

## Etude de l'influence de différents métaux sur le développement et l'activité saprophytique de deux espèces de *Trichoderma*

### [ Study of the influence of different metals on the development and saprophytic activity of two *Trichoderma* species ]

**Azeddine ERRIFI, Abdellatif OUAZZANI CHAHDI, Karima SELMAOUI, Rachid BENKIRANE, Amina OUAZZANI TOUHAMI, and Allal DOUIRA**

Laboratoire de Botanique, Biotechnologies et de Protection des Plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP. 133, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** The effects of metal ions (Cu, Fe, Zn, Mg, Mn) on the life cycle and ability of two *Trichoderma* species to compete in the soil were searched.

The strains of *T. harzianum* (Tcomp) and *T. viride* (TV1) presented a slowed mycelial growth (respectively 31 - 22 and 57.16 - 59.33 mm; 20 - 14.76 and 17.16 - 14.83 mm) on agar media supplemented with 200 and 400 mg/L copper and ferrous sulphate salts. By cons, in the presence of different concentrations of magnesium, zinc and manganese sulfates, mycelial growth varied between 66.66 and 90 mm compared to controls. Conidia production of the two strains was null in the presence of 400 mg/l of FeSO<sub>4</sub> and reduced in the presence of different concentrations of other salts varying between 0.37 and 1.97 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup> compared to the controls, 4,50 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup> for Tcomp et 4,10 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup> for TV1

The neutral pH became acid after culturing of the two strains in the liquid medium with or without the test salts varying between 3.75 and 5.71, except in the presence of TV1 in media supplemented with FeSO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub>. In addition, the two *Trichoderma* strains showed a very strong saprophytic soil activity exceeding 80% at a concentration of 100 mg/L of the salts tested.

The ability of strains of *Trichoderma* to grow up and to show great saprophytic activity in the presence of metal ions and other soil fungi, suggests the possibility of using them for the remediation of contaminated soil.

**KEYWORDS:** *Trichoderma*, metal ions, life cycle, weight, saprophytic activity, soil.

**RÉSUMÉ:** Les effets des ions métalliques (Cu, Fe, Zn, Mg, Mn) sur le cycle de vie et l'aptitude à la compétition dans le sol de deux espèces de *Trichoderma* ont été étudiés.

Les souches de *T. harzianum* (Tcomp) et *T. viride* (TV1) ont présenté une croissance mycélienne ralentie (respectivement 31 - 22 et 57,16 - 59,33 mm ; 20 - 14,76 et 17,16 - 14,83 mm) sur les milieux gélosés à base de pomme de terre additionnés de sulfate de cuivre et de sulfate ferreux aux concentrations de 200 et 400 mg/L. Par contre, en présence des différentes concentrations des sulfates du magnésium, du Zinc et du manganèse, la croissance mycélienne a varié entre 66,66 et 90 mm par rapport aux témoins 90 mm. La sporulation des deux souches a été nulle en présence de 400 mg/L de FeSO<sub>4</sub> et réduite en présence des différentes concentrations des autres sels variant entre 0,37 et 1,97 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup> par rapport aux témoins, 4,50 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup> pour Tcomp et 4,10 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup> pour TV1.

Le pH neutre avant la mise en culture est devenu acide après la mise en culture des deux souches dans le milieu liquide à base de pomme de terre avec ou sans les sels testés variant entre 3,75 et 5,71 sauf en présence de TV1 dans les milieux additionnés de FeSO<sub>4</sub> et MgSO<sub>4</sub>. De plus, les deux souches de *Trichoderma* ont montré une très forte activité saprophytique dans le sol dépassant les 80% à la concentration de 100 mg/L des sels testés.

La capacité des souches de *Trichoderma* de se développer et de montrer une grande activité saprophytique en présence des ions métalliques et des autres champignons du sol, suggère la possibilité de les utiliser pour la dépollution des sols de culture contaminés par les métaux.

**MOTS-CLEFS:** *Trichoderma*, ions métalliques, cycle de vie, poids, activité saprophytique, le sol.

## 1 INTRODUCTION

Plusieurs pesticides utilisés en agriculture comportent des ions métalliques. D'autre part, les métaux peuvent être présents dans le sol à la suite d'une contamination. Certains ions métalliques, tels que le Cuivre, le Zinc, le Fer, le Manganèse, le Magnésium et le Soufre, sont nécessaires pour la croissance des champignons, mais ils sont aussi toxiques à des concentrations élevées [9]. L'absorption des métaux toxiques par *Rhizopus arrhizus* et *Trichoderma viride* a été examinée par Morley et Gadd [11].

Les espèces du genre *Trichoderma* sont utilisées en lutte biologique pour concurrencer les champignons phytopathogènes du sol, leur efficacité dépend de leur aptitude à la compétition saprophytique et de la quantité d'inoculum incorporée au sol. Les souches de *T. harzianum* et *T. viride* testées par Mouria et al., [13] ont été caractérisées par une croissance rapide et une grande capacité de compétition saprophytique.

Lors de l'application des souches antagonistes de *Trichoderma spp.* il est très important de tenir compte des paramètres environnementaux affectant la lutte biologique contre les agents pathogènes dans le sol. Une série de paramètres environnementaux abiotiques et biotiques ont une influence sur l'efficacité des *Trichoderma spp.* La température, le potentiel de l'eau, le pH, la présence des pesticides, des ions métalliques et les bactéries antagonistes dans le sol sont des paramètres importants dont les effets doivent être pris en considération [9].

Les paramètres environnementaux biotiques et abiotiques peuvent avoir des effets négatifs sur l'efficacité de la lutte biologique par *Trichoderma*, il est donc très important de recueillir des informations sur les effets des facteurs environnementaux sur les différentes activités des souches de *Trichoderma* [9].

Les champignons peuvent s'adapter et se développer sous des conditions extrêmes de pH, de température et d'éléments nutritifs ainsi qu'en présence de concentrations élevées de métaux [1].

L'absorption et la bioremediation du sol par des organismes vivants est une méthode efficace contre les sols pollués par les métaux lourds [22 ; 23]. La technique alternative d'utilisation des organismes vivants est utilisée pour le traitement des eaux usées polluées par les métaux lourds [2].

*Trichoderma harzianum* a été identifié comme un agent efficace pour la bioconversion des déchets solides, car elle produit des enzymes extracellulaires [18].

Il a été montré que le Cu (II) peut se lier à la surface de la paroi cellulaire de *T. viride*, un mécanisme de tolérance aux métaux qui le rend moins disponible dans le milieu [1]. Ainsi, il pourrait être considéré comme un agent de bioremédiation [7].

Les isolats de *Trichoderma asperellum* ont été étudiés pour leur efficacité dans l'élimination de Cu (II) [21]. *Trichoderma asperellum* est omniprésent, et non pathogène et donc facilement utilisable comme un agent de bioremédiation du sol pour l'élimination des métaux lourds. La bioremédiation a été déterminée sous l'influence du temps, le pH et des concentrations initiales de Cu (II) [20].

Ainsi, l'objectif de ce travail est de tester l'effet de certains ions métalliques sur le cycle de vie, la capacité de maintien et l'aptitude à la compétition dans le sol des *Trichoderma*.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 ESPÈCES FONGIQUES

Une souche de *Trichoderma viride* (TV1) et une souche de *Trichoderma harzianum* (Tcomp) appartenant à la Mycothèque du Laboratoire de Botanique et Protection des Plantes de la Faculté des Sciences de Kénitra (Maroc), sont maintenues en

culture sur milieu PSA (200 g pomme de terre, 20 g saccharose, 15 g Agar-agar, 1000 mL eau distillée) à 25°C et à l'obscurité pendant 7 jours.

## 2.2 LES IONS MÉTALLIQUES

Cinq ions métalliques (Cu, Fe, Zn, Mg, Mn) ont été utilisés sous forme de sels, sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ), sulfate ferreux ( $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ) et sulfate de manganèse ( $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ).

## 2.3 EFFETS DES IONS METALLIQUES *IN VITRO* SUR LE CYCLE DE VIE DES DEUX SOUCHES DE *TRICHODERMA*

### 2.3.1 SUR MILIEU A BASE DE POMME DE TERRE SOLIDE

Chaque sel est ajouté au milieu PSA à des concentrations croissantes (0, 50, 100, 200, 400 mg/L). Les milieux de culture additionnés par les sels sont stérilisés à 120°C pendant 30 mn.

Des implants mycéliens de 5 mm de diamètre découpés à l'emporte pièce dans la zone de croissance active d'une culture âgée de 7 jours des deux souches de *Trichoderma* sont déposés au centre des boîtes de Petri contenant le milieu PSA. Les boîtes ensemencées sont incubées à 25°C et à l'obscurité pendant 7 jours. La croissance mycélienne est estimée en mesurant les diamètres perpendiculaires de chaque colonie toutes les 48 h en fonction du temps d'incubation.

Après 7 jours d'incubation, la sporulation est estimée sur des cultures ayant servies à la mesure de la croissance mycélienne. 4 rondelles de 5 mm de diamètre sont prélevées à l'aide d'un emporte pièce, placées dans un tube à essai contenant 1 mL d'eau distillée stérile et agitées au vortex pendant quelques secondes pour libérer les conidies. Le comptage des conidies s'est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de 10 comptages par espèce et par concentration.

### 2.3.2 DANS LE MILIEU A BASE DE POMME DE TERRE LIQUIDE

Les cultures liquides sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml à raison de 100 ml par Erlen contenant le milieu à base de pomme de terre (Pomme de terre : 200 g ; Saccharose : 20 g ; Eau distillée : 1000 mL) enrichies par les sels aux concentrations allant de 0, 50, 100, 200, 400 mg/L. Elles sont ensuite autoclavées à 120°C pendant 30 min et additionnées par 50 mg/L de chloramphénicol, maintenues en surfusion à 45°C puis ensemencées avec une bouture obtenue à partir d'une culture d'une des deux souches de *Trichoderma* âgée de 7 jours. Toutes les cultures sont incubées à l'obscurité et à 25°C.

Le pH du milieu est mesuré par un pH-mètre avant autoclavage et 7 jours après la mise en culture des deux espèces.

Après 7 jours d'incubation, les cultures liquides de *Trichoderma* sont filtrées sur mousseline et lavées deux fois à l'eau distillée. Le mycélium est mis entre plusieurs couches de papier filtre, puis le poids frais du mycélium est pesé avec une balance de précision. Le poids sec est pesé après séchage du mycélium dans l'étuve à 80°C pendant 24 h [14].

## 2.4 LE MAINTIEN DES SOUCHES DE *TRICHODERMA* SPP. DANS LE SOL

### 2.4.1 SUBSTRAT

Le sol de la forêt de la Mamora utilisé est meuble, très sableux, de pH légèrement basique (7,27), avec une teneur en matière organique de 0,6%, avec 0,35% de carbone organique [12]. La quantité nécessaire aux essais est tamisée puis stockée au sec à température ambiante dans un sac en polyéthylène fermé.

Selon la méthode de Davet et Comporota [4], 10 g de farine d'orge est ajoutée à 200 g de sol dans des fioles de Roux. Le mélange est humidifié par 30 mL d'eau distillée et autoclavé deux fois pendant 30 min à 120°C à 24 h d'intervalle.

### 2.4.2 PRÉPARATION DE L'INOCULUM

Les deux souches de *Trichoderma* sont cultivées en boîte de Petri de 90 mm de diamètre sur milieu PSA (Potato Sucrose Agar). Les cultures sont incubées à 28°C pendant 4 jours à l'obscurité puis 3 jours sous la lumière blanche continue.

Les suspensions sporales sont obtenues par introduction de 3 ml d'eau distillée stérile dans chaque boîte. Ensuite la surface chargée de spores est raclée à l'aide d'une spatule. La suspension sporale est ajustée par de l'eau distillée stérile à la concentration de  $10^5$  spores/mL par une lame de Malassez.

Les milieux de culture sol plus farine d'orge autoclavés sont alorsensemencés chacun par 2 ml de la suspension sporale.

Selon la méthode de Davet et Comporota [4], les fioles sont placés douze jours dans un incubateur à 28°C, puis maintenues pendant 12 jours à la température du laboratoire et à la lumière du jour.

Les mixtures sont récupérées, homogénéisées et séchées à l'air dans des conditions aseptiques pendant trois jours. Les poudres ainsi obtenues sont stockées à 5°C et constituent l'inoculum.

### **2.4.3 COLONISATION DE LA PAILLE**

Une quantité de 10 g d'inoculum est mélangée à l'aide d'une spatule pendant 8 min à du sol de la Mamora tamisé, non stérilisé et non humidifié, amendé par les sels à la concentration de 100 mg/L de manière à obtenir 200 g de sol inoculé. 2 g de paille d'orge, coupés aux ciseaux en fragments d'environ 2 cm et 15 mL d'eau sont ainsi ajoutés au sol inoculé. L'ensemble est brassé à l'aide d'une spatule et introduit dans des Erlen fermés. Les Erlen sont incubés quatre jours à 28°C et à l'obscurité.

La paille est ensuite récupérée, lavée sous un courant d'eau pendant une minute, désinfectée superficiellement à l'hypochlorite de sodium pendant deux minutes, rincée et découpée en fragments de 5 mm de long.

Pour chaque Erlen, 100 fragments sont mis en culture dans une boîte de Petri sur le milieu PSA additionné de 100 mg/L de chloramphénicol, pendant 7 jours à l'obscurité et à 28°C. Les pourcentages des fragments colonisés par *Trichoderma* sont estimés par rapport au nombre total de fragments pour chaque traitement.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement.

### **2.5 ANALYSE STATISTIQUE**

Le traitement des données a porté sur l'analyse de la variance. Une comparaison des moyennes est réalisée par le test PPDS (plus petite différence significative) si une différence significative est enregistrée au seuil de probabilité de 5%,

Les pourcentages ont été transformés en Arcsin  $\sqrt{P}$  (où P désigne la proportion du pourcentage).

## **3 RÉSULTATS**

### **3.1 EFFETS DES IONS METALLIQUES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE ET LA SPORULATION DES DEUX SOUCHES DE *TRICHODERMA* SUR LE MILIEU SOLIDE**

La colonisation du milieu PSA par Tcomp et TV1 en présence des différents ions métalliques dépend de la nature du produit incorporé au milieu PSA et de sa concentration.

En présence de  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{FeSO}_4$ , la croissance mycélienne de Tcomp et de TV1 n'a pas dépassé 50 mm à 50 mg/l du premier produit et 60 mm à 200 mg/l du second. Elle est devenue très faible pour les deux souches lorsque la concentration des deux produits a atteint 400 mg/l. Par contre, les autres sels n'ont eu qu'un faible effet sur la croissance mycélienne des deux souches, elle n'a pas diminué en dessous de 65 mm par rapport au témoin (90 mm) (Tableau 1).

Après 7 jours d'incubation, le nombre de spores de Tcomp et de TV1 a diminué significativement lorsque le milieu est additionné par les différents sels. Il a été nul en présence de 400 mg/l de  $\text{FeSO}_4$  et il a varié de 0,50 à  $1,50 \cdot 10^5$  spores/mm<sup>2</sup> en présence des autres éléments chimiques par rapport au témoin, respectivement 4,50 et  $4,10 \cdot 10^5$  spores/mm<sup>2</sup>.

### **3.2 EFFETS DES IONS METALLIQUES SUR LES POIDS FRAIS ET SEC DES DEUX SOUCHES DE *TRICHODERMA* ET DU PH DANS LE MILIEU LIQUIDE**

Le poids frais de Tcomp et de TV1 n'a pas été affecté par l'addition des sulfates de cuivre, zinc et magnésium dans le milieu liquide, il est resté significativement identique à celui du témoin respectivement 7,07 et 6,23 mg. En présence du sulfate de fer, le poids frais de Tcomp a diminué en présence des concentrations élevées jusqu'à 2,274 mg alors que celui de

TV1 a diminué à 2,565 mg pour une concentration de 50 mg/l. Une diminution de presque la moitié est également observée en présence du sulfate de manganèse pour les deux souches (Tableau 3).

De même, le poids sec des deux souches est resté stable en présence des sulfates de cuivre et de zinc, ne montrant aucune différence significative avec le témoin respectivement 3,51 et 1,92 mg. Le poids sec de la souche TV1 a diminué légèrement en présence des différentes concentrations du sulfate de Magnésium par rapport au témoin et il est resté stable en présence des sulfates de fer et de manganèse. Par contre, le poids sec de Tcomp a diminué significativement en présence des concentrations de 200 et 400 mg/l du sulfate de Fer atteignant 1,002 mg/l et de toutes les concentrations de sulfate de Manganèse en variant entre 0,739 et 1,741 mg/l. Le poids de cette souche n'a significativement augmenté qu'après addition des différentes concentrations du sulfate de magnésium atteignant 5,391 mg/l.

Le pH avant la culture en milieu liquide est de  $7,66 \pm 0,01$  pour le témoin et il a varié entre 8,27 et 6,90 après addition des différentes concentrations des sels testés au milieu de culture. Mais après la mise en culture, les deux souches de *Trichoderma* ont acidifié le milieu de culture aussi bien pour les témoins, respectivement de 4,44 et 5,29, que pour les cultures additionnées par les différents sels atteignant une valeur de 3,75 en présence du sulfate de Zinc. Cependant, le pH est resté neutre après incubation suite à l'addition des différentes concentrations de  $MgSO_4$  en présence des deux souches et  $FeSO_4$  en présence de TV1. La souche Tcomp a présenté un pH neutre après addition d'une concentration de 400 mg/l de  $FeSO_4$  (Tableau 5).

### 3.3 LE MAINTIEN DE *TRICHODERMA* SPP. DANS LE SOL DE MAAMORA EN PRÉSENCE DES IONS MÉTALLIQUES ET DES AUTRES MICROORGANISMES

A la concentration de 100 mg/l de  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $MgSO_4$  et  $MnSO_4$ , les deux souches de *Trichoderma* se sont maintenues dans le sol non stérile de la Maamora. Les pourcentages des fragments colonisés par Tcomp en présence de  $CuSO_4$ ,  $MnSO_4$  et  $MgSO_4$  ne sont pas significativement différents du témoin (100%) et ils sont supérieurs à 85% en présence de  $FeSO_4$  et  $ZnSO_4$  (Figure 1A). Par contre, la souche TV1 a montré des pourcentages de colonisation significativement identique au témoin (100%) en présence  $FeSO_4$  et  $ZnSO_4$  et supérieurs à 80% en présence des autres sels minéraux testés (Figure 1B).

Les deux souches de *Trichoderma* se sont montrées compétitives au niveau du sol en présence des champignons telluriques, *Rhizopus* sp. et *Fusarium* sp., qui ont également colonisé une partie des fragments de paille.

## 4 DISCUSSION ET CONCLUSION

L'utilisation intense des pesticides et de produits chimiques en agriculture ainsi que les eaux usées industrielles sont responsables de la libération de différents métaux dans le sol des cultures.

Le problème de la pollution du sol par les éléments métalliques a soulevé la nécessité d'étudier des alternatives telles que l'utilisation de *Trichoderma* spp. comme bio-pesticides, et bio-absorbants ainsi que comme agent de bioaccumulation surtout dans les sols agricoles. D'autre part, l'application de *Trichoderma* avec certains pesticides et / ou engrais chimiques soulève la nécessité des études approfondies.

La méthode utilisée pour mesurer l'aptitude de Tcomp et de TV1 à la compétition, en présence des différents métaux ne prétend pas être un reflet fidèle de ce qui se passe dans le sol. Elle paraît, cependant, bien moins artificielle que des mesures de croissance du champignon seul ou en présence de quelques microorganismes du sol, sur des milieux contenant les produits à étudier. Les conditions d'essai *in vitro* peuvent être standardisées.

Les souches des espèces de *T. harzianum* et *T. viride* ont pu survivre à des concentrations plus élevée de  $ZnSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ . *T. harzianum* a montré une tolérance à ces composés, tandis qu'en présence de  $CuSO_4$  et de  $FeSO_4$ , la croissance mycélienne a diminué significativement en parallèle avec l'augmentation de la teneur en  $CuSO_4$  et  $FeSO_4$ , de 200 à 400 mg/l.

*Trichoderma atroviride* a réussi à croître malgré une forte concentration de Zn contrairement au fer qui élimine la croissance de *Trichoderma atroviride* à forte concentration. Les concentrations maximales notées dans le mycélium de *T. atroviride* se sont établies respectivement à 21,3 et 4,5 mg/g pour Zn et Fe [8].

*T. atroviride* s'est adapté à diverses conditions permettant son utilisation comme agent biologique pour la restauration des sols [8].

En effet, le  $CuSO_4$  a montré une forte inhibition de la croissance mycélienne de toutes les espèces de *T. harzianum*, *T. hamatum* et *T. virens* [3].

Les essais *in vitro* avec *T. atroviride* ont confirmé sa grande tolérance au cuivre. *T. atroviride* a survécu à des concentrations comprises entre 0 et 300 mg/l avec presque des niveaux constants de biomasse. Cependant, la croissance a diminué à 350 mg/l, ou une réduction de 80% a été observée, alors qu'aucune croissance n'a été détectée à une concentration de 400 mg/l [5].

L'effet inhibiteur de  $MnSO_4$ ,  $H_2O$  sur la croissance mycélienne de *T. harzianum* et *T. hamatum* a été observé à partir de la concentration de 166 mg/l de  $MnSO_4$ , avec une réduction de 50% du taux de croissance diamétrale à 219,25 et 343,46 mg/l de  $MnSO_4$ ,  $H_2O$  respectivement pour *T. harzianum* et *T. hamatum* [3].

À une concentration maximale de 800 ppm, les ions de manganèse ont causé un affaiblissement de la germination des conidies de *T. harzianum* et *T. viride* [6]. Dans le cas de  $ZnSO_4$ , le taux de croissance de *T. harzianum* a diminué lorsque le milieu est additionné par 50 à 550 mg/l de  $ZnSO_4$  toutefois, le taux de croissance diamétrale de *T. hamatum* a augmenté à 91,2 mg/l de  $ZnSO_4$  [3].

Aucune croissance n'a été détectée à une concentration de 1000 mg/l alors que la croissance mycélienne de *T. virens* a diminué plus lentement que les autres isolats. La diminution de la croissance diamétrale de ce champignon a été observée à partir de 302 mg/l de  $ZnSO_4$ . Cette souche a été capable de survivre même à 1000 mg/l de  $ZnSO_4$ . Par conséquent, *T. virens* a montré la plus haute résistance au  $Zn^{2+}$  par rapport aux autres souches de *Trichoderma* [3].

Les essais *in vitro* ont confirmé une grande tolérance de *T. atroviride* au zinc. En effet, *T. atroviride* a été capable de survivre à des concentrations plus élevées de zinc, jusqu'à 750 mg/l, avec une réduction plus progressive de la croissance, 50% de réduction est observée à 200 mg/l [5].

La présence de  $FeSO_4$ , avec des concentrations allant de 5 à 302 mg/l, dans un milieu de croissance n'a pas affecté le taux de croissance de *T. harzianum*, *T. hamatum* et *T. virens*. L'augmentation de la concentration de  $FeSO_4$ , a provoqué une inhibition du pourcentage de la croissance mycélienne jusqu'à 13,19 ; 15,54 et 28,19% à la concentration de 550 mg/l et à 91,96 ; 89,65 et 85,31% à 1000 mg/l respectivement pour *T. harzianum*, *T. hamatum* et *T. virens* [3].

En présence de  $MgSO_4$ , il n'y a aucune différence significative entre la croissance mycélienne des deux souches de *Trichoderma* spp. et de leurs témoins [3]. Kredics et al., [10] ont également montré que les ions métalliques, notamment le manganèse, ont une influence importante sur la croissance mycélienne des souches de *T. harzianum*, *T. viride* et *T. aureoviride*.

Les champignons du genre *Trichoderma* sont influencés par la présence de métaux dans l'environnement. Sierota (1984) a observé une stimulation de la sporulation de *T. viride* par les ions de manganèse. Il a été remarqué que les ions de manganèse ont conduit à des changements dans les quantités d'enzymes extracellulaires produites par *Trichoderma* spp. [10].

Certains fongicides commerciaux contiennent du manganèse, tel que le Dithane M-45 WP, qui à une concentration de 100 ppm a inhibé significativement la croissance mycélienne de *Trichoderma* [16]. Par conséquent, les données sur les effets du manganèse sur les souches de *Trichoderma* ont une importance particulière de point de vue de la gestion intégrée des pathogènes fongiques. *Trichoderma* pourrait être utilisé en combinaison avec le manganèse contenu dans les fongicides.

L'activité métabolique des micro-organismes provoque une variation du pH du substrat de culture influençant par la suite la bonne croissance des micro-organismes. Les champignons filamenteux se développent bien dans des milieux acides et peuvent tolérer les changements de pH (2,5 jusqu'à 7,5). Ce changement du pH peut être dû à la sécrétion de métabolites par les souches de *Trichoderma* spp. ou de l'accumulation des métaux par les espèces fongiques. En effet, l'acidification du milieu de culture PSA liquide représentée par la diminution du pH est observée 7 jours après la culture de *T. harzianum* dans le milieu de culture témoin et celui amendé par les différentes concentrations de NaCl [17].

Les souches de *T. harzianum* et *T. viride* se sont maintenues dans le sol amendés par les différents sels minéraux et en présence des autres microorganismes. Ouazzani Chahdi et al., [17] ont également montré que l'installation et la viabilité de *T. harzianum* dans le sol n'ont pas été affectées les concentrations croissantes de NaCl, les pourcentages de colonisation ont dépassé 97%.

Les *Trichoderma* spp., sont connus par leur capacité de produire différents types d'enzymes qui jouent un rôle important dans l'activité de lutte biologique, comme la dégradation de la paroi cellulaire, la croissance fongique et l'antagonisme contre les agents pathogènes des plantes. *Trichoderma* spp. sont des espèces cosmopolites qui interagissent avec les écosystèmes des racines, du sol et des feuilles. Elles sont capables de se développer rapidement et devenir de bons concurrents en compétition avec d'autres microorganismes [15].

Yazdani *et al.* [23] ont constaté que *Trichoderma atroviride* a une capacité de tolérance et d'absorption de Zn, a des concentrations de 500 à 1000 mg / L tant en milieu solide qu'en milieu de culture liquide. La forte capacité d'absorption de Zn suggèrent que *T. atroviride* est un bioremédiateur du sol.

Certaines souches de *Trichoderma sp.* peuvent persister dans les écosystèmes avec des concentrations élevées de métaux lourds [7]. Jovičić Petrović *et al.* [7] ont indiqué que certaines souches isolées de *Trichoderma spp.* ont fait preuve de tolérance vis-à-vis de concentrations plus élevées de cuivre.

D'après les résultats obtenus, le Magnésium, le Manganèse et le Zinc ont très peu ou pas du tout modifié le développement de *T. harzianum* et de *T. viride in vitro* et en présence des autres champignons du sol. Le Cuivre inhibe les deux souches de *Trichoderma in vitro* à des concentrations élevées. Par contre, *in vivo*, il n'a aucun effet sur le développement des deux souches de *Trichoderma*. Le Fer, à faible concentration, n'a pas inhibé leur développement *in vivo* et *in vitro*, par contre à des concentrations très élevées exerce une faible inhibition *in vitro*. Le Magnésium a donc eu une action stimulante très marquée.

Ainsi, la capacité des souches de *Trichoderma* de se développer et de montrer une grande activité saprophytique en présence des ions métalliques et des autres champignons du sol, suggère la possibilité de les utiliser pour la dépollution des sols de culture contaminés par les métaux.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du programme national d'appui à la recherche sectorielle, projet RS-23, « Situation phytosanitaire de la culture du Fraisier au Maroc et recherche de moyens de lutte alternatifs : Production et formulation d'un Biofongicide à base de *Trichoderma spp.* » financé par le Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc.

## RÉFÉRENCES

- [1] Anand P., Isar J., Saran S. and Saxena R.K., 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. Bioresource Technology, 97: 1018-25.
- [2] Bayramoglu G., Bektas S. and Yakup Arica M., 2003. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. Journal of Hazardous Materials, 101 (3): 285-300.
- [3] Behzad H., 2010. Effect of some metal-containing compounds and fertilizers on mycoparasite *Trichoderma* species mycelia growth response. African Journal of Biotechnology, Vol. 9(26) : 4025-4033.
- [4] Davet P. et Comporota P., 1986. Étude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. Agronomie, 6: 575-581.
- [5] Errasquin L. E. and Vazquez V., 2003. Tolerance and uptake of heavy metal by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. Chemosphere, 50 (1) : 137-143.
- [6] Jaworska M. and Dłużniewska J., 2007. The effect of manganese ions on development and antagonism of *Trichoderma* isolates. Journal of Environmental Studies, 4: 549-553.
- [7] Jovičić Petrović J., Danilović G., Ćurčić N., Milinković M., Stošić N., Panković D. and Raičević V., 2014. Copper tolerance of *Trichoderma* species. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 66 (1), 137-142.
- [8] Kacprzak M., et Malina G., 2005. The tolerance and Zn, Ba and Fe accumulation by *Trichoderma atroviride* and *Mortierella exigua* isolated from contaminated soil. Canadian Journal of Soil Science, 85(2): 283-290.
- [9] Kredics L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Kevei F. and Nagy E., 2003. Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential, Biotechnol. 41: 37-42.
- [10] Kredics L., Doczi I., Antal Z. and Manczinger L., 2001. Effect of heavy metals on growth and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 66: 249-254.
- [11] Morley G. F. and Gadd G. M., 1995. Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. Mycol. Res., 99: 1429-1438.
- [12] Mouria B., 2009. Contribution à la lutte biologique contre la pourriture grise et la verticilliose de la tomate cultivée sous serre par utilisation du compost et les *Trichoderma spp.* seul ou en combinaison. Thèse de Doctorat National. Université Ibn Tofail. Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc, 295 p.
- [13] Mouria B., ouazzani-touhami A., Badoc A. et Douira A., 2005. Effet de diverses farines sur la compétitivité des inoculum de trois souches de *Trichoderma* vis-à-vis des champignons phytopathogènes du sol. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 144 : 211-224.
- [14] Moussaoui M., 2009. Développement et extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs. Mémoire de master en microbiologie, université Mentouri constantine, Algérie, 64 pages

- [15] Munir S., Jamal Q., Bano K., Sherwani S.K., Bokhari T.Z., Khan T.A., Khan R.A., Jabbar A. and Anees M., 2013. Biocontrol ability of *Trichoderma*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 6 (18): 1246-1252.
- [16] Nadolnik M., Dłużniewska J. and Jaworska M., 1999. *In vitro* effect of some fungicides containing metal ions on *Trichoderma* fungi. Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology. 6 (7) : 615, [In Polish].
- [17] Ouazzani Chahdi A., Chliyah M., Mouria B., Dahmani J, Ouazzani Touhami A., Benkirane R., Achbani EL. and DouiraA., 2014. *In vitro* and *in vivo* effect of salinity on the antagonist potential of *Trichoderma harzianum* and sensitivity of tomato to *Verticillium* wilt. International Journal of Recent Scientific Research 5 (4): 780-791.
- [18] Rahman A., Begum D., Rahman M., Bari M.A., Ilias G. N. M and Alam M.F., 2011. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. Turk J Biol., 35: 183-194.
- [19] Sierota Z., 1984. Influence of some mineral salts on the development of *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. *in vitro*. Prace Inst. Bad. Leśnictwa, 611: 67, 1982 [In Polish].
- [20] Tan W. S. and Ting A. S. Y., 2012. Efficacy and reusability of alginate immobilized live and heat-inactivated *Trichoderma asperellum* cells for Cu (II) removal from aqueous solution. Bioresource Technology, 290-295.
- [21] Ting A.S.Y. and Choong C.C., 2009. Bioaccumulation and biosorption efficacy of *Trichoderma* isolate SP2F1 in removing copper (Cu(II)) from aqueous solutions. World J Microbiol Biotechnol., 25: 1431-1437.
- [22] Volesky B., 1994. Advances in biosorption of metals: Selection of biomass types, FEMS Microbiology, 14: 291-302.
- [23] Yazdani M., Yap C.K., Abdullah F. and Tan S.G., 2010. An *in vitro* Study on the Adsorption, Absorption and Uptake Capacity of Zn by the Bioremediator *Trichoderma atroviride*. Environment Asia, 3(1) : 53-59.



ANNEXE

Tableau 1 : Croissance mycélienne des deux espèces de *Trichoderma* après 48 h d'incubation en présence de concentrations croissantes de différents sels minéraux (exprimée en mm).

Sels minéraux	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations en mg/L				
		0	50	100	200	400
CuSO <sub>4</sub>	Tcomp	90 <sup>a</sup>	40,83 <sup>b</sup>	40,16 <sup>b</sup>	31 <sup>c</sup>	20 <sup>d</sup>
	TV1	90 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>	38,5 <sup>b</sup>	22 <sup>c</sup>	14,76 <sup>c</sup>
FeSO <sub>4</sub>	Tcomp	90 <sup>a</sup>	83,66 <sup>a</sup>	80,66 <sup>a</sup>	57,16 <sup>b</sup>	17,16 <sup>c</sup>
	TV1	90 <sup>a</sup>	78 <sup>b</sup>	83,33 <sup>b</sup>	59,33 <sup>c</sup>	14,83 <sup>d</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	Tcomp	90 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	84,66 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
	TV1	90 <sup>a</sup>	66,66 <sup>c</sup>	71,66 <sup>c</sup>	72,16 <sup>c</sup>	82,16 <sup>b</sup>
MnSO <sub>4</sub>	Tcomp	90 <sup>a</sup>	77,66 <sup>ab</sup>	71,66 <sup>b</sup>	82,5 <sup>ab</sup>	86,66 <sup>a</sup>
	TV1	90 <sup>a</sup>	85,33 <sup>b</sup>	90 <sup>a</sup>	89 <sup>b</sup>	78,5 <sup>c</sup>
MgSO <sub>4</sub>	Tcomp	90 <sup>a</sup>	87,5 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	74,66 <sup>b</sup>	89 <sup>a</sup>
	TV1	90 <sup>a</sup>	72,16 <sup>bc</sup>	76,16 <sup>bc</sup>	67,5 <sup>c</sup>	80,66 <sup>a</sup>

Les valeurs présentées sur la même ligne et suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (PPDS).

Tableau 2 : Sporulation des deux espèces de *Trichoderma* après 7 jours d'incubation en présence de concentrations croissantes de différents sels minéraux (exprimée en 10<sup>5</sup> spores/mm<sup>2</sup>).

Sels minéraux	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations en mg/l				
		0	50	100	200	400
CuSO <sub>4</sub>	Tcomp	4,50 <sup>a</sup>	1,30 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>	1,50 <sup>b</sup>
	TV1	4,10 <sup>a</sup>	1,97 <sup>b</sup>	1,30 <sup>b</sup>	1,66 <sup>b</sup>	1,29 <sup>b</sup>
FeSO <sub>4</sub>	Tcomp	4,50 <sup>a</sup>	1,40 <sup>b</sup>	0,80 <sup>c</sup>	0,30 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
	TV1	4,10 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,005 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	Tcomp	4,50 <sup>a</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,37 <sup>c</sup>	0,50 <sup>c</sup>
	TV1	4,10 <sup>a</sup>	0,60 <sup>b</sup>	0,60 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>
MnSO <sub>4</sub>	Tcomp	4,50 <sup>a</sup>	1,00 <sup>bc</sup>	1,79 <sup>b</sup>	0,70 <sup>c</sup>	0,68 <sup>c</sup>
	TV1	4,10 <sup>a</sup>	1,40 <sup>b</sup>	1,10 <sup>b</sup>	1,40 <sup>b</sup>	0,69 <sup>b</sup>
MgSO <sub>4</sub>	Tcomp	4,50 <sup>a</sup>	1,70 <sup>b</sup>	1,40 <sup>bc</sup>	0,90 <sup>c</sup>	0,90 <sup>c</sup>
	TV1	4,10 <sup>a</sup>	1,60 <sup>b</sup>	1,10 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,79 <sup>b</sup>

Les valeurs présentées sur la même ligne et suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (PPDS).

Tableau 3 : Poids frais (P.F) des deux espèces de *Trichoderma* en présence de concentrations croissantes de différents sels minéraux (Exprimé en mg).

Sels minéraux	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations en mg/L				
		0	50	100	200	400
CuSO <sub>4</sub>	Tcomp	7,07 <sup>a</sup>	8,326 <sup>a</sup>	9,334 <sup>a</sup>	8,794 <sup>a</sup>	6,688 <sup>a</sup>
	TV1	6,23 <sup>a</sup>	4,931 <sup>a</sup>	5,693 <sup>a</sup>	6,316 <sup>a</sup>	7,598 <sup>a</sup>
FeSO <sub>4</sub>	Tcomp	7,07 <sup>ab</sup>	7,478 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>	3,951 <sup>b</sup>	2,274 <sup>b</sup>
	TV1	6,23 <sup>a</sup>	2,565 <sup>c</sup>	3,647 <sup>b</sup>	2,809 <sup>c</sup>	2,888 <sup>c</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	Tcomp	7,07 <sup>a</sup>	8,192 <sup>a</sup>	8,562 <sup>a</sup>	8,964 <sup>a</sup>	8,42 <sup>a</sup>
	TV1	6,23 <sup>a</sup>	10,611 <sup>a</sup>	8,28 <sup>a</sup>	7,262 <sup>a</sup>	6,396 <sup>a</sup>
MnSO <sub>4</sub>	Tcomp	7,07 <sup>a</sup>	3,202 <sup>c</sup>	3,392 <sup>bc</sup>	3,832 <sup>bc</sup>	4,106 <sup>b</sup>
	TV1	6,23 <sup>a</sup>	4,407 <sup>a</sup>	3,918 <sup>a</sup>	4,645 <sup>a</sup>	3,19 <sup>b</sup>
MgSO <sub>4</sub>	Tcomp	7,07 <sup>b</sup>	7,728 <sup>b</sup>	8,76 <sup>a</sup>	7,976 <sup>ab</sup>	7,775 <sup>b</sup>
	TV1	6,23 <sup>c</sup>	5,672 <sup>e</sup>	6,875 <sup>a</sup>	6,564 <sup>b</sup>	5,864 <sup>d</sup>

Les valeurs présentées sur la même ligne et suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (PPDS).

Tableau 4: Poids sec (P.S) des deux espèces de *Trichoderma* et en présence de concentrations croissantes de différents sels minéraux (Exprimé en mg).

Sels minéraux	Souches de <i>Trichoderma</i>	Concentrations en mg/L				
		0	50	100	200	400
CuSO <sub>4</sub>	Tcomp	3,51 <sup>a</sup>	3,044 <sup>a</sup>	3,386 <sup>a</sup>	3,55 <sup>a</sup>	3,286 <sup>a</sup>
	TV	1,92 <sup>a</sup>	1,471 <sup>a</sup>	2,31 <sup>a</sup>	1,961 <sup>a</sup>	2,272 <sup>a</sup>
FeSO <sub>4</sub>	Tcomp	3,51 <sup>a</sup>	3,422 <sup>a</sup>	3,804 <sup>a</sup>	1,752 <sup>b</sup>	1,0022 <sup>b</sup>
	TV	1,92 <sup>ab</sup>	1,321 <sup>b</sup>	2,128 <sup>a</sup>	1,645 <sup>ab</sup>	1,339 <sup>b</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	Tcomp	3,51 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2,747 <sup>b</sup>	4,112 <sup>a</sup>	3,628 <sup>a</sup>
	TV	1,92 <sup>b</sup>	2,937 <sup>ab</sup>	3,935 <sup>a</sup>	2,395 <sup>b</sup>	2,83 <sup>ab</sup>
MnSO <sub>4</sub>	Tcomp	3,51 <sup>a</sup>	0,739 <sup>c</sup>	0,933 <sup>bc</sup>	1,741 <sup>b</sup>	1,387 <sup>bc</sup>
	TV	1,92 <sup>a</sup>	2,697 <sup>a</sup>	2,54 <sup>a</sup>	2,975 <sup>a</sup>	2,618 <sup>a</sup>
MgSO <sub>4</sub>	Tcomp	3,51 <sup>b</sup>	5,286 <sup>a</sup>	5,167 <sup>a</sup>	4,823 <sup>a</sup>	5,391 <sup>a</sup>
	TV	1,92 <sup>a</sup>	1,626 <sup>b</sup>	1,001 <sup>e</sup>	1,416 <sup>c</sup>	1,305 <sup>d</sup>

Les valeurs présentées sur la même ligne et suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (PPDS).

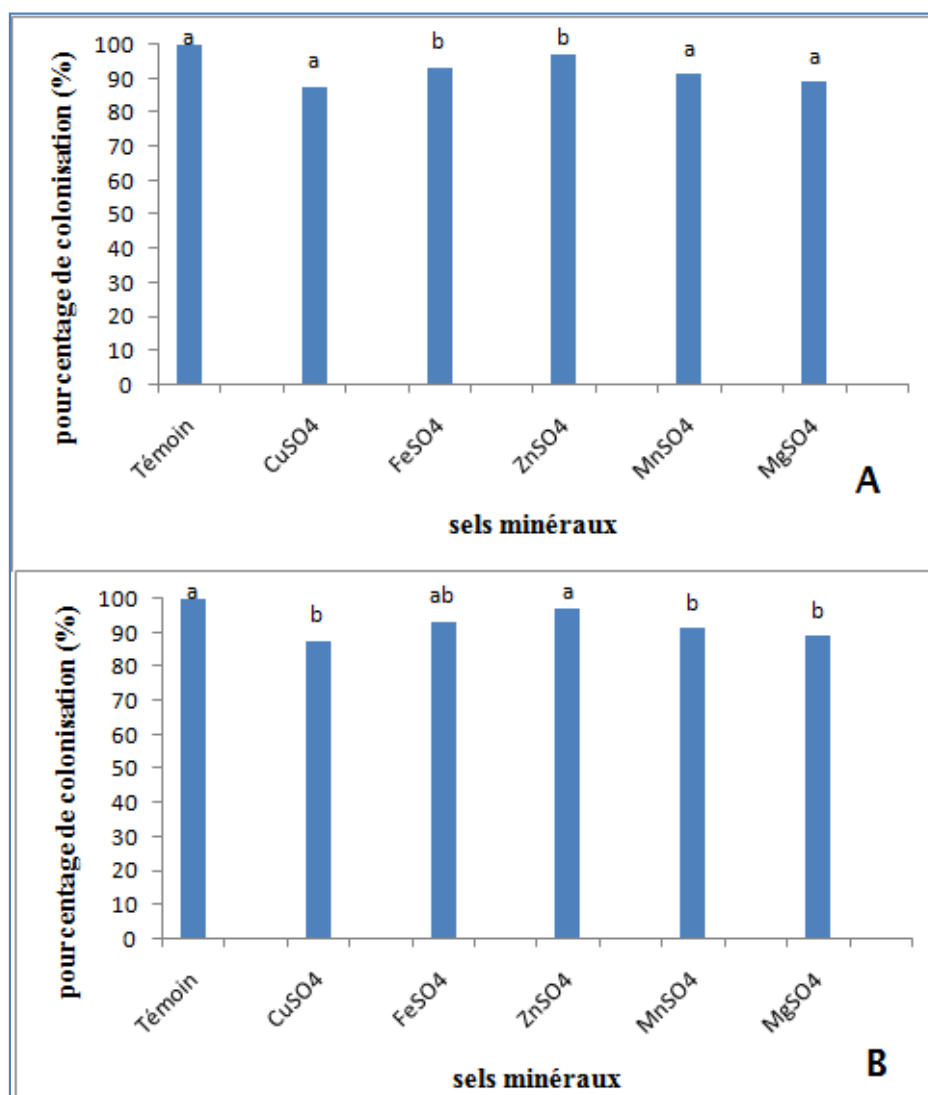


Figure 1 : Colonisation des fragments de paille d'orge par les souches *Trichoderma harzianum* (A) et *Trichoderma viride* (B), après quatre jours d'incubation dans un sol non stérilisé à 28°C, en présence de 100 mg/L des sels minéraux (exprimée en %).

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (PPDS).

Tableau 5 : pH des cultures avant et après incubation des souches *Trichoderma* spp. en présence de concentrations croissantes de différents sels minéraux.

Sels minéraux	Souches de <i>Trichoderma</i>	pH avant culture					pH après culture				
		Concentrations en mg/L					Concentrations en mg/L				
		0	50	100	200	400	0	50	100	200	400
CuSO <sub>4</sub>	Tcomp	7.66 <sup>d</sup>	8,27 <sup>a</sup>	7,95 <sup>b</sup>	7,83 <sup>c</sup>	7,72 <sup>d</sup>	4,44 <sup>d</sup>	5,05 <sup>c</sup>	5,04 <sup>c</sup>	5,3 <sup>b</sup>	5,46 <sup>a</sup>
	TV1	7.67 <sup>b</sup>	8,10 <sup>a</sup>	7,70 <sup>b</sup>	7,53 <sup>c</sup>	7,32 <sup>d</sup>	5,29 <sup>b</sup>	5,2 <sup>b</sup>	5,48 <sup>a</sup>	4,86 <sup>d</sup>	5,12 <sup>c</sup>
FeSO <sub>4</sub>	Tcomp	7.66 <sup>a</sup>	7,52 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>	7,42 <sup>c</sup>	7,24 <sup>d</sup>	4,44 <sup>d</sup>	5,05 <sup>c</sup>	5,34 <sup>b</sup>	5,11 <sup>c</sup>	6,7 <sup>a</sup>
	TV1	7.67 <sup>a</sup>	7,71 <sup>a</sup>	7,37 <sup>b</sup>	7,26 <sup>c</sup>	6,9 <sup>d</sup>	5,29 <sup>b</sup>	6,17 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	6,34 <sup>a</sup>	6,30 <sup>b</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	Tcomp	7.66 <sup>a</sup>	7,44 <sup>a</sup>	7,47 <sup>a</sup>	7,44 <sup>a</sup>	7,28 <sup>a</sup>	4,44 <sup>a</sup>	3,94 <sup>b</sup>	4,12 <sup>ab</sup>	4 <sup>b</sup>	3,75 <sup>b</sup>
	TV1	7.67 <sup>a</sup>	7,52 <sup>ab</sup>	7,5 <sup>bc</sup>	7,41 <sup>c</sup>	7,44 <sup>c</sup>	5,29 <sup>a</sup>	3,72 <sup>d</sup>	4,5 <sup>b</sup>	4,35 <sup>c</sup>	3,93 <sup>e</sup>
MnSO <sub>4</sub>	Tcomp	7.66 <sup>a</sup>	7,56 <sup>ab</sup>	7,5 <sup>bc</sup>	7,41 <sup>c</sup>	7,3 <sup>d</sup>	4,44 <sup>d</sup>	5,09 <sup>c</sup>	5,2 <sup>b</sup>	4,48 <sup>d</sup>	5,71 <sup>a</sup>
	TV1	7.67 <sup>a</sup>	7,46 <sup>b</sup>	7,5a <sup>b</sup>	7,46 <sup>b</sup>	7,4 <sup>b</sup>	5,29 <sup>a</sup>	5,1 <sup>b</sup>	4,73 <sup>d</sup>	5,1 <sup>b</sup>	4,8 <sup>c</sup>
MgSO <sub>4</sub>	Tcomp	7.66 <sup>b</sup>	7,42 <sup>d</sup>	7,55 <sup>c</sup>	7,6 <sup>bc</sup>	7,74 <sup>a</sup>	4,44 <sup>c</sup>	4,84 <sup>a</sup>	4,41 <sup>c</sup>	4,72 <sup>b</sup>	4,04 <sup>d</sup>
	TV1	7.67 <sup>a</sup>	7,5 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>	7,48 <sup>b</sup>	7,52 <sup>b</sup>	5,29 <sup>e</sup>	6,45 <sup>d</sup>	7,56 <sup>c</sup>	7,66 <sup>b</sup>	7,8 <sup>a</sup>

Les valeurs présentées sur la même ligne et suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (PPDS).