

4/04

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT DE GENIE CHIMIQUE

**PROJET DE FIN D'ETUDES
THEME**

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
CONDITIONS OPERATOIRES POUR LA CULTURE DE LA
MICRO ALGUE *TETRASELMIS SUECICA***

Proposé et dirigé par :

**Mr C.E. CHITOUR
Mr M.BENIDDIR**

Etudié par :

Mlle Lamia BRACI

المعهد الوطني للبحوث والدراسات
العلمية والتقنية
Ecole Nationale Polytechnique

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

**Ce travail rentre dans le cadre des activités du laboratoire de valorisation
des énergies fossiles sous la direction du Professeur Chems Eddine
CHITOUR**

REMERCIEMENTS

Ce mémoire de fin d'études, représente, pour moi, le couronnement final de cinq longues et laborieuses années qui m'ont permis d'accumuler certes beaucoup d'expérience et de savoir mais aussi, de connaître la valeur des femmes et des hommes de sciences qui m'ont appris, forgée et éduquée .

En effet, ils m'ont soutenue par leur persévérance, leur pédagogie et leur sérieux dans l'exécution de leur noble tâche : celle de former les futurs cadres de la nation.

Mon grand espoir réside dans le fait que, ce modeste travail reflètera fidèlement les effets des conseils et orientations qui m'ont prodigués par mes professeurs tout au long des années de sacrifices.

Mon grand souhait est de me savoir être à la hauteur de l'attente combien patiente de ma chère famille qui n'a ménagé aucun effort pour m'offrir un soutien continu, tant moral que matériel, particulièrement dans les moments cruciaux.

Mes remerciements les plus sincères vont vers :

- **Le professeur CHITOUR**, promoteur de ce précieux travail, qui s'est montré très persévérant tout au long de nos travaux et expériences, assurant dès le départ, un maximum de réussite.
- **Monsieur BENIDDIR**, co-promoteur, qui a su allier connaissances et expérience dans ce domaine, aussi vaste, de la microbiologie et apporter son soutien matériel aussi précieux.
- **Ma famille** qui m'a accompagnée et encouragée à toujours donner le meilleurs de moi-même.
- **Mes amis étudiants et étudiantes**, particulièrement, **Mademoiselle HADJ-ALI INTISSAR** qui m'a soutenue moralement, particulièrement, dans les moments difficiles.
- Et enfin à mon école **l'ENP**, qui restera gravée dans ma mémoire à jamais, pour m'avoir permis d'être ingénieur, au service de mon pays.

إن الدراسة التي منحت لنا، متمثلة في تحدي أفضل الشروط العملية لنمو الطحلب المجهرى المستعمل خاصة في مجال الصيدلة و مستحضرات التجميل و التغذية الفلاحية.
وبعد عدة محاولات و تركيب مؤشرات استطعنا شيئا فشيئا، تحسن نمو الطحلب المجهرى عن طريق البق بقة و إضافات محلول غذائي تحت إضاءة دائمة.
إن الرقبة الجيدة للبق بقة و الإضاءة انشاء الانتقال إلى مرحلة عالية لشبه القيادة، مستفتح الأبواب لمستقبل مؤكد للتطبيق الصناعي لهذا البحث.
الكلمات الهامة: "تيترا ميلمس"، الطحلب، الطحلب المجهرى، محلول غذائية تطوير

ABSTRACTS :

The purpose of this study is to determine the optimum operating conditions for the growth of *micro-alga Tetraselmis Suecica*, used especially in a lot of fields as : pharmaceutics, cosmetics and food drugs.

After a lot of essays and combinations of specs, we managed to ameliorate gradually, the growth of the micro alga by bubble and addition of nutritious solution under a constant lighting.

A best control of bubble and the lighting during the passage to a superior level of semi-pilot will offer a certain future to an industrial application for this research.

Keywords: tetraselmis, alga, micro alga, nutritious solution.

RESUME :

L'étude qui nous a été confiée, étant de déterminer les conditions opératoires optimales pour la croissance de la micro algue *Tetraselmis suecica* ; utilisée notamment dans plusieurs domaines (pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire) .

Après plusieurs essais et combinaisons de paramètres nous avons pu améliorer, au fur et à mesure, la croissance de la micro algue par barbotage et rajouts d'une solution nutritive sous une luminosité constante.

Un meilleur contrôle du barbotage et de la luminosité lors du passage à un stade supérieur de Semi-pilote ouvrirait les portes d'un avenir certain à une application industrielle de cette

Recherche.

Mots clé : tétraselmis, algue, micro algue, milieu de culture.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------	---

Partie Bibliographique

Chapitre I : GENERALITES	2
I. Introduction	2
II. Définition et classement des algues	5
III. Systématique et morphologie	6
IV. Ecologie générale	9
Chapitre II : LA BIOLOGIE DES MICRO ALGUES	9
I. Introduction	9
II. La photosynthèse	9
III. Reproduction	9
IV. La culture des micro algues	10
V. Le contrôle développement algal	19
VI. Moisson et conservation des micro algues	21
VII. Coût de production d'algues	22
VIII. Les algues utilisées en aquaculture	23
IX. Critère de choix	25
X. Valeur alimentaire	25
XI. Culture des algues à l'échelle industrielle	26
Chapitre III : PRODUCTION DES MICRO ALGUES	27
I. Introduction	27
II. La préparation des milieux de cultures	27
III. La stérilisation des milieux de cultures et hygiène générale	30
IV. Maintien des souches	31
V. Comptage des cellules d'algues à la cellule de Malassez	37

Partie Expérimentale

Chapitre IV : ETUDE DE LA CROISSANCE D'UNE MICRO ALGUES	43
I. Introduction	43
II. Matériels utilisés	43

III.	Paramètres physico-chimiques intervenant dans la croissance de micro algue	45
IV.	Etude de la croissance du tetraselmis suecica dans différents milieux de Conway	45
V.	Etude de la croissance du tetraselmis suecica pour différentes concentrations de souche dans le milieu de Conway avec barbotage d'air	52
VI.	Etude de la croissance du tetraselmis suecica avec augmentation de volume de milieu de culture	55
	CONCLUSION GENERALE	59

INTRODUCTION GENERALE :

Le travail qui nous a été confié est d'approcher les conditions de culture optimale d'une algue « tetraselmis » qui a une importance

Selon le professeur Jean Meynadier, chef du service de dermatologie du CHU de Montpellier, « une micro-algue est un organisme autotrophe : il peut se suffire à lui-même et croître à partir d'éléments minéraux, d'eau et d'énergie lumineuse. Pendant leur croissance, ces « pièges à la lumière » vont donc synthétiser de nombreuses biomolécules élémentaires nécessaires à la vie ... de nos cellules cutanées. Le champ de recherches et d'applications cosmétiques, diététiques

Et en thalassothérapie présenté par les micro-algues et leurs milieux naturels est infini », [1]

La production de ces algues répond à la demande alimentaire des animaux, soit en utilisation directe, soit indirectement par le relais des animaux proies, servant eux-mêmes à l'alimentation des larves, des poissons et crustacés.

Beaucoup d'études ont été faites, sur la culture des micro-algues, on cite :

- sur Micro algues et nutrition larvaire en éclosion de mollusques de Robert R. et Trintignac P., 1997, [2].
- GUERRI et Col (1981), RAVAIL et ROBERT (1985), Col (1989) portent sur les conditions physico-chimiques, des cultures des microalgues. [17], [4].
- enfin les travaux de DABADIE (1994) portent sur la culture intensive des microalgues, [5].

Partie Bibliographique

Chapitre 1

GENERALITES

I. Introduction :

L'humain est Tous jour à la quête d'une vie meilleure et d'un confort absolue , pour cela son envie de vouloir plus et sa curiosité infinie explique le ranimant perpétuelle de la *biologie* qui est un mot la latin se compose de : bios : nature ,logie science d'où la définition de l'étude des science naturelle avec tout paramètre confondue du monde vivant qu'il soit animale ,végétal, microscopique .

II. Définition et classification des algues

II.1. Les Algues ,

On les appelle aussi phycophytes (du gr *.phukos = algue ; phuton = plantes*), ce sont des Thallophytes chlorophylliens, c'est-à-dire des organismes capables de photosynthèse. Elles élaborent en présence de lumière , grâce aux pigments assimilateurs contenus dans les plastes , leurs propres molécules organiques à partir des éléments minéraux du milieu (eau, gaz carbonique) .Elles sont donc *autotrophes* .

Les Algues sont, typiquement, des organismes *aquatiques*. Elles forment de grands peuplements en milieu marin , peuplements à partir desquels se nourrissent les organismes incapables de photosynthèse (animaux).Du point de vue écologique , elles constituent le premier maillon des chaînes alimentaires : ce sont les *producteurs* quasi exclusifs des mers et des océans (7/10 de la surface du globe).

Elles sont fréquentes aussi en eau douce (lacs , mares, ruisseaux) .Elles sont plus rares en milieu aérien (poussière verte des troncs d'arbres, terre humide).

Pour réaliser la photosynthèse, les algues sont tributaires de la lumière. Or celle-ci est absorbée par l'eau et à quelques mètres de profondeur l'éclairement devient insuffisant pour assurer une assimilation compensant les pertes dues à la respiration.

Les algues sont limitées, pour cette raison en milieu aquatique, à une zone superficielle qui , en général , ne dépasse pas 40 à 60 mètres de profondeur (ce qui , à l'échelle océanique représente une mince pellicule ; au-delà , le milieu marin est dépourvu des producteurs) .

On distingue dans les populations algales aquatiques deux grands ensembles :

- Le premier est constitué d'espèces qui flottent ou nagent en plein eau ; elles sont en général microscopiques et souvent unicellulaires . Elles forment la partie végétale et productrice du plancton ou *phytoplankton* (du grec *plankton* = errant).
- Le second ensemble appelé *phytobenthos* (du grec *benthos* = fond) est constitué par des espèces fixées au fond. Elles constituent en particulier une riche frange de végétation sur littoral. Parmi ces *algues côtières* se rencontrent des espèces dont les thalles atteignent de grandes dimensions et un degré élevé d'organisation pluricellulaire.

II.2. Classification des algues : [19], [17],[10]

Les algues ont des couleurs variées dues à la présence de pigments masquant plus au moins la chlorophylle. Ce caractère conduit à subdiviser le groupe en trois grandes lignées , ou embranchements, qui s'opposent par un ensemble de caractères biochimiques , structuraux et fonctionnels :

Les Chlorophytes (Algues Vertes) :

Elles sont dépourvues de pigments surnuméraires, dont les chloroplastes colorés , sont formés de même pigments que chez les végétaux supérieurs : Chlorophylle , xanthophylle, carotène.

Les Chromophytes (Algues Brunes)

Leurs chloroplastes contiennent, non seulement la chlorophylle, mais encore un pigments caroténoïde brun : la phycoxanthine. Pendant la vie de l'organisme, ce pigment masque les précédents, mais il disparaît au moment de sa mort .

Les Rhodophytes (Algues Rouges) :

Chez lesquelles les pigments ordinaires sont mêlés au pigments surnuméraire de teinte rouge : la phycoérythrine qui masque la chlorophylle. Ce pigment surnuméraire n'est fixé aux chloroplastes que pendant la vie ; Lorsque l'algue meurt , il diffuse dans l'eau .

Les cyanobactéries (Algues Bleues) :

Malgré l'absence de plastes , de noyaux différenciés et de l'amidon ce groupe est également rattaché aux algues leur cytoplasme contient à l'état diffus de la chlorophylle associée à un pigment bleu , la phycoocyanine

Aujourd'hui, plus de 40 espèces différentes de micro algues d'isolement, sont cultivées dans différentes régions du monde, en tant que contraintes pures dans les systèmes intensifs[8].

II.3. Nature des micro algues [39] :

Pour comprendre ce que sont les micro algues, il faut d'abord savoir ce que sont le *plancton* et le *phytoplancton*. Pour, cela imaginons que la mer ne se résume pas à l'eau, le sel et les poissons. A sa surface et sur une dizaine de mètres de profondeur, flottent et se déplacent au gré des courants, des organismes pour la plupart invisibles à l'œil nu ou de très petite taille qui forment ce que l'on appelle le plancton ; du grec planktos, «errant».

Ce dernier se divise en deux grandes familles suivant le mode de distribution des organismes qui le composent :

- une partie animale : *le zooplancton*
- et une partie végétale, *le phytoplancton*, principalement composé d'algues microscopiques, d'une taille inférieure à 200 microns, et qui vivent dans les couches superficielles des océans.

Les micro algues sont vitales ; parce que le phytoplancton est le tout premier fournisseur d'oxygène de la planète, la forêt amazonienne étant le second. Il prolifère à la surface de nos océans et libère les 2/3 de l'oxygène que nous respirons. Il synthétise aussi les premières molécules organiques indispensables à la vie (vitamines, acides aminés...) et constitue le premier maillon de la chaîne énergétique des océans. Consommés par les animaux, ils assurent le fonctionnement des grands cycles biologiques et le maintien de la biodiversité. De plus, les algues microscopiques s'adaptent à merveille aux changements de leur environnement pour survivre. Est-il plus chaud, moins acide, davantage éclairé ?

Elles savent s'adapter au milieu environnant

On retrouve toujours une concentration impressionnante d'actifs bienfaisants pour l'organisme et pour l'épiderme. Les protéines, par exemple, constituent jusqu'à 75% du poids sec de certaines micro algues, soit deux fois plus que dans les graines de soja. Les acides aminés, de 5 à 20%, les glucides, jusqu'à 20% sans oublier les lipides, les vitamines B, H, C, provitamine A, de très nombreux oligo-éléments (cuivre, fer, zinc) et des sels minéraux. Beaucoup de micro algues ont, également, des vertus anti-inflammatoires, anti-enzymatiques ou anesthésiantes. Les spécialistes du monde marin affirment que la mer est une véritable réserve de médicaments. Sur 4000 substances décrites, 500 ont une activité biologique prouvée : antibiotique, antivirale (AZT contre le Sida), anti-tumorale...

III. Systématique et Morphologie :

L'algue *Tetraselmis* se caractérise par : des cellules solitaires libres , mobiles, comprimées latéralement , leur base est arrondie , possédant quatre flagelles de même taille , la paroi est lisse rigide , pyrenoïde bien visible .Diamètre 4 à 9 μ m, longueur 12 à 16 μ m.[38]

Son classement selon (KYLIN) Butch [22] :

Embranchement : Chlorophycophyte

Classe : Parasinophycée

Sous classe : Chlorophycidae

Ordre : Pyramimonadale

Famille : Pyramimonacée

Genre : *Tetraselmis*

Espèce : *Tetraselmis Suecica*

Tetraselmis est un grand flagellé vert avec un niveau de lipides très élevé. Il contient également les acides aminés normaux qui stimulent l'alimentation chez les animaux marins. C'est une excellente alimentation pour la crevette larvaire.[38]

Tetraselmis suecica avait des effets sur l'épiderme. In vitro, sur des cultures de cellules cutanées provenant de l'épiderme humain, on observe qu'au bout de 20 minutes d'incubation, les cellules de la peau sont stimulées et qu'elles se multiplient ou augmentent leur production en protéines.[39].

Composition de l'algue *Tetraselmis* [39] :

Nous donnons dans le tableau 1 suivant les caractéristiques essentielles des constituants de l'algue

Poids Sec	Calories de 10 ml de poids sec	Protéine	Hydrate de carbone	Lipide (Total)	EPA (C20:5n3)
18.9%	48.2	54.66 %	18.31 %	14.27 %	9.30 %
DHA (C22:n3)	ARA (18:2n-6)	Vitamine C	Chlorophylle A	Acides aminés	
0 %	0.40 %	0.25 %	1.42 %	24%	
Composition des acides aminés					
Sérine	Glutamique	Glycine	Histidine	Arginine	Thréonine
3.71	17.59	5.93	0.19	4.59	4.40
Alanine	Proline	Tyrosine	Valine	Méthionine	Lysine
7.62	6.47	1.84	5.00	2.55	8.20
Isolucine	Leucine	Phénylalanine	Taurine	Aspartique	
0.97%	7.94%	3.51%	10.55%	8.95%	

Tableau 1 : Composition de tetraselmis

Du fait de son importance, les coûts unitaires sont élevés et peuvent être résumés à titre indicatif dans le tableau 2.

1 litre	1 cas (10 litres)	4 cas (40 litres)	10 cas (100 litres)
\$80.00	\$660.00	\$2400.00	\$5500.00
	\$66.00 pièce	\$60.00 pièce	\$55.00 pièce

Tableau 2 : Coûts indicatifs de l'algue

IV. Ecologie Générale :

IV.1. Répartition géographique :

Les algues sont des organismes chlorophylliens ayant besoins d'eau, d'air, de lumière, et de sels nutritifs pour leurs développements (BANSE, 1976, GEIDE et COL. 1992) [13],[3]

Elles prospéreront partout où se trouvent réunies ces conditions c'est-à-dire, dans les lacs ,les étangs,les marais , les mers , les ruisseaux et aux rivières (DAUTA, 1982, BOURRELLY 1990) [13],[10] .

Leur développement dépendra également des facteurs biotiques c'est-à-dire , les espèces prédatrices et compétitrices .[3]

1. La température :

Pour chaque espèce, il existe une température de tolérance, maximale, minimale, et optimale pour son développement. Les espèces qui résistent à de larges variations de température sont dites, *Eurythermes*, par contre celle qui ne supportent que de faibles variations, sont dites Sténothermes (GAYRAL, 1975).[17]

En général le phytoplancton a un pic de développement au printemps, et un deuxième pic un peu moins élevé en automne (BARNABE, 1991).[3]

2. La lumière :

La lumière est un facteur de grande importance pour le phytoplancton, du fait qu'elle intervient dans la photosynthèse. Il existe, pour chaque espèce des micro algues, une illumination maximale, minimale et optimale pour son développement.

Pour cela il existe, les espèces photophiles qui aiment une illumination importante, et les espèces sciaphiles qui n'aiment que de faible illumination (BELKOURA et COL.-1994).[7]

La lumière agit essentiellement sur la répartition verticale des micro algues (GAYRAL.1975). [17]

3. Les sels nutritifs :

Certains éléments fondamentaux sont nécessaires à des concentrations assez élevées sont les macro-éléments : N, P, Si, Ca, Mg. D'autres jouent un rôle important mais à des faibles concentrations ce sont les micro-éléments : Cu, Mn, Zn, Fe... etc. (BOUGIS.1974).[9]

Ils sont pratiquement présents en quantité suffisante dans les eaux naturelles, ils se manifestent par un effet inhibiteur lorsque leur concentration dépasse un certain seuil (GAYRAL-1975).[17]

4. Salinité :

La Salinité exprime la teneur total, en sels dissous dans les eaux naturelles.

Des salinités élevées sont essentiellement dues à la présence de chlorures .La teneur en chlorure est un facteur chimique de première importance ,en effet lorsque la salinité s'élève. Elle élimine les algues dites d'eau douce, lorsqu'elle s'abaisse au dessous de certaine valeur elle élimine les algues marines, (GAYRAL.1975).[17]

Pour chaque espèce il existe une salinité, maximale, minimale, et optimale pour son développement. Les espèces qui résistent aux fortes variations de salinité sont dites *Euryhalines*, et celles qui ne supportent que de faibles variations sont dites, *Sténohalines* (RAVAIL-1985)[30]

Chapitre II

LA BIOLOGIE DES MICRO ALGUES

I. Introduction :

Les algues unicellulaires planctoniques sont des organismes autotrophes qui représentent le premier maillon de la production primaire aquatique et par conséquent le départ de la chaîne alimentaire.

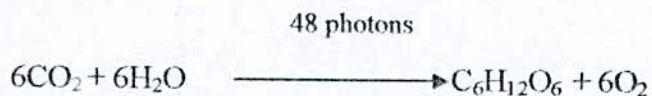
La production de ces algues répond à la demande alimentaire de larves de mollusques, de crustacés et de rotifères. Les différentes espèces cultivées en aquaculture ont été choisies en fonction de leur valeur nutritive, de leur taille et de la maîtrise de leur culture.

II. La photosynthèse :

Les micro algues se servent de l'énergie lumineuse, pour construire leurs propres substances à partir du sels nutritifs par photosynthèse.

(VIVIER et Col 943, JAQUES, 1975, HARRIS.1978).[36], [21], (20).

L'équation de la photosynthèse peut s'écrire :



Où $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ est le glucose donc, Il y a production de matière organique $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ et libération d' O_2 (MOYSE 1956, BOUGIS 1974) (LE BORGNE. 1986) [27], [9], [25]

III. Reproduction :

On rencontre chez les micro algues, les deux types de reproduction, la reproduction sexuée et asexuée (Le BORGNE et Col- 1974) [24]

III.1. La Reproduction sexuée :

Elle est caractérisée par la mise en jeu de cellules spécialisées ou gamètes où l'union cytoplasmique et nucléaire de gamètes complémentaires, c'est-à-dire de potentialités différentes (Mâle et Femelle), forme l'œuf dont le stock chromosomique est évidemment double de celui de chaque gamète (GAYRAL-1975) [17]

III.2. La Reproduction asexuée :

Dans ce type de reproduction les micro algues se multiplient, sans qu'intervienne la sexualité soit, par multiplication cellulaire où les cellules se divisent par scissiparité dans le cas des cyanophycées (BOURRELLEY-1979) [11] et de division par mitose normale chez les

Eucaryotes unicellulaires, (DE TASSIGNY- 1968) [14] soit par formations des cellules spécialisées appelées *Spores* dont , la germination- aboutit à un organisme identique à celui qui l'a produit (ROBIN-1981)[34]

IV. La culture des micro algues :

IV. 1. Conditions de culture :

Les paramètres les plus importants réglant la croissance d'algues sont quantité et qualité nutritive, lumière, pH, turbulence, salinité et température. Les paramètres les plus optimaux aussi bien que les gammes tolérées sont des espèces spécifiques et une large généralisation pour les paramètres les plus importants est donnée dans le tableau2. En outre, les divers facteurs peuvent être interdépendants et un paramètre qui est optimal pour un ensemble de conditions n'est pas nécessairement optimal pour des autres.[23]

1. Lumière[23]

De façon analogique avec une unité industrielle,, les micro algues photosynthétiques c'est à dire : elles assimilent le carbone inorganique pour la conversion dans la matière organique. La lumière est la source d'énergie qui conduit cette réaction et à cet égard intensité, qualité spectrale et besoin de photopériode d'être considéré. L'intensité de la lumière joue un rôle important, mais les conditions changent considérablement avec la profondeur de culture et la densité de la culture d'algues: à des profondeurs et à des concentrations plus élevées en cellules l'intensité de la lumière doit être augmentée pour pénétrer par la culture (*par exemple*. 1.000 lux conviennent aux flacons erlenmeyer, 5.000-10.000 sont exigés pour de plus grands volumes). La lumière peut être normale ou fournie par les tubes fluorescents. Une haute intensité de la lumière (*par exemple*. la lumière directe du soleil, le petit récipient près de la lumière artificielle) peuvent avoir comme conséquence photo inhibition. En outre, la surchauffe due à l'illumination normale et artificielle devrait être évitée. Des tubes fluorescents émettant dans le spectre de lumière bleue ou rouge devraient être préférés du fait que ces derniers sont les parties les plus actives du spectre léger pour la photosynthèse. La durée de l'illumination artificielle devrait être le minimum 18 h de lumière par jour, bien que le phytoplancton cultivé se développent normalement sous l'illumination constante.

2. Agitation et Aération :[23]

Le mélange est nécessaire pour empêcher la sédimentation des algues, pour s'assurer que toutes les cellules de la population sont également exposées à la lumière et aux aliments, pour éviter la stratification thermique (*par exemple*. dans les cultures extérieures) et pour améliorer l'échange de gaz entre le milieu de culture et l'air. Le dernier a une grande importance car l'air contient la source de carbone pour la photosynthèse sous forme d'anhydride carbonique. Pour les cultures très denses, le CO_2 provenant de l'air (contenant 0,03% CO_2) bouillonnées par la culture limite la croissance d'algues et l'anhydride carbonique pur peut être un supplément à l'air (*par exemple*. à un taux de 1% du volume d'air). L'addition de CO_2 en outre protège l'eau contre des changements de pH en raison du rapport $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ constant. Selon la balance du système de culture, le mélange est réalisé en remuant l'échantillon à la main (des tubes à essai, des erlenmeyers), en aérant (des sacs, des réservoirs), ou en employant des roues de palette et des étangs. Cependant, il convient de noter que toutes les espèces d'algues ne peuvent tolérer une agitation vigoureuse.

3. La température .[23].

La température optimale pour des cultures de phytoplancton est généralement entre 20 et 24°C, bien que ceci puisse changer avec la composition du milieu de culture, de l'espèce et de la contrainte cultivée. Les espèces le plus généralement cultivées des micro algues tolèrent les températures entre 16 et 27°C. Les températures inférieures à 16°C ralentiront la croissance, tandis que celles plus hautes que 35°C sont mortelles pour un certain nombre d'espèce. Au besoin, des cultures d'algues peuvent être refroidies par un écoulement d'eau froide au-dessus de la surface du récipient de culture ou en commandant la température de l'air avec de l'air frigorifié - unités de traitement.

4. Ph. [23].

La gamme de pH pour la plupart des espèces d'algues cultivées est entre 7 et 9, avec une gamme optima située entre 8,2 et 8,7. L'effondrement complet de la culture dû à la rupture de beaucoup de processus cellulaires peut résulter de l'impossibilité de garder le pH dans l'intervalle considéré. Le dernier est accompli en aérant la culture (voir ci-dessous). Dans le cas de la culture d'algues à haute densité, l'addition de l'anhydride carbonique permet d'obtenir un pH élevé qui peut atteindre 9 pendant la croissance des algues

5. Salinité [5] :

Le phytoplancton marin peut tolérer des changements faibles de la salinité. La plupart des espèces se développent mieux à une salinité qui est légèrement inférieure à celle de leur habitat indigène, qui est obtenu en diluant l'eau de mer avec de l'eau robinet. Des salinités de 20-24 g.l⁻¹ se sont avérées optimales.

6. Les sels nutritifs :

Les concentrations cellulaires des algues cultivées, sont généralement beaucoup plus élevées, que celles rencontrées dans le milieu naturel. Il faut en contre parti leur fournir, des sels nutritifs car ceux qui sont présents dans l'eau ne suffisent plus, c'est ainsi qu'on ajoute :

L'azote sous forme NH₄⁺, NO₃, KNO₃ ou NNO₃ (DAUTA-1982) [13]

Le phosphate sous forme NaH₂PO₄ (FIALA-1978) [16]

Na₂HPO₄ (MCLACHLAN-1973), [26] P₂O₅ (BEKER et Col - 1976). [6]

La silice utilisée pour la culture des diatomées (ROBIN-1981) 525°, sous forme de NaSiO₃ (BERLAND-1966)[8].

IV. 2 Stérilisation :

D'après LE BORGNE (1986) [25]. Il convient d'éliminer les organismes présents dans l'eau qui peuvent entrer en compétition avec le micro- algues, il peut s'agir d'autres espèces de phytoplancton ou simplement des bactéries. La stérilisation par les moyens physiques (filtration, autoclave) ou par moyens des chimiques (acidification, chloration) permet de résoudre le problème.

IV.3 Obtention des souches :

1. prélèvement et enrichissement de l'eau naturelle :

Il consiste à prélever un échantillon d'eau naturelle, le filtrer pour éliminer le zooplancton, et le placer dans un milieu nutritif, pour permettre une augmentation du nombre de cellules d'après (FIALA, 1978).[16]

2. L'isolement des souches :

L'isolement des souches permet d'obtenir des cultures mono spécifiques, il est conseillé d'utiliser les culture en phase de croissance exponentielle (GUILLARD- 1973).[18]

Trois méthodes sont généralement utilisées :

2.1 . L'isolement en milieu liquide :

A partir d'un échantillon observé au microscope on peut prélever une goutte du milieu contenant parmi , d'autres la cellule recherchée , répétant cette opération , plusieurs fois on arrive à isoler , une goutte uni algale , qui est mise en culture (BERLAND – 1966, LE BORGNE- 1986 , ALLEN – 1973) [8], [25], [18]

2.2 L'isolement en milieu solide :

Cette technique est identique à celle employée en bactériologie .Les boîtes de pétri sont remplies en gélose enrichie en milieu de culture (ALLEN-1973, AUDINEAU-1986) [1],[2] de 1 à 1.5 % (FIALA-1978) [16] on étale sur la gélose à l'aide d'une anse de platine, une goutte contenant des cellules algales.

IV.4. Les types de culture :[23]

Des algues peuvent être produites en utilisant plusieurs méthodes, s'étendant des méthodes étroitement contrôlées de laboratoire aux méthodes moins prévisibles dans les réservoirs extérieurs. Les techniques décrivant le type de culture d'algues incluant:

L'intérieur/extérieur La culture d'intérieur permet le contrôle de l'illumination, de la température, du niveau nutritif, de la contamination avec des prédateurs et des algues de concurrence, tandis que les systèmes à base d'algues extérieurs le rendent très difficile d'accroître les cultures d'algues spécifiques pendant des périodes prolongées.

L'ouvert/fermé Des cultures ouvertes telles que les étangs et les réservoirs découverts (à l'intérieur ou dehors) plus aisément sont souillées que les navires fermés de culture tels que des tubes, des flacons, des touries, des sacs, etc...

L'Axenic (= sterile)/Xenic Les cultures d'Axénique sont exemptes de tous organismes étrangers tels que les bactéries et exigent une stérilisation stricte de toute la verrerie, milieux de culture et ustensiles pour éviter la contamination.

Les trois types de base de culture de phytoplancton sont :

1. Culture en lots

La culture en lots se compose d'une inoculation simple des cellules dans un récipient d'eau de mer fertilisée suivie d'une période croissante de plusieurs jours et finalement de la moisson quand la population d'algues atteint sa densité maximum ou proche du maximum. Dans la pratique, des algues sont transférées à de plus grands volumes de culture avant d'atteindre la phase stationnaire et les volumes plus grands de culture sont alors apportés à une densité maximum et moissonnés.

2. Culture continue

La méthode continue de culture, c'est à dire une culture dans laquelle un approvisionnement sans interruption en eau de mer fertilisée pompée dans une chambre de croissance et la culture excessive est simultanément enlevée), permet l'entretien des cultures très près du taux de croissance maximum. Deux catégories des cultures continues peuvent être distinguées:

La culture de turbidostat, dans laquelle la concentration d'algues est maintenue à un niveau préréglé en diluant la culture avec le milieu frais au moyen d'un système automatique.

La culture de chemostat, dans laquelle un écoulement de milieu frais est présenté dans la culture à un temps régulier prédéterminé. Le dernier aliment ajouté est limitateur (*par exemple* nitrate) à un taux fixe et de cette façon le taux de croissance et non la densité de cellules est maintenu constant.

3. Culture semi continue

La technique semi-continue prolonge l'utilisation de grandes cultures de réservoir par la moisson périodique partielle suivie immédiatement par une remise à niveau au volume initial et de compléter avec des aliments pour réaliser le niveau original de l'enrichissement. La culture est grandie encore, partiellement moissonné, etc... Les cultures semi continues peuvent être cultivées à l'intérieur ou dehors, mais habituellement leur durée est imprévisible. Les concurrents, les prédateurs et/ou les contaminants et les métabolites s'accumulent par la

suite, rendant la culture peu convenable pour davantage d'usage. Puisque la culture n'est pas moissonnée complètement, la méthode semi continue rapporte plus d'algues que la méthode en lots pour une taille donnée de réservoir.

Type de culture	Avantages	Inconvénients
À l'intérieur	Un degré élevé de commande (prévisible)	Cher
Dehors	Meilleur marché	Peu de commande (moins prévisible)
Fermé	Contamination moins probablement	Cher
Ouvert	Meilleur marché	Contamination plus probablement
Axenic	Prévisible, moins enclin aux accidents	Cher, difficile
Non-axenic	Meilleur marché, moins difficile	Plus enclin aux accidents
Continu	Efficace, fournit un approvisionnement cohérent en cellules de haute qualité, l'automation, le taux le plus élevé de périodes étendues de production	Difficile, habituellement seulement possible de cultiver de petites quantités, complexe, dépenses d'équipement peut être haute
Semi-continu	Plus facile, quelque peu efficace	Qualité sporadique, moins fiable
Groupe	Le plus facile, le plus fiable	Moindre efficace, qualité peut être contradictoire

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de diverses techniques d'algues de culture (modifiées d'Anonymous, de 1991).[23]

VI. 5. Milieux de culture :

Les concentrations des cellules dans des cultures de phytoplancton sont généralement plus hautes que ceux trouvées en nature. Des cultures d'algues doivent donc être enrichies avec des aliments pour compenser les insuffisances dans l'eau de mer, que sont les suivants :

- Les micro-éléments métalliques : généralement ils sont sous forme Chélate (FIALA.1978)[16]
- Les micro éléments organiques : Vitamine B₁₂, B₁, et H (AUDINEAU et col, 1986).[2]

Les éléments nutritifs majeurs : N, P et Si seulement pour les diatomées (NICHOLS-1973)[28]

Paramètres	Gamme	Optimums
La température (°C)	16-27	18-24
Salinité (g.l ⁻¹)	12-40	20-24
Intensité de la lumière (lux)	1,000-10,000 (dépend du volume et de la densité)	2,500-5,000
Photopériode (lumière: obscurité, heures)		16:8 (minimum) 24:0 (maximum)
pH	7-9	8,2-8,7

Tableau 2 : Un ensemble généralisé de conditions pour la cultivation des micro-algues (modifiées d'Anonymous, de 1991). [23]

Les milieux de culture couramment utilisés sont : [37]

- Milieu ASN III pour le cyanobacteria marin (Rippka, R.) 1988: [37]
- Milieu d'algues (AM) (Fábregas et autres, 1984) : [34]
- Milieu de Botryococcus (nomenclature) (Ben-Amotz et Tornabene, 1983) : [37]
- Milieu Chu-10 (H. C. Bold, 1978) : [34]
- Milieu d'Erdschreiber (fin de support) (Rosowski et Parke, 1971) : [37]
- Milieu D'Euglène (Fin de support) (George, 1976) : [37]
- F/2, médias H/2 (Guillard et Ryther, 1962) : [37]
- Milieu de Lewin pour les diatomées (LMD) (J. C. Lewin, 1958) : [37]
- Milieu de Walne (modifié de Laing, de 1991). : [37]
- Milieu F/2 de Guillard (modifié de Smith *et autres.*, 199a). : [37]

IV.6 Dynamique de croissance: [5]

La croissance d'une culture de micro algues est caractérisée par quatre phases :

- Phase de latence :

Elle correspond à l'adaptation aux nouvelles conditions de culture ; cette phase peut être très courte ,(moins de 24 heures). Plus la culture est âgée , plus la phase de latence est longue d'où la nécessité de repiquer la souche pendant la phase exponentielle

- Phase exponentielle :

En cette phase , la croissance est la plus active où les cellules se divisent dans un temps caractéristiques, appelé « Temps de division ». Le développement de la population est exprimé par un taux de croissance de la forme :

$$K_e = \frac{\ln(C_t) - \ln(C_0)}{t - t_0}$$

où : t = le temps en jour

C_t = Nombre de cellules (nbre cell /ml) au temps ,t

C₀ = Nombre de cellules en t₀

K_e = la constante de croissance/jour

- Phase stationnaire :

Pendant cette phase la multiplication cellulaire est ralentie par un facteur limitant (Lumière, ...). Le nombre de cellules est constant , ces dernières constituent leur réserves intracellulaire

- Phase de décroissance :

Dans cette phase il y'a un arrêt total des divisions cellulaires, les cellules qui meurent ne sont plus remplacée

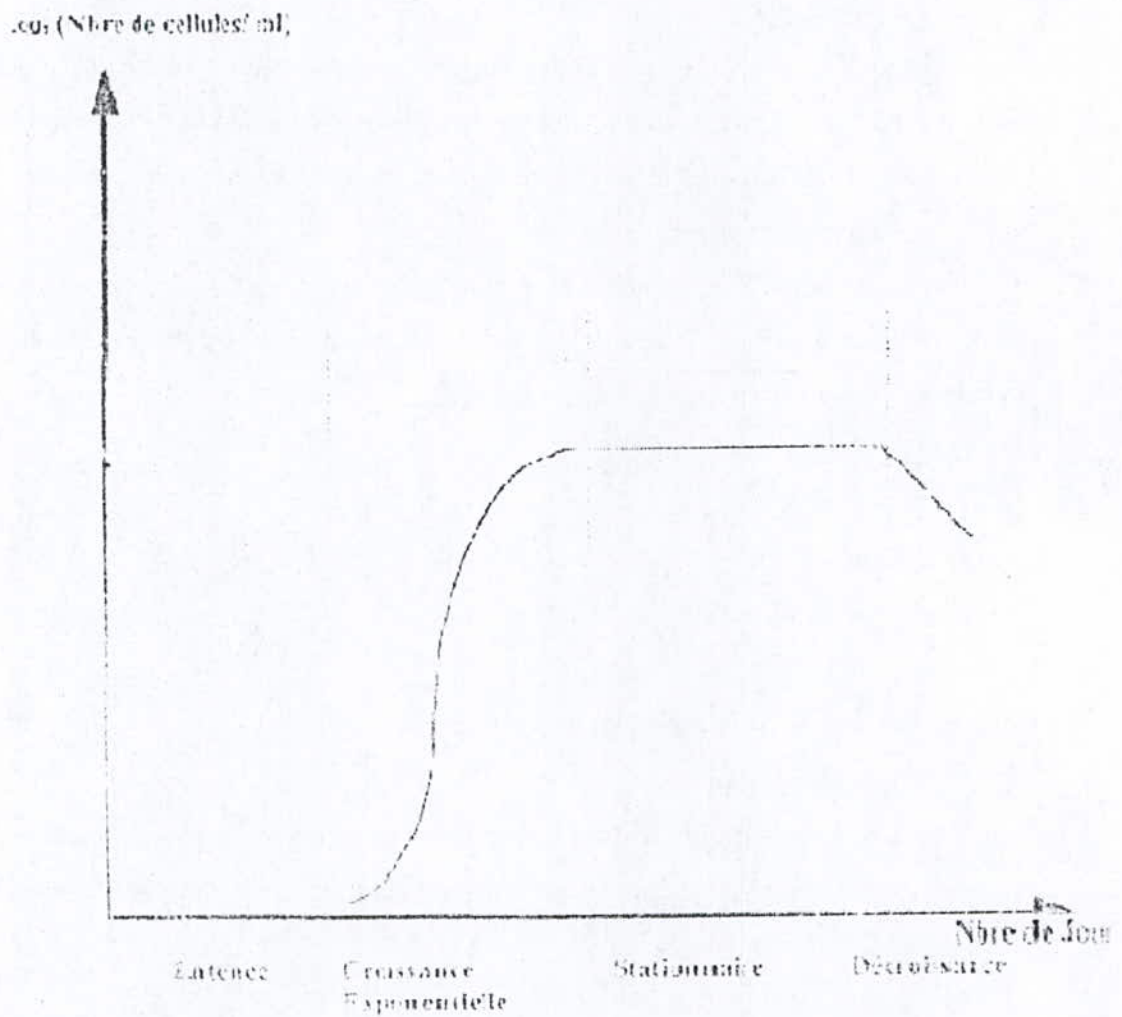


Figure: Différentes Etapes de croissance des micro- Algues (AUDINEAU et Col 1986) :

[2]

V. Le contrôle de développement algal :

La croissance d'une culture est généralement exprimée comme l'augmentation d'une biomasse, d'un nombre de cellule ou d'un taux de chlorophylle par unité de temps (DAUTA - 1982) : [13]

Les méthodes d'évaluation de croissance peuvent être regroupées :

Méthodes indirectes : Densité optique, pigments, protéines, Carbone, Azote,

Méthode directes : Comptage, poids sec, volume cellulaire.

1. Densité optique :

La densité des cellules dans les cultures est estimée par une mesure de la densité optique, avec un établissement d'une correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaires (SOROKIN- 1973), : [35] en utilisant comme appareil de mesure, un Colorimètre .

2. Le volume cellulaire :

La méthode consiste à mesurer le volume du concentrat, de la culture centrifugée, qui correspond à une concentration de culture (BARNABE et Col -1984). : [4]

3. La mesure de poids sec :

Après la centrifugation d'un volume assez important on peut sécher l'échantillon.

(SOROKIN-1973) : [36], C'est une mesure précise pour comparer plusieurs cultures entre elles, mais le processus est long et ne permet un diagnostic rapide (LE BORGNE – 1986). : [25]

4. Le comptage :

Le comptage s'effectue sous le microscope à l'aide d'une cellule de profondeur connue et dont le quadrillage défini donne un volume déterminé (Figure2)

Plusieurs types de cellules de comptage existent, chacune d'elles fournissant une précision optimale pour une taille de cellule et une concentration donnée (FIALA – 1978: [16], AUDINEAU et COL – 1986 : [2] (Tableau 3)

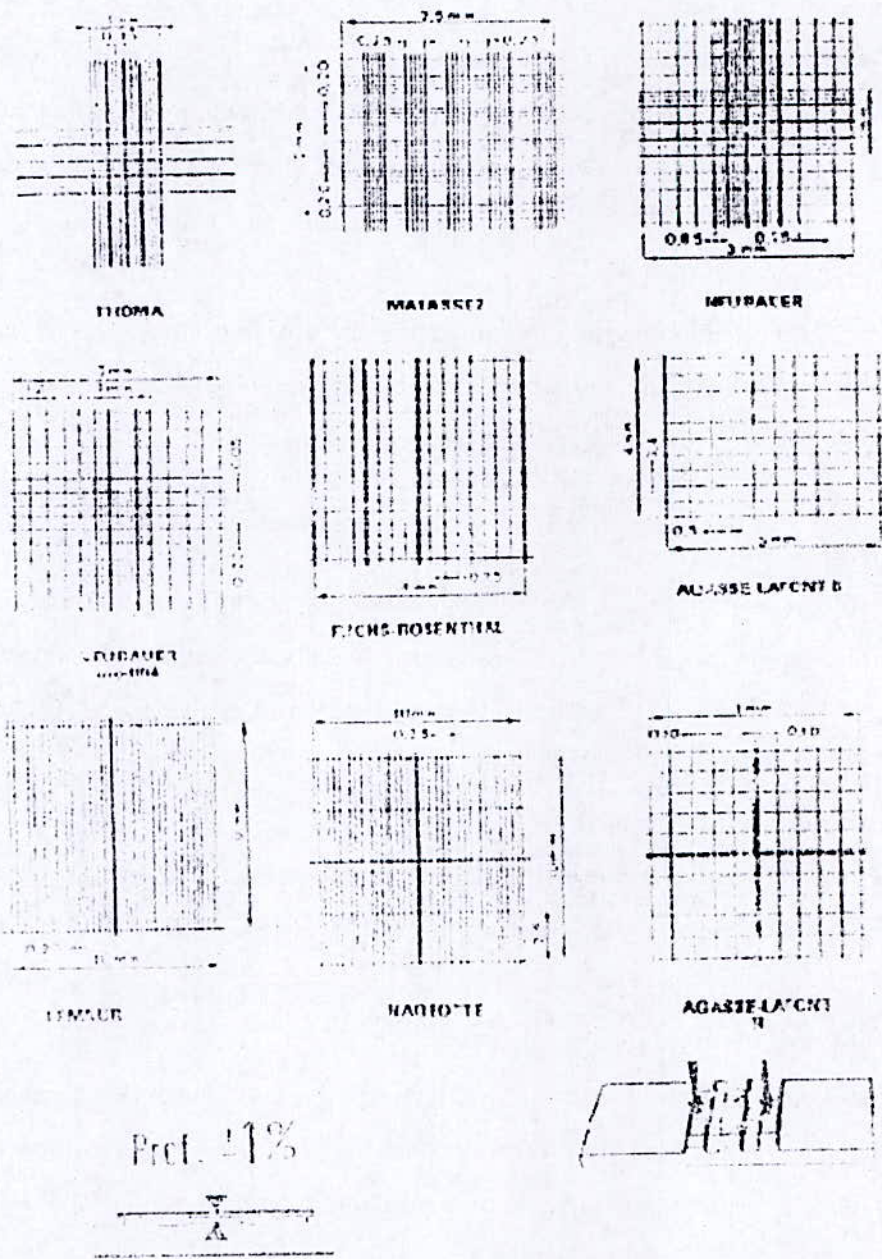


Figure2 : Quadrillages de quelques cellules de numération (FIALA, 1978) : [16]

Type de cellule	Dimensions du quadrillage Lx l x P(mm)	Volume (ml)
Thoma	1x1x0,1	10^{-4}
Agasse Lafont	1x1x0,1	10^{-4}
Neubauer	3x3x0,1	$9 \cdot 10^{-4}$
Mallassez	2,5x2x0,2	10^{-3}
Fushs Rosenthal	4x4x0,2	$32 \cdot 10^{-4}$
Agasse LafontB	5x4x0,5	10^{-2}
Lemaur	10x10x0,4	$4 \cdot 10^{-2}$
Nageotte	10x10x0,5	$5 \cdot 10^{-2}$
Chambres		
Palmer Maloney	Ø 17,9x0,4	10^{-1}
Sedgwich Rafter	50x20x1	1

Tableau 3 : Caractéristiques des principales cellules et chambres de comptag

VI. Moisson et conservation des micro algues[23] :

Dans la plupart des cas, il est inutile de séparer les micro algues du milieu de culture. La production excessive en hors saison peut, cependant, être concentrée et préservée. Les diverses techniques utilisées pour moissonner des micro algues ont été passées en revue par Fox (1983) et Barnabé (1990). Des cultures d'algues à haute densité peuvent être concentrées par floculation chimique ou centrifugation. Les produits tels que le sulfate d'alumine et les sels tels que le chlorure ferrique peuvent causer la coagulation et précipiter au fond ou flotter à la surface. Le rétablissement de la biomasse d'algues est alors, respectivement accompli en siphonnant le surnageant ou par écrémage des cellules hors de la surface. rs. La centrifugation de grands volumes de culture d'algues est habituellement effectuée à l'aide d'un séparateur crème; le débit étant ajusté selon l'espèce d'algues et le taux de centrifugation du séparateur. Des cellules sont déposées sur les parois de la centrifugeuse comme pâte d'algues épaisse, qui est alors remise en suspension avec un volume limité d'eau. La boue résiduaire peut être stockée pendant 1-2 semaines dans le réfrigérateur ou être congelée. Dans ce dernier cas, des agents cryoprotectifs (glucose, diméthylsulfoxyde) sont ajoutés pour maintenir l'intégrité de

cellules pendant la congélation. Cependant, la rupture de cellules et la durée de conservation limitée demeurent les inconvénients principaux de la biomasse pour la préservation en longue durée des algues. Les cultures concentrées *du suecica de Tetraselmis* maintenues dans l'obscurité à 4°C gardent leur viabilité, alors qu'elles seront complètement perdues en cas de congélation. En outre, les cultures stockées dans des fioles hermétiquement scellées perdent leur viabilité plus rapidement que celles maintenues dans des fioles bouchonnées avec du coton.

VII. Coût de production d'algues[23].

Les évaluations du coût de production d'algues varient de 300 à 400 US\$ par kilogramme de biomasse sèche (tableau 4). La production d'algues dans les étangs extérieurs est relativement bon marché, mais n'est valable seulement que pour certaines espèces.

Des accidents imprévisibles de culture dus aux conditions climatologiques de contaminations et/ou de fluctuation de températures sont prévisibles. La production d'algues d'intérieur offre une meilleure adaptation aux conditions de culture et leur développement est meilleur, mais, elle est plus chère que la culture extérieure qui demande de l'espace, de l'énergie et de la main-d'oeuvre qualifiée.

Coût de production (poids ^{sec} en\$.kg -1)	Remarques	Source
300	<i>Suecica de Tetraselmis</i> 200 l culture en lots	calculé à partir de Helm <i>et autres</i> (1979)
167	diverses diatomées (240 m ³) ^a cultures continues d'écoulement	calculé à partir de Walsh <i>et autres</i> (1987)
4-20	culture extérieure	De Pauw et Persoone (1988)
160-200	culture d'intérieur	
23-115	cultures continues d'écoulement de production d'été-hiver dans les sacs (8 m ³) et réservoirs (150 m ³) ^a	Dravers (COMM. de pers.. 1990)
50	culture de réservoir (450 m ³) ^a	Donaldson (1991)
50 - 400	aperçu international parmi les opérateurs bivalves d'établissement d'incubation en 1991	Coutteau et Sorgeloos (1992)

Tableau 4. Coût de production de micro algues marines (modifiées de Coutteau et de Sorgeloos, de 1992).[8]

Un volume total disponible pour la production d'algues

VIII. Les Algues utilisées en aquaculture :

Les algues les plus utilisées en aquaculture sont , d'après FANCIULLI (1987).

Les diatomées :

- *Phaedactylum tricornutum*
- *Skeletonema costatum* *syclotella nana*
- *Chaetoceros calcitrans*

Qui sont généralement utilisées dans l'élevage larvaire des pénéidés .

Les haptophycées :

- *Isochysis galbana*
- *Pavlova lutheri*

Utilisées dans l'élevage des mollusques bivalves , leur contenu est élevé en acides gras insaturés à longue chaîne

Parasinophycées :

-Tetraselmis

Chlorophycées :

-Dunaliella

-Chlorella

-Nannochloris

Genre	Compte De Cellules *	Type	Taille	Sec Poids	Espèce	Durée de conservation
<u>Nannochloropsis</u>	3600 milliards/ml	68 Vert Algues	2	18.4%	Poissons Rotifères	12-14 semaines 2 ans congelés
<u>Tetraselmis</u>	3600 milliard/ml	1.5 Vert Flagellé	12	18.9%	Poissons Crevette Mollusques et crustacés	12-14 semaines 2 ans congelés
<u>Isochrysis</u>	1800 milliards/ml	4.6 D'or Brun Flagellé	5	9%	Poissons Crevette Mollusques et crustacés Enrichissement	12-14 semaines frigorifié seulement
<u>Pavlova</u>	1800 milliards/ml	3.3 D'or Brun Flagellé	4-7	9%	Poissons Mollusques et crustacés Enrichissement	12-14 semaines frigorifié seulement
<u>Thalassiosira weissflogii</u> (TW)	1800 320millions 4.6 milliards/ml *	Diatomée	5-20	9%	Crevette, Mollusques et crustacés	12-14 semaines frigorifié seulement
<u>Régime De</u>	1800	2 Mélange	5 à	9%	Mollusques et	12-14

Mollusques et crustacés		milliards/ml		16		crustacés	semaines frigorifié seulement
----------------------------	--	--------------	--	----	--	-----------	-------------------------------------

Tableau 5 :Caractéristiques et utilisations des Micro algues en aquaculture

IX.Critères de choix :

Les espèces des micro algues cultivées sont sélectionnées selon les critères suivants :

- La facilité de culture
- Valeur alimentaire
- La taille cellulaire
- La composition biochimique

X. Valeur alimentaire :

Les micro algues possèdent des caractéristiques biochimiques et nutritionnelles en protéines très importantes, cinq fois celles des algues macroscopiques (ROBIN-1981) [34]

Elles présentent en outre de teneurs relativement fortes d'acides gras insaturés essentiellement pour l'alimentation des animaux marins (FERNANDEZ REIREZ -1989) [31]

Le tableau suivant donne les principales caractéristiques.

Espèces	% protéines	%lipide	%Carbo-Hydrates
Pavlova Lutheri	33,55	28,88	18,53
Isochrysis gabana	39,97	28,60	15,21
Hétérosigma Arashiwo	27,27	49,96	16,55
Tetrasmis Sueccica	40,85	24,24	12,30
RHodomonas	16,75	27,86	12,60
Phaeodactylum Ericomitum	2,58	0	0,72

Chaetoceros	2,60	11,76	2,42
Calitraus			

Tableau 6 : Composition biochimique, exprimée en pourcentages (%) de poids sec de 7 espèces de micro algues (FERNANDEZ-REIREZ et Col-1989)[31]

XI.Culture des algues à l'échelle industrielle :[23]

Les médias alternatifs d'enrichissement qui conviennent à la production en série des micro-algues dans les systèmes étendus à grande échelle contiennent seulement les aliments les plus essentiels et se composent d'engrais d'agriculture catégorie plutôt que de laboratoire catégorie (tableau 7).

Combinaisons	A	B	C	D	E	F
Engrais	Concentrations mg.l ⁻¹					
Sulfate d'ammonium	150	100	300	100	-	-
Urée	7,5	5	-	10-15	-	12-15
Superphosphate de calcium	25	15	50	-	-	-

Tableau 7. Diverses combinaisons des engrais qui peuvent être employés pour la culture de masse des algues marines (modifiées de Palanisamy et autres. , 1991).

Chapitre III

PRODUCTION DES MICRO ALGUES

1. Introduction :

Il existe une diversité de type physiologique et trophique demandé pour la croissance et la multiplication de micro algues ,elles ont toutes un certain nombre de besoin ,

-une source d'énergie

-une source de Carbone

-des éléments minéraux

Parmi les travaux qui ont été faites, nous avons présenté celui de AQUAMER SA productions Marines et Extraits Végétaux, France.

II . La préparation des milieux de cultures

II . A. Préparation de l'eau des milieux :

Les milieux de culture, pour **les souches** et **les cultures d'algues**, sont à la **salinité de 25g/L**

Le mélange de l'eau de mer et d'eau douce du réseau permettra d'obtenir une eau à 25 g/l de sel. Pour cela, il faut connaître la salinité de l'eau de mer qui peut varier tous les jours en fonction de la météorologie. A priori, on considère que l'eau douce est à environ 0 g/l de sels.

- prélevez dans une éprouvette graduée (500mL) de l'eau de mer filtrée,
- mesurez **simultanément** la température et la densité,
- déterminez la salinité à l'aide de l'abaque (Salinité = f(Temps, Densité)).
- procédez ou pas à un ajustement de la salinité de l'eau de mer du milieu, soit en ajoutant du sel, soit en diluant avec de l'eau douce du réseau de la Ville,
- contrôlez la salinité après l'avoir ajustée et après avoir mélangé les eaux douces, de mer et/ou éventuellement le sel.

NB : Si vous préparez de l'eau de milieu de culture pour des petits volumes (tubes à essais - bouteilles de 5L), faites vos mélanges dans un seau de 15L. Pour les cultures de plus grand volume, vous devrez, tous les jours, remplir les réserves d'eau à 25 g/L de sel en utilisant l'eau de mer filtrée de l'étang et l'eau douce du réseau de la Ville.

II. B. Préparation des solutions de nutriments :

Pour que les cultures d'algues soient de bonne qualité et productives, des nutriments doivent être rajoutés à l'eau salée. En effet, ces nutriments (éléments minéraux) avec la lumière et une température de 18 à 21 °C participent à l'anabolisme et à la division des cellules alguales

II. B.1. préparation de la solution de CONWAY

préparation de la solution principale (dans l'ordre) :

Substance	Quantité
Eau distillée	900ml
NaCl	25g
Na EDTA Triplex	45,00g
KNO ₃ Nitrate de Potassium (ou NaNO ₃ Nitrate de Sodium)	119,00 g (100,00g)
H ₃ BO ₃ Acide orthoborique	33,60g
NaH ₂ PO ₄ Dihydrogénophosphate de sodium	20,00g
MnCl ₂ (4H ₂ O) Chlorure de Manganèse	0,36g
FeCl ₃ (6H ₂ O) Chlorure de Fer	1,30g

Tableau 1 : Compositions de la solution de Conway.

- choisissez une fiole de 2L propre, rincez la avec de l'eau déminéralisée, y introduire un barreau aimanté et placez la sur l'agitateur magnétique.
- dissolvez dans l'eau déminéralisée les produits de la solution principale. Ceci, dans l'ordre de la liste et après dissolution complète de chaque produit avant de passer au suivant.
- passez à l'autoclave pendant **30mn** après le début de l'ébullition (vérifiez avant chaque stérilisation à l'autoclave que la quantité d'eau sous la verrerie est suffisante pour le temps de stérilisation)

- **étiquetez la fiole**, notez la date et stockez la dans le réfrigérateur après l'avoir laissée refroidir à l'extérieur.

NB : Habituellement, une quantité précise de solution trace de métaux est additionnée à la solution principale. A Sète, l'eau de l'étang utilisée contient suffisamment de métaux lourds .

II. B.2 . préparation de la solution vitaminique

Substance	quantité
eau distillée stérile	100 ml
Vitamine B1 Thiamine dichlorure	200mg
Vitamine B12 Cyanocobalamine	10 mg

Tableau 2 : composition de la solution vitaminique

- choisissez une fiole d' 1 L propre, rincez la avec de l'eau déminéralisée, y introduire un barreau aimanté et placez la sur l'agitateur magnétique.
- dissolvez les produits avec l'eau distillée.
- **ne pas autoclaver la fiole .**
- **étiquetez la fiole**, notez la date et stockez la dans le réfrigérateur.

II.B.3 . préparation de la solution de métrasilicates

(utilisée pour la culture de Diatomées).

Substance	Quantité
eau distillée	2000 mL
Sodium métrasilicate	40g

Tableau 3 : compositions de la solution métrasilicates

- choisissez une fiole de 2L propre, rincez la avec de l'eau déminéralisée, y introduire un barreau aimanté et ta placer sur l'agitateur magnétique.
- dissolvez les silicates dans l'eau distillée.
- passez à l'**autoclave pendant 30 mn après** le début de l'ébullition (vérifiez

avant chaque stérilisation à l'autoclave que la quantité d'eau sous la verrerie est suffisante pour le temps de stérilisation - environ 5 cm).

- **étiquetez la fiole**, notez la date et stockez la dans le réfrigérateur.

II.C. Addition des solutions aux milieux de culture :

La solution principale du milieu de CONWAY sera ajoutée au milieu de culture à raison de 1 ml / litre de culture d'algues.

La solution vitaminique sera ajoutée au milieu de culture à raison de 0,1 ml / litre de culture d'algue.

La solution de métasilicates est ajoutée au milieu de culture à raison de 1 ml / litre de culture d'algues.

II.D. Préparation des milieux de culture de petits volumes (tubes à essai) et de grands volumes (gaines) :

Pour préparer les milieux de culture de petits volumes (tubes à essais - ballons de 2L), et **avant stérilisation à l'autoclave**,

- préparez l'eau à 25 g/l de sel dans un seau de 15L,
 - ajoutez la solution de Conway, (sans vitamines)
 - remplissez, avec ce mélange, chaque contenant selon la quantité voulue, en attente de stérilisation.

Pour tes milieux de culture en grands volumes (bouteilles de 5L - gaines L), remplissez vos contenants avec l'eau de la réserve à 25g/L, préalablement préparée la veille.

III. La stérilisation des milieux de cultures et hygiène générale

Le but de cette opération est d'obtenir des cultures d'algues **mono spécifiques sans contaminants extérieurs**.

Pour cela, les contenants avec les milieux de culture sont stérilisés (sauf les vitamines).

III.A. Stérilisation à l'autoclave :

- Les petits volumes (tubes à essais/ ballons de 2L) sont stérilisés à l'autoclave à **120°C** :
- vérifiez le niveau d'eau douce dans l'autoclave (+5 à 6 cm depuis le fond),
- placez dans l'autoclave les récipients bouchonnés de coton et de papier aluminium,
- quand l'eau de l'autoclave boue, comptez heure,
- éteignez l'autoclave et laissez refroidir. Au bout d'un certain temps vous pouvez ouvrir le couvercle de l'autoclave et sortir les récipients. Laissez-les refroidir sur la paillasse au moins 6 heures.

III. B. Stérilisation chimique par acidification :

Les grands volumes (bouteilles de 5L - gaines) sont stérilisés par acidification :

- versez 0,5mL **d'acide chlorhydrique** industriel (33%) / L de milieu (les tubes d'aération étant dans le récipient),
- laissez agir au minimum 6 heures,
- après avoir calibré la sonde pH, mesurez le pH du milieu ,
- remontez le pH à 7,9/ **8,1** en rajoutant une solution de Carbonate de Sodium Na_2CO_3 (100g/L) à raison de 4mL/L.

III.C. Hygiène générale :

Plus généralement et pour remplir l'objectif de culture d'algues mono spécifiques, la salle d'algue doit être propre. Les personnes y travaillant doivent l'être également, sur leur personne, et dans les opérations effectuées avec méthode et rigueur.

Tout le matériel utilisé devra être nettoyé avant et après chaque usage. S'il y a des dépôts de calcaire sur la verrerie après l'avoir lavée à l'eau douce, elle sera acidifiée (+ Ha), rincée puis déposée à sécher.

Tout le matériel devra être rangé à sa place habituelle.

Avant toute opération de repiquage le plan de travail et les mains sont désinfectés à l'alcool.

IV. Maintien des souches, repiquage et mise en route d'une culture en bloom :

IV.A. Principes :

Dans notre cas, la production est discontinue et suit le schéma de type "**bloom**" (fig 2).

Le repiquage de la souche consiste à obtenir 3 souches filles à partir **d'une souche mère** (fig 3).

La totalité du volume élémentaire est utilisé comme 3 inoculum (sauf le culot) .

La **mise en route de la culture** consiste à augmenter le volume de la culture et la concentration de cellules dans le temps, d'un tube à essai à un erlen de 250mL, puis à un ballon de 2 litres, puis à une bouteille de 5 litres, à une gaine de 50 L et enfin à une gaine de 300L. Il faut environ un mois pour obtenir une concentration maximale de cellules algales dans un volume de 300 L (fig 4).

Les courbes de croissance des populations algales unicellulaires (concentration de cellules par millilitres en fonction du temps) permettent de situer de façon précise, la meilleure période de "repiquage" des algues (phase exponentielle des courbes de croissance cellulaire établies pour chaque espèce, (fig 5).

Dans notre cas, la décision du transfert de la culture dans un récipient plus volumineux se fera en fonction des comptages effectués au cours du temps et/ou de l'aspect de la culture (aspect extérieur - couleur, écume... et contrôle microscopique).

L'opération de transfert des algues se fera dans un milieu de culture adéquat, dans un récipient de plus grand volume correctement stérilisé et en condition stérile à la flamme (jusqu'à 2L).

IV. B. Mode opératoire :

La salle d'algues est un lieu de travail où il existe un "flux microbien" pouvant être préjudiciable à l'objectif de mise en culture des algues. Le **nettoyage et la désinfection** ont pour but d'assurer une bonne hygiène que ce soit au niveau des locaux, du matériel, du personnel mais aussi de l'air ambiant. Ils sont une des conditions nécessaires à l'obtention d'un produit de bonne qualité.

Pour la préparation des milieux de culture (eau de mer et solutions nutritives) reportez vous au protocole - préparation des milieux de culture.

Pour chaque opération de repiquage, vérifiez que vous avez bien noté (après l'avoir effectivement fait) : l'espèce, la date du repiquage et la nature des solutions nutritives

(+ C (Conway) + V (Vitamines) + M (Métrasilicates)), ex :

ISO-25 / 11 + C + V

IV. C. Repiquage de souches à partir d'une souche mère :

- Dans l'eau de **milieu de culture** (seau de 15L), versez 1ml/L (soit 10ml pour 10L) de la solution de **Conway**. Versez également 1 ml/L de métasilicates s'il s'agit d'une culture de diatomées,
- dans chacun des **3 tubes à essai** propres, versez 15mL de ce mélange,
- stérilisez les 3 tubes, une demi-heure à 100°C à l'autoclave. Sortez les tubes dès que possible et laissez refroidir environ 6h,
- **à proximité d'une flamme** et suivant une technique employée en microbiologie, **repiquez** dans chacun des tubes 1/3 de la souche mère.
- Pour acquérir la technique, entraînez vous avec des tubes, à blanc.
- rajoutez dans chacun des 3 tubes **1 goutte de solution de vitamines**,
- rebouchez le tube à essai (avec du coton et du papier Aluminium), identifiez le et replacez le sur un portoir,
- laissez reposer à température ambiante environ **1 semaine sous une lumière tamisée** (moins de 1000 lux).

N.B : Un des tubes est mis de côté. La souche fille devient souche mère et participera aux manipulations telles qu'elles viennent d'être décrites précédemment. Pour chacun des 2 tubes restant, la suite des événements sera la même c'est à dire qu'on fera une mise en route de culture par augmentation de volume.

IV . D. Mise en route d'une culture d'algue par augmentation de volume :

IV. D.1 : d'un tube à essai à un erlen de 250mL

- remplissez un erlenmeyer de 250mL avec 100mL d'eau de milieu de culture préalablement additionnée de nutriments (comme précédemment).
- bouchez l'erlen avec du coton et de l'aluminium.
- stérilisez l'erlen une demi-heure à **100°C** à l'autoclave. Sortez les tubes dès que possible et laissez refroidir environ 6h.
- à proximité d'une flamme et suivant la technique employée en microbiologie, transvasez le contenu du tube à essai sans le dépôt dans l'erlen.

- rajoutez 1 goutte de solution de vitamines.
- rebouchez l'erien, identifiez le (esp, date...) et rangez le.
- laissez reposer à température ambiante (20°C) sous une lumière tamisée (moins de 1000 lux).
- les jours suivants et deux fois par jour, remettez en suspension le mélange, sans geste brusque, et surtout sans mouiller le coton .

IV.D.2 : d'un erlen de 250mL à un ballon de 2L

- remplissez un ballon de 2 litres avec 850 mL d'eau de milieu de culture (idem dans un ballon de 2L)
- versez dans le ballon, 1 ml/L de la solution de Conway
- (+ des métasilicates s'il s'agit d'une culture de diatomées),
- stérilisez le ballon, une demi-heure à 100°C à l'autoclave et laissez refroidir environ 6h,
- à proximité d'une flamme et suivant la technique employée en microbiologie, transférez le contenu de l'erlenmeyer de 250mL dans le ballon d'1 litre (ou 2L).
- rajoutez la solution de vitamines à raison de 0,1ml/L .
- rebouchez le ballon, identifiez le (esp, date...) et rangez le.
- laissez reposer à température ambiante (20°C), sous une lumière tamisée (moins de 1000 lux), puis passez le ballon en lumière normale dès que la concentration est suffisante,
- les jours suivants et une fois ou deux fois par jour, remettre en suspension le mélange. Sans geste brusque .

IV. D.3 : d'un ballon de 2L à une bouteille de 5 L

- versez dans la bouteille de 5L, 4 L d'eau de mer filtrée et 2 mL d'HCl (0,5mL /L),
- installez le dispositif de buttage. Les bulles doivent permettre d'homogénéiser doucement le mélange
- laissez buller au moins 6 heures
- ajoutez 4mL/L de Na₂CO₃ (100g/L) soit 20mL
- réajustez le pH à 7,9 - 8,1 avec HCl ou Na₂CO₃

- ajouter 1 mL/L soit 5 mL de la solution de Conway (+ des métasilicates s'il s'agit d'une culture de diatomées) et 0,1 mL/L de vitamines soit 0,5 mL dans la bouteille de 5L.
- transvasez le contenu du ballon dans ta bouteille de 5L.
- rebouchez la bouteille de 5L, identifiez la (esp, date...) et rangez la
- réglez un bullage modéré

IV. D.4 d'une bouteille de 5 L à une gaine de 50 L

- confectionnez une gaine de 50L.
- versez dans la gaine 50 L d'eau de mer filtrée à 25 g/l et 20 mL d'HCl
- installez le dispositif de bullage. Les bulles doivent permettre d'homogénéiser doucement le mélange
- laissez buller au moins 6 heures
- Pour neutraliser l'acide, ajoutez 200 mL de Na₂CO₃ (Na₂CO₃=100g/L à 4mL/L)
- réajustez le pH à 7,9 - 8,1, avec HCl ou Na₂CO₃
- ajouter 1 mL/L soit 50 mL de la solution de Conway (+ des métasilicates s'il s'agit d'une culture de diatomées) et 0,1 mL/L de vitamines soit 5 mL dans la gaine de 50L
- transvasez le contenu de ta bouteille de 5L dans la gaine de 20L.
- identifiez la gaine (esp, date...),
- réglez un bullage modéré.

VI. D.5 d'une gaine de 50 L à une gaine plastique de 300 L

Dans un premier temps, l'opération démarre par la préparation de la gaine, cf protocole - fabrication d'une gaine -

Une fois la gaine préparée, remplie de son milieu de culture, aérée et stérilisée :

- placez un entonnoir dans une fente faites sur la gaine,
- verser le contenu de la gaine de 50L dans la gaine de 300 L,
- réglez un bullage modéré.
- notez le détail des opérations sur la gaine :
- identifiez la gaine (esp, date...)

s'il y a eu stérilisation notez :

HCl : heure de départ

s'il y a eu neutralisation notez :

Na₂CO₃ : heure

précisez enfin, le volume exact contenu dans la gaine

V. Comptage des cellules d'algues a la cellule de Malassez (fig 6) :

prélevez dans un bécher un échantillon d'algues

- pour immobiliser les algues, si elles appartiennent à une espèce d'algues mobiles, utilisez du formol (10%) à la dose de 2 gouttes pour 20ml de culture
- après homogénéisation de l'échantillon, prélevez à l'aide d'une pipette Pasteur plusieurs gouttes d'échantillon
- introduisez les algues par capillarité sur la zone de comptage, entre lame et lamelle. La lamelle ne doit pas se soulever (estimation incorrecte).
- dénombrez au microscope (grossissements 300)
- repérez une cellule en haut ou en bas. Chaque cellule contient 20 cases,
- localisez une case. Chaque case contient 20 petits carrés,
- comptez le nombre d'algues dans 12 cases, enlevez les valeurs extrêmes (mini et maxi) et faites la moyenne N sur les 10 valeurs restantes.
- notez le résultat. La concentration d'algues est de $N \cdot 10^5$ cellules d'algues.mL⁻¹.









Détail de la cellule ou cuve de Malassez :

Calcul du nombre d'algues par mL :

- toute la cuve volume 10^3 mm^3	n. 10^3 cellule par mL -
--une ligne volume 10^{-4} mm^3	n. 10^4 cellule par mL
- une case volume 10^5 mm^3	n. 10^5 cellule par mL

Tableau des familles et des genres

ESPILLES.POLYPLAURIMONTIQUES

GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATIONS EN CULTURE	TAILLE EN MICROM
Chaetoceros Calcitrans	Marron		$5 \cdot 10^8$ E/ml	4 - 6 µm
Chaetoceros Curvisetus	Marron		/	3 - 30 µm
Thalassiosira Pseudonana	Marron		/	12 - 40 µm
Skeletonema Costatum	Marron		$3 \cdot 10^8$ E/ml	3 - 8 µm
Phaeoactylum Tricarinatum	Marron		$5 \cdot 10^8$ E/ml	8 µm
Cylindrocapsa	Marron		$5 \cdot 10^8$ E/ml	6 µm
Nitzschia Sorbata	Marron		/	80 - 100 µm
Navicula Discens	Marron		/	70 - 120 µm

ESPILLES.POLYPLAURIMONTIQUES







GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATIONS EN CULTURE	TAILLE EN MICROM
Platymonas Swedia (Tuberosa) Swedia	Verte		$2 \cdot 10^8$ E/ml	8 - 10 µm
Pyramomonas Grossii	Verte		/	8 - 10 µm

fig 1a : tableau des familles de microalgues les plus courantes.

FAMILLE DES HAPTOPYTESSES				
GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATION EN CULTURE	TAILLE EN MICRON
Isocrysis Galbana	Brune		$17 \cdot 10^6$ E/ml	2 - 3 μ m
Isocrysis souche du pacifique	Brune		$20 \cdot 10^6$	2-3
Pavlova Lutherie (Pavlova chrysis)	Brune		$15 \cdot 10^6$ E/ml	2 - 3 μ m
Pseudoisocrysis				

FAMILLE DES CHLOROPHYTESSES				
GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATION EN CULTURE	TAILLE EN MICRON
Buniatella Tertiolecta	Verte		$2 \cdot 10^6$ E/ml	8 - 10 μ m
Chlorella Stigmatophora	Verte		$40 \cdot 10^6$ E/ml	1 - 2 μ m
Rhodochloris	Verte		$40 \cdot 10^6$ E/ml	1 - 2 μ m

FAMILLE DES CRYPTOPHYTESSES				
GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATION EN CULTURE	TAILLE EN MICRON
Rhodomonas Baltica	Rouge		$2 \cdot 10^6$ E/ml	8 - 10 μ m

fig 1b : tableau des familles de microalgues les plus courantes.

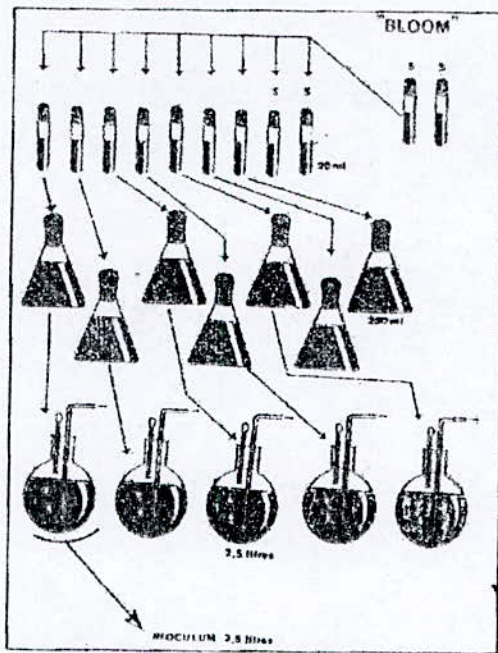


fig 2 : principe de la culture en « bloom ».

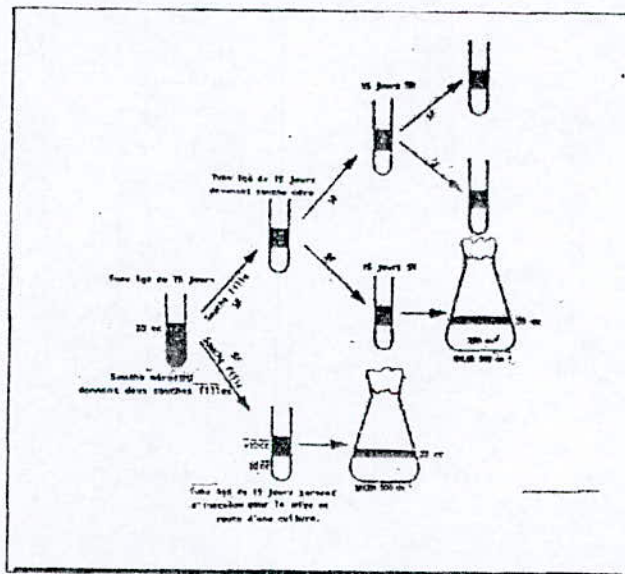


fig 3 : maintien des souches de microalgues.

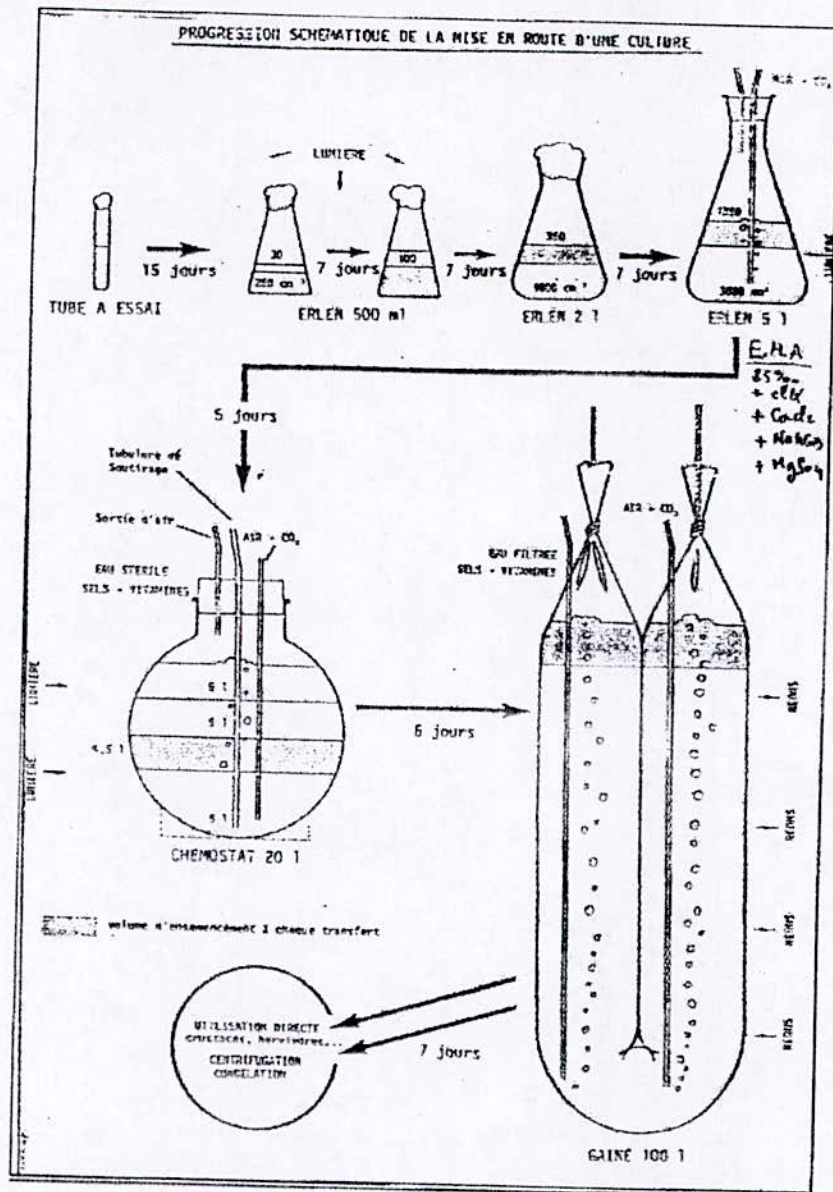


fig 4 : schéma d'une culture en « bloom ».

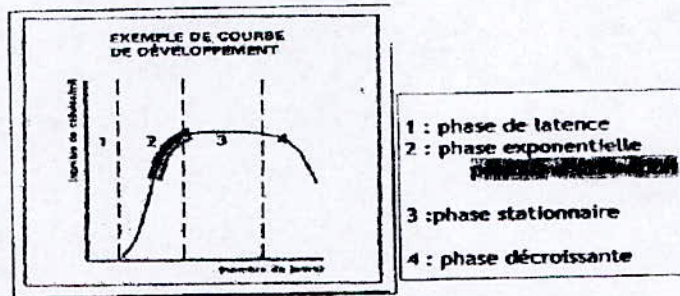


fig 5 : courbe de croissance d'algues unicellulaire.

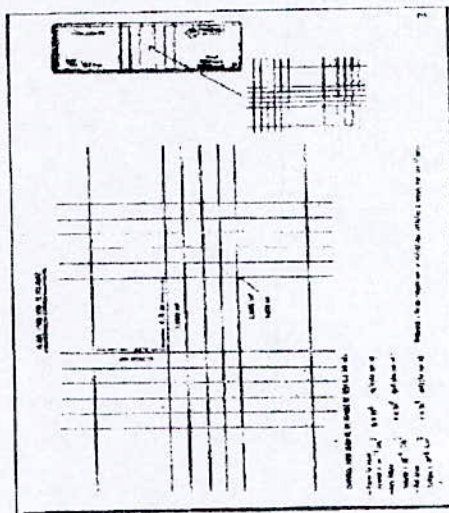


Fig6 : Détail de la cellule ou cuve de Malassez

Partie Expérimentale

Chapitre IV

ETUDE DE LA CROISSANCE D'UNE MICRO ALGUE

1.Introduction :

Le but de cette étude est de déterminer les conditions optimales pour un développement favorable de la micro algue tetraselmis.

II. Matériels utilisés :

II.2.1 Matériels biologique :

La micro algue cultivée est *le Tetraselmis succica*, le choix de cette espèce s'est basé sur la facilité de sa culture et son utilisation étendue en aquaculture.

La souche nous a été fournie par AQUAMER SA productions Marines et Extraits Végétaux, France.

II.2.2/Equipements :

Pour mener à bien les manipulations , nous avons utilisés les équipements suivantes :

- 4 tubes à essai : 2 de 10 ml, 1 de 30 ml et 2 de 50 ml .
- 12 erlenmyers : 9 de 250 ml et 3 de 500 ml.
- 1 ballon de 1L.
- Des pipettes graduées ,5 mL, 10 mL.
- Une pissette.
- un Colorimètre,pour mesurer la densité optique .
- une cocote minute.

II.2.3 Milieu de culture :

Le paramètre le plus important en dehors des conditions opératoires est le milieu de culture ,nous avons utilisé *le milieu de Conway* qui se compose des éléments suivant données dans le tableau 1 :

Substances	Quantités
Eau distillée (+ agitateur magnétique)	900,00 mL
Na cl	25,00g

Na EDTA Triplex	45,00g
KNO ₃ nitrate de potassium	119,00g
ou NaNO ₃ nitrate de sodium	100,00g
H ₃ BO ₃ acide ortho borique	33,60g
NaH ₂ P ₄ O ₄ di hydrogène phosphate de sodium	20,00g
Mncl ₂ (4H ₂ O) chlorure de manganèse	0,36g
Fecl ₃ (6H ₂ O) chlorure de fer	1,30g

Tableau 1 : compositions de milieu de culture

II.2.3.a Préparation du milieu de culture :

Pour les expériences le protocole opératoire est le suivant

- Choisir un ballon de 2 L propre et bien rincer avec l'eau distillée, y introduire un barreau aimanté, le placer sur l'agitateur magnétique.
- Dissoudre dans l'eau distillée les produits de la solution principale (milieu de culture) dans l'ordre de la liste (ci-dessus) et s'assurer de la dissolution complète de chaque produit avant de passer au suivant et ainsi de suite .
- Passer à la cocote ,remplie avec un peu d'eau douce ,environs 5cm de hauteur depuis le profond ,pendant 30 minutes après le début de l'ébullition .
- Stocker la solution ainsi obtenue dans le réfrigérateur après l'avoir laissée refroidir à l'extérieur.

La concentration de milieu de culture qui a été utilisée dans notre étude est de 2mL de solution de Conway dans 1 L d'eau de mer.

II.2.3.b Stérilisation du milieu de culture :

Avant toutes opération, il est nécessaire de stériliser les équipements aussi que le milieu de culture

Nous avons utilisé la stérilisation à l'autoclave, en remplaçant l'autoclave par une cocote minute, suivant les démarches suivantes :

- Remplir la « cocote » qui fait office d'autoclave avec 5 à 6 cm de l'eau douce.
- Placer dans la « cocote » les récipients bouchonnés avec du coton enveloppé de papier aluminium.

- Laisser chauffer, 30 minutes après le début de l'ébullition de l'eau
- Retirer la cocote de la flamme, ouvrir le couvercle et sortir les récipients remplis de milieu de culture
- Laisser refroidir au moins 6 heures avant l'utilisation.

NB. On stérilise les récipients utilisés pour nos expériences, de la même manière.

III. Paramètres physico – chimiques intervenant dans la croissance de micro algue :

Plusieurs paramètres intervenant dans la croissance nous citerons, la température, la vitesse d'agitation, le débit d'air de barbotage, la composition de la solution et naturellement la luminosité :

- ✓ La température de l'armoire est d'environ de 32 ± 2 °C
- ✓ les cultures ont été soumises à un éclairage artificiel d'une intensité lumineuse de 400 watt. (10 néons de 40 watt).
- ✓ Un barbotage d'air de 80 bulles/minute.

IV. Étude de la croissance du *tetraselmis succica* dans différentes concentrations de souches en milieu de Conway :

IV.1 Le protocole expérimental :

Les principales parties sont données dans la figure 1

Le protocole expérimental que nous avons suivi pour cette étude est le suivant :

- 1) Allumer le bec bunsen, nettoyer et désinfecter la paillasse sur laquelle on travaille, pour assurer une bonne hygiène et éviter au maximum de contamination de notre algue par le « flux microbien » qui existe dans le labo.
- 2) Stériliser, 3 erlenmeyers et 2 tubes à essai bouchonnés avec du coton enveloppé de papier aluminium, une demi heure à 100°C dans la cocote, les sortir et les laisser refroidir au moins 6 heures.
- 3) verser, 50 ml de milieu de culture (stérilisé) dans chacun des 2 tubes à essai et 100 ml, 250 ml, 500 ml, dans chacun des erlenmeyers respectivement, reboucher-les (avec du coton et du papier Aluminium)



- B
- A : Néon (40 watt)
- B : Pompe à air
- C : Mélange (souche + solution nutritive)
- D : Diffuseur
- E : Bouchon (Coton)
- F : Robinet d'air

Figure1 : le montage expérimentale élaboré

- 4) avec des pipettes stérilisées, on prélève 2 fois 1ml et 3 fois 2 ml de souche mère , on les verse dans respectivement: 1tube à essai de 50 ml, 1 erlenmeyer de 100 ml, 1 tube à essai de 50 ml, 1erlenmyer de 250 ml, 1 erlenmeyer de 500 ml, tous remplis de milieu de culture (stérilisé), et on les rebouche (avec du coton enveloppé de papier aluminium) .
- 5) Agiter, reboucher, laisser reposer à température ambiante sous une lumière (400watt).
- 6) Analyser au colorimètre par rapport à une solution témoin (eau distillée) toutes les 24 heures et à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations de souche définies, on peut exprimer directement les résultats en nombres de cellules par millilitre de milieu de culture.

IV.2 La courbe d'étalonnage :

Le but de la courbe d'étalonnage est de servir de référence pour l'évaluation de la cinétique. On prépare des solutions de souche mère de différentes concentrations dans le milieu de culture, on détermine ensuite la densité optique des différentes solutions et on obtient la droite de la figure 2 ci-dessous.

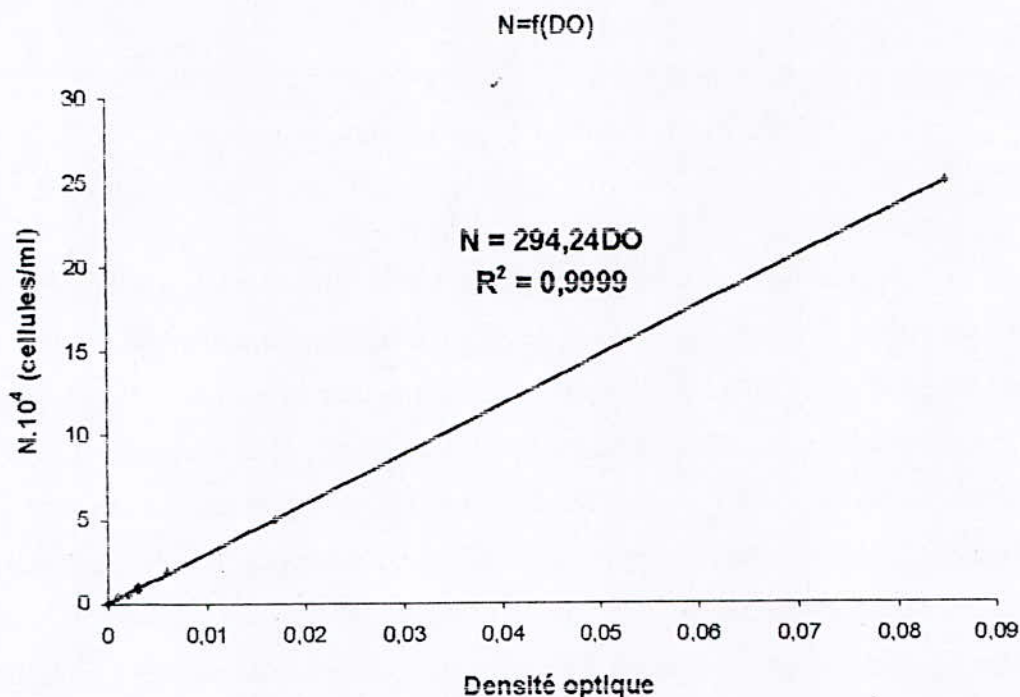


Figure 2 : Courbe d'étalonnage.

IV.3 Résultats :

Nous avons porté $\text{Log}_2[N]$ en fonction du temps, selon (AUDINEAU et col 1986) [32], les différentes étapes de croissances des micro algues sont présentés par $\text{Log}_2[N]$ en fonction du temps.

Les résultats du suivi de la croissance du tetraselmis dans les différentes concentrations de souche dans le milieu de culture sont représentés dans la figure 3 et 4, Tableau 2 et 3.

Souche/MC	1ml/50ml		1ml/100ml	
	10^{-3} Cell/ml	Log_2 (cell/ml)	10^{-3} Cell/ml	Log_2 (cell/ml)
1,000	8,827	13,108	5,885	12,523
2,000	8,827	13,108	29,424	14,845
3,000	29,424	14,845	29,424	14,845
4,000	44,136	15,430	44,136	15,430

6,000	58,848	15,845	14,712	13,845
7,000	58,848	15,845	29,424	14,845
8,000	58,848	15,845	14,712	13,845
10,000	58,848	15,845	14,712	13,845
11,000	14,712	13,845	44,136	15,430
12,000	44,136	15,430	58,848	15,845
13,000	29,424	14,845	5,885	12,523

Tableau 2: Variation de la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* en fonction du temps et pour 1 ml de souche .

Souche/MC	2ml/50ml		2ml/250ml		2ml/500ml	
	10^{-3} Cell/ml	\log_2 (cell/ml)	10^{-3} Cell/ml	\log_2 (cell/ml)	10^{-3} Cell/ml	\log_2 (cell/ml)
1,000	17,654	14,108	8,827	13,108	2,942	11,523
3,000	44,136	15,430	29,424	14,845	14,712	13,845
4,000	117,696	16,845	117,696	16,845	58,848	15,845
5,000	176,544	17,430	88,272	16,430	117,696	16,845
6,000	205,968	17,652	102,984	16,652	117,696	16,845
7,000	941,568	19,845	176,544	17,430	250,104	17,932
8,000	882,720	19,752	147,120	17,167	235,392	17,845
10,000	1530,048	20,545	191,256	17,545	470,784	18,845
11,000	1706,592	20,703	161,832	17,304	132,408	17,015
12,000	1706,592	20,703	156,742	17,258	360,510	18,460
13,000	1677,168	20,678	132,408	17,015	382,512	18,545

Tableau 3 : variation de la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* en fonction du temps et pour 2 ml de souche .

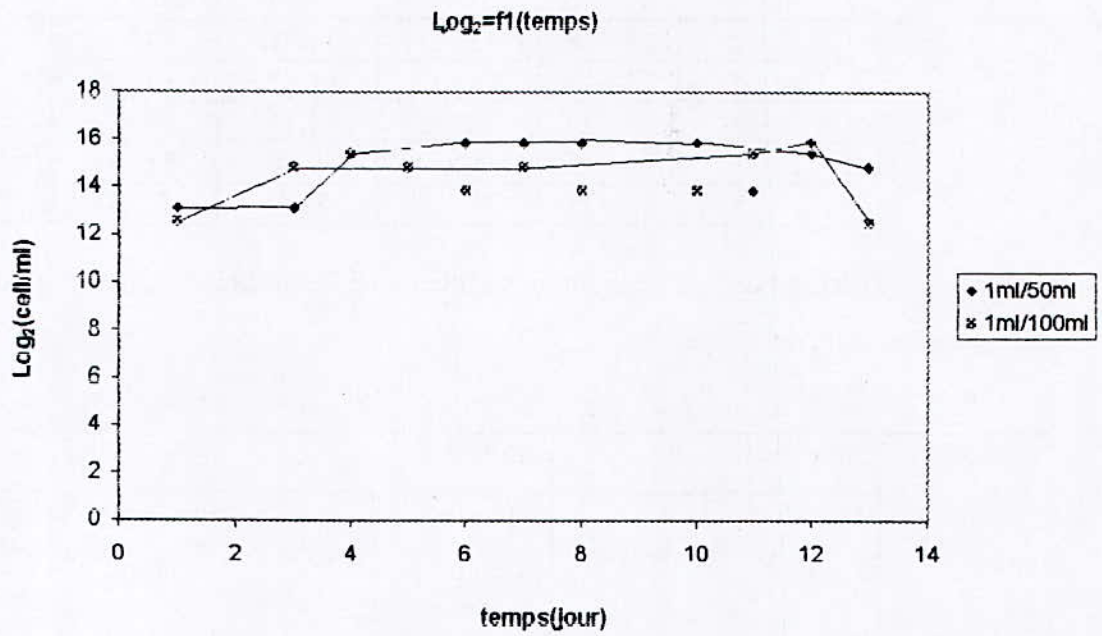


Figure2 : variation de la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* en fonction du temps et pour 1ml de souche .

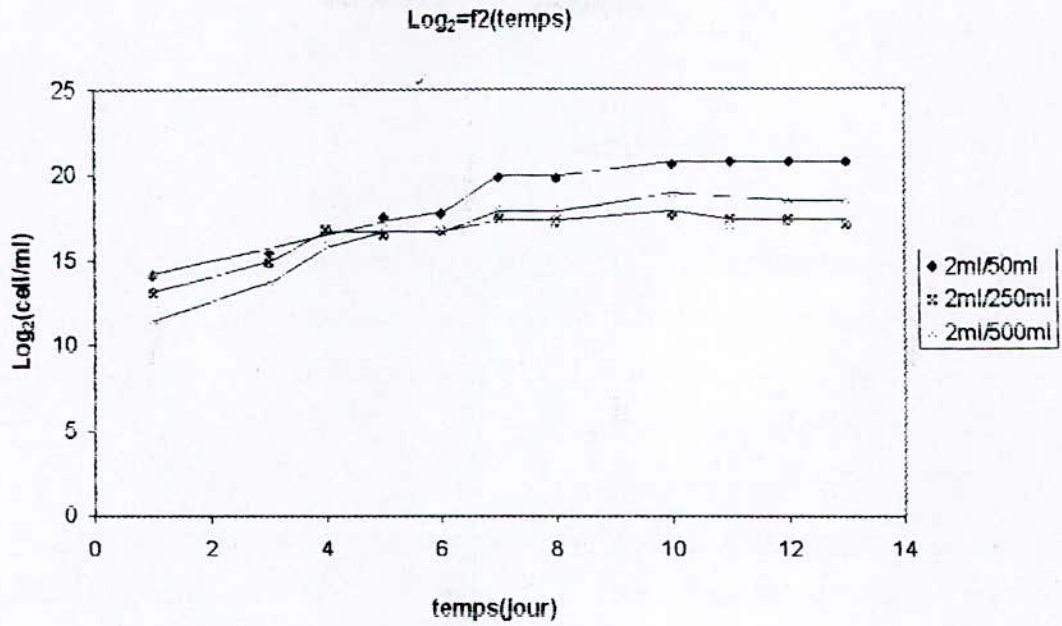


Figure 3: variation de la concentration cellulaire de *Tetrastelmis suecica* en fonction du temps et pour 2 ml de souche .

IV.4 Interprétation :

-Nous constatons d'après le la figure 2 les résultats suivants :

* Pour une concentration 1ml / 50 ml : Le développement de la micro algue *tetrastelmis* dans ce cas , présente une phase de latence de (02) jours , puis une phase exponentielle de (03) jours avec une concentration maximale de $58,848.10^3$ cell/ml et une croissance calculée de la façon suivante : $\frac{[N_{max} - N_0] \cdot V}{t_{max} - t_0} = 0,425.106$ cellules /jour

de 0,546 /j, suivie d'une phase stationnaire de (04) jours , puis une phase de déclin .

* Pour une concentration 1ml / 100ml :Le développement du *tetrastelmis* dans ce cas présente une phase latence de moins de (02) jours, suivie d'une phase exponentielle de (11)

jours avec une concentration maximale de $58,84 \cdot 10^3$ cell/ml et une croissance de $0,486 \cdot 10^6$ /J suivie d'une phase de déclin.

- et nous constatons d'après la figure 3 que :

***Pour une concentration 2ml /50ml :** Après une phase de latence moins de (02) jours, on a une phase exponentielle de (10) jours avec une concentration maximale de $1706,592 \cdot 10^3$ cell/ml, et un taux de croissance de $8,782 \cdot 10^6$ /J, puis une phase stationnaire de (02) jours ; suivie d'une phase de déclin.

***Pour concentration 2ml / 250ml :** Après une phase de latence moins de (02) jours, on a une phase exponentielle d'environ (09) jours avec une concentration maximale de $192,256 \cdot 10^3$ cell/ml et un taux de croissance de $51,08 \cdot 10^6$ cellules /J, Puis une phase de déclin.

*** Pour une concentration 2ml / 500 ml :** Le développement du tetraselmis dans ce cas, présente une phase de latence moins (02) jours suivi d'une phase exponentielle de (09) jours, avec une concentration maximale de $470,784 \cdot 10^3$ cell/ml, et une croissance de $260,95 \cdot 10^6$ /j, suivi d'une phase de déclin avec absence de la phase stationnaire .

IV.5 Discussion et conclusion :

D'après les résultats obtenu, le bon développement de la micro algue tetraselmis serait du au volume élevé du milieu nutritif, donc les sels nutritif ,selon (DAUTA.1982)[11],(FIALA.1978)[26] , (MCLACHLAN.1973)[27].

On conclue donc que la meilleure croissance de la micro algue tetraselmis ($260,95 \cdot 10^6$ cell/jour) est obtenue avec le volume du milieu nutritif le plus élevé (2ml de souche dans 500ml).

V. Etude de la croissance du tetraselmis succica pour différentes concentrations de souches dans le milicu de Conway avec barbotage d'air :

V.1 Montage expérimental :

Nous avons réalisé un bâti pouvant recevoir une lumière artificielle (néons) ainsi qu'un dispositif de barbotage d'air en série (pompe).

V.2 Le protocole expérimental :

Le montage expérimental est donné par la figure 1.

Le protocole expérimental suivi par cette étude est le suivant :

- 1) Allumer le bec bunsen, nettoyer et désinfecter la paillasse sur laquelle on travaille, pour assurer une bonne hygiène et éviter au maximum la contamination de notre algue par le « flux microbien » qui existe dans le labo.
- 2) Stériliser 3 erlenmeyers et 2 tubes à essai, bouchonnés avec du coton enveloppé de papier aluminium, dans une cocote, une demi heure à 100°C, les sortir et les laisser refroidir au moins 6 heures .
- 3) verser 50 mL de milieu de culture (stérilisé) dans chacun des 2 tubes à essai et 100 ml, 250 ml et 500 ml, dans chacun des erlenmeyer respectivement, puis les reboucher.
- 4) avec des pipettes stérilisées, on prélève 2 fois 1ml et 3 fois 2 ml de souche mère, on les verse dans 1tube à essai de 50 ml, 1erlenmeyer de 100 ml, 1tube à essai de 50 ml, 1 erlenmyer de 250 ml et 1erlenmeyer de 500 mL de milieu de culture (stérilisé), respectivement, les reboucher (avec du coton enveloppé de papier aluminium) .
- 5) Agiter et aérer à l'aide d'une pompe à air liée par l'intermédiaire de diffuseurs qu'on plonge dans les erlenmeyers et les tubes à essai de cette expérience , les reboucher (avec du coton et du papier aluminium) .
- 6) laisser reposer à température ambiante sous une lumière (400watt).
- 7) Analyser au colorimètre par rapport à une solution témoin (eau distillée) toutes les 24 heures et à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations de souche définies, on peut exprimer directement les résultats en nombres de cellules par millilitre de milieu de culture .

Souche/MC	2ml/250ml		2ml/500ml	
	10 ⁻³ .cell/ml	Log ₂ (cell/ml)	10 ⁻³ .cell/ml	Log ₂ (cell/ml)
1,000	8,827	13,108	2,942	11,523

2,000	14,712	13,845	14,712	13,845
3,000	29,424	14,845	29,424	14,845
4,000	44,136	15,430	73,560	16,167
6,000	235,392	17,845	205,968	17,652
7,000	323,664	18,304	294,240	18,167
8,000	353,088	18,430	529,632	19,015
9,000	529,632	19,015	411,936	18,652
10,000	500,208	18,932	294,240	18,167
11,000	529,632	19,015	500,208	18,932
13,000	735,600	19,489	401,315	18,614
14,000	735,600	19,489	441,360	18,752
15,000	735,600	19,489	441,360	18,752
16,000	647,328	19,304	353,088	18,430

Tableau 4: Les variations de la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* en fonction de temps et pour différentes concentrations de souche dans le milieu de Conway.

Nous avons porté aussi graphiquement (figure 4) le \log_2 de la concentration en fonction du temps. Nous obtenons, là aussi, 4 phases (latence, exponentielle, stationnaire, déclin).

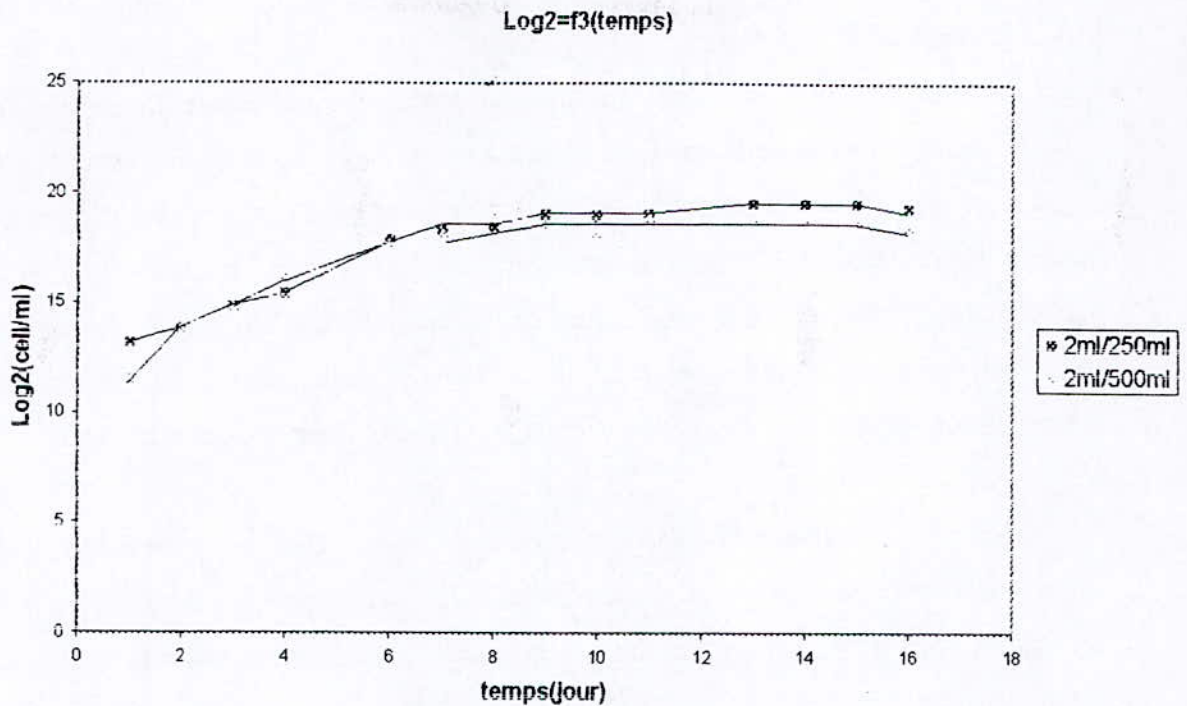


Figure 4: Variation des log₂ de la concentration en fonction du temps (avec barbotage)

V.3 Interprétations :

-Nous constatons d'après la figure 4 que :

* Pour une concentration 2ml / 250 ml : Après une phase de latence moins d'un (01)jour, nous avons une phase exponentielle plus de (12) jours ,avec une concentration maximale de $735,600.10^3$ cell/ml ,et une croissance de $15,26.10^6$ cell/J,Puis une phase stationnaire de (02) jours ,suivi d'une phase de déclin.

* Pour concentration 2ml / 500ml : Nous constatons une phase de latence moins de (01) jour, et une phase exponentielle plus de (07) jours, avec une concentration maximale de $529,632.10^3$ cell/ml, et une croissance de $37,771.10^6$ cell/J, suivie d'une phase stationnaire de (01) jour et une phase de déclin .

V.3 Discussion et conclusion :

La comparaison des résultats obtenus nous fait remarquer que le barbotage a initialement eu un effet négatif sur la croissance, alors que la micro algue *Tetraselmis* se sert du CO₂ pour produire la matière organique (le glucose) et de l' O₂ pour la respiration d'après (LEBORGNE .1986)[22]. Donc la composition de l'air n'a pas un effet inhibiteur sur la micro algue ; c'est en fait la température de l'air qui inhibe la croissance, due à la chaleur dégagée par les néons qui a réchauffé l'air sortant des diffuseurs (32°C), alors que la température pour une croissance maximale de la micro algue se situe entre 16 et 27°C[8] .

Cette température élevée est néfaste pour le milieu car elle a eu pour conséquence d'élever le taux de salinité (au dessus de celui de l'eau de mer qui est de 30%), selon BARNAB(1991)[12], le seuil optimal de la salinité pour la bonne croissance de la micro algue *tetraselmis* est de 25%,

notamment pour les petits volumes, ce qui explique la mort de toutes les cellules existantes dans les cas ,1ml/100ml ,1ml/50ml, 2ml/ 50ml ;

le meilleur développement est donc obtenu avec un volume élevé de milieu nutritif et une luminosité en dessous de 400 watt (10 néons) .

VI. Etude de la croissance du *tetraselmis succica* avec augmentation de volume de milieu de culture :

VI. Le protocole expérimental :

Le montage expérimental est donné par la figure 1

Le protocole expérimental suivi par cette étude est le suivant :

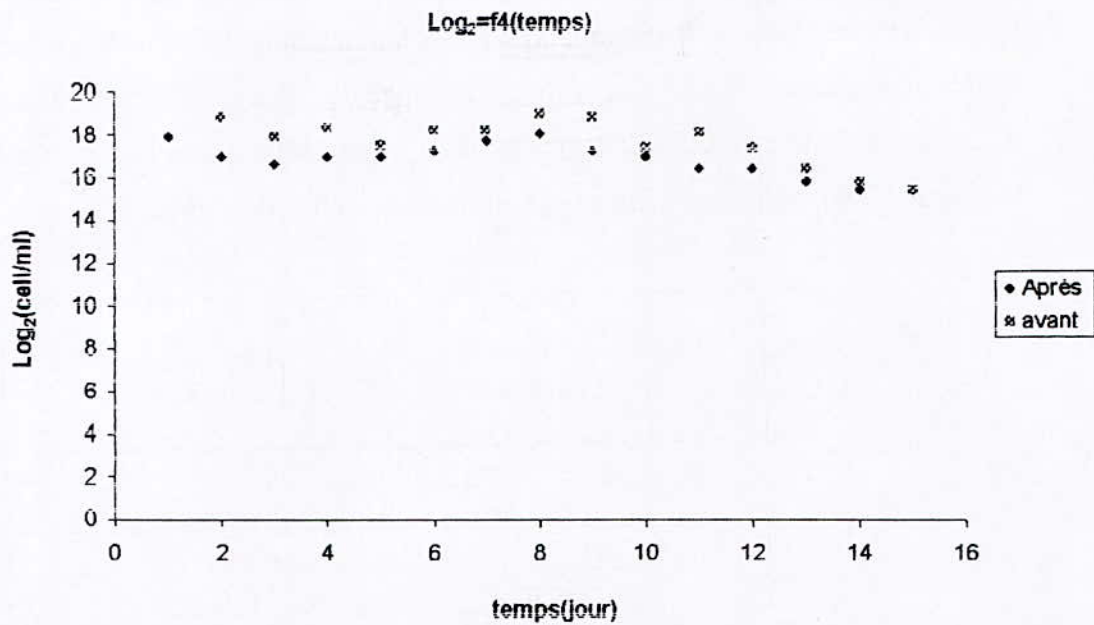
- 1) Allumer le bec bunsen, nettoyer et désinfecter la paillasse sur laquelle on travail, pour assurer une bonne hygiène et éviter au maximum de contamination de notre algue par le « flux microbien » qui existe dans le labo.
- 2) Stériliser à chaque fois une demi heure à 100°C dans la cocote les tubes à essai et les erlenmeyers utilisés, bouchonnés avec du coton enveloppé de papier aluminium, puis les sortir et les laisser refroidir au moins 6 heures .

- 3) le premier jour ; en utilisant une pipette stérilisée ,on prélève 1 ml de milieu de culture (stérilisé) et 1 ml de souche mère dans un tube à essai de 10 ml , le reboucher (avec du coton et du papier aluminium), les jours suivants on rajoute chaque jour le double du volume de milieu de culture du jour précédent .
- 4) Quand le volume du mélange est arrivé à plus de 2000 ml on aère.
- 5) Agiter, reboucher, laisser reposer à température ambiante sous une lumière (400watt).
- 6) Analyser au colorimètre par rapport à une solution témoin (eau distillée) toutes les 24 heures avant et après le rajout du volume de milieu de culture et à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations de souche définies, on peut exprimer directement les résultats en nombres de cellules par millilitre de milieu de culture.

Jour	10^{-3} .cell/ml	Log ₂ (cell/ml)
1,000	250,104	17,932
2,000	470,784	18,845
2,000	132,408	17,015
3,000	250,104	17,932
3,000	102,984	16,652
4,000	353,088	18,430
4,000	132,408	17,015
5,000	191,256	17,545
5,000	132,408	17,015
6,000	323,664	18,304
6,000	161,832	17,304
7,000	323,664	18,304
7,000	220,680	17,752
8,000	529,632	19,015
8,000	279,528	18,093
9,000	470,784	18,845
9,000	161,832	17,304
10,000	176,544	17,430
10,000	132,408	17,015
11,000	294,240	18,167
11,000	88,272	16,430
12,000	176,544	17,430
12,000	88,272	16,430
13,000	88,272	16,430
13,000	58,848	15,845
14,000	44,436	15,803

15,000	44,136	15,430
--------	--------	--------

Tableau 5: Variation de la concentration cellulaire du *Tetraselmis suecica* exprimées en fonction de temps et pour différentes concentrations de souche dans le milieu de Conway.



La figure 5 : Variation des log₂ de la concentration en fonction du temps (avec barbotage)

VI.2 Interprétations :

Dans la figure 5 nous remarquons que à chaque fois que nous rajoutons un volume de milieu de Conway , nous avons après un jour un développement rapide de cellules, au bout de 7eme jour nous avons une concentration maximale de $529,632.10^3$ cell/ml et une croissance calculées de la façon suivante :

$$\frac{(N_{\text{max}} \cdot V_{\text{max}} - N_0 \cdot V_0)}{T_{\text{max}} - t_0} = 9,613.106 \text{ cell/j}$$

$T_{\text{max}} \quad t_0$

VI.3 Discussion et conclusion :

La croissance est plus faible que dans le cas des précédentes expériences à cause des rajouts répétitifs du milieu nutritif, ce qui a pu provoquer probablement la contamination du milieu par des microbes donc les cellules.

On peut conclure que pour éviter toute contamination on prolonge l'intervalle de rajout en commençant par une concentration plus faible de souche dans le milieu de culture.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'étude qui nous a été confiée étant de déterminer les conditions optimales pour la croissance de la *micro algue Tetraselmis Suecica* utilisée dans plusieurs domaines notamment : la pharmacie, les cosmétiques et l'agro-alimentaire .

Nous avons, d'abord, conçu et réalisé un appareil qui nous permette d'avoir une bonne source lumineuse et la possibilité de faire un barbotage.

Dans une deuxième étape nous avons travaillé sans barbotage et la croissance est bien importante

Nous avons, alors refait d'autres manipulations en maintenant le barbotage à différentes concentrations ; les résultats sont moins faibles.

Enfin, nous avons réalisé la même opération en rajoutant de la solution nutritive ; les résultats sont plus faibles encore.

Une suite de ce travail consisterait à mieux contrôler le barbotage et la luminosité et passer à l'échelle semi- pilote

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]: M.M. ALLEN, "methods for cyanophyceae", 127-138p, in hand book of phycological methods, 1973.

[2]: P. AUDINEAU et J. BLANCHELTON, "production d'algues unicellulaires", 1-19p, IFREMER, équipe MEREAE, station : DEVA-SUD, 1986.

[3]: G. BARNABE, «les cultures planctoniques, bases biologiques et écologiques de l'aquaculture » : 67-83p, 1991.

[4]: G. BARNABE et G. PERIGAULT, "collecte et utilisation du phytoplancton produit dans les étangs de lagunage de mèze", 1984.

[5]: A. BECHAGRA, »La culture des micro algues », ISMAL, 1996.

[6]: W.E BECKER, et L. VENKATARAMAN, « manual on the cultivation and processing of green algae », 20p, C.F.T.R.I, 1976.

[7]: M. BELKOURA. et A. DAUTA., « caractéristiques photosynthétiques de chlorella sorokiniana (shihira & krauss), en relation avec l'intensité lumineuse et la température corrélation avec le taux de croissane » : 30(1) : 3-9p, 1994.

[8]: B. BERLAND, «contribution à l'étude des cultures de diatomées marines », 40(56) : 316p, recueil des travaux de la station marine d'ENDOUME, 1966.

[9]: P. BOUGIS, «écologie du plankton marin » I : 196p, 1974.

[10]: P. BOURRELLY. « les algues d'eau douce, initiation à la systématique » I : 572p, 1990.

- [11]: P. BOURRELLY : « les cyanophycées, algues ou bactéries » : 5-9p, revue, algologie, 1979.
- [12] : L. DABADIE, « résultats et connaissances acquises grâce à des cultures intensives des microalgues sur lisier de porcherie »
B. annls. limnol : 233-245p, 1985.
- [13]: A. DAUTA « conditions de développement du phytoplancton étude comparative du comportement de huit espèce en culture » : 217-262p, 263-292p, Annls. Limnol, 1982.
- [14]: M. DETASSIGNY, « les algues d'eau douce », 13 : 3-11p, la pisciculture française, aquariphilie, 1968.
- [15]: FANCIULLI « production contrôlée en éclosérie de phyto et de zooplancton », rapport MEDRAP, 109-124p, (1987).
- [16]: M. FIAL « culture d'algues in JAQUES. G phytoplancton, biomasse, production, numération et culture », 77-85p, 1978.
- [17]: P. GAYRAL, « les algues morphologie, cytologie, reproduction, écologie » : 165p, DOIN éditeur, 1975.
- [18]: R.R.L. GUILLARD, « methods for micro flagellates and nanoplankton », 69-86p, in hand book of phycereological methods, 1973.
- [19]: M. GUERRI, L. BRUNEL ; A. DAUTA « interaction de la lumière et de la température sur le taux de la croissance de *scenedesmus crassus* » 17(2) : 97-104p, Annals . Limnol, 1981.
- [20]: G.P. HARRI, « photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. Erybnisse der limnologie. 10 : 1-163p, 1978.
- [21]: G. JAQUES., « production photosynthétique du milieu prélogique, perspectives, d'amélioration », 1975.

[22]: ILLAING et M. HELM « factors affectig the semi-continious production of tetraselmis succica : (kylin)

[23] : P. LAVENS et P. SORGELOOS, « La culture des micro algues », Laboratoire de l'aquiculture et du centre de référence d'artemia ,Université de Gent, Belgique ,2003

[24]: A. LEBORGNE et G .PAULMIER. « le milieu naturel et ces variations », le milieu biologique, la conchyculre française. ISTPM, 1.69-71, 1974.

[25]: Y. LEBORGNE, « la culture des microalgues » : 181-192p, aquaculture, 1986.

[26]: J. MCLACHLAN, « growth media marine », dans hand book of phycological méthodes, 25-51p, 1973.

[27]: A. MOYSE. « les bases scientifiques des perspectives nouvelles d'utilisation de la photosynthèse, la culture accéléré d'algues », (32) (34) : 101-128p, 1956.

[28]: A. W. H. NICHOLS “ growth media fresh water”, 7-24p, dans hand book of phycological methods, 1973.

[29] : A. OTERO, J. fábregas, “changes in the nutrient composition of tetraselmis suecica cultured and renewal rates”.

[30] : B. RAVAIL et J. M. ROBERT, « influence de la salinité sur la multiplication du skeletonema costatum dans les eaux etuariennes de la loire » Cryptogamie VI01 : 51-60 p, 1985.

[31]: F. REIRIZ, M. J., PEREZ-CAMACHO, A. FERREIRO, M. J., BLANCO, J., CAMPOS, M. J ET LABARTAU, U., « biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine micro algae”,

[32] : J. C. RLAND et B. VIAN « ATLAS de biologie végétale », France, 1990.

[33] : Robert. R et Trintignac « Micro algues et nutrition larvaire en éclosionerie de mollusques » France, 1997.

[34]: J.H.ROBIN, elevage annexe algue 76 : 13-17p, aquaculture marine nouvelle, 1981.

[35]: C.SOROKIN, "dry weight, packed cell volume and optical density" dans hand book of phycological methods, 321-343p, 1973.

[36] : P.VIVIER et E .MANGUIN., « les algues d'eau douce et leur intrêt en pisciculture », 137-155p de pisciculture, première année n°192, 1943.

[37]: www.cibnor.mx/colecciones/malgas/ites-1.php

[38]: www.microalgae.com

[39] :www.sea-river.com/eau/aqua01-5.php

ANNEXE

ANNEXE

Cell :Cellules

J :Jour

Log₂[N]: logarithme à base 2,c'est-à-dire que $\text{Log}_2[N] = \frac{\text{Log}[N]}{\text{Log}2}$

Log2

MC :Milieu de Culture

N0 : nombres de cellules au point initiale

Nmax : Nombre de cellules au point maximal

t0 :le temps de croissance au point initiale.

tmax le temps de croissance au point maximal

V0 : Volume du milieu initiale

Vmax volume du milieu au point maximum