélectionnés, par un procédé de fermentation en milieu solide, sur résidus ou produits végétaux, notamment par des démarches de contrôle qualité stériles ;
- e) la formulation des inocula obtenus avec des compléments nutritionnels et une méthode d'inoculation des dites formules par épandages ou/et enfouissement dans les sols afin de restituer les populations indigènes multipliées ;
- f) le contrôle post-implantatoire du bon développement des populations réintroduites, notamment par des méthodes de méta-génomique, garantissant une exacte traçabilité de la mise en état maximal de colonisation des sols.