

## Réalisation d'un mini aspirateur de type « cyclone » pour récolter des spores de champignons à sec

Frédéric Pascal<sup>1</sup> et Philippe Nicot<sup>1</sup>

**Résumé.** L'appareil que nous avons conçu et réalisé utilise l'effet cyclone qui permet de séparer de fines particules solides d'une veine gazeuse. L'effet cyclone utilise la force centrifuge pour séparer mécaniquement des particules en suspension dans un fluide. Le mouvement giratoire du fluide dans le corps cylindro-conique de l'appareil, est obtenu en faisant entrer le fluide tangentiellement à la circonférence, au voisinage de la paroi. Avec la force centrifuge, les particules solides prises dans le vortex se déplacent vers la paroi, leur vitesse se réduit par frottement et les particules se concentrent dans la partie basse et conique de l'appareil. La veine gazeuse débarrassée de ses particules remonte vers la partie supérieure pour sortir par l'ouverture axiale. Cet appareil miniaturisé à l'extrême permet de récolter de manière stérile directement dans des tubes d'Eppendorf des spores de champignons et pourrait aussi être utile pour d'autres particules de taille équivalente.

**Mots clés :** effet cyclonique, pompe à vide, brasure, inoculum, *Botrytis*

### Introduction

Certaines études sur les champignons phytopathogènes comportent une étape où on fait sporuler le microorganisme sur un substrat nutritif et on utilise ensuite ces spores pour des tests d'inoculation sur plantes. La plupart du temps ces spores sont récupérées dans de l'eau à partir du substrat de culture. Cependant, il est parfois nécessaire de récupérer des spores à sec. C'est le cas par exemple quand la présence d'eau peut modifier les propriétés des spores que l'on veut étudier. C'est aussi le cas quand on craint la présence de contaminants qui pourraient être récoltés dans l'eau en même temps que les spores du champignon et perturber ensuite les phénomènes étudiés.

Nous avons étudié la mise au point d'un mini aspirateur utilisant l'effet cyclonique pour prélever des spores à la surface du substrat où le champignon se développe et les récolter à sec dans un tube d'Eppendorf. Pour permettre le prélèvement successif de plusieurs échantillons, l'appareil devait pouvoir être facilement nettoyé et désinfecté.

### 1. Réalisation du prototype

L'appareil est constitué de l'assemblage de quatre pièces en métal pour permettre une stérilisation à la flamme entre chaque prélèvement d'échantillons et présenter une bonne tenue à la corrosion. Le cuivre et le laiton ont été retenus car ils peuvent être brasés ensemble aisément avec un métal d'apport à base de cuivre et de phosphore.

Les brasures délicates ont été réalisées avec un petit chalumeau oxyacétylénique doté d'une buse de 40 litres/minute. Le métal d'apport utilisé est une baguette CASTOLIN 808G avec une teneur en argent de 6% et une température de fusion comprise entre 645 et 725°C d'usage courant en plomberie sanitaire. La brasure tendre à l'étain, bien que plus facile à réaliser a été

---

<sup>1</sup> INRA, UR407, Pathologie végétale, INRA-PACA - F-84140 Montfavet, France  
☎ 04 32 72 28 40 ✉ [Frederic.Pascal@avignon.inra.fr](mailto:Frederic.Pascal@avignon.inra.fr)

exclue car son point de fusion (232°C) est trop bas et aurait donc fait courir un risque de fusion des liaisons lors de la stérilisation de l'appareil à la flamme par les utilisateurs.

### 1.1. Fournitures nécessaires

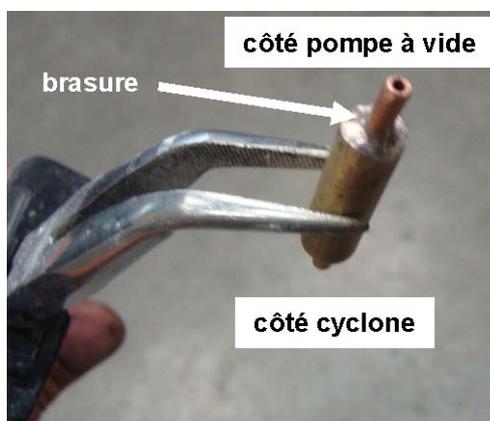
Les pièces sont réalisées à partir de tubes de cuivre de trois diamètres ( $\varnothing$ ) différents et d'un rondin en laiton :

- cylindre en cuivre de  $\varnothing$  intérieur 8 mm et extérieur 10 mm, utilisé en plomberie sanitaire; longueur : 17 mm ;
- cylindre en cuivre de  $\varnothing$  intérieur 4 mm et extérieur 6 mm, utilisé en plomberie ; longueur : 60 mm ;
- tube capillaire en cuivre de  $\varnothing$  intérieur 1,5 mm et extérieur 3 mm, utilisé habituellement pour réaliser des détendeurs frigorifiques ; longueur : 45 mm et 60 mm ;
- rondin en laiton de  $\varnothing$  8 mm ; longueur : 27 mm.

### 1.2. Première étape : préparation du cœur de l'aspirateur

Le rondin en laiton a été percé en son centre d'un trou de diamètre 3,2 mm sur toute sa longueur. Pour que le trou soit parfaitement centré, il a été réalisé par un foret monté sur un tour à métaux. Le tube capillaire d'une longueur de 45 mm a été très légèrement cintré pour éviter qu'il glisse à l'intérieur du rondin. Puis il a été introduit dans le rondin et positionné pour obtenir un dépassement de 10 mm du côté cyclone, où les spores seront collectées.

L'autre extrémité du tube, situé du côté d'aspiration avec la pompe à vide, a été brasée avec le rondin (**Figure 1**), laissant aussi un dépassement de 10 mm par rapport au bord du rondin. Le diamètre réduit du capillaire, par rapport à celui du rondin, permet de réduire le débit d'aspiration.



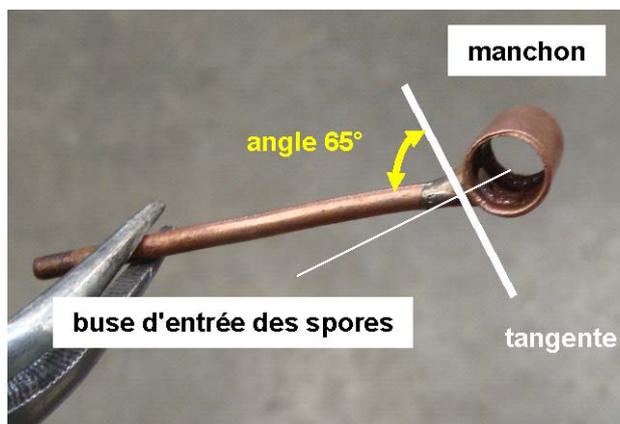
**Figure 1.** Cœur de l'aspirateur: vue de la brasure du tube en cuivre sur le rondin en laiton.

### 1.3. Deuxième étape: préparation du manchon portant la buse d'entrée des spores

Le manchon a été réalisé avec le cylindre en cuivre de  $\varnothing$  8-10 mm. Celui-ci a été coupé à l'aide d'un coupe-tube puis parfaitement ébavuré. Un trou de  $\varnothing$  4 mm a été percé à 5 mm d'une extrémité du cylindre en vue d'y insérer la buse d'entrée des spores. Dans ce trou, un morceau de tube capillaire de 60 mm de longueur a été brasé perpendiculairement à l'axe du cylindre, mais avec une inclinaison d'environ 65° par rapport à la tangente, de façon à pouvoir ensuite créer un effet cyclonique (**Figure 2**). L'extrémité du tube capillaire a été biseautée à 45° pour faciliter ensuite le prélèvement des spores et aussi augmenter la surface d'aspiration.

L'intérieur du cylindre a été limé afin de faire disparaître l'extrémité du tube capillaire brasé ainsi que les éventuelles bavures de brasage.

Une autre version du prototype a également été créée en utilisant un tube capillaire de diamètre supérieur ( $\varnothing$  intérieur 4 mm et extérieur 6 mm) afin d'éviter son obturation par du matériel végétal ou des filaments mycéliens lors de l'utilisation. Ce tube a été brasé sur le cylindre sans perçage préalable. Après la réalisation de la brasure, un orifice a été réalisé sur le cylindre en perçant avec un foret de 4 mm par l'intérieur du capillaire.

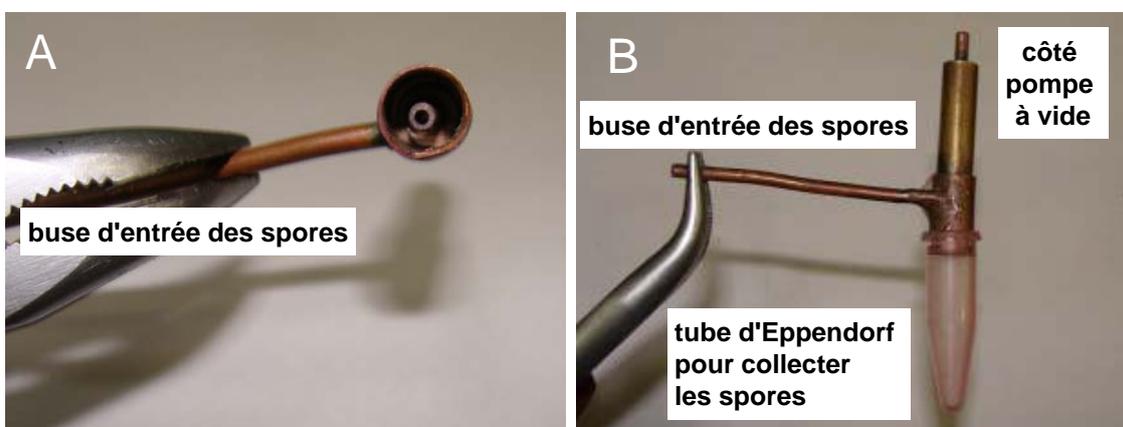


**Figure 2.** *Vue du tube capillaire brasé sur le manchon en cuivre.*

#### 1.4. Assemblage final

Enfin, le cœur est introduit dans le manchon avec un emboîtement de 2 mm de manière à ce que le capillaire du cœur (côté cyclone) affleure à ras du manchon (**Figure 3-A**). Les deux pièces ont été maintenues en place à l'aide de pinces et brasées. Ensuite, les brasures ont été méticuleusement brossées pour faire disparaître toute trace de décapant et d'oxydation.

Une fois assemblé, l'aspirateur doit être muni d'un tube d'Eppendorf de volume 1,5 mL (par exemple, marque Dutscher, réf : 034018) pour la collecte des spores (**Figure 3-B**). La conicité du tube d'Eppendorf permet d'obtenir l'effet cyclonique recherché. Sur l'autre extrémité, un tuyau transparent souple (diamètre 8 mm) est emboîté et relié à une pompe à vide.



**Figure 3.** *Aspirateur assemblé. A. vue de dessous, côté cyclone, où un tube d'Eppendorf sera emboîté pour récupérer les spores à sec. B. vue d'ensemble avec un tube d'Eppendorf.*

## 2. Utilisation

### 2.1. Contexte scientifique

Dans le cadre d'un projet sur la protection intégrée des cultures légumières regroupant plusieurs unités du centre Inra-PACA, l'équipe MISTRAL (Unité de Pathologie végétale) travaille sur l'effet de différentes conditions de culture sur la sensibilité de plantes maraîchères à différents champignons phytopathogènes. Le niveau de fertilisation azotée, par exemple, influence la sensibilité de la tomate au champignon *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise (Lecompte *et al.* 2010). Comme de nombreux champignons phytopathogènes, *B. cinerea* sporule abondamment sur les plantes malades et ces spores, facilement dispersées par le vent et les courants d'airs, permettent la propagation de la maladie (Decognet *et al.* 2009). Comme la fertilisation influence la composition des tissus de la plante en différents minéraux ou sucres (qui servent de nourriture au champignon), elle pourrait avoir un effet sur l'abondance de spores produites sur les plantes malades (l'inoculum "secondaire"). Elle pourrait aussi influencer le pouvoir pathogène de ces spores.

Pour étudier ce phénomène, il est nécessaire de pouvoir récupérer des spores sur des plantes attaquées (plantes ayant été produites sous des régimes de fertilisation différents avant leur inoculation). Ces spores seront ensuite utilisées pour inoculer de nouvelles plantes, afin de vérifier si la sévérité des attaques qu'elles provoquent est influencée par le niveau de fertilisation des plantes initiales.

La récolte des spores sur les plantes attaquées doit être réalisée à sec à la surface des lésions, sans prélever de fragments de plante pourrie, car ceux-ci peuvent être pollués par des micro-organismes saprophytes (bactéries ou champignons) qui se développent sur les tissus décomposés par le champignon phytopathogène. Ces micro-organismes contaminants peuvent ensuite interférer avec le champignon étudié et modifier la sévérité des attaques quand les spores sont utilisées pour l'inoculation.

### 2.2. Récupération de spores à sec à l'aide de l'aspirateur

Des tests ont d'abord été réalisés avec des spores produites sur un milieu de culture (**Figure 4**). L'aspirateur a été relié à une pompe à vide (marque Heto, modèle : SUE300E, puissance: 75 W). Afin de protéger la pompe à vide de l'aspiration d'éventuelles impuretés nous avons intercalé, entre l'aspirateur de spores et la pompe, une fiole à vide en Pyrex de 500 mL (marque Dutscher, réf : 001162) contenant environ 100 mL d'eau. Le barbotage dans l'eau retient toutes les particules qui pourraient s'échapper de l'aspirateur avant qu'elles ne puissent entrer dans la pompe.

Ces tests préliminaires ont permis de récolter efficacement des quantités élevées de spores sèches. Le taux de germination de ces spores, 24 heures après dépôt sur un milieu gélosé nutritif, était identique à celui de spores récoltées dans l'eau avec la méthode habituelle (environ 98-99 %).

Le mini-aspirateur a ensuite été utilisé pour récolter des spores sur des tronçons de tige de tomate, 14 jours après leur inoculation avec *B. cinerea* (**Figure 5**). A nouveau, des quantités élevées de spores sèches ont pu être récoltées. Les lots de spores récoltées étaient indemnes de contaminants et leur taux de germination n'était pas affecté. Ces spores ont donc pu être utilisées pour inoculer des nouvelles plantes et leur pouvoir pathogène a pu être comparé. Nous avons ainsi mis en évidence un effet significatif de la fertilisation azotée des plantes initiales (ayant fourni les tronçons de tiges) sur l'agressivité de l'inoculum secondaire, un résultat très original.



Figure 4. Récolte de spores de *Botrytis cinerea* à sec à l'aide du mini aspirateur.

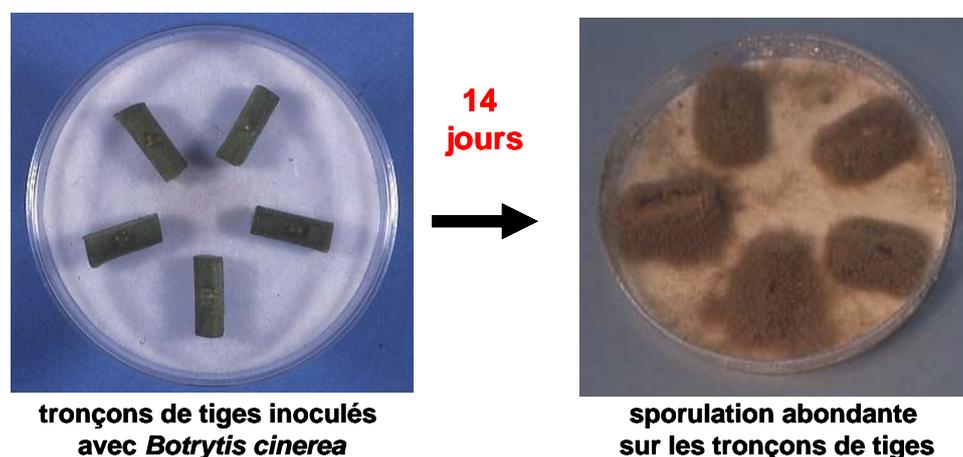


Figure 5. Production de spores de *Botrytis cinerea* sur des tronçons de tiges de tomate.

### Conclusions et perspectives

Cet appareil de conception simple et facilement reproductible (avec un peu de minutie) a permis de résoudre une difficulté de prélèvement d'échantillons. Il peut être utilisable tel quel ou modifié dans de nombreux autres cas pour lesquels il est nécessaire de collecter des particules (spores de différents champignons, grains de pollen par exemple) à sec.

### Références bibliographiques

Decognet V, Bardin M, Trottin-Caudal Y, Nicot PC (2009) Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology* 99:185-193.

Lecompte F, Abro MA, Nicot PC (2010) Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology* 59:891-899.