

Biosphère Urbaine : Filière clonage de champignons



https://wiki.lowtechlab.org/wiki/Biosph%C3%A8re_Urbaine_:_Fili%C3%A8re_clonage_de_champignons

Dernière modification le 22/02/2025

 Difficulté **Difficile**

 Durée **2 jour(s)**

 Coût **40 EUR (€)**

Description

Ce tutoriel a été créé dans le cadre de l'expérience de mode de vie low-tech en ville menée par Biosphère Expérience à Boulogne Billancourt. Il présente les étapes de confection de mycélium en grains par la filière dédiée à la culture de champignons.

Sommaire

Sommaire

Description

Sommaire

Introduction

Étape 1 - Monter la filière

Étape 2 - Achat du matériel

Étape 3 - Culture en gélose

Étape 4 - Préparation des boîtes de Petri

Étape 5 - Stérilisation des boîtes de Petri

Étape 6 - Clonage du champignon

Étape 7 - Culture liquide (optionnelle)

Étape 8 - Préparation des grains

Étape 9 - Inoculation des grains

Étape 10 - Etapes suivantes....

Notes et références

Commentaires

Introduction

Le projet - Biosphère Urbaine

Pendant 4 mois, Corentin et Caroline ont expérimenté un mode de vie low-tech en ville en collaboration avec un réseau d'acteurs locaux. L'idée est de profiter de la forte densité de population pour répartir les connaissances, diviser le travail et mutualiser le matériel. Ainsi, Emma a constitué et coordonné des filières temporaires composées de structures locales mais aussi de citoyens. Au total, ce sont 14 personnes du territoire de Boulogne Billancourt qui ont participé à cette expérience !

Filière - culture de pleurotes

Les champignons sont délicieux et nutritifs, mais leur coût élevé sur le marché pose souvent un défi financier. Pour résoudre ce problème, Emma a créé une filière temporaire de culture de pleurotes qui assure tout le cycle de reproduction. À partir de pellets de paille et de mycélium en grains confectionnés au ChampiLab, Virginie, Laurine, Corentin et Caroline ont reconstitué tout le cycle de culture du pleurote. L'idée est de mutualiser un espace pour créer des ateliers de confection des tours de culture mais aussi pour stocker le matériel et les tours pendant la phase d'incubation. **Ce tutoriel vise à démocratiser la culture de pleurotes à l'échelle d'un territoire.**

Déroulé de l'organisation durant l'expérience :

- Toutes les 2 semaines, du mycélium en grains était confectionné au ChampiLab. Ce tutoriel permettra de découvrir les étapes pour réaliser du mycélium en grains
- Toutes les 2 semaines, les 4 personnes citées plus haut se retrouvaient au ChampiLab pour confectionner 8 kits de culture. À cette occasion, chaque personne repartait avec 2 tours de champignons à faire fructifier chez elle (voir tutoriel Biosphère Urbaine - Culture de pleurotes)

Si vous souhaitez découvrir la culture de pleurotes, sans créer de filière de ce type, rendez-vous sur le [tutoriel de la science participative dédié à la culture de pleurotes maison](#).

Matériaux

Ceci est une liste de matériaux exhaustive. Si vous avez déjà certains éléments, nous vous conseillons de favoriser la seconde main et d'adapter les dimensions et tailles tout au long du tuto.

Culture en gélose (10 géloses)

- 10 boîtes de Petri
- 200 mL d'eau
- 300 g de pommes de terre
- 4 g d'agar agar
- 8 g de sucre de betterave
- 4-5 champignons idéalement pas trop vieux (nombre dépend de la variété)

Culture liquide (2 bocaux)

- 2 bocaux avec couvercle à vis (0,5 L)
- 2 bouchons auto refermables (exemple)
- 2 x 2 disques filtrants synthétiques (exemple)
- 2 barreaux agitateurs aimantés (exemple) + agitateur magnétique (exemple) ou des pièces de monnaie pour remplacer les 2 éléments précédents
- 2 seringues stériles de 10 mL avec aiguilles roses de 18G (exemple aiguille)

Inoculation des grains (2 sacs)

- 2 sacs de culture
- 2x 1,4 kg de grains de seigle
- 2x 7 g de chaux éteinte
- 2x 800 mL d'eau

Outils

Ceci est une liste d'outils exhaustive à adapter en fonction de ce que vous possédez déjà.

- Une perceuse avec forets Ø10 mm
- Un autoclave ou une cocotte minute avec manomètre
- Un scalpel
- Gants hygiéniques
- Masque hygiénique
- Blouse de laboratoire
- Sur-chaussure
- Lampe à alcool
- Thermoscelleuse

Étape 1 - Monter la filière

Si vous souhaitez monter une filière de ce type, il vous faudra trouver un espace partagé sur le territoire et des voisins motivés pour participer à la filière. Bien évidemment, je vous invite à adapter cette filière selon vos besoins et l'organisation qui vous va le mieux.

Comment trouver un espace partagé ?

Il me fallait trouver un endroit avec plusieurs espaces : un laboratoire, un local de stockage et un espace atelier. En prospectant sur le territoire, j'ai cherché des lieux déjà existants comme un biolab (laboratoire collaboratif pour explorer le vivant) ou des espaces de la ville. Dans notre cas, il n'existe pas de Biolab à Boulogne Billancourt ce qui m'a amené à discuter avec la ville pour trouver le bon espace : la Maison de la Planète.

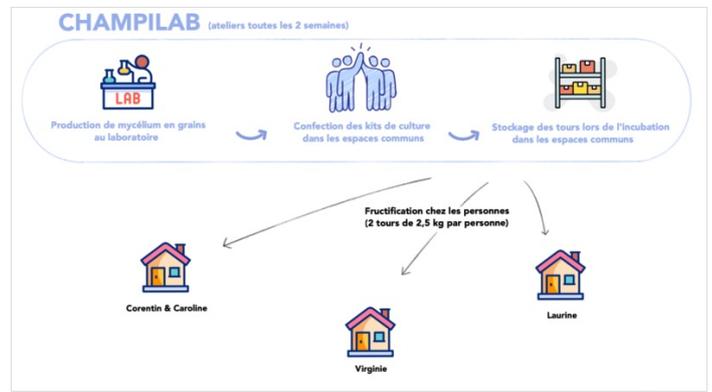
Comment trouver des personnes pour monter une filière ?

De mon côté, j'ai largement diffusé l'information via les réseaux de la ville (site internet, article dans le journal de la ville), nos réseaux sociaux ou encore les associations du territoire en les contactant par mail et par téléphone. Quelques exemples d'associations :

Shifters, Ville en transition, Low-tech Lab..

Plus généralement, j'ai parlé du projet à toutes les personnes que je rencontrais au quotidien. Si vous souhaitez en parler à votre entourage, à vos amis, à vos collègues, je vous invite à utiliser toute la documentation présente sur ce tutoriel pour vous sentir capable de présenter les objectifs et intérêts de monter une telle filière à l'échelle du territoire.

Par ailleurs, 250 citoyens en France et à l'étranger ont expérimenté la culture de pleurotes dans le cadre du programme de sciences participatives. N'hésitez pas à rejoindre les groupes WhatsApp mis en place durant l'expérience! Vous trouverez peut être des personnes, proche de chez vous, intéressées pour monter cette filière.



Étape 2 - Achat du matériel

Suivant le montage que vous choisissez et votre utilisation du réemploi, nous estimons entre 30 et 40 euros le coût pour réaliser un sac de mycélium en grains.

Avant de faire vos achats, nous vous conseillons fortement de lire en entier le tutoriel. Nous vous encourageons à réaliser des achats groupés pour éviter le gaspillage et partager les éventuels frais de livraison.

Étape 3 - Culture en gélose

Les étapes suivantes montrent comment réaliser plusieurs boîtes de Petri nécessaires pour inoculer les grains de seigle.



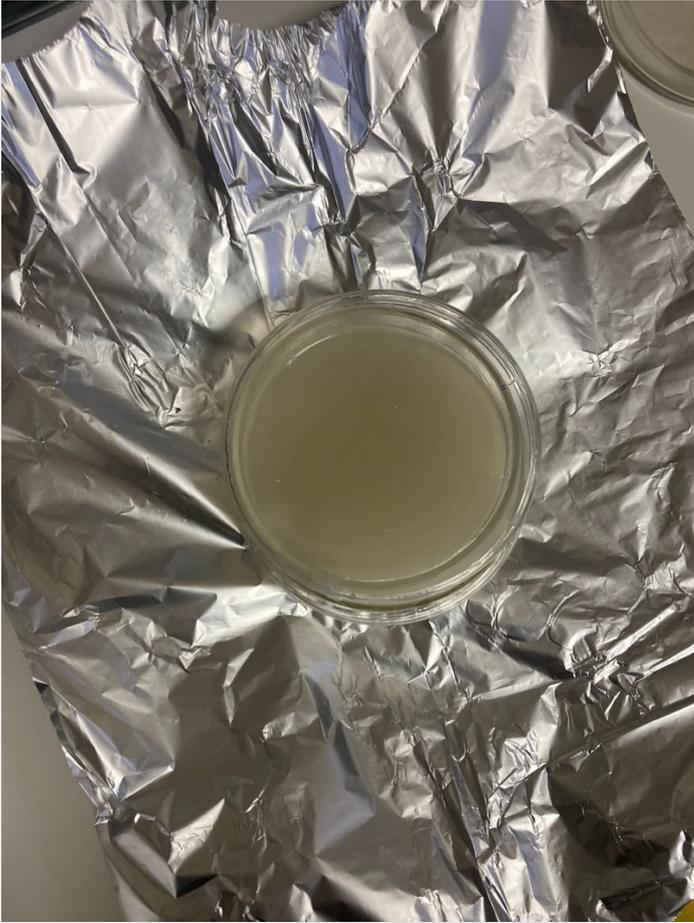
Étape 4 - Préparation des boîtes de Petri

Cette recette permet de réaliser 10 boîtes de Petri. Je vous invite à juster les quantités selon le nombre de boîte de Pétri désiré.

- Faites cuire 300 g de pomme de terre préalablement découpées dans 1 L d'eau pendant 1 h
- Filtrez le jus de pommes de terre et conservez le jus filtré dans un récipient
- Dans un récipient, mélangez 200 mL d'eau, 40 g de jus de pommes de terre, 4 g d'agar agar et 8 g de sucre de betterave jusqu'à obtenir une solution homogène (voir photo 1)
- Faites chauffer la préparation et lorsque l'ébullition est atteinte, éteignez le feu (voir photo 2)
- Filtrez la préparation (passoire à maillage fin, étamine...) puis versez-la dans les 10 boîtes de Petri afin d'avoir une gélose de 2 à 3 mm d'épaisseur (voir photo 3)
- Laissez refroidir la gélose jusqu'à ce qu'elle prenne (elle doit être figée et pas liquide)
- Placez plusieurs boîtes de Petri superposées au centre de votre feuille d'aluminium puis emballez-les (voir photo 4 et 5). Il est important que l'aluminium se referme sur le dessus des boîtes de Petri. Réalisez la même opération avec les boîtes de Petri restantes







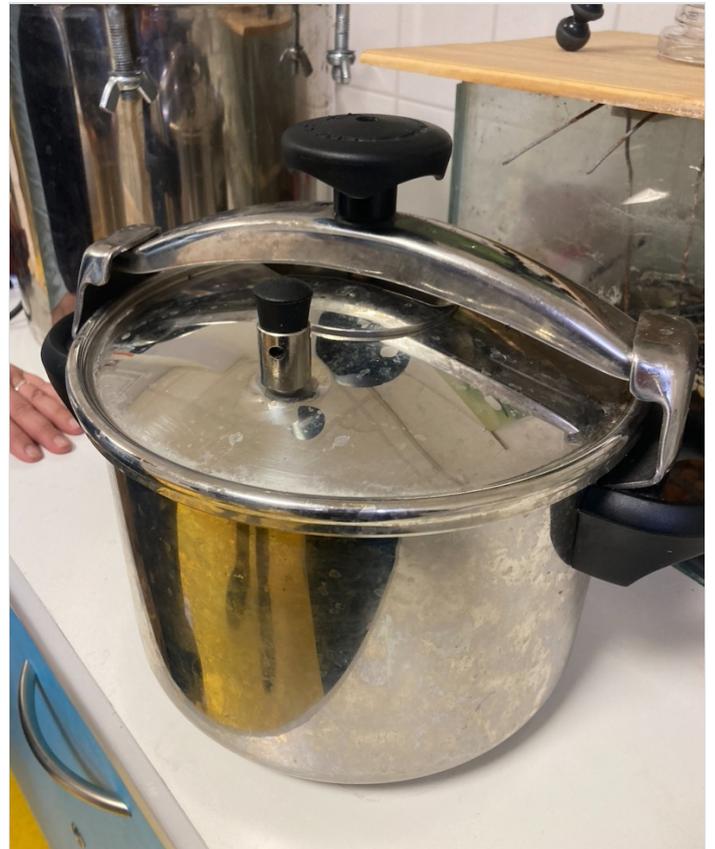
Étape 5 - Stérilisation des boîtes de Petri

Stérilisation à la cocotte minute avec manomètre

- Placez un panier vapeur à l'envers à l'intérieur de la cocotte minute
- Versez de l'eau jusqu'à 2 mm du haut du panier vapeur
- Disposez les blocs de boîte de Petri sur le panier vapeur. Il ne faut pas que les boîtes de Petri baignent dans l'eau (voir photo 1)
- Fermez le couvercle de la cocotte minute puis chauffez le tout pour stériliser les boîtes de Petri pendant 1h à 121°C (voir photo 2). Utilisez un manomètre pour contrôler la température (il n'est pas visible sur notre photo)
- Une fois la stérilisation finie, ouvrez la cocotte et laissez refroidir dans un environnement propre et le plus stérile possible. Ici, nous réalisons ces étapes dans le ChampiLab mis en place dans le cadre de notre projet. La cocotte minute est placée devant le flux laminaire (voir photo 6) qui permet de réduire les risques de contamination (voir tutoriel Biosphère Urbaine - Flux laminaire)

Stérilisation à l'autoclave

- Versez de l'eau jusqu'à 2 mm du haut du plateau
- Disposez les blocs de boîte de Petri sur le plateau. Il ne faut pas que les boîtes de Pétri baignent dans l'eau (voir photo 3)
- Fermez le couvercle de l'autoclave (voir photo 4) puis branchez-le pour stériliser les boîtes de Petri pendant 1h à 121°C (voir photo 5)
- Une fois la stérilisation finie, ouvrez l'autoclave et laissez refroidir dans un environnement propre et le plus stérile possible. Ici, nous réalisons ces étapes dans le ChampiLab mis en place dans le cadre de notre projet. L'autoclave est placé devant le flux laminaire (voir photo 6) qui permet de réduire les risques de contamination (voir tutoriel Biosphère Urbaine - Flux laminaire)









Étape 6 - Clonage du champignon

Le **clonage** est une étape délicate car elle nécessite un espace propre et stérile pour éviter les contaminations. Dans le cadre du projet, nous avons monté un ChampiLab, un atelier partagé où l'on retrouve tout le matériel nécessaire pour réaliser du clonage. Notamment, nous avons fabriqué un flux laminaire avec l'entreprise Breizh Bell, spécialiste de la culture de champignons dans une démarche low-tech (voir tutoriel Biosphère Urbaine - Flux laminaire).

Le clonage peut se réaliser avec toute variété de champignons, idéalement pas trop vieux : un jeune champignon aura une croissance plus rapide. Dans le cadre du projet nous avons généralement cloner des pleurotes.

- Lorsque vous rentrez dans le ChampiLab, mettez une blouse de laboratoire, une charlotte sur la tête, un masque, des gants hygiéniques, des surchaussures (voir photo 1)
- Nettoyez les surfaces de travail et le filtre du flux laminaire avec un tissu propre imbibé d'alcool à 70°C (voir photo 2)
- Récupérez les blocs de boîte de Petri avec des gants résistants à la chaleur et laissez-les refroidir devant le flux laminaire (voir photo 2)
- Pendant ce temps, allumez la lampe à alcool et nettoyez à nouveau vos gants, les surfaces de travail et aspergez le champignon d'alcool à 70°C (voir photo 3)
- Prenez le pied du champignon puis cassez-le en 2 dans le sens de la longueur avec vos doigts (voir photo 4). Vous pouvez placer une moitié de champignons de côté : la zone d'intérêt sur le dessus proche du flux laminaire pour éviter toute contamination. Vous allez à présent manipuler l'autre moitié de champignons.
- Désinfectez le scalpel et passez sa lame dans la flamme afin de la stériliser (voir photo 4). Laissez refroidir quelques secondes
- A l'aide de la lame du scalpel, coupez un carré de 5 mm de côté dans le cœur du champignon sous le chapeau, au niveau du pied (voir photo 4)

⚠ La lame du scalpel ne doit pas toucher l'enveloppe externe du champignon, celle-ci n'est pas stérile

- Gardez le morceau de champignon sur le scalpel, ouvrez le couvercle d'une des boîtes de Petri, et placez le morceau de champignon au centre de la gélose (voir photo 5)
- Refermez la boîte de Petri et sceller avec le parafilm pour éviter les contaminations par l'air. Appliquez une extrémité du parafilm sur un bord de la boîte de Pétri puis tirez le parafilm pour le déposer sur toute la circonférence (voir photo 5). Il faut que le parafilm recouvre bien l'ouverture créée par le couvercle (voir photo 6)
- Répétez ces opérations en récupérant un autre carré de 5 mm de côté dans le cœur du même champignon sous le chapeau, au niveau du pied. S'il n'y a plus de place sur ce champignon, vous pouvez utiliser la moitié que vous avez mis proche du flux laminaire. Je vous invite à ajuster la quantité de champignons selon le nombre de boîte de Petri souhaitée

💡 Dans tous les cas, je vous conseille de réaliser 2 fois plus de boîtes de Petri pour assurer les éventuelles pertes ou contaminations.

- Placez vos boîtes de Petri dans un environnement sombre et ventilé comme un placard. Le développement du mycélium prendra quelques jours



Étape 7 - Culture liquide (optionnelle)

Cette étape est fortement conseillée car elle permet d'avoir le meilleur environnement pour que le mycélium se développe bien. Si vous ne souhaitez pas passer par cette étape, rendez-vous à l'étape suivante pour la préparation des grains.

Préparation des bocaux

- Percez 2 trous de diamètre légèrement inférieur à ceux du bouchon et du disque. Ici nous avons utilisé un foret de Ø10 mm pour le bouchon (Ø13 mm) et un foret de Ø10 mm pour le disque (Ø20 mm)
- Collez les disques des 2 côtés d'un même trou puis enfoncez le bouchon dans le second trou du couvercle
- Répétez l'opération selon le nombre de bocaux à réaliser pour votre culture. Ici nous réalisons 2 bocaux par session de clonage



Je vous conseille de réaliser 2 fois plus de bocaux pour assurer les éventuelles pertes ou contaminations.

Préparation de la culture

- Dans chacun des bocaux, versez :
 - 145 mL d'eau
 - 5,4 mL de sucre de betterave
- Si vous avez un agitateur magnétique (voir photo 2), placez un barreau agitateur aimanté à l'intérieur de chaque bocal, fermez-les puis secouez-les doucement pour uniformiser le mélange
- Si vous n'avez pas d'agitateur magnétique, placez une pièce de monnaie propre et désinfectée à l'alcool 90° à l'intérieur de chaque bocal, fermez-les puis secouez-les doucement pour uniformiser le mélange

Stérilisation des bocaux

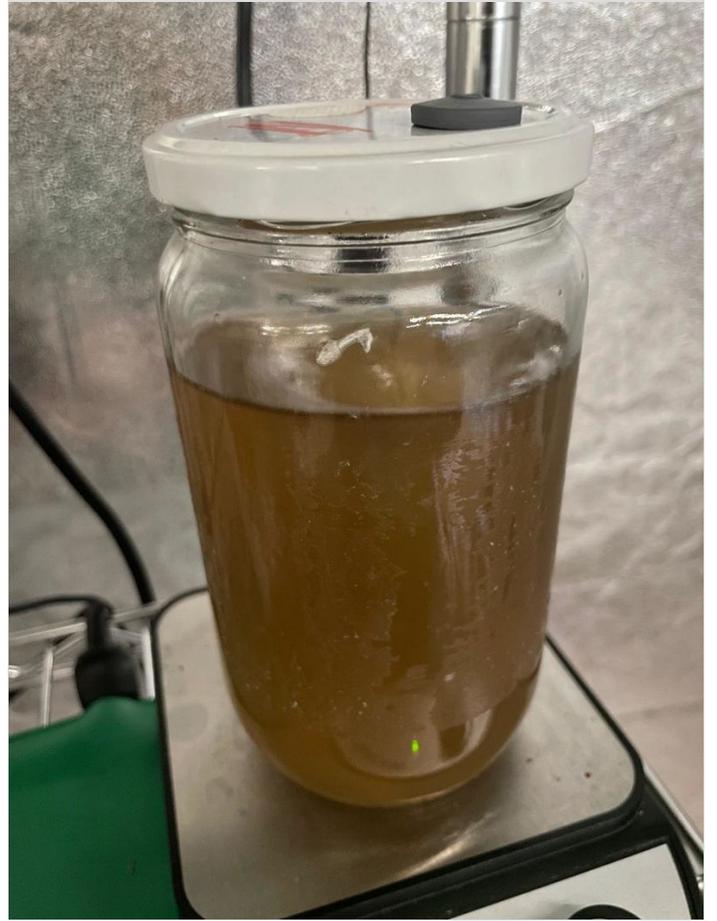
- Vous pouvez réaliser les mêmes étapes que celles décrites à l'étape 5 pour stériliser les bocaux, soit avec l'autoclave soit avec la cocotte minute. Petit conseil : assurez vous que les couvercles sont bien fermés

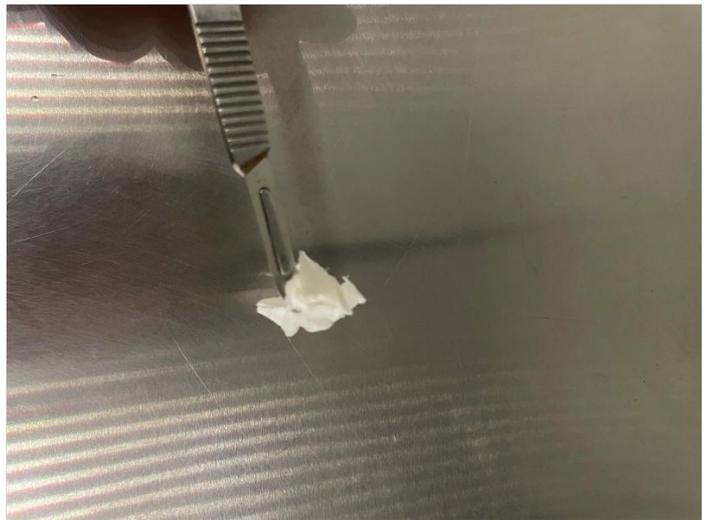
Ensemencement des cultures liquides à partir des boîtes de Petri (dans le ChampiLab)

- Lorsque vous rentrez dans le ChampiLab, mettez une blouse de laboratoire, une charlotte sur la tête, un masque, des gants hygiéniques, des surchaussures
- Nettoyez les surfaces de travail et le filtre du flux laminaire avec un tissu propre imbibé d'alcool à 90°
- Placez les bocaux de culture liquide proche du flux laminaire
- Lorsque le mycélium s'est bien développé dans les boîtes de Petri (voir photo 3), récupérez du mycélium de la boîte de Petri à l'aide d'un scalpel. Au préalable, désinfectez le scalpel et passez sa lame dans la flamme afin de la stériliser. Laissez refroidir quelques secondes puis utilisez la lame du scalpel pour gratter le mycélium de la boîte de Petri
- Placez un quart de mycélium de la boîte de Petri dans un bocal de culture liquide (voir photo 4). Réalisez cette opération pour tous les bocaux de culture liquide à ensemercer
- Fermez les couvercles puis secouez doucement les bocaux
- Si vous avez un agitateur magnétique, placez les bocaux dessus et laissez-les une vingtaine de minutes en agitation. Si vous n'en avez pas, secouez les bocaux afin que la pièce de monnaie mélange uniformément le mélange

Incubation des cultures liquides

- Placez les bocaux dans un endroit sombre à 24°C : ces conditions sont idéales pour la propagation de la culture liquide (voir photo)
- **Le plus souvent possible, faites en sorte d'homogénéiser la culture liquide pendant 3 jours : si vous avez un agitateur aimanté, lancez l'agitation ; sinon assez régulièrement, secouez doucement vos bocaux pour que la pièce de monnaie fragmente le mycélium.** En effet, le mycélium a tendance à créer une seule masse ce qui n'est pas pratique lorsqu'on devra extraire le liquide
- Au bout de 7 à 14 jours (selon l'espèce de champignons cloné), la culture liquide devrait être prête à être utilisée. Si vous ne souhaitez pas l'utiliser tout de suite, vous pouvez la stocker quelques semaines au frigo.
- **Comment savoir si la culture liquide est contaminée ?** Vous pouvez réaliser un test visuel de turbidimétrie, c'est-à-dire observer le trouble de la solution. Il s'agit d'observer la solution au repos, et non pas après avoir homogénéisé :
 - Si le liquide est trouble, c'est que la culture est probablement contaminée (**voir photo**) : il ne vaut mieux pas l'utiliser pour ensemercer les grains
 - Si le liquide est clair, c'est que la culture est en bonne santé (**voir photo**)





Étape 8 - Préparation des grains

Lorsque le mycélium s'est bien développé dans les boîtes de Petri (voir photo 1) ou dans les cultures liquides (voir photo), vous pouvez préparer les grains avant inoculation. Pour rappel, ce tutoriel est prévu pour réaliser 1 sac de 1,7 kg de mycélium en grains dans le but de confectionner 8 tours de culture pouvant fournir jusqu'à 500 g de champignons.

💡 À chaque session, nous réalisons 2 sacs pour assurer les éventuelles pertes ou contamination. Je vous conseille de réaliser 2 fois plus de sacs que la quantité nécessaire pour anticiper ces problèmes. De manière générale, adaptez les indications selon le nombre de sac que vous souhaitez réaliser.

Pour chacun de sacs de culture :

- Versez 1,4 kg de grains de seigle
- Versez 5 g de chaux éteinte
- Versez 800 mL d'eau
- Mélangez le tout en secouant le sac délicatement
- Fermez le sac avec une pince dédiée (voir photo 2) ou des pinces à linge en bois
- Répétez l'opération selon le nombre de sac à réaliser. De notre côté nous réalisons 2 sacs par session pour assurer les éventuelles contaminations.
- Laissez reposer pendant 10 à 12h maximum

Stérilisation des grains

- Vous pouvez réaliser les mêmes étapes que celles décrites à l'étape 5 pour stériliser les sacs de grains, soit avec l'autoclave soit avec la cocotte minute



Étape 9 - Inoculation des grains

Ces étapes nécessitent un environnement stérile, c'est pourquoi nous les réalisons dans le ChampiLab.

- Lorsque vous rentrez dans le ChampiLab, mettez une blouse de laboratoire, une charlotte sur la tête, un masque, des gants hygiéniques, des surchaussures
- Nettoyez les surfaces de travail et le filtre du flux laminaire avec un tissu propre imbibé d'alcool à 90°

Inoculation des grains avec gélose des boîtes de Petri. Cette étape vous concerne si vous n'avez pas réalisé la culture liquide (étape 7)

- Allumez la lampe à alcool et désinfectez le scalpel à l'alcool puis en passant sa lame dans la flamme afin de la stériliser
- Avec le scalpel, grattez la gélose puis versez le tout dans le sac de grains (voir photo 1)
- Scellez le haut du sac en utilisant une thermoscelleuse (voir photo 3)
- Vérifiez que le sac est bien scellé en appliquant une pression dessus : si vous entendez de l'air qui s'échappe, réitérez l'opération (voir photo 3)
- À travers le sac, décomposez la gélose et mélangez le tout pour la répartir uniformément dans les grains (voir photo 3)
- Placez les sacs en incubation dans un environnement sombre à 25°C pendant quelques semaines (voir photo 3)
- Le sac est prêt lorsque le mycélium a colonisé une majorité du sac : vous pourrez observer de nombreuses zones blanches à l'intérieur du sac (voir photo 4)

Inoculation des grains avec culture liquide. Cette étape vous concerne si vous avez réalisé la culture liquide (étape 7)

- Plantez la seringue stérile de 10 mL avec aiguilles rose de 18G dans le bouchon d'un bocal préalablement désinfecté à l'alcool à 90° (voir photo 2)
- Penchez votre bocal à l'horizontal puis prélevez 10 mL de la culture liquide avec la seringue (voir photo 2)
- Versez l'intégralité de la seringue dans un sac de grains de seigle stérilisé (voir photo 2)
- Scellez le haut du sac en utilisant une thermoscelleuse (voir photo 3)
- Vérifiez que le sac est bien scellé en appliquant une pression dessus : si vous entendez de l'air qui s'échappe, réitérez l'opération un peu plus bas (voir photo 3)
- À travers le sac mélangez le tout pour répartir le liquide uniformément dans les grains (voir photo 3)
- Placez les sacs en incubation dans un environnement sombre à 25°C pendant quelques semaines (voir photo 3)
- Le sac est prêt lorsque le mycélium a colonisé une majorité du sac : vous pourrez observer de nombreuses zones blanches à l'intérieur du sac (voir photo 4)

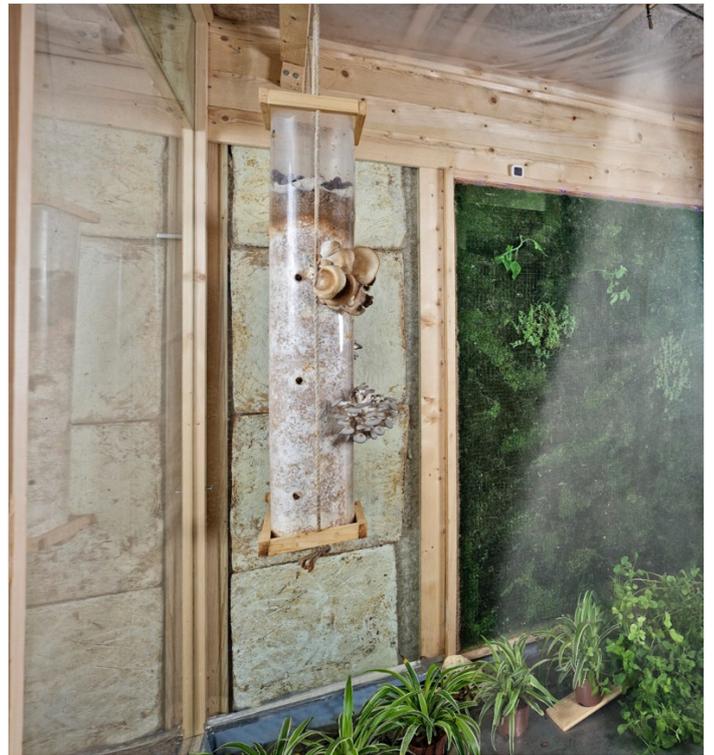






Étape 10 - Etapes suivantes...

Retrouvez les étapes de confection des kits de culture à partir de ce mycélium en grain dans le tutoriel suivant : Biosphère Urbaine - Culture de pleurotes



Notes et références

Document rédigé par Emma Bousquet-Pasturel dans le cadre de l'expérience Biosphère Urbaine de Biosphère Expérience. Un grand merci à Pierre Bonnet de Breizh Bell pour la relecture du document.

Documentation

- Rapport de stage de Candice Bernard sur l'élaboration de protocoles scientifiques de culture de mycélium de pleurotes pour l'expérimentation "Biosphère Urbaine"