

PRODUCTION D'ALGUES UNICELLULAIRES A DES FINS D'AQUACULTURE

Jean-Pierre FLASSCH

C.O.B., B.P. 337, 29273 BREST Cedex

RESUME :

L'élevage d'algues marines et de postlarves dépend de la chaîne alimentaire qui inclue toutes les tailles nécessaires d'algues et de proies. Une telle unité fonctionne depuis 1973 au C.O.B. à Brest et est à la base de toute recherche expérimentale sur les mollusques, les crustacés et les poissons marins. Dans cet article, la technique de production d'algues unicellulaires en culture semi-continue (20 l.) aussi bien qu'en unité de production de 60 l. est décrite.

Une nouvelle technique simplifiée d'introduction des sels minéraux et des vitamines a été étudiée dans un système semi-continu. L'unité de production de masse testée pendant ces trois dernières années a donné toute satisfaction et est décrite ici en détail.

SUMMARY : *Production of unicellular algae for aquaculture.*

Large-scale rearing of marine larvae and postlarvae depends upon a food chain including all the necessary sizes of algae and prey. Since 1973, at the Centre Océanologique de Bretagne, a unit has been functioning at the basis of all experimental research on mollusks, Crustacea and marine fish. In this paper, techniques for the production of unicellular algae in a semi continuous culture (20 l.), as well as a production unit (60 l.), are described.

A new and simplified technique for the input of mineral salts and vitamins has been improved in a semi continuous system. The mass production unit tested last three years has given full satisfaction and is described here in detail.

INTRODUCTION

Le plancton de nature végétale est la base de la production en matière organique des mers et demeure le point de départ de toute chaîne alimentaire.

Les algues intéressant l'élevage d'animaux marins sont pour la plupart unicellulaires ou en chaîne. Il s'agit du nanoplancton dont la taille varie entre 2 et 20 μ . De rares espèces sont à retenir dans l'ultramicroplancton, inférieur à 2 μ , et dans le microplancton dont la taille se situe entre 20 et 200 μ .

Lorsqu'il faut suppléer la nature dans la production de jeunes, de la larve au juvénile, la tendance est d'accroître la capacité de cette nourriture de base, soit en favorisant sa croissance dans le milieu naturel plus ou moins contrôlé, soit en créant de toute pièce ce premier chaînon.

Dans le premier cas, il s'agit des "eaux vertes" à potentialité multispécifique dans l'espace et dans le temps, eaux dont l'ensemencement est réalisé à partir d'algues colonisant l'étendue d'eau concernée, ou concentrées à partir du milieu naturel ; cette méthode est couramment utilisée par l'école japonaise.

Dans le second cas, la production est mieux contrôlée, et le point de départ de cette culture est constitué par un inoculum monospécifique concentré. Un élevage de ce type peut être utilisé dans sa totalité au bout d'un temps variable selon les systèmes, ou en partie, c'est la technique semi-continue, ou encore en continu. Il s'agit là d'un cas particulier, le chémostat, qui est difficilement utilisable dans des conditions de production à long terme pour des raisons technologiques.

Les facteurs limitant sont : l'énergie lumineuse, la température et la concentration en sels minéraux et vitamines du milieu de culture, les exigences variant en fonction des espèces.

Dans tous les cas, des sels sont ajoutés la plupart du temps à base de nitrates et de phosphates. En règle générale, le rendement d'une culture (poids sec par unité de volume par unité de temps) pour une espèce donnée est inversement proportionnel au volume de l'élevage.

LES ESPECES

L'espèce choisie dépend de l'utilisation que l'on veut en faire, de la facilité avec laquelle on peut se la procurer, de la facilité avec laquelle elle peut être cultivée et enfin de sa qualité nutritive.

Les algues couramment employées sont les suivantes, selon, pour la plupart, la classification de PARKE et DIXON (1968).

Diatomées (ou Bacillariophycées) :

Cyclotella, *Thalassiosira*, *Coccinodiscus*, *Skeletonema*
Chaetoceros, *Thalassiothrix*
Nitzschia, *Phaeodactylum*

Parmi ces genres, seule *Phaeodactylum tricornutum* est très aisée à cultiver à forte concentration, mais ne présente pas un très grand intérêt du fait de son faible pouvoir nutritif. Cette espèce est eurytherme et se trouve en condition optimale entre 18 et 26°. Les autres genres sont couramment produits mais plus délicats à cultiver, même en volumes de 20 litres. *Chaetoceros calcitrans* semble être une algue très bien assimilée mais demeure une des plus difficiles à contrôler. Cette espèce supporte mal les salinités à 35‰ et se cultive plus facilement entre 20 et 30 ‰ à 16°C.

Haptophycées :

Isochrysis galbana Parke (3 à 5 µ)
Pseudoisochrysis virginica Dupuis (3 à 5 µ)

sont considérées comme les algues de base pour tout élevage larvaire de mollusques. Leur production en grand volume reste plus délicate mais est très possible, en 60 l ; en culture semi-continue la concentration varie de 5 à 15 10⁶ ζ/ml.

Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) (3 à 5 µ) (CHRETIENNOT-DINET, 1977)

constitue avec *Isochrysis galbana* et *P. virginica* l'une des trois espèces les plus couramment employées pour l'élevage des mollusques bivalves. Sa concentration en volumes de 20 litres varie de 10 à 20 10⁶ ζ/ml et en 60 litres de 5 à 15 10⁶ ζ/ml. Les conditions optimales d'éclairement de ces trois espèces se situent autour des 4000 lux au niveau de la culture. *I. galbana* et *P. lutheri* sont des algues de climat typiquement tempéré, leur gamme de température optimale varie entre 16 et 20°. Par contre *P. virginica* peut supporter des températures supérieures jusqu'à 24°C.

Prasinophycées :

Platymonas (Tetraselmis) suecica Kylin (10-12 μ)

P. tetrahele C.S. West (10-15 μ)

Tetraselmis maculata Butch (10-18 μ)

Pyramimonas obovata N. Carter (3-5 μ)

P. suecica, algue de climat tempéré, supporte très bien les fortes densités en 20 l, 60 l de 2 à 3.5 10^6 \varnothing /ml. Vu sa taille, elle est utilisée par les larves d'herbivores ainsi que par les adultes. Ses qualités nutritives semblent excellentes. Elle sert jusqu'à présent comme nourriture de base pour Rotifères et *Artemia* si besoin est. Elle est couramment utilisée dans les élevages d'huîtres (WALNE, 1976), d'ormeaux (FLASSCH et al., 1977), de pénéides. Son rendement optimal s'obtient autour de 10 000 lux pour un apport de CO_2 à 1 % dans le but de stabiliser le pH et de fournir une source de carbone supplémentaire. Au-delà de 22°C, le contrôle de la culture est plus difficile, la sédimentation augmentant.

Chlorophycées :

Dunaliella

Chlamydomonas

Chlorella

Nannochloris

Les deux premiers présentent un bon taux de croissance mais sédimentent très facilement et ont une qualité nutritive médiocre (PERSON-LE RUYET, 1975).

Au sujet des chlorelles marines, les renseignements sont assez contradictoires, car elles sont souvent considérées comme toxiques.

Les tests effectués sur *Nannochloris oculata* (Droop) donnent de bons résultats sur les élevages de Rotifères. En ballon de 20 l, les concentrations sont de l'ordre de 50 10^6 \varnothing /ml en culture semi-continue. *N. oculata* est très eurytherme et peut supporter des températures jusqu'à 28°C.

Dynophycées :

Gymnodinium splendens Lebour (53 μ)

Les péridiens sont souvent toxiques, toutefois *G. splendens* semble donner de bons résultats sur les larves d'anchois. Ce dinoflagellé est cultivé ordinairement à 12 ‰ dans un milieu additionné d'extrait de terre (LINDEN, 1973). Mais il a été possible au C.O.B. d'adapter cette espèce à 35 ‰ et au milieu de Conway. Cette espèce est fragile et ne supporte pas à forte concentration un éclairage inférieur à 3000 lux, ni un brassage important. La croissance optimale se situe entre 20-27° à 5000 lux.

SCHEMA DE PRODUCTION

Les milieux de culture

Les algues sont cultivées dans une eau de mer enrichie en sels minéraux et en vitamines. Ces sels sont stockés concentrés. La composition de ce milieu varie selon les auteurs, mais il est toujours constitué de nitrates sous forme potassique ou sodique, de phosphates, de traces de métaux, d'un chélateur et d'une solution vitaminique.

Les milieux utilisés sont fonction des espèces cultivées mais varient surtout en fonction des laboratoires où ils ont été mis au point, compte-tenu des

qualités physico-chimiques de l'eau environnante (milieux de Conway, de Woods Hole, de Milford) : WALNE, 1966 ; GUILLARD, 1972 ; UKELES, 1975.

Pour parvenir à son volume d'utilisation, la culture doit suivre une voie bien classique (Fig. 1). Toutes les manipulations sont effectuées à la flamme. Le milieu de Conway est utilisé en routine.

"Volume élémentaire"

Ce volume élémentaire permet d'assurer la production de cultures de haute qualité qui jouent le rôle d'inoculum pour des volumes plus importants dans des conditions de contrôle moins rigoureuses.

Le schéma de principe de cette unité élémentaire diffère selon les cas (Fig. 2). Ce volume fait partie d'une chaîne de production.

Quel que soit le système adopté, la culture doit être utilisée lorsqu'elle se trouve encore dans sa phase exponentielle, phase de jeunesse cellulaire. Dans le cas 1, il y a utilisation totale de la culture ; dans le cas 2 d'une culture semi-continue, le soutirage est partiel avec régénérescence toutes les 24 heures. A ce niveau, un bon contrôle technologique doit être assuré car le volume élémentaire est garant de la production algale sur le plan qualitatif ainsi que sur le plan quantitatif (Fig. 3). Un soutirage quotidien du 1/4 du volume 6 jours sur 7 limite le vieillissement de la culture en lui conservant une concentration constante (WALNE, 1966).

La nécrose des algues se déposant lors du soutirage ou lors du brassage par aération est évitée par des injections de vapeur à 120°. Il ne s'agit pas ici d'une stérilisation mais d'un nettoyage efficace.

Les tubulures d'admission (milieu + vapeur, air) peuvent être en pyrex, ce qui alourdit l'installation, ou en matière siliconée stérilisable résistant à la lumière, du type exacenal (COB).

L'isolement de l'enceinte d'élevage vis-à-vis du milieu est très important. Le bouchon peut être en coton, métallique ou en caoutchouc gris-bleu à durée limitée ; ces trois types de fermeture sont déconseillés car s'avèrent à long terme de mauvais isolants ou de fabrication et d'utilisation délicates. Seul le bouchon en Versilic, produit siliconé stérilisable présente les qualités d'isolement et de résistance. Son seul défaut est d'être onéreux.

Pour des quantités importantes, la confection du milieu de culture (eau de mer + sels + vitamines) constitue une source de pollution non négligeable.

Les sels peuvent être ajoutés à l'eau de mer préfiltrée. Le milieu ainsi constitué est stocké plusieurs jours au noir dans un container susceptible d'être nettoyé à la vapeur, puis est redistribué à la demande par gravité sur les volumes après filtration à 0.22 μ (WALNE, 1966 ; FLASSCH et al., 1974). Le débit de distribution est faible et à long terme le milieu stocké est colonisé par des ciliés. Ces ciliés, s'ils sont arrêtés au niveau du filtre, changent néanmoins rapidement la formulation du milieu.

Une autre possibilité consiste à distribuer sels et vitamines directement au niveau du volume élémentaire, ce qui supprime cuve de mélange et récipient de stockage. Le produit nutritif peut être ajouté à la flamme en soulevant le bouchon. Cette technique simple peut satisfaire quelque temps mais s'avère difficilement reproductible, la pollution (ciliés, champignons, microalgues) limitant la durée de vie de la culture.

Une technique mise au point au COB donne entièrement satisfaction depuis 1 an. Elle consiste, à l'aide de seringue et aiguille, en l'injection des sels nutritifs au travers d'un tube à vide de faible dimension mais aux parois épaisses (10 mm) (Fig. 3). Cette injection s'effectue selon les normes sanitaires dans la veine d'eau de mer filtrée lors du remplissage du volume élémentaire

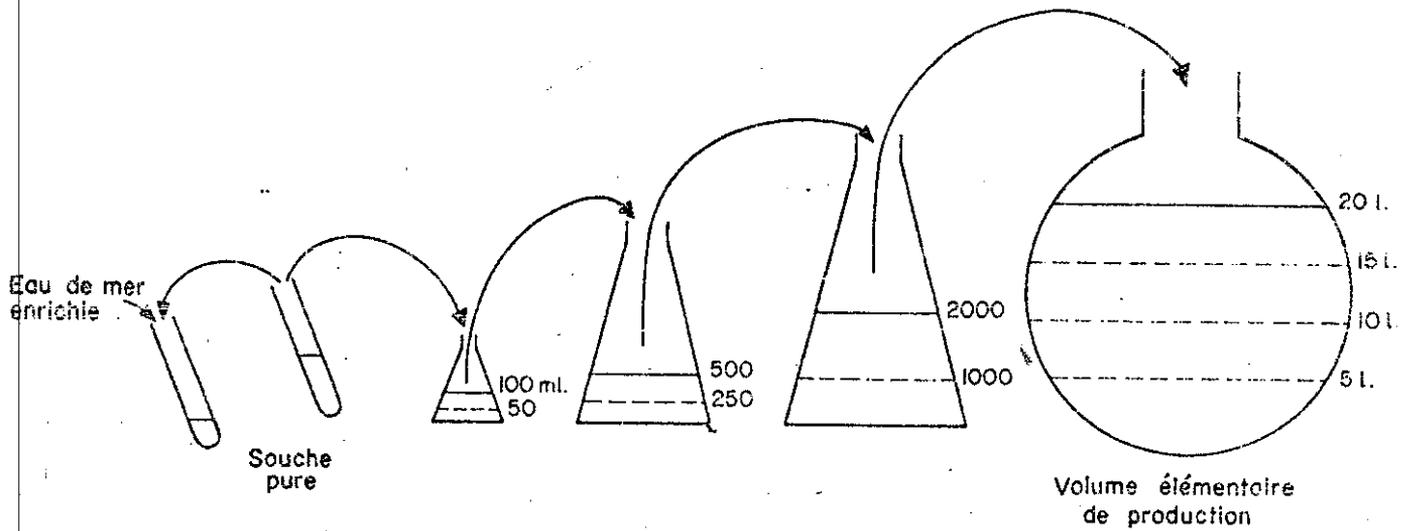


Fig. 1 - SCHEMA D'UTILISATION D'UNE CULTURE.

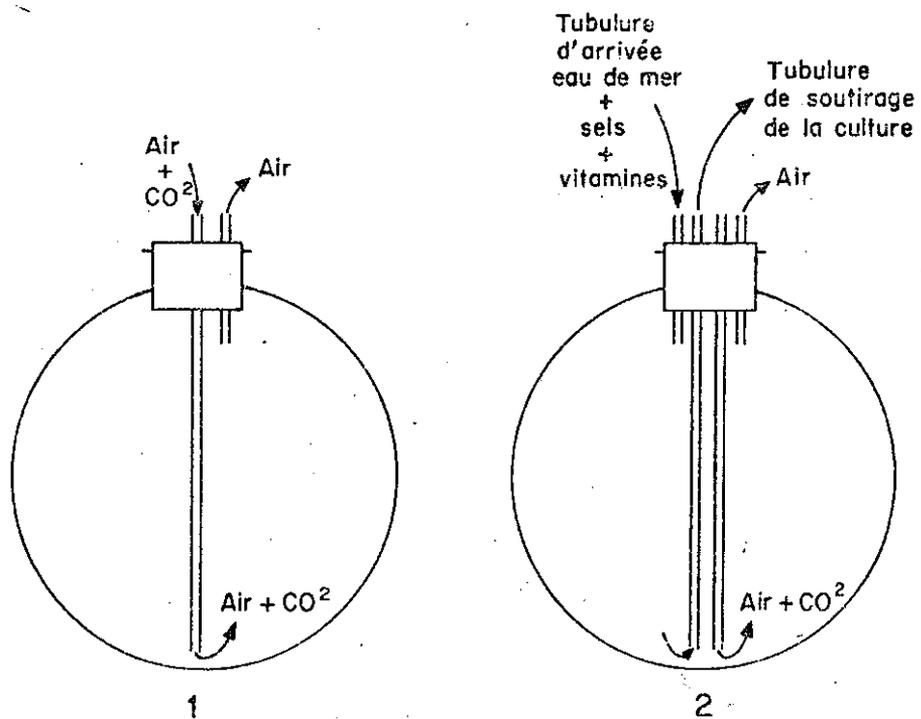


Fig 2 - VOLUME ELEMENTAIRE DE PRODUCTION.

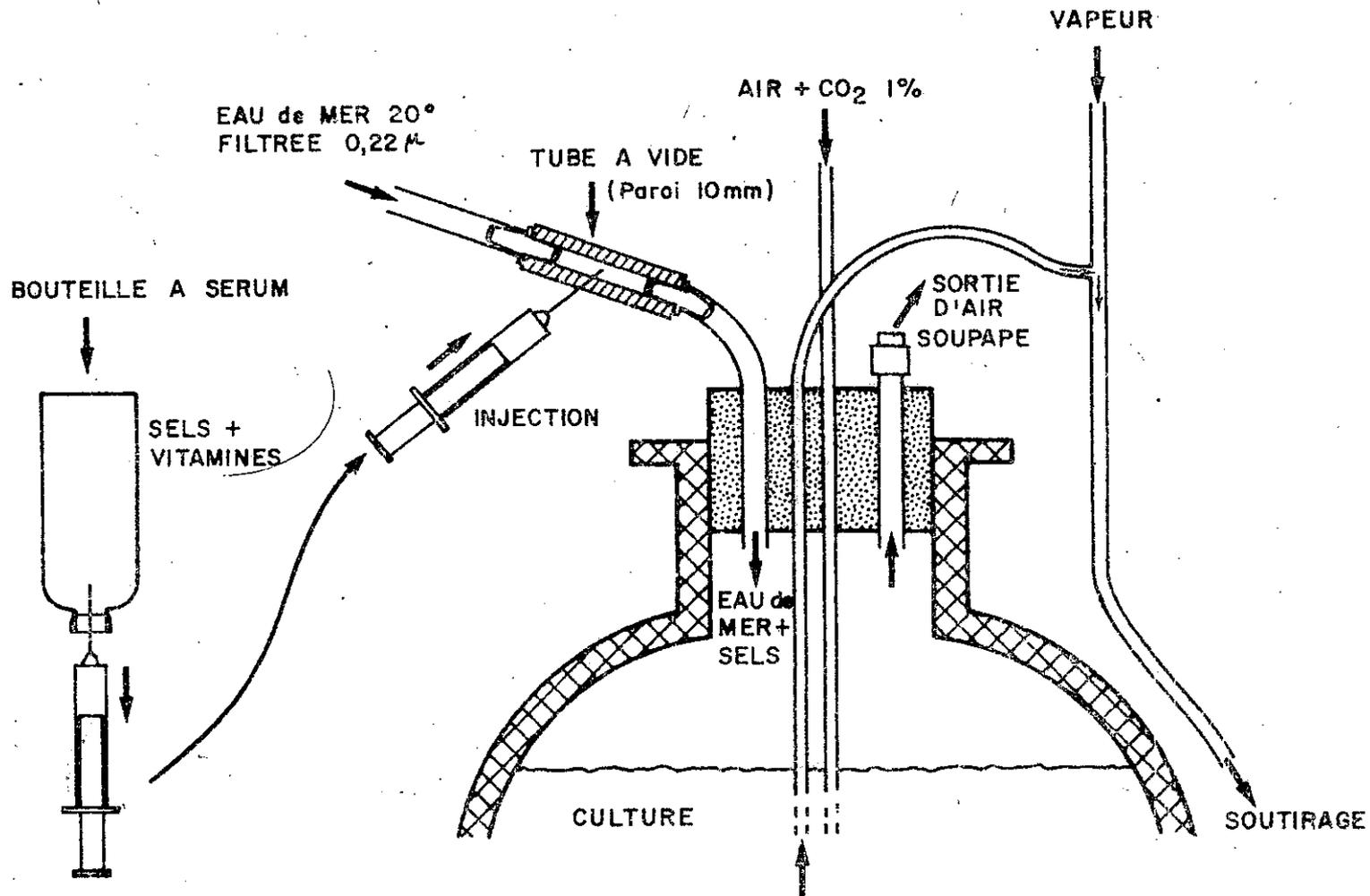


Fig.3 - DETAIL DU SYSTEME D'ALIMENTATION DU VOLUME ELEMENTAIRE

après soutirage. Le trou créé par l'aiguille se referme automatiquement du fait de l'épaisseur de la paroi.

Ce système est aussi utilisé dans une salle d'algue de terrain (module expérimental de production d'ormeaux d'Argenton) sans utilisation de vapeur et a donné jusqu'à présent toute satisfaction.

Il s'agit là de la technologie de base, d'entretien de souches jusqu'à l'exploitation d'une culture en production contrôlée où tous les paramètres sont sensés être connus : apport en air + CO₂, énergie lumineuse, apport en milieu, évolution de la culture, température, pH.

La production "aval"

En aval, les techniques sont variées et évoluent rapidement. A ce sujet, les données susceptibles d'être trouvées dans la littérature, mais portant sur des résultats obtenus à long terme, sont très rares, tant sur le plan expérimental que dans le domaine industriel.

Nous sommes encore à l'heure actuelle en aquaculture dans une phase de débroussaillage et toute technique "d'avant garde" est gardée secrète, même si elle est rapidement abandonnée. Le tableau 1 laisse toutefois entrevoir les possibilités offertes par la technique de production contrôlée.

Dans le cadre de la définition d'un outil de production stéréotypé à des fins d'élevage, il était nécessaire de mettre au point un volume de production contrôlée adapté aux conditions tempérées (interdisant toute production extérieure programmée toute l'année) susceptible de fournir régulièrement la quantité de nourriture nécessaire à la conduite des élevages. La culture en cuves de plusieurs centaines de litres a été poursuivie durant deux années (FLASSCH et al., 1974) et a été remplacée par la culture en sacs polyéthylène présentant un rendement bien supérieur (2.5 10⁶ cellules/ml de *P. suecica* en 4 jours pour 1.5 10⁶ cellules/ml dans le même temps) avec un encombrement et une main d'oeuvre moindres. Le volume de production est constitué de deux gaines en polyéthylène de deux mètres de haut emboîtées l'une dans l'autre (Fig. 4) dont la partie inférieure est terminée en cône (soudé à chaud) de façon à faciliter au maximum l'homogénéisation obtenue par aération à l'aide d'une tige de verre. L'air additionné de CO₂ à 1 % contenu sous pression constante dans un tube à vide est distribué dans les unités de production par le jeu d'aiguilles hypodermiques piquées dans la veine de distribution d'air. Sans robinetterie, il est ainsi possible d'obtenir une gamme de débits du fluide différents correspondant aux diamètres des aiguilles utilisées. Cette production en sacs polyéthylène donne entière satisfaction depuis 1973.

Les dimensions standard utilisées sont les suivantes : gaine de 350 mm de large, 15/100 mm d'épaisseur ; volume de production : 50 à 80 litres. La gaine extérieure est réutilisée jusqu'à usure (parfois plusieurs mois), la gaine contenant la culture effectue 4 cycles de production (Inoculum et 3 repiquages à partir de 7 litres de cultures). Chaque cycle de production dure 3 à 5 jours suivant l'espèce, pour un Inoculum variant de 4.10⁵ Z/ml dans le cas de *P. suecica* à 10⁶ Z/ml pour *I. galbana*.

La quantité d'air à 1 % de CO₂ distribuée est de l'ordre de 7,5 l par litre de culture pour toutes des espèces d'algues contrôlées.

En aquaculture tropicale (Centre Océanologique du Pacifique), la technologie est constituée par une forme identique mais fixe en polyester. Cette technologie donne aussi d'excellents résultats.

	Milieu naturel mois favorable : mars-avril	TAMIYA 1959 (Japon)	RÝTHER 1972 (U.S.A.)	C.O.B. 1974 (France)	I.F.P. (Mexique)
Espèces	variées	<i>Chlorella sp.</i> eau douce	variées	<i>P. suecica</i>	<i>Spirulina</i>
g Sec/m ³ /jour	1.8 (-5 m détroit de Géorgie)	80	20	380	24
g Sec/m ³ /jour intégré pour toute la colonne d'eau	0,4 à 19	9	9	90	12
Lumière	naturelle	naturelle	naturelle	artificielle 9 000 lux	naturelle
Thermorégulation	-	1/2 +	1/2 +	+	-
Température	variable	variable	variable	20°C	variable
Brassage mécanique	-	+	+	-	-
Observations	-	bassin en ciment D = 15m P = 0,2	bacs polyesters D = 1,10m P = 0,5	polyéthylène en sac U = 60 l S = 0,25 m ² 4 U/m ²	bassins rectan- gulaires ; sur- faces variables P = 0,5

TABLEAU 1 : Tableau comparatif de production phytoplanctonique

STOCKAGE

Afin de rentabiliser au maximum une salle d'algues, il est nécessaire de normaliser la production par stockage. La concentration du produit devient alors évidente, soit par filtration, soit par centrifugation. La filtration est très vite abandonnée compte-tenu des difficultés techniques, le débit étant très faible et le colmatage immédiat.

La centrifugation reste le seul moyen pour concentrer les algues à des débits raisonnables. Le procédé idéal serait d'obtenir à volonté toutes les gammes d'hydratation au débit le plus élevé possible et à une vitesse de rotation relativement faible (2 à 6000 tours/minute), afin de respecter la viabilité de l'espèce considérée.

Les centrifugeuses type écrémeuses donnent de bons résultats, mais le produit obtenu est encore très hydraté et les ultracentrifugeuses sont d'utilisation moins commode (BURLEW, 1964).

Le type de centrifugeuse présentant le maximum d'avantages est une centrifugeuse décanseuse à bol de taille raisonnable pesant 300 kg, fonctionnant à un débit de 100 litres à 1 m³/h suivant la taille du produit à concentrer à partir de 2 µ. Très facile d'emploi, elle peut aussi être utilisée pour la récolte sauvage lors de poussées phytoplanctoniques naturelles.

A titre d'exemple, la correspondance moyenne volumes-poids obtenus par concentration est la suivante pour *P. suecica* : à 2 10⁶ Cellules/ml, 100 litres de cultures, 100 g humide, 36 g sec (étuve 60°, 4 jours).

Cette démarche va de pair avec la possibilité de stockage. L'algue congelée en pâte à -25° est stockée, remise en solution lors de l'emploi. Il s'agit là de proies mortes. La nourriture donnée de cette façon rend très bien sur des élevages de Rotifères et d'*Artemia* pour des volumes de production, mais n'a pas encore été testée à une dimension suffisamment représentative sur les élevages de bivalves afin de tirer des conclusions définitives. De l'état de pâte, l'obtention d'un produit lyophilisé ne pose plus de problèmes. De la concentration au stockage de proies mortes, on débouche naturellement sur les problèmes liés à la reviviscence des phytoflagellés.

A partir de produits concentrés 25 fois, il est possible d'obtenir la reviviscence d'une culture de *P. suecica* en utilisant des cryoprotecteurs. Les tests effectués après un mois de congélation sont positifs et le meilleur résultat est obtenu avec glycerol à 10 % (FLASSCH et al., 1975).

Si cette voie de recherche aboutissait, serait rendu possible le stockage, sous forme concentrée, de gros inoculum susceptibles d'être utilisés comme point de départ de cultures en grands volumes. Ainsi, les unités de terrain dépendant d'une production en proies vivantes pourraient se passer de la première étape : la production en milieu contrôlé nécessitant une technologie très spécialisée.

CONCLUSION

Cette unité de production d'algues unicellulaires comprend donc 3 niveaux : le premier en eau stagnante stérile, va de la souche à l'inoculum destiné à l'ensemencement du "volume élémentaire" ; le second correspond à la série des volumes élémentaires (ballons sphériques de 20 litres) fonctionnant en système semi-continu et assurant un produit stable et de haute qualité ; le troisième niveau définit la production, l'unité en sacs "polyéthylène" permet une production contrôlée de routine stable avec une technologie simple et un coût réduit (FF 0,40 le litre) pour une unité de recherche expérimentale.

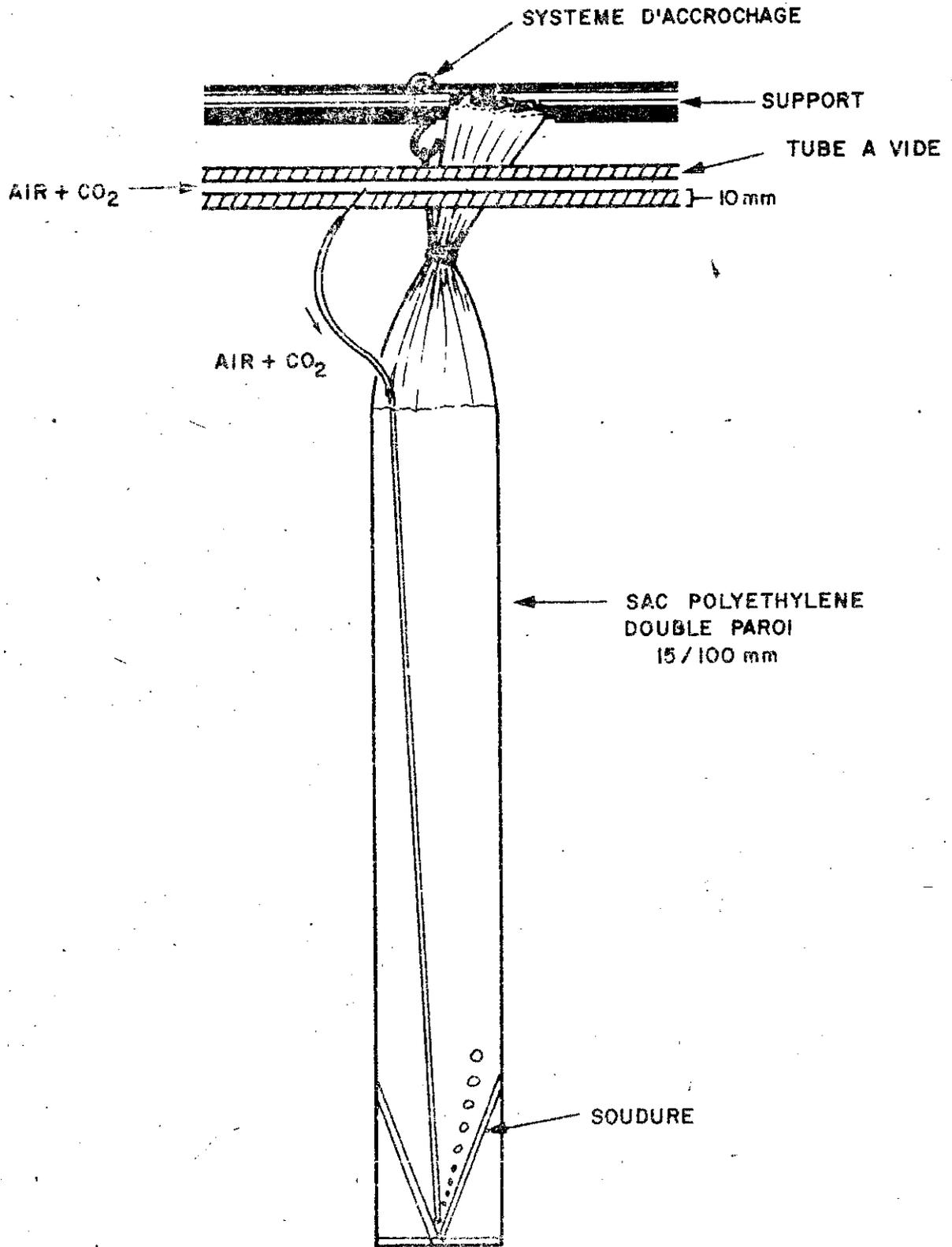


Fig. 4 - SCHEMA D'UNE UNITE DE PRODUCTION.(50 à 80 l.)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BURLEY J.S. (ed.), 1964 - Pilot plant studies in the production of *Chlorella*. In "Algal culture from laboratory to pilot plant". Carnegie Institution of Washington Publication 600, Washington D.C. : 235-272.
- CHRETIENNOT-DINET M.J., 1977 - Les Nannoflagellés. Problèmes systématiques et écologiques. Océanis, 3 (3) : 29-67.
- GUILLARD R.R.L., 1972 - Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Proceedings of the Conference on Culture of Marine Invertebrate animals. Greenport Plenum Press. New-York 1975 : 29-60.
- FLASSCH J.P. et Y. NORMANT, 1974 - Mise en place d'une unité de production d'algues au Centre Océanologique de Bretagne : premiers résultats. Informes técnicos del Instituto de Investigaciones científicas, 14 : 57-61.
- FLASSCH J.P., SAULAN G. et Y. NORMANT, 1975 - Viability of a phytoflagellate after freezing. Proceedings of the sixth annual Meeting World Mariculture Society : 423-428.
- FLASSCH J.P. et E. WOITELIER, 1977 - L'élevage de l'ormeau, *Haliotis tuberculata* L. 1- Action d'un régime alimentaire d'algues phytoplanctoniques sur la croissance post-larvaire. 3rd Meeting of the ICES Working Group on Mariculture, Actes de Collôques du CNEOX, 4 : 287-305.
- LINDEN L., 1973- Optimum light and temperature requirements for *Gymnodinium splendens*, a larval fish food organism. Fish. Bull., 7 (2) : 599-601.
- PARKE M. and P.S. DIXON, 1968 - Check-list of British Marine Algae. Second revision. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 48 : 783-832.
- PERSON - LE RUYET J., 1975 - Technique d'élevage en masse d'un rotifère (*Brachionus plicatilis* Müller) et d'un crustacé branchiopode (*Artemia salina* L.). 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, 1 : 331-343.
- RYTHER J.H., DUNSTAN W., TERNORE K.R. and J.E. HUGUENIN, 1972 - Controlled Eutrophication. Increasing Food Production from the Sea by Recycling Human Waters. Bio. Sci., 22 (3) : 144-152.
- TAMIYA H., 1959 - Culturing and possibility of utilizing as food or feed of *Chlorella*. Proceedings of the Symposium on algology. New-Delhi : 383-389.
- UKELES R., 1973 - Continuous culture. A method for the production of unicellular algal foods. In J.R. Stein (ed.). Handbook of phycolgical methods culture methods and growth measurements. Cambridge Univ. Press : 253-256.
- WALNE P.R., 1966 - Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. L. Fish. Invest., Min. Agric. Fish. Lond., 2 : 25-53.