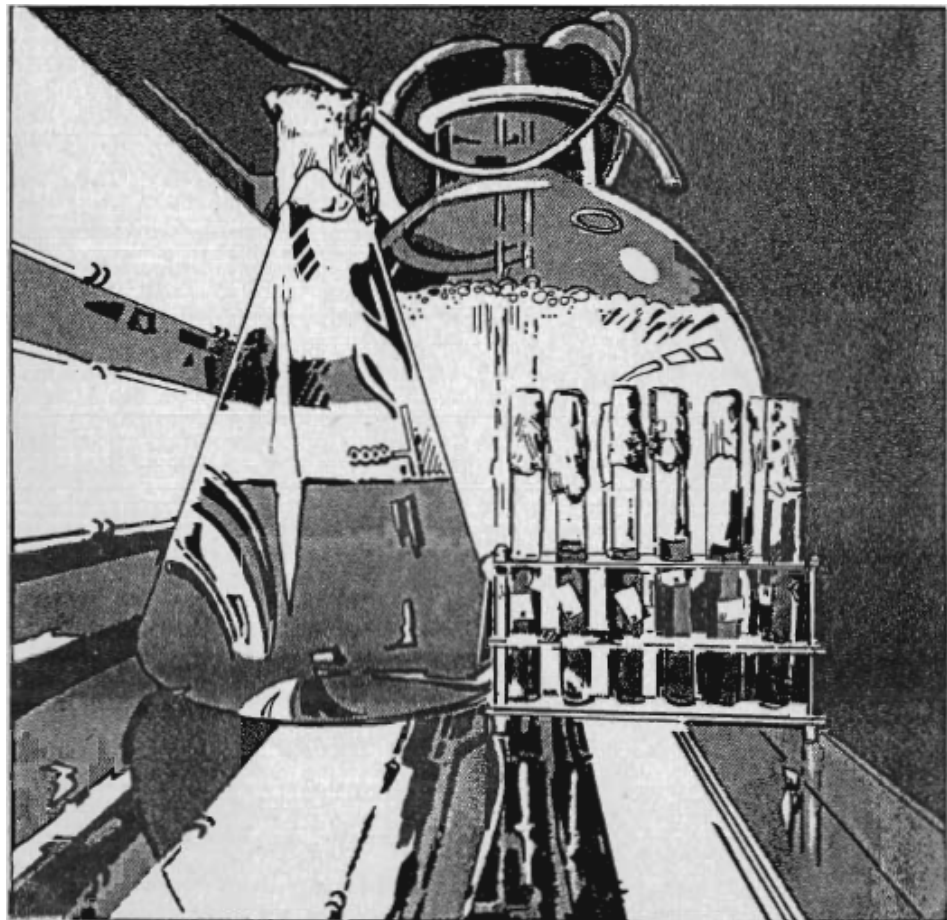


Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>

ifremer

Station de Palavas 1985-86

Production d'Algues unicellulaires



Audineau

Blancheton

0007365
ORL07365
SISN46271

H761
AUD
L

S O M M A I R E

INTRODUCTION	
I. DESCRIPTIF DES DIFFERENTES FAMILLES LES PLUS COURAMMENT TROUVEES DANS LE MILIEU NATUREL ET CULTIVEES EN LABORATOIRE.	P.1 P.1
II. CONDITIONS GENERALES DE CULTURE	P.7
II.1. Thermorégulation	P.7
II.2. Lumière	P.7
II.3. Eau de mer - Eau douce	P.7
II.4. Réseau d'air	P.7
II.5. Matériel divers	P.7
II.6. Eau de mer artificielle	P.8
II.7. Eléments nutritifs majeurs	P.8
II.8. Milieu de culture	P.9
II.8.1. Milieu de Conway	P.9
II.8.2. Milieu adapté à l'eau de mer artificielle	P.10
II.8.3. Milieu vitaminique	P.10
III. TECHNIQUE DE CULTURE	P.11
III.1. L'entretien des souches	P.11
III.1.1. Principe	P.11
III.1.2. Méthode	P.12
III.2. Mise en route d'une culture	P.12
III.3. Maintien de la culture en continu	P.12
III.4. Culture bloom	P.13
IV. ISOLEMENT	P.13
IV.1. En milieu liquide	P.13
IV.2. Sur milieu solide	P.13
IV.3. Par dilution	P.13
V. STERILISATION	P.14
VI. COMPTAGE	P.14
VII. VALEUR NUTRITIVE	P.15
VIII. STOKAGE	P.16
VIII.1. Centrifugation	P.16
VIII.2. Congélation	P.16
VIII.3. Cryopréservation	P.16
IX. DESCRIPTION DE LA SALLE D'ALGUES	P.17
X. APPROCHE DU PRIX DE REVIENT DU LITRE D'ALGUES	P.18
CONCLUSION	P.19

IFREMER Bibliothèque de PALAVAS



100 42112

INTRODUCTION

Les algues planctoniques monocellulaires sont des organismes autotrophes. Elles représentent le point de départ de la chaîne alimentaire et constituent le premier maillon de la production primaire.

On les trouve en forte concentration dans le milieu naturel au printemps et à l'automne, périodes où les conditions de température et de salinité sont propices à leur développement et où les disponibilités en sels minéraux adéquates sont importantes.

La production de ces algues répond à la demande alimentaire des larves de bivalves, et de Pénéides. Elle permet aussi le développement de cultures de rotifères. Le choix des espèces exploitées est conditionné par leur valeur nutritive, leur taille et leur facilité d'élevage.

La taille des cellules alguales varie de 2 à 100 microns. Il en existe un grand nombre de familles, celles-ci étant déterminées selon différents critères :

- Constitution de la membrane,
- Disposition des flagelles,
- Composition des cellules etc...

I. DESCRIPTIF DES DIFFÉRENTES FAMILLES LES PLUS COURAMMENT TROUVÉES DANS LE MILIEU NATUREL ET CULTIVÉES EN LABORATOIRE.

I.1. Place systématique des principaux genres du phytoplancton marin (D'après PARKE et DIXON, 1968 et HENDEY, 1964)

Toutes les classes d'algues marines sont reportées. Seuls les ordres (ou sous-ordres) comportant des formes planctoniques sont mentionnés. Certains genres signalés ne sont pas vraiment planctoniques mais sont cultivés couramment au laboratoire.

Cyanophycées

O. Nostocales

Oscillatoria (*Trichodesmium*), *Nostoc*, *Richelia*.

Rhodophycées

Cryptophycées

O. Cryptomonadales

Hemiselmis, *Cryptomonas*.

Dinophycées

O. Prorocentrales

Exuviella, *Prorocentrum*.

O. Dinophysiales

Amphisolenia, *Dinophysis*, *Phalacroma*, *Ornithocerus*.

O. Péridiniales

Amphidinium, *Cochlodinium*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Warnowia*, *Polykrikos*, *Oxyrrhis*, *Noctiluca*, *Glenodinium*, *Peridinium*, *Gonyaulax*, *Pyrodinium*, *Ceratium*, *Goniodona*, *Oxytoxum*, *Cladopyxis*, *Podolampas*, *Oodinium*, *Blastodinium*.

O. Phytodinales

Pyrocystis.

Haptophycées

0. Isochrysidales *Dicrateria, Isochrysis.*
 0. Prymnésiales *Chrysochormulina, Prymesium, Phaeocystis.*
Coccolithophorides Acanthoica, Calciosoleinia, Calyptosphaera,
Cricosphaera, Crystallolithus, Pontosphaera, Syracosphaera, Coccolithus,
Chylococcolithus, Rhabdosphaera.

Chrysophycées

0. Ochromonadales *Dinobryon.*
 0. Chromulinales *Chromulina, Monochrysis, Pseudopetinella.*
 0. Dictyochaes (*Silicoflagellés*).

Craspédophycées

Xanthophycées

0. Hétérochloridales *Olisthodiscus, Phacomonas.*

Bacillariophycées

0. Bacillariales

- S.O. Coscinodiscinées *Coscinodiscus, Cyclotella, Melosira, Planktoniella,*
Porosira, Skeletonema, Stephanopyxis, Thalassiosira,
 S.O. Biddulphiinées *Biddulphia, Cerataulina, Ditylum, Eucampia,*
Hemiaulus, Chaetoceros, Bacteriostrium.
 S.O. Rhizosoleniinées *Corethron, Dactyliosolen, Lauderia, Leptocylindrus,*
Shroederella, Guinardia, Rhizosolenia,
 S.O. Fragilariinées *Asterionella, Thalassionema, Thalassiothrix,*
 S.O. Naviculinéés *Nitzschia, Phaeodactylum.*

Phaeophycees

Prasinophycées

0. Pyramimonadales *Pyramimonas, Platymonas, Tetraselmis,*
 0. Halosphaerales *Halosphaera.*

Chlorococcales

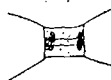
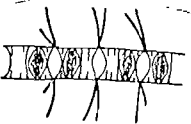

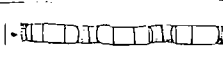
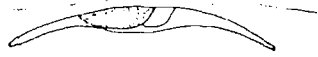

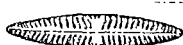
0. Volvocales *Dundiella, Carteria, Chlamydomonas,*
 0. Chlorococcales *Chlorella, Nannochloris.*

Euglenophycées

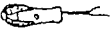

- Euglena.*

I.2. Tableaux des familles et des genres


FAMILLES DES BACILLARIOPHYCEES

GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATIONS EN CULTURE	TAILLE EN MICRON
Chaetoceros Calcitrans	Marron		$5 \cdot 10^6$ \varnothing /ml	4 - 5 μ m
Chaetoceros Curvisetus	Marron		/	7 - 30 μ m
Thalassiosira Pseudonana	Marron		/	12 - 40 μ m
Skeletonemas Costatum	Marron		$3 \cdot 10^6$ \varnothing /ml	5 - 8 μ m
Phaeodactylum Tricornutum	Marron		$5 \cdot 10^6$ \varnothing /ml	8 μ m
Cylindrothéca	Marron		$5 \cdot 10^6$ \varnothing /ml	6 μ m
Nitzschia Seriata	Marron		/	80 - 140 μ m
Navicula Distans	Marron		/	70 - 120 μ m

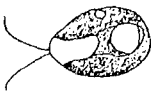

FAMILLE DES HAPTOPHYCEES

GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATION EN CULTURE	TAILLE EN MICRON
Isochrysis Galbana	Brune		$17 \cdot 10^6$ ϱ /ml	2 - 3 μ m
Pavlova Lutherie (Monochrysis)	Brune		$15 \cdot 10^6$ ϱ /ml	2 - 3 μ m
Pseudoisochrysis				

FAMILLE DES PRASINOPHYCEES

GENRE	COULEUR	FORME	CONCENTRATION EN CULTURE	TAILLE EN MICRON
Platymonas Suecica (Tetraselmis)	Verte		$2 \cdot 10^6$ ϱ /ml	8 - 10 μ m
Pyramimonas Grossii	Verte		/	8 - 10 μ m

FAMILLE DES CHLOROPHYCEES

! GENRE	: COULEUR :	FORME	: CONCENTRATION EN	: TAILLE EN MICRON !
!	:	:	: CULTURE	:
! Dunaliella Tertiolecta	: Verte :		: 2 - 10 ⁶ ζ/ml	: 8 - 10 μm !
!	:	:	:	!
!	:	:	:	!
! Chlorelle Stigmatophora	: Verte :		: 40 - 10 ⁶ ζ/ml	: 1 - 2 μm !
!	:	:	:	!
!	:	:	:	!
! Nannochloris	: Verte :		: 40 - 10 ⁶ ζ/ml	: 1 - 2 μm !
!	:	:	:	!
!	:	:	:	!
!	:	:	:	!


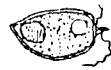
FAMILLE DES CRYPTOPHYCEES

! GENRE	: COULEUR :	FORME	: CONCENTRATION EN	: TAILLE EN MICRON !
!	:	:	: CULTURE	:
! Rhodomonas Baltica	: Rouge :		: 2 - 10 ⁶ ζ/ml	: 8 - 10 μm !
!	:	:	:	!
!	:	:	:	!

FAMILLE DES CYANOPHYCEES

!	GENRE	: COULEUR :	FORME	: CONCENTRATION EN :	TAILLE EN MICRON !
!		:		: CULTURE :	!
!	Spiruline	: Verte :		:	!
!		:		:	!
!		:		:	!
!		:		:	!

FAMILLE DES DYNOPHYCEES (Péridinien)

!	GENRE	: COULEUR :	FORME	: CONCENTRATION EN :	TAILLE EN MICRON!
!		:		: CULTURE :	!
!	Gymnodinium Splendens	: Brune :		: 2 à 300/ml :	53 µm !
!		:		:	!
!		:		:	!
!	Prorocentrum Micans	: Brune :		: 2 à 300/ml :	48 µm !
!		:		:	!
!		:		:	!
!		:		:	!

II. CONDITIONS GENERALES DE CULTURE

II.1. Thermorégulation

La régulation thermique est assurée par une climatisation suffisamment puissante pour pallier le dégagement thermique des rampes d'éclairage et maintenir une température comprise entre 18 et 20°C, température moyenne qui satisfait les exigences des espèces cultivées. Pour le bon maintien de la climatisation, la salle est thermiquement isolée.

II.2. Eclairage artificiel

Les cultures sont maintenues sous un éclairage de tubes fluorescents de 40 et 60 watts placés verticalement. Les tubes utilisés sont de type "blanc industrie" ou "Warm White".

Pour des raisons de sécurité les boîtiers d'éclairage sont étanches.

L'intensité lumineuse préférentielle pour l'ensemble des espèces cultivées varie de 3.500 à 5.000 lux.

Pour obtenir une production maximale l'énergie lumineuse est fournie 24 heures sur 24.

II.3. Réseau eau de mer - eau douce

La méthode de culture proposée nécessite l'utilisation de l'eau de mer et de l'eau douce.

L'eau douce est principalement utilisée pour la constitution de l'eau de mer artificielle, celle-ci étant utilisée pour obtenir des cultures à forte concentration.

L'eau de mer est uniquement utilisée pour le maintien des souches et la mise en route des cultures.

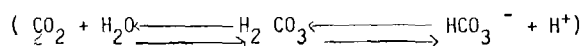
II.4. Réseau d'air et de gaz carbonique

L'air surpressé est insufflé à une pression de 0,4 bars. On y adjoint 2 à 3% de gaz carbonique. Le débit d'air est réglé à l'entrée de la salle et au niveau des gaines et des chémostats*. L'air enrichi de CO₂ est introduit au niveau des cultures à l'aide de cannes de verre.

Un filtre à cartouches peut être disposé en amont du circuit pour limiter la contamination bactérienne.

L'air apporte aux algues l'oxygène et le gaz carbonique et permet l'agitation du milieu pour le maintien des algues en suspension. Compte-tenu des conditions d'élevage en période totalement diurne, un apport en CO₂ est indispensable pour obtenir des concentrations importantes. Il permet d'une part le maintien du pH.

(mis en solution il va réagir avec l'eau pour donner de l'acide carbonique puis s'ioniser pour donner du bicarbonate qui stabilisera le pH).



d'autre part il constitue une source de carbone pour les algues.

II.5. Matériel divers

- un stérilisateur cylindrique horizontal de 0,2 m³ convertible en générateur de vapeur
- 2 pompes centrifuges utilisées respectivement pour le transport des algues, et pour le transport des fluides à travers des filtres.
- Filtres (de type Cuno) de 5 et 1 µm, filtre à membrane multipore de 0,45 ou 0,22 µm
- réfrigérateur
- distillateur
- chauffe-eau
- évier, paillasse, hotte pour repiquage
- rouleau de gaine 20/100ème et 40 cm à plat
- balance, microscope, agitateur, plaque chauffante.

* Chémostat : Ballon utilisé pour la culture en continue.

Verrerie : - 15 chémostats ou corps de réacteur
 - erlen meyer, becher, tube à essai, support de tubes
 - canne de verre
 - bouchons et tuyaux siliconés stérilisables

Autres petits matériels de laboratoire

Rangements.

II.6. Eau de mer artificielle : Composition pour 100 litres à une salinité de 25‰.

Na Cl	2,2 kg	
K Cl	22,4 g	sels à dissoudre avant
Ca Cl ₂	48,3 g	de rajouter le Mg SO ₄
Na H CO ₃	14,4 g	

Mg SO ₄	250, g	

II.7. Éléments nutritifs majeurs

- L'azote

Généralement apporté sous forme de Na NO₃ ou K NO₃. L'azote est aussi assimilé sous forme de N.NH₄.

- Phosphore

Est employé sous forme de Na H₂ PO₄. Le glycérophosphate de sodium parfois utilisé présente l'inconvénient de précipiter à la chaleur.

- La silice

Nécessaire uniquement pour les diatomées, elle est apportée sous forme de métasilicate de sodium Na SiO₃ qui se dissout dans l'eau douce.

La solution précipite à l'eau de mer si elle n'est pas stabilisée avec du H Cl à un pH proche de 2.

- Micro-éléments inorganiques

Ils sont employés sous forme de sels (chlorure ou sulfate) solubles. Les éléments précipitent ce qui nécessite l'apport d'un chélateur Na₂ E.D.T.A.

Le fer est également chélaté sous forme d'un complexe assimilable Na - Fe.

Les principaux métaux utilisés sont le cobalt, le cuivre, le manganèse, le molybdène, le zinc.

- Micro-éléments organiques.

Trois vitamines sont généralement employées :

La cyanocobalamine B12

La thiamine B1

La biotine

Les vitamines sont stérilisées par filtration car elles sont détruites à la chaleur. Elles doivent être conservées à l'abri de la lumière et au frigidaire.

II.8. Milieux de Culture

II.8.1. - Le milieu de Conway est utilisé pour l'enrichissement de l'eau de mer naturelle. Il convient à l'ensemble des souches d'algues cultivées.

MILIEU DE CONWAY

A utiliser essentiellement pour l'eau de mer naturelle.

SOLUTION PRINCIPALE

1 litre H₂O

Na ₂ EDTA	45 gr	
Na NO ₃	100 gr	Nitrate de Na
H ₃ BO ₃	33,6 gr	Acide Borique
NaH ₂ PO ₄	20 gr	Dihydrogénophosphate de Na
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,36 gr	Chlorure de Manganèse
FeCl ₃ 6H ₂ O	1,3 gr	Chlorure Ferrique

Trace de métaux 1 ml

Dosage : 1 ml par litre d'eau de mer

SOLUTION trace de métaux

Zn cl ₂	2,1 gr
Co cl ₂ 6H ₂ O	2,0 gr
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,9 gr
Cu SO ₄ 5H ₂ O	2,0 gr

Eau distillée: 100 ml

1 ml/l de solution principale + HCl pour dissoudre les sels et aussi obtenir 1 solution limpide.

SOLUTION VITAMINIQUE

Thiamine aneusiné Hydrochloride (B ₁)	200 mg
Cyanocobalamine (Vit B ₁₂)	10 mg
Eau distillée	100 ml

Dosage : 0,1 ml/litre d'eau de mer.

SOLUTION Silicatée pour diatomées

4 mg Na₂ SiO₃ 5H₂O pour 100 ml eau distillée

Dosage : 2,5 ml/litre d'eau de mer.

II.8.2. - Milieu adapté à l'eau de mer artificielle.

Solution I à ajouter à l'eau artificielle : 1 cc/l de milieu

H ₂ O	1000 cc	
Na NO ₃	150	Solution à stériliser à l'autoclave
Na H ₂ PO ₄	20 g	
NH ₄ Cl	50 g	

Solution II : métaux à ajouter à l'eau de mer artificielle 1cc/l de milieu.

H ₂ O	1000 cc	dissoudre le Fe Cl ₃ puis le Na ₂ EDTA
Fe Cl ₃ anhydre	4,33 g	mélanger doucement
Na ₂ EDTA	10,22 g	laisser reposer 1/2 heure
		ajouter les solutions a,b,c,d,e
Solution a,b,c,d,e	2,25 cc	stériliser la solution finale.

Solution a	Zn SO ₄	2,2 g/100 cc	
Solution b	Ca SO ₄	0,98 g/100 cc	solution à préparer
Solution c	Mn Cl ₂	18 g/100 cc	individuellement et
Solution d	Co Cl ₂	1 g/100 cc	à conserver
Solution e	Na MO O ₄	1,26g/100 cc	

II.8.3. Milieu vitaminique

Il est constitué à partir d'eau distillée stérilisée.

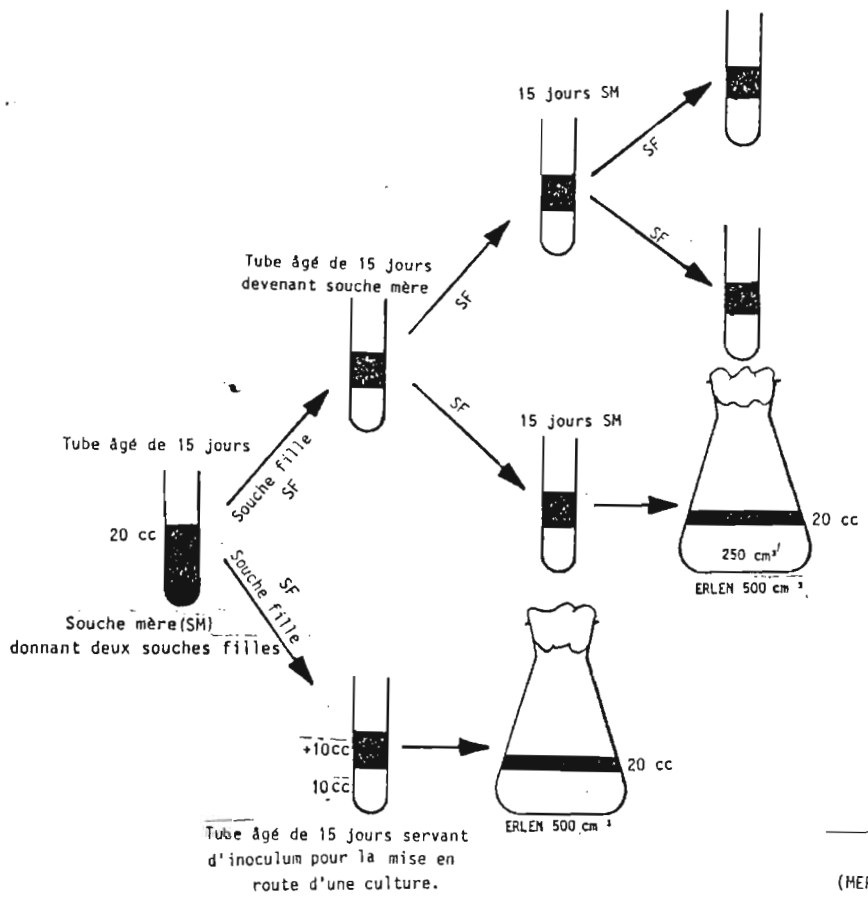
La solution vitaminique doit être conservée à l'abri de la lumière et de la chaleur.

Solution vitaminique 0,1 cc/litre de milieu

H ₂ O	100 cc
B12	50 mg
B1	1 g

III. TECHNIQUE DE CULTURE
III.1. L'entretien des souches
III.1.1. Principe

Les souches doivent être repiquées tous les quinze jours afin de les maintenir en bonne condition. Cette durée entre chaque repiquage est idéale pour conserver des cellules jeunes avec un bon potentiel de multiplication. Le repiquage consiste à dédoubler une souche mère pour obtenir deux souches filles. Une souche fera, au bout de quinze jours, office de souche mère. L'autre souche fille permettra une éventuelle mise en route d'une culture.



DEROULEMENT SCHEMATIQUE DE L'ENTRETIEN DES SOUCHES ET DE LA MISE EN ROUTE D'UNE CULTURE

III.1.2. Méthode

Les tubes servant au repiquage sont remplis de 10 ml d'eau de mer enrichie avec du milieu de conway (cf page 9) à raison de 1 ml par litre d'eau de mer.

Ils sont ensuite bouchés avec du coton cardé et fermés avec une feuille d'aluminium. Une stérilisation de l'ensemble est indispensable pour éviter toute contamination. Une petite précipitation apparaîtra après la stérilisation, mais celle-ci n'altère en rien la qualité du milieu.

L'apport de vitamine est fait après refroidissement à l'aide d'une seringue équipée du filtre à membrane de 0,45 ou 0,22 micron (la solution vitaminique se dégrade à la chaleur).

Le repiquage s'effectuera dans la zone stérile autour de la flamme d'un bec de bunsen, et de façon la plus aseptique possible.

III.2. Mise en route d'une culture

Elle consiste à passer progressivement du tube à essai à un volume de 4,350 litres. Cette étape dure vingt jours et se fait sans aération : on parle de culture stagnante.

On utilise l'eau de mer naturelle jusqu'au passage en chémostat de 20 litres. La culture intensive démarre à partir du volume de 4,350 litres. Pour cela, l'apport de 2 à 3% en volume de CO₂ dans l'air est bénéfique. La concentration maximale est atteinte au bout de 5 ou 6 jours. On effectuera à ce stade le passage en chémostat. Le volume est augmenté progressivement jusqu'à 20 litres par apport d'eau de mer artificielle. Le volume final est obtenu au bout de 5 à 7 jours.

On utilise l'eau de mer artificielle pour deux raisons : obtention d'une forte concentration de cellules algales et fiabilité de la culture. (cf milieu de culture page 10).

III.3. Maintien d'une culture en continu

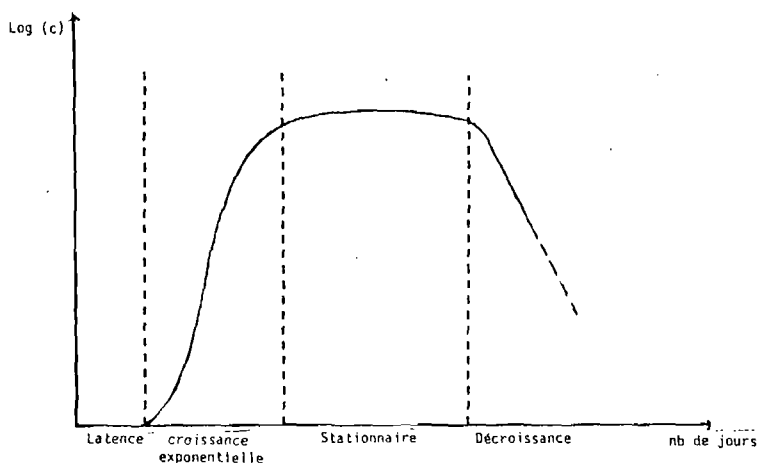
Une culture en continu n'est possible que si le milieu n'est pas contaminé. Pour cela les étapes précédentes auront été effectuées de façon la plus axénique possible. En général le maintien en culture continue ne dépasse pas trois semaines : au delà des problèmes apparaissent soit de contamination, soit de vieillissement des cellules.

La culture en continu consiste à maintenir des algues jeunes à une concentration importante, c'est-à-dire en phase de croissance exponentielle. Il est donc indispensable, pour éviter le vieillissement des cellules de renouveler chaque jour le quart du volume de culture par un apport d'eau de mer artificielle enrichie. Les algues seront utilisées pour la mise en culture du bloom, (production en gaines).

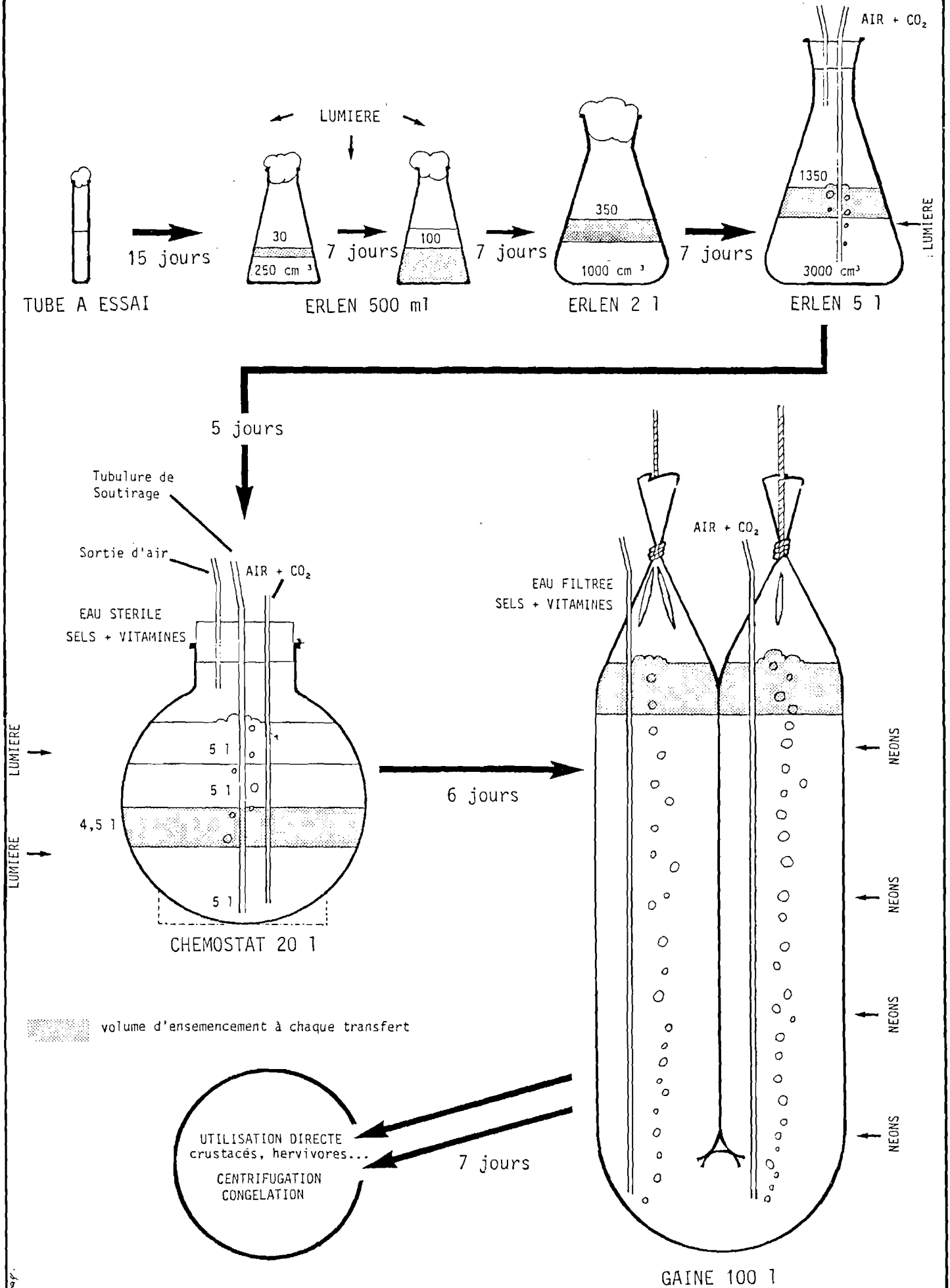
L'intérêt de la culture continue est d'avoir à disposition des algues jeunes à forte concentration, pour l'ensemencement de volumes plus importants. Un chémostat permet l'inoculation d'algues de qualité pendant une période de trois semaines.

Courbe de développement

- On distingue quatre phases :
- phase de latence
 - phase exponentielle
 - phase stationnaire
 - phase de décroissance



SCHEMA DE FONCTIONNEMENT GENERAL DE LA SALLE PHYTO
 PROGRESSION SCHEMATIQUE DE LA MISE EN ROUTE D'UNE CULTURE



La phase de latence est due à l'adaptation des cultures avant une reprise de la multiplication. Plus la culture est âgée, plus la phase de latence est longue d'où l'intérêt de repiquer la souche pendant la phase exponentielle.

III.4. Culture de bloom

Elle permet d'obtenir rapidement (environ 7 à 10 jours) une concentration maximale de cellules algales dans un volume de 100 litres. Les algues sont généralement utilisées dès l'atteinte du plateau de concentration. Il est déconseillé de les laisser trop longtemps à ce stade car les cellules vieillissent vite et meurent. La dégradation de cette matière organique induit en général un développement bactérien, cette culture n'étant pas axénique.

L'utilisation des gaines* plastiques jetables a l'avantage d'éviter le nettoyage des bassins de culture. Les gaines sont pliées puis suspendues à chaque extrémité, ce qui supprime les soudures souvent défectueuses. Elles sont ensuite remplies d'eau douce non stérile. L'eau de mer artificielle est reconstituée par apport de sels (cf milieu de culture page 8). Des cannes de verre seront introduites de chaque côté jusqu'au fond de la gaine pour assurer une bonne aération et la solubilisation des sels. L'eau de mer artificielle est alors enrichie en sels nutritifs et en vitamines. L'inoculum d'algues à partir de chémostat est de l'ordre de 10 litres pour une gaine de 100 litres. Les 10 litres nécessaires proviennent de deux chémostats. (cf figure n° 3 page 12 bis).

IV. Technique d'isolement

L'isolement des cellules permet d'obtenir des cultures monospécifiques. Il est conseillé d'utiliser des cultures en phase de croissance exponentielle c'est-à-dire composées de cellules jeunes ayant un bon potentiel de multiplication. Le choix des algues dans le milieu naturel est déterminant. Une mise en culture préalable peut augmenter la concentration des cellules et améliorer leur qualité. Trois méthodes d'isolement sont généralement utilisées.

IV.1. Isolement en milieu liquide

Cette méthode convient principalement aux cellules assez grosses, ou en chaîne, de type spiruline, skeletonema et chaetoceros en chaîne.

Les cellules doivent être diluées dans de l'eau de mer stérile et placées sous la loupe binoculaire. Elles sont ensuite prélevées une par une à l'aide d'une fine pipette pasteur et introduites dans un tube à essai contenant le milieu de culture. Une stérilisation de la souche sera effectuée ultérieurement par traitement antibiotique.

IV.2. Isolement sur milieu solide

La technique est la même que celle pratiquée en bactériologie. On utilise des boîtes de pétri remplies de gélose et enrichies en milieu de culture (conway). On étale ensuite sur la gélose, à l'aide d'une anse de platine, une goutte contenant des cellules algales.

Un premier développement apparaît. On prélève à nouveau quelques cellules qu'on étale sur une nouvelle boîte de pétri.

L'opération peut-être reproduite plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un développement d'algue monospécifique. Cette technique d'isolement est assez longue et laborieuse.

IV.3. Isolement par dilution

Cette technique consiste à isoler les cellules par une succession de dilutions. C'est une méthode simple et rapide qui donne de bons résultats. La dilution peut être de l'ordre de 1/5ème du volume à chaque étape. On utilise généralement des tubes à essai. En fin de dilution on doit obtenir une cellule par tube à essai.

* Gaine plastique : poche de 20/100 d'épaisseur, utilisée pour la culture en bloom.

MILIEU DE CULTURE BACTERIEN E 6 POUR VERIFIER LA
STERILITE DES TUBES

KNO ₃	0,050 g
K ₂ HPO ₄	0,005 g
Extrait de foie	0,250 g
Bacto Tryptone	0,250 g
Glucose	0,250 g
Extrait de sol concentré	2,5 ml
Eau distillée	500 ml
Eau de mer filtrée	500 ml

Filter le milieu sur papier plissé. Répartir 10 ml par tube.
Passer à l'autoclave 10 minutes.

V. Stérilisation

On utilise généralement trois types d'antibiotiques qui permettent de couvrir tout le spectre bactérien.

La pénicilline agit sur les Gram +

La streptomycine agit sur les Gram -

Le chloramphénicol agit sur les deux.

Solution préparée à partir de certains antibiotiques :

Pénicilline sulfate 5 mg/ml

Streptomycine 1,6 mg/ml

Chloramphénicol 0,2 mg/ml

La technique consiste à préparer 10 ml d'une solution d'antibiotiques que l'on filtre à 0,3 μ . On verse 6 ml de culture dans six tubes numérotés. Dans le premier on ajoute 6 ml de la solution d'antibiotique, dans le deuxième 6 ml provenant du tube n°1 (culture + antibiotiques), et ainsi de suite... On ajoute une goutte de milieu organique E6 (cf page 134) pour augmenter l'efficacité de la pénicilline. On laisse incuber 24 heures à 18°C pour vérifier la stérilité de chaque tube avec le milieu E6 : on ajoute une goutte de chacun des tubes de culture traités dans d'autres tubes contenant du milieu E6. Les tubes qui deviennent opaques après quelques jours d'incubation sont ceux qui n'ont pas été décontaminés.

REMARQUE : La stérilisation par antibiotique ne doit s'utiliser que de façon ponctuelle afin d'éviter toute forme de résistance au niveau bactérien.

VI. Comptage

Le comptage s'effectue à l'aide de cellules de profondeur connue et dont le quadrillage défini, donne un volume déterminé.

(Voir tableau p 15, Figure p. 14 bis, Figure p. 14 ter).

Plusieurs types de cellules de comptage existent, chacune d'elles fournissant une précision optimale pour une taille de cellule, et une concentration donnée. La procédure à suivre pour l'utilisation d'une cellule est la suivante :

- disposer la lamelle sur la cellule après avoir humidifié les zones de support avec de la salive pour assurer une bonne adhérence de celle-ci.

Le comptage des algues mobiles n'est possible que si elles sont préalablement tuées. Pour ce faire on utilise généralement du formol à 10% à la dose de 2 à 3 gouttes pour 20 ml de culture. Cette préparation n'est pas nécessaire pour les algues statiques (diatomées).

Après homogénéisation les algues sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et introduites sur la zone de comptage (entre lame et lamelle) par capillarité. Il faut éviter de déborder de cette zone de comptage pour conserver un volume déterminé.

DETAIL D'UNE CUVE DE MALASSEZ

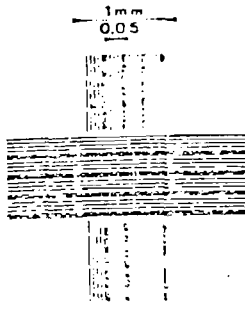


COMPTAGE POUR OBTENIR UN NOMBRE DE CELLULE PAR ml.

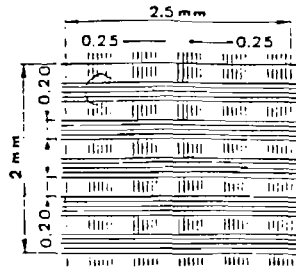
- Toute la cuve
Volume : 10^{-3} mm^3 $n \times 10^3$ cellule par ml
- Une ligne
Volume : 10^{-4} mm^3 $n \times 10^4$ Cellule par ml
- Une case
Volume : 10^{-5} mm^3 $n \times 10^5$ cellule par ml

Remarque : On ne compte que la moitié des cellules à cheval sur les lignes.

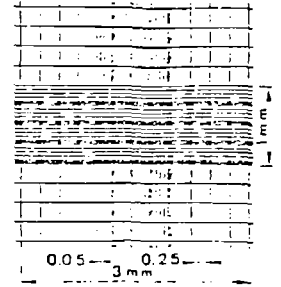
QUADRILLAGES DE QUELQUES CELLULES DE NUMEROTATION



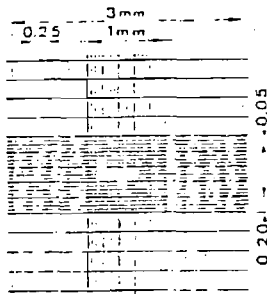
THOMA



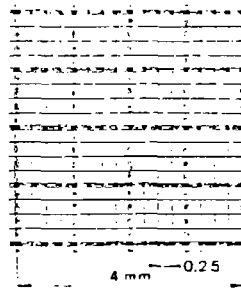
MALASSEZ



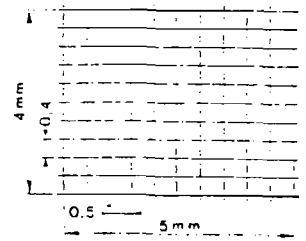
NEUBAUER



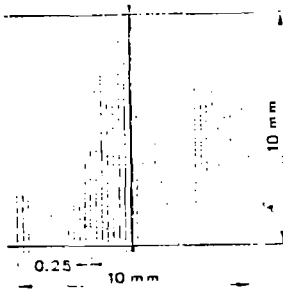
NEUBAUER
modifié



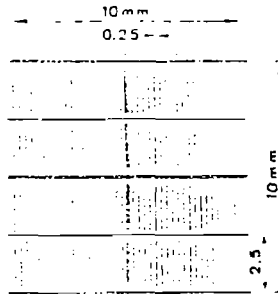
FUCHS-ROSENTHAL



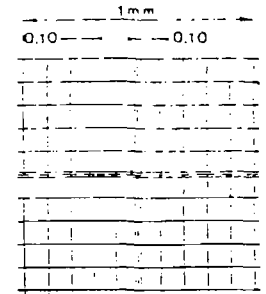
AGASSE-LAFONT B



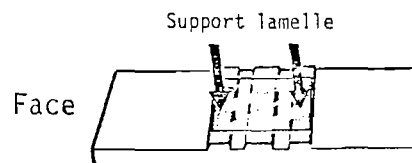
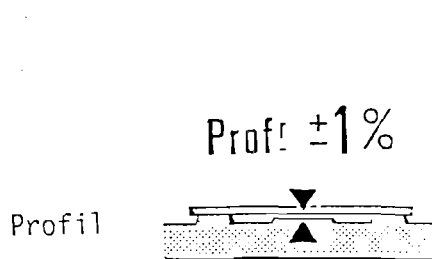
LEMAUR



NAGEOTTE



AGASSE-LAFONT
R



Détail d'une cellule de comptage et pose de la lamelle

CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES CELLULES ET CHAMBRES DE COMPTAGE

! TYPE DE CELLULE	: DIMENSIONS DU QUADRILLAGE	: VOLUME (ml)	!
!	: L x l X p (mm)	:	!
! . Thoma	: 1 x 1 x 0,1	: 10 ⁻⁴	!
! Agasse Lafont	: 1 x 1 x 0,1	: 10 ⁻⁴	!
! Neubauer et	: 3 x 3 x 0,1	: 9.10 ⁻⁴	!
! Neubauer modifié :	:	:	!
! . Mallassez	: 2,5 x 2 x 0,2	: 10 ⁻³	!
! . Fuchs Rosenthal	: 4 x 4 x 0,2	: 32.10 ⁻⁴	!
! . Agasse Lafont B	: 5 x 4 x 0,5	: 10 ⁻²	!
! Lemaire	: 10 x 10 x 0,4	: 4.10 ⁻²	!
! . Nageotte	: 10 x 10 x 0,5	: 5.10 ⁻²	!
! Chambres	:	:	!
! Palmer Maloney	: Ø 17,9 x 0,4	: 10 ⁻¹	!
! Sedgwick-Rafter	: 50 x 20 x 1	: 1	!
!	:	:	!

VII. Valeur nutritive

Les protéines, les hydrates de carbone et les lipides sont les constituants principaux des algues cultivées.

La valeur nutritive d'une algue est fonction de sa composition chimique, celle-ci étant variable d'une espèce à l'autre : (tableau P.15).

LA PRODUCTION PRIMAIRE

ANALYSE EN POURCENTAGE DU POIDS SEC, DE DIFFERENTES ESPECES D'ALGUES UNICELLULAIRES CULTIVEES
(D'après PARSONS, STEPHENS & STRICKAND 1961)

! ESPECES	: PROTEINES	: HYDRATES DE CARBONE	: LIPIDES	: PIGMENTS	: CENDRES	: TOTAL	!
! Tetraselmis Maculata	: 52	: 15,0	: 2,9	: 2,1	: 23,8	: 96	!
! Dunaliella salina	: 57	: 31,6	: 6,4	: 3,0	: 7,6	: 106	!
! Monochrysis luthéri	: 49	: 31,4	: 11,6	: 0,8	: 6,4	: 99	!
! Syracosphaera carterae	: 56	: 17,8	: 4,6	: 1,1	: 36,5	: 116	!
! Chaetoceros sp.	: 35	: 6,6	: 6,9	: 1,5	: 28,0	: 78	!
! Skeletonema costatum	: 37	: 20,8	: 4,7	: 1,8	: 39,0	: 103	!
! Coscinodiscus sp.	: 17	: 4,1	: 1,8	: 0,5	: 57,0	: 81	!
! Phaeodactylum tricorutum	: 33	: 24,0	: 6,6	: 2,9	: 7,6	: 73	!
! Amphidinium carteri	: 28	: 30,5	: 18,0	: 2,4	: 14,1	: 93	!
! Exuviella sp.	: 31	: 37,0	: 15,0	: 1,1	: 8,3	: 92	!
! Spiruline	: 70	: 18,0	: 8	: 1,0	: 3,0	: 100	!
!	:	:	:	:	:	:	!

VIII. Stockage

Les algues sont généralement utilisées vivantes pour l'alimentation de rotifères, d'artémia, de larves de crevettes, et de mollusques. Cependant la maîtrise du stockage et de la conservation des algues peut permettre des facilités de distribution et de gestion de la production.

VIII.1. Centrifugation

Il est important de savoir que toutes les cellules algales peuvent être centrifugées. centrifugation varient de 2 à 6000 tours par minute pour un débit d'un m³/heure. Par exemple 100 litres de *tetraselmis suecica* à une concentration de deux millions de cellules par ml permettent d'obtenir, après centrifugation, 100 g de pâte humide et, après passage à l'étuve à 60°C pendant quatre jours, 36 g de matière sèche.

VIII.2 La congélation

Les algues centrifugées peuvent être congelées de façon classique c'est-à-dire à 25°C. En général, gardées de cette manière, elles ne se conservent pas très longtemps et perdent leur valeur nutritive. Outre leur mauvaise qualité nutritionnelle, ces algues congelées ont aussi un effet polluant important.

VIII.3. Cryoconservation

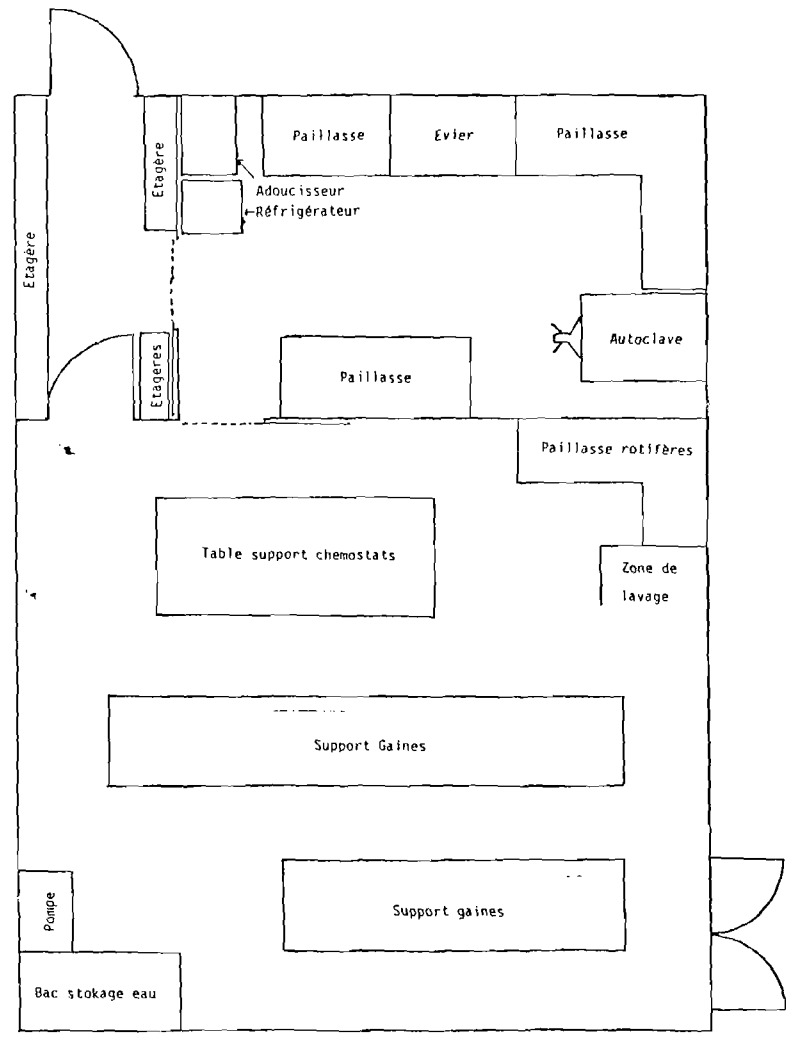
Les résultats obtenus en matière de cryoconservation permettent d'envisager l'application de ce type de traitement aux cellules algales. Actuellement des recherches sont en cours, qui devraient permettre la conservation de pains d'algues vivantes, directement utilisables après décongélation, pour le démarrage d'une production ou pour l'alimentation.

Cette congélation se fait à -85°C ou dans l'azote liquide à -196°C. L'adjonction de cryoprotecteur type glycérol ou D.M.S.O. permet de maintenir le potentiel de survie des algues. La décongélation s'effectue de façon classique par utilisation d'un bain-marie à +40°C.

IX. Description de la salle d'algues

La salle d'algues représente une superficie de 55 m². Elle se situe aussi près que possible des lieux de consommations.

PLAN NOUVELLE SALLE D'ALGUES HALL 4



1 mètre échelle 1/50ème

X. APPROCHE DU COUT DE PRODUCTION D'UN LITRE D'ALGUES

Le coût de production a été calculé en évaluant successivement les consommations d'eau, d'électricité, de sel, de matériel et de main d'oeuvre et permet d'apprécier l'importance de ces différents postes.

NATURE	QUANTITE	P.TOTAL HT	P. 1 l HT	PRIX 100 l HT	%	% Hors MO
Sels minéraux		6414,16	0,07	7,19	14,6	5,6
Electricité	161 658 KW	26190	0,29	29,39	60,0	23,05
Eau douce	100 m ³	430	0,004	0,48	1,0	0,37
Aération		6312,5	0,07	7,08	14,4	5,55
Matériel	280 kg*	4328,8	0,048	4,859	10,0	3,81
Main d'oeuvre	1427 H 30	69955	0,78	78,5		61,50
Total AMO		113630,90	1,27	127,5		100
Total HMO		43675,90	0,48	48,99	100%	

CONCLUSION

La technique de production de micro-algues présentée dans ce rapport et développée à la Station de PALAVAS permet de satisfaire quantitativement les besoins des élevages qui en dépendent (larvaire crevettes, rotifères).

- Fiabilité de la production meilleure qu'avec les techniques utilisant l'eau de mer naturelle.
- Concentration en cellules très élevées
- Bonne qualité vis à vis d'éventuels contaminants (bactéries, ciliés...).

Le développement de technique de cryoconservation devrait à terme, permettre de mieux gérer une salle d'algues (étalement de la production sur l'année et disponibilité pour des utilisateurs ponctuels).

Les aliments inertes de type microparticules devraient progressivement remplacer les algues, dans la mesure où l'aspect "maintien de la qualité du milieu" qu'elles assurent (production de O_2 , consommation d'ammoniac...) sera pris en compte, à un autre niveau, (gestion des élevages...), cependant les algues resteront un apport alimentaire d'appoint pour pallier d'éventuelles carences qualitatives de la nourriture artificielle.

La maîtrise des cultures d'algues passe par un travail rigoureux et constant tant sur le plan de la surveillance que sur le plan de la manipulation. Le bon maintien des souches est primordial car il conditionne toute la suite de la production.

Les cultures d'algues en grand volume donnent de bons résultats surtout pour les diatomées (chaetoceros, skeletonema, thalassiosira...). Ce type de culture permet une production importante d'algues mais nécessite une surface d'installation importante compte tenu des faibles concentrations obtenues.

BIBLIOGRAPHIE

- . Technique de culture d'algues unicellulaires : 1974
Monsieur FIALA et G. de BILLY
Laboratoire Arago 66650 BANYULS/MER

- . Ecologie du plancton marin : le Phytoplancton :1974
P. BOUGIS

- . Culture d'algues : 1979
Rapport IFREMER - Gérard JONQUIERES

- . Manuel de planctonologie Méditerranéenne : 1978
C.N.R.S. Grégoire TREGOUBOFF, Maurice ROSE

- . Etude technico-économique de l'élevage du loup : 1985
Rapport IFREMER - Jean FOSSIEZ