

Direction DRV-RA
Laboratoire de Génétique et Pathologie

MANANTSARA Mandresy

Rapport de stage

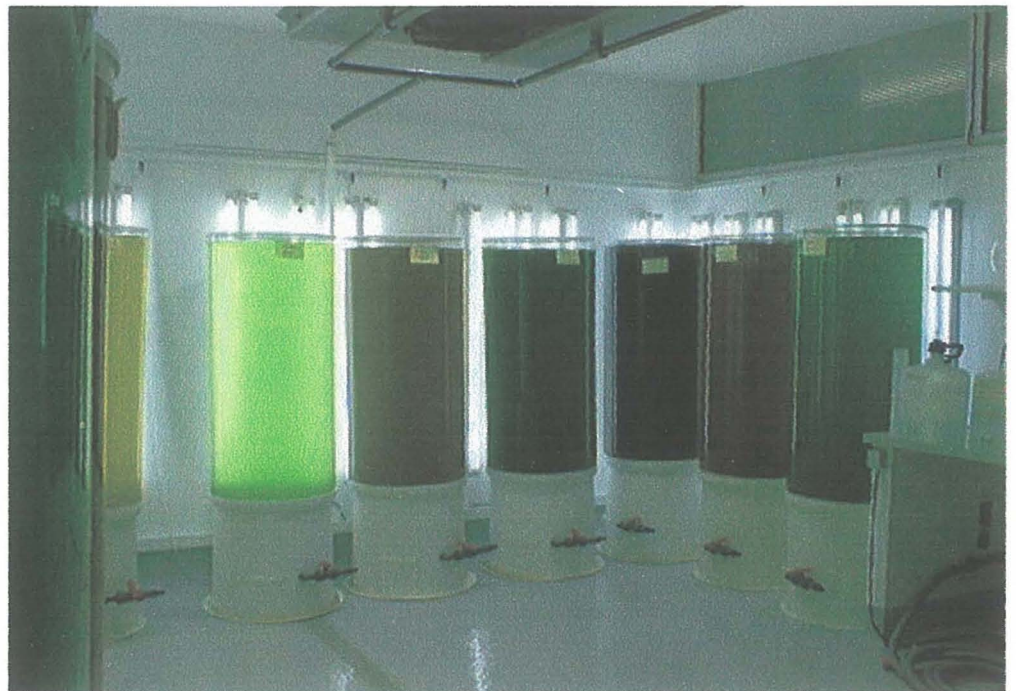
Janvier - Avril 2002

BTSA ANABIOTEC Promotion (2000-2002)

LYCEE AGRICOLE PRIVE de REIMS-THILLOIS

ifremer

**Contribution à l'étude de la production
de micro-algues au sein de l'écloserie
de mollusques de la station IFREMER
de La Tremblade**



Fred. BLOUIN

Remerciements

Je voudrais remercier Philippe Gouletquer, chef de station , pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques.

Je tiens également à remercier Raphaël Brizard, et Frederic BLOUIN pour leur encadrement tout au long de mon stage.

Un grand merci à Karine Bouilly pour ses corrections ainsi qu'à Nicolas Taris pour son aide pour ma présentation orale.

Je voudrais aussi remercier Florence Rivet et Delphine Rousic pour leur aide d'un point de vue documentaliste et administratif.

Un grand merci à Nicole Faury pour m'avoir aidé au cours de mes travaux.

Egalement à Franck Berthe qui a facilité ma vie quotidienne à La Tremblade.

J'aimerais aussi remercier Guenaëlle Lancelot pour son aide informatique (ordinateur).

Je remercie aussi toute l'équipe de la maison des stagiaires sans qui mon séjour n'aurait pas été le même.

Et pour finir, je crois que je ne pourrai pas oublier toute l'équipe de La Tremblade, la DEL, le LGP et les Mickeys (Patro).

Encore un grand merci à tous.

Sommaire

Introduction	1
1. Présentation du stage	2
1.1 Rôle et objectifs de L'IFREMER :	2
1.2 Buts du stage :	4
1.3 Rappel sur la biologie du phytoplancton :	4
2..Matériels et méthodes.....	6
2.1. Principe de production du phytoplancton	6
2-2- Mode de production.....	8
2-3- Moyen d'étude de la production	10
3..Résultats et discussions	14
3-1- Etude de la production.....	14
3.2 Production moyenne:.....	24
3-3- Répartition du phytoplancton dans l'ensemble de l'écloserie et la quantité consommée :	25
3-4-Tests d'optimisation de production en phytoplancton réalisés .	27
4..Conclusion et perspectives	32

Introduction

Connu sous le nom du phytoplancton et faisant partie des plus anciennes formes de vie, les microalgues ou les algues unicellulaires appartiennent au plancton. C'est la mise au point du microscope qui permit de les observer la première fois et depuis les scientifiques et chercheurs n'ont pas cessé de découvrir de nouvelles espèces.

Des nombreuses espèces sont bien connues par les scientifiques à l'heure actuelle, mais il en existe des nombreuses non découvertes ou mal connues quant à leur taxonomie.

Cole fut le premier à démontrer en 1973 que les algues unicellulaires flagellés pouvaient servir de nourriture à des larves des poissons, mollusques, crustacés... Etant donné que ces algues possèdent des flagelles, leur mobilité joue un rôle important pour la disponibilité en tant que nourriture.

Assurant la fonction de garde manger, la salle d'algue est quasiment présente dans toutes écloseries. Toutes ont mis en place des systèmes de production d'algues unicellulaires qui peuvent être à l'intérieur ou à l'extérieur des structures selon l'espèce produite. Pour assurer le bon déroulement de la production, c'est à dire le bon développement des individus élevés, les écloseries cherchent à produire plus de phytoplancton et surtout produire des microalgues de bonne qualité nutritionnelle. Pour cette raison l'écloserie de l'IFREMER de La Tremblade, spécialisée dans la reproduction de mollusques bivalves, a lancé une étude sur son système de production. C'est dans ce cadre que j'ai effectué mon stage de 3 mois pour étudier l'étape de production de micro-algues.

Grâce à des suivis de croissance et à des mesures de concentrations finales de production, à l'étude de la répartition du phytoplancton dans l'écloserie, j'ai pu apprécier la gestion de la production, des suivis de croissance du phytoplancton, de quantifier les productions moyennes, de connaître leur devenu au sein de l'écloserie et de tester certaines paramètres afin d'améliorer les productions.

Les résultats de mon étude me permettront à la fin d'apporter un regard critique par rapport au système de production mis en place et de proposer des solutions pour optimiser les cultures.

1. Présentation du stage

1.1 Rôle et objectifs de L'IFREMER :

L'IFREMER (*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer*) est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) résultant de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et de l'ISTPM (*Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes*). Il est placé sous tutelle conjointe des ministères de l'Education nationale, de la Recherche et de la Technologie, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement, des Transports et du Logement.

L'IFREMER est le seul organisme de recherche français dont la vocation soit exclusivement maritime. Ses missions principales sont les suivantes :

- connaître, évaluer, mettre en valeur et rationaliser l'exploitation des ressources de l'océan;
- améliorer la connaissance, les méthodes de protection et de restauration de l'environnement marin;
- favoriser le développement socio-économique du monde maritime;
- apporter son concours à l'État, aux professions maritimes et aux autres organismes scientifiques, techniques et économiques concernés.
- créer et gérer les équipements d'intérêt général (flotte océanographique française);
- recueillir, diffuser, valoriser les informations nationales et internationales;
- s'associer à l'élaboration d'accords et de conventions de coopération internationale dans le domaine marin.

L'IFREMER est présent dans 72 laboratoires ou services de recherche, répartis dans 24 stations ou centres, sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM TOM. Sa présence sur l'ensemble du littoral constitue une des originalités et une de ses forces. Elle permet à la fois d'assurer l'observation et la surveillance de l'environnement côtier et de rester proche du monde maritime et des professionnels de la mer.

L'institut dispose d'un budget annuel de 150 millions d'euros provenant de subventions versées par l'état auxquelles s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC lui permet de développer. Environ 1700 chercheurs, ingénieurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER.

La Station de La Tremblade :

Sur les 150000 tonnes d'huîtres produites annuellement en France, environ 50000 proviennent du bassin de Marennes-Oléron. Du fait de l'importance de l'ostréiculture dans l'économie régionale, l'IFREMER a choisi de développer une station côtière pluridisciplinaire de manière à soutenir la profession. Aujourd'hui, elle se compose de 3 laboratoires dont les activités se complètent pour étudier l'ensemble des sujets qui touche l'ostréiculture. Ces laboratoires sont :

Le laboratoire côtier de la DEL (*Direction Environnement et Aménagement du Littoral*) dont les missions principales consistent à surveiller la qualité des eaux littorales. Différents suivis existent et ils sont regroupés par réseaux d'observation. Ils permettent de

veiller à ce que la qualité des eaux d'élevages soit toujours satisfaisante pour garantir des coquillages sains. Les trois réseaux sont :

- **Le RNO** : Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin
- **Le REPHY** : Réseau de suivi du phytoplancton et des phycotoxines : surveillance de la quantité et la nature des espèces phytoplanctoniques sur le long du littoral pour détecter l'apparition de celles susceptibles d'être toxiques.
- **Le REMI** : Réseau de suivi microbiologique : il est destiné à contrôler la qualité microbiologique des eaux. Ce suivi permet d'établir le classement sanitaire des zones d'élevages.

Le LCPC (Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes) : Ce laboratoire côtier étudie entre autres les rendements de productions (croissance, mortalités...) sur les différentes zones d'élevage du bassin. Afin d'améliorer les productions il travaille en collaboration avec les professionnels pour tester de nouvelles solutions d'élevages (cultures en eaux profondes, en filière...).

Le LGP (Laboratoire de Génétique et de Pathologie des mollusques) : Cette unité a été constituée pour appuyer la profession et aider à son développement. Après les problèmes d'épidémies rencontrées dans les élevages de mollusques au cours de ces dernières décennies, les compétences du laboratoire s'organisent autour de deux axes : la pathologie et la génétique.

Afin de permettre un travail de veille zoosanitaire, ce laboratoire participe aux analyses d'échantillons pour détecter tout risque pathologique et travaille d'autre part à la mise au point de nouveaux outils de diagnostic en utilisant des techniques de pointe (microscopie électronique, biologie moléculaire...).

Parallèlement, des généticiens poursuivent des travaux destinés principalement à évaluer les ressources génétiques des stocks d'huîtres creuses, sélectionner des animaux aux performances intéressantes et développer la production d'animaux triploïdes. Tous ces travaux concourent à améliorer les rendements de production et la qualité des animaux produits.

Pour développer ces travaux, le LGP dispose d'un outil de production et d'expérimentation : c'est l'**écloserie**. Cette structure permet de stabiliser et reproduire des mollusques bivalves, principalement des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et des huîtres plates *Ostrea edulis* pour les besoins des chercheurs. Ce dispositif comprend différentes salles d'élevage qui ont une fonction particulière correspondant à chaque stade de la production de naissain de mollusques :

- La maturation : on y effectue l'acclimatation et le conditionnement des géniteurs préalablement à la reproduction en maintenant la température de l'eau à 20°C et en apportant une quantité importante de phytoplancton.
- La salle d'élevage larvaire : une fois la reproduction effectuée, les larves obtenues sont élevées dans des bacs de 30 à 150 litres pendant une vingtaine de jour. Trois fois par semaine, l'eau est entièrement renouvelée, les larves sont échantillonnées et comptées. Cette phase de l'élevage se déroule à 22-23°C et une ration composée de plusieurs types de micro-algues en quantité adaptée permet d'aboutir à la métamorphose des larves.
- La salle de micronurserie : au terme de l'élevage larvaire, les larves se métamorphosent et vont passer de la vie planctonique à la vie benthique ou fixée. Pour réaliser cette étape dans de bonnes conditions, il est nécessaire de mettre les larves dans une enceinte où elles trouveront leur support de fixation. Sitôt la fixation effectuée, les petites huîtres doivent être fortement

nourries pour assurer une croissance optimum. A l'issue de cette phase, le naissain obtenu pourra être mis en élevage sur les parcs ostréicoles.

Pour réaliser ce type d'élevage, l'écloserie est équipée d'une unité de production de phytoplancton qui permet de subvenir à tous ses besoins. Ce maillon est incontournable et indispensable pour permettre les travaux de reproduction des mollusques.

1.2 Buts du stage :

Pendant 3 mois j'ai travaillé à l'écloserie du laboratoire de Génétique et de Pathologie et plus particulièrement sur les aspects de production de phytoplancton.

Ceci m'a permis dans un premier temps d'apprendre les techniques de culture du phytoplancton et le savoir-faire qui s'y associe.

Ensuite, j'ai étudié et évalué la production en phytoplancton soit par dénombrement cellulaire soit par dosage de chlorophylle à l'aide d'un fluorimètre.

L'objectif était de caractériser les capacités de l'unité de production de microalgues et de tenter de les améliorer. En réalisant des tests et en portant un regard critique sur le mode de production, j'ai étudié différentes hypothèses et essayé de cerner les dérives de protocoles éventuelles.

1.3 Rappel sur la biologie du phytoplancton :

Premier maillon de la chaîne alimentaire, les microalgues sont utilisées soit directement pour la nourriture des espèces élevées en aquaculture (mollusques, premiers stades larvaires de crustacés), soit indirectement pour nourrir les proies qui serviront ensuite d'aliment (pour les poissons ou les crustacés).

Comme dans la plupart des éclosiers, l'écloserie de l'IFREMER de La Tremblade utilise des microalgues unicellulaires pour nourrir ses géniteurs et ses larves (*Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*). Il existe de nombreuses espèces de microalgues dans les milieux planctoniques marins. Seulement une douzaine d'espèces est régulièrement employée en aquaculture au plan mondial. Il s'agit principalement de :

- *Chaetoceros calcitrans*,
- *Tetraselmis suecica*,
- *Isochrysis galbana*,
- *Isochrysis aff. galbana* « Tahiti »,
- *Skeletonema costatum*,
- *Pavlova lutheri*,
- *Chaetoceros gracilis*,
- *Nannochloropsis oculata*,
- *Phaedactylum tricornerum*,
- *Pyramimonas virginica*,
- *Dunaliella sp.*,
- *Thalassiosira pseudonana*.



Parmi ces douze espèces, seules les 6 premières espèces sont utilisées en routine à l'écloserie de La Tremblade. (Source, TRINTIGNAC 1996)

1-3-1- Classification systématique :

Les 6 espèces utilisées dans notre éclosérie appartiennent à 3 familles systématiques.

➤ Les prymnésiophycées

-*Isochrysis aff. galbana* "Tahiti"
surnommé (AISO)

-*Pavlova lutheri* (Pavlo)

➤ Les diatomophycées

-*Chaetoceros calcitrans* (Cal)

-*Chaetoceros calcitrans forma pumilum*
ou *Chaetoceros* « *tenuissimus* » (Extubo)

-*Skeletonema costatum* (Skele)



➤ Les Prasinophycées

-*Tetraselmis suecica* (Tetra)

Source : Atlas du phytoplancton marin vol 3, 2, 1.

1.3.2 Mode de reproduction

En général, la reproduction est végétative (asexuée), ou plus exactement se réalise par division binaire, néanmoins la reproduction sexuée n'est pas exclue dans certaines circonstances selon les espèces concernées.

Dans des conditions favorables de cultures, la reproduction est asexuée et les biomasses vont croître de façon exponentielle.

Dans des conditions défavorables, la reproduction est sexuée, le temps de génération est long et voire même une absence de croissance en biomasse.

1.3.3 Isolement des souches

Plusieurs techniques sont utilisées en fonction de l'échantillon du départ :

- Isolation par micro-pipette

A partir d'un échantillon d'eau de mer observé au microscope, on peut prélever une goutte du milieu contenant entre autres la cellule recherchée. En répétant cette opération, on arrive à isoler une goutte de milieu unialgal qui est mise en culture en tube à essais.

- Milieu solide

On peut également effectuer des repiquages successifs sur milieu solide (agar agar) en boîte de pétri en choisissant parmi les colonies qui se développent celles qui correspondent à la souche d'algue unicellulaire voulue.

2..Matériels et méthodes

2.1. Principe de production du phytoplancton

2.1.1 Les souches

a) Obtention des souches

La plupart des souches disponibles en aquaculture proviennent aujourd'hui de souchiers entretenus par différents organismes. Les souches utilisées à l'écloserie de la Tremblade proviennent de la collection de microalgues de la Station de l'IFREMER-CNRS de la Rochelle et elles sont renouvelées tous les 2 à 3 ans environ. → *argentan - tous les ans*

Elles sont envoyées à raison de 5 à 10 ml de culture dans des flacons. Une fraction est maintenue en petit volume de culture pour conservation de la souche, l'autre part est mise en culture pour assurer les repiquages successifs.

b) Purification de souches

Malgré les précautions prises pour conserver dans les meilleures conditions les souches d'algues, le développement bactérien est inévitable du fait des repiquages réguliers. Pour purifier une culture et obtenir une souche dépourvue de bactéries, on peut utiliser un cocktail d'antibiotiques pour éliminer les micro-organismes indésirables. Ce type de traitement est à utiliser avec les précautions suffisantes dans le cas d'emploi d'antibiotiques.

Il existe également une autre procédé par filtration sur une membrane sélective.

c) Entretien des souches

Les souches sont entretenues dans le phytotron. C'est une enceinte thermorégulée qui dispose d'un système d'éclairage programmable. Dans notre cas, les souches de microalgues sont maintenues à 18°C, la durée de l'éclairage est de 12 h sur 24. Elles sont repiquées tous les 2 mois dans des tubes à essais ou des erlens-meyer de 50 ml.

2.1.2 Généralités sur les cultures

a) Les milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la production de phytoplancton doit apporter les sels nutritifs nécessaires au développement de celui-ci. On utilise l'eau de forage comme base du milieu, à laquelle on ajoute un enrichissement spécifique : le milieu de Conway.

La composition du milieu de Conway est présentée à (l'annexe2).

◆ Caractéristiques de l'eau de forage

Cette eau est pompée dans le sous-sol, à 100 mètres de profondeur. Elle présente plusieurs avantages pour la culture de microalgues :

- sa température est de 17°C et sa salinité de 33 pour mille constamment,
- elle est axénique,
- elle est plus riche en sels minéraux que l'eau de mer.

Ses caractéristiques sont détaillées dans (l'annexe1).

Théoriquement en fonction de concentration en biomasse initiale, on varie l'apport en Conway: par exemple, pour notre cas, on fixe à 5 ml pour les milieux à 2 l, 15 ml pour les ballons de 10 l, et 300 ml pour 300 l de culture.

Les milieux de culture seuls ne sont pas suffisants pour assurer une bonne croissance des algues unicellulaires : des facteurs physico-chimiques et des contraintes microbiologiques sont d'autres paramètres très importants pour un bon développement du phytoplancton.

Les vitamines

En complément des sels nutritifs, des vitamines sont ajoutées aux cultures en petit volume (2 et 10 litres). La solution de vitamine comprend de la thiamine (vit B1), de la vit B12, et de la biotine (vit H). Elles sont conservées à 4°C. A cause de leurs caractéristiques thermolabiles, on les ajoute après les stérilisations. Elles sont ajoutées en faible quantité à raison de 1 ml/l de culture. On n'ajoute pas de vitamines dans les bacs de 300 l pour une raison de coût et d'autre part on ne constate pas d'effet limitant.

b) Les facteurs physico-chimiques :

• La lumière

L'énergie lumineuse joue un grand rôle dans les réactions photosynthétiques chez les algues unicellulaires. Les besoins varient beaucoup avec le volume et la densité de la culture: plus le volume est important ou plus la concentration cellulaire est élevée, et plus il faudra d'intensité lumineuse, car les premières couches de liquide empêcheront la pénétration en profondeur.

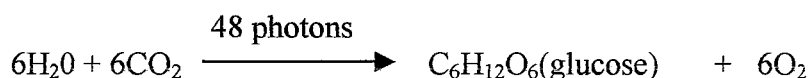
La salle de phytoplancton de l'écloserie de l'IFREMER de La Tremblade dispose d'un éclairage constant environ 1000 Lux fonctionnant continuellement 24 heures/24. La lumière est dispensée par des rampes de tubes fluorescents de xW. Elle est complétée par des lampes halogènes qui améliorent la qualité de la lumière.

• La température

La température de la salle de phytoplancton dans laquelle on travaille varie de 18 à 20°C. Ceci constitue l'optimum thermique des différentes espèces cultivées. Une climatisation assure le maintien de la température.

• Le dioxyde de carbone

Le phytoplancton est photosynthétique, donc il est autotrophe. Il assimile le carbone minéral pour élaborer de la matière organique selon la formule simplifiée suivante :



Les cultures sont agitées en permanence par un bullage d'air surpressé. Afin d'augmenter la productivité, du CO₂ est ajouté sur l'alimentation d'air, dont le débit est environ égal à 0,84 %.

Lors du développement d'une culture d'algue, on constate une augmentation de pH variant de 7,5 à 9. Cet accroissement du pH est dû à la consommation du CO₂ et à la production d'O₂. Cette augmentation peut être un facteur limitant au développement du phytoplancton: l'apport en CO₂ permet alors d'y remédier. En effet, l'injection de CO₂ dans le milieu induit la réaction suivante et tend à acidifier le milieu et donc à le maintenir aux alentours de 8 :



c) la stérilisation

Elle consiste à éliminer les organismes présents dans les milieux de culture pouvant entrer en compétition avec les micro-algues. Il peut s'agir d'une autre espèce d'algue, zooplancton phytophage, ou bien de bactéries. Pour cela, les ballons de 2 l et 10 l sont autoclavés (121°C pendant 20 minutes sous atmosphère humide à 1 bar) tandis que pour les cuves de 300 l, on procède à un lavage à l'acide entre chaque batch.

(Source : Aquaculture 2^{ème} édition Gilbert BARNABE)

2-2- Mode de production

2-2-1- Les cultures intérieures

Le principe des cultures produites dans la salle d'algue est basé sur le maintien des cultures en phase exponentielle.

On utilise 3 types de cultures de volumes différents :

Le ballon de 2 litres :

il sert à préparer une culture d'inoculation en phase exponentielle. Cette culture permet d'ensemencer un nouveau 2 litres destiné

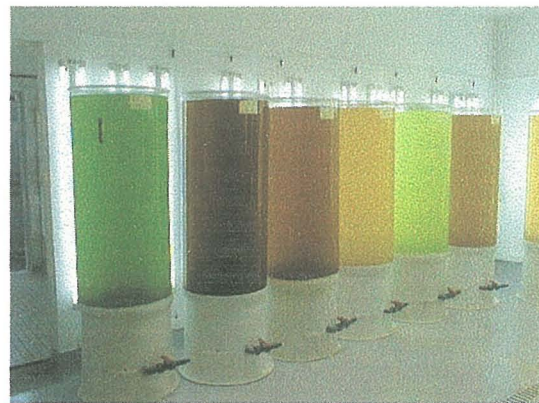
au maintien de la souche en phase exponentielle et une culture dans le ballon de 10 litres.

Le **ballon de 10 litres** correspond à la préparation de l'inoculum pour le bac cylindro-conique de 300 litres. Les 300 litres de culture est le stade de production finale et les microalgues produites iront directement nourrir les animaux.

En connaissant approximativement la durée de la phase exponentielle de croissance, on a adapté la durée du cycle de production. Pour les espèces *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis aff. galbana* (souche Tahiti), le cycle se déroule sur 4 jours et on utilise donc 5 ballons de 2 l, 5 ballons de 10 l, et 5 cylindres coniques de 300 l. Pour le *Tetraselmis suecica*, le cycle est plus court, c'est à dire de 3 jours, on a fixé la production à 4 ballons de 2 l, 10 l et 4 cylindres coniques de 300 l.

Quant aux espèces *Chaetoceros calcitrans forma pumilum*, *Isochrysis aff. galbana* (souche Tahiti), *Tetraselmis suecica* et *Pavlova lutheri* qui sont destinés aux élevages larvaires, on utilise seulement 2 ballons de 2 l et 5 l. Ils sont renouvelés tous les lundis et jeudis. On laisse les microalgues se développer pendant 3 jours et elles sont distribuées sur 3 ou 4 jours.

Ces ballons et ces cuves sont équipés de vannes d'entrée et de sortie d'air assurant l'agitation du milieu et les apports en air et en dioxyde de carbone.



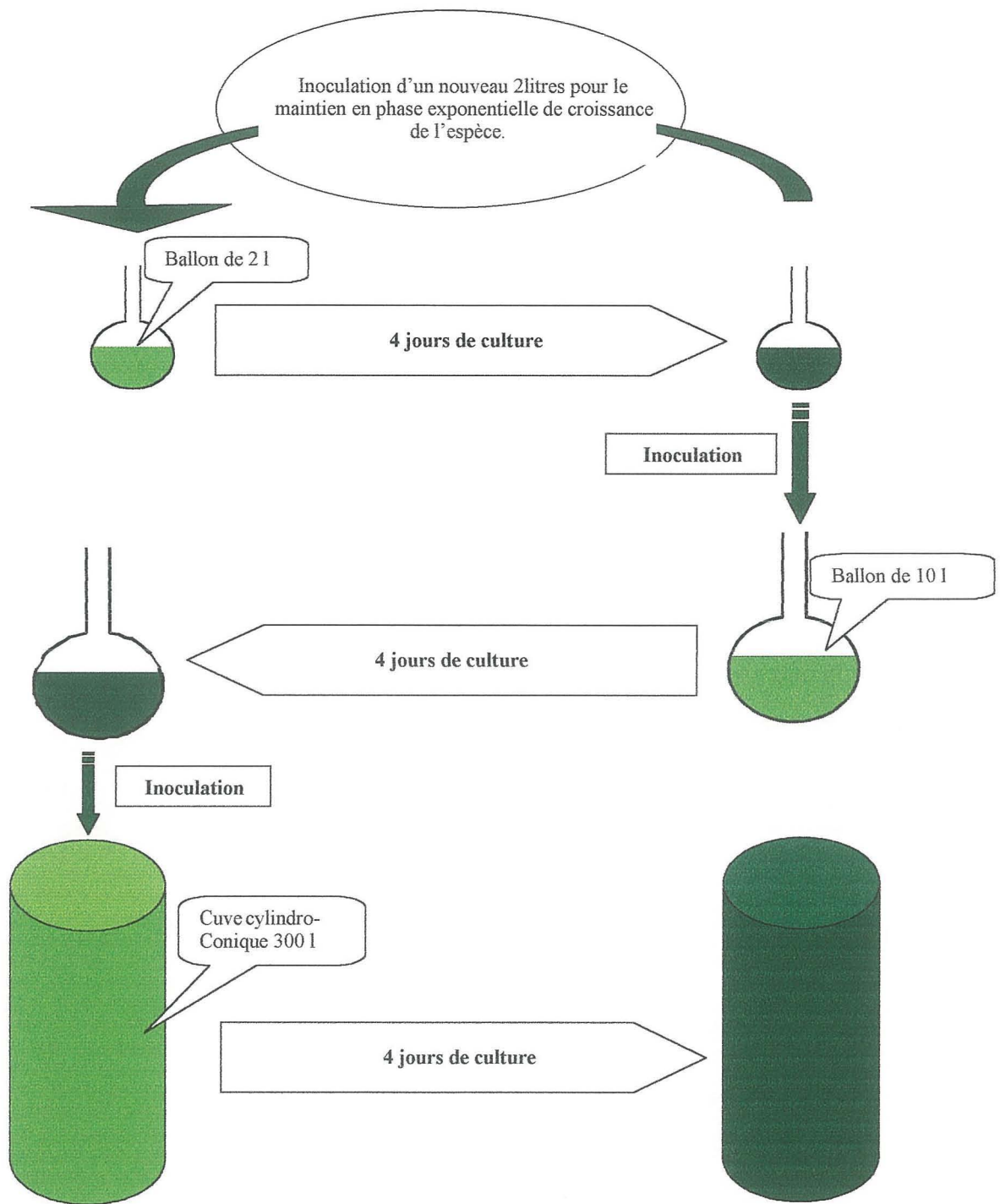


Figure n°1 : Schéma synthétique d'une culture en Batch

2-2-3- Culture extérieure

On dispose de 4 bassins de 20 m³ dans lesquels on cultive l'espèce *Skeletonema costatum*. La distribution se fait tous les trois jours, pendant la phase exponentielle de croissance.

A partir du bassin distribué, on inocule un nouveau bassin, le temps d'inoculation varie de 10 à 18 minutes d'où les variations de biomasses de début de culture.

Remarque: Pour des raisons économiques, on n'utilise pas de Conway pour les cultures extérieures. Les milieux sont enrichis par du dissodium trioxosilicate pentahydrate (METSO 520) 20 g/m³ de culture, AMMONITRATE 40 g/m³ et l'acide phosphorique à raison de 2,5 ml/m³ de culture.

Vu que ces bassins sont soumis aux conditions extérieures, aucune désinfection n'est possible. Pour maintenir le milieu le plus sain possible, le bassin est décapé au laveur haute-pression entre chaque culture et on utilise l'eau de forage. Régulièrement, le bassin est passé à l'acide.

La lumière est la lumière naturelle et la température dépend des conditions climatiques saisonnières. Donc de mauvaises conditions météorologiques peuvent être un facteur limitant.

2-3- Moyen d'étude de la production

En fonction des concentrations cellulaires rencontrées dans notre étude, nous ne pouvons pas employer les mêmes techniques. En effet, l'utilisation de la cellule de Malassez n'est possible qu'à partir de seuil de concentration supérieur à 300000 cellules par ml. Son intérêt est la réponse rapide.

Pour mesurer des concentrations plus faibles, nous avons choisi de mesurer la quantité de chlorophylle qui est proportionnelle à la quantité de phytoplancton présente dans l'eau. Cette mesure s'effectue à l'aide d'un fluorimètre.

2.3.1 Dénombrements cellulaires

- il s'agit de connaître la courbe de croissance d'une culture de phytoplancton. En condition de culture, l'évolution du nombre de cellules se décompose en quatre phases:

- Une phase de latence (1) pendant laquelle aucune division cellulaire n'a lieu, les cellules doivent s'adapter au milieu.
- Une phase exponentielle (2) où les cellules sont jeunes et ont un fort potentiel de division.
- Une phase stationnaire (3) correspondant à un plateau de concentration, généralement due à un appauvrissement du milieu.
- Une phase de décroissance (4) ou de sénescence pendant laquelle les cellules meurent.

Pour un même milieu, ces différentes phases sont plus ou moins longues en fonction des espèces de micro algues.

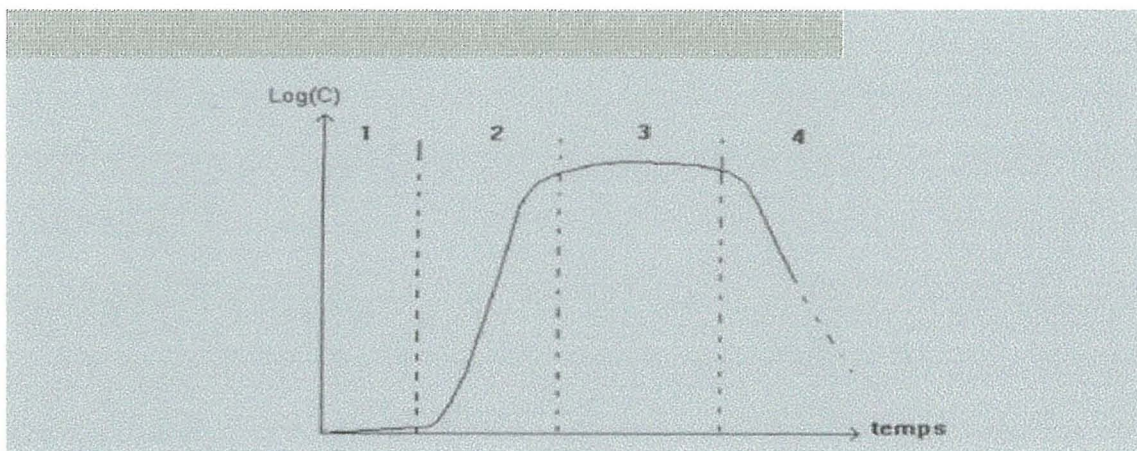


Figure n°2 : Croissance d'une culture d'algue en fonction du temps (Source : TRINTIGNAC,1996)

- Deuxièmement, les suivis de croissance et les comptages de micro algues

L'évolution de la biomasse est suivie par numération cellulaire. On utilise la cellule de Malassez comme technique de numération : Cette lame de comptage comporte une grille gravée dans le verre et dont la surface est connue 5 mm². L'échantillon est déposé entre cette lame et une lamelle couvre objet. L'épaisseur d'échantillon est 0,2 mm. On peut rapporter le nombre de cellules comptées au dessus de la grille à un volume précis d'un mm³ et ainsi calculer la concentration en cellules/ml. Pour augmenter la capacité d'analyse cette technique de comptage est couplée à un analyseur d'image. C'est un système qui fonctionne avec le logiciel SAMBA.

L'application utilisée a été développée par Le Déan et al (1991). Le résultat des comptages correspond à la moyenne des 10 champs et tient compte de la surface du champ analysée et de la profondeur de l'échantillon. Il est exprimé en nombre de cellules par ml de culture et est précisé par l'erreur standard. Le coefficient de variation, lié à l'ensemble des étapes (échantillonnage, dilution, dépôt sur lame, ...) de cette méthode de numération est inférieur à 6%.

Le taux spécifique de croissance initial, caractérisant la vitesse de division cellulaire est défini par la formule suivante:

$$\mu = \frac{\text{Ln}(X) - \text{Ln}(X_0)}{T - T_0}$$

X: biomasse au temps T (en cellules/ml)
X₀: biomasse au temps T₀ (en cellules/ml)

On en déduit le temps de génération :

Temps de génération (en jour) : $G = \text{Ln}2 * T / (\text{Ln}X - \text{Ln}X_0)$
Productivité (en cellules/J) : $P = (X - X_0) / T$

Vitesse spécifique de croissance (en cellules/J) : $\mu =$

X_0 étant la concentration initiale de culture au départ qui influence beaucoup la production finale, mon travail consiste à suivre les croissances de phytoplancton en faisant varier l'inoculum.

Les éléments nutritifs sont des facteurs principaux de croissance du phytoplancton, dont l'absence peuvent être un facteur limitant au développement. (Source, Optimisation de l'enrichissement nutritif pour la culture d'*Isochrysis galbana affinis* 2001).

2-3-2- Quantification du phytoplancton au sein de l'écloserie par fluorimètre:

Le phytoplancton produit à l'extérieur et à l'intérieur va être distribué à travers l'écloserie pour nourrir les huîtres. Ce phytoplancton est dilué avec de l'eau de mer brute décantée avant d'être distribué. Les répartitions se font par un système d'injection relié à l'arrivée d'eau de chaque salle.

Donc à l'aide d'un fluorimètre, on a essayé de quantifier le phytoplancton à différents niveaux de l'adduction d'eau dans l'écloserie et le phytoplancton consommé à la sortie de bacs d'élevage.

Pour cela, on a essayé d'analyser les différents types d'eau existant à l'écloserie susceptibles de contenir du phytoplancton.

a) Principe de fluorimétrie:

La méthode consiste à mesurer la fluorescence avant acidification (F_A) et après acidification (F_B) d'un acétone de pigment. La diminution de fluorescence observée est en relation avec le pourcentage relatif de chlorophylle a par rapport à la somme chlorophylle a + phéophytine a. Elle est très voisine de la méthode spectrophotométrique de LORENZEN (1976) dans son principe; la seule différence est qu'elle utilise la propriété de fluorescence des pigments plutôt que l'absorption de lumière.

b) Les étapes de mise en oeuvre

● Filtration:

- Préparer les échantillons, et faire une dilution adéquate à l'eau de forage ou à l'acétone si besoin .
 - Filtrer sous vide léger à l'aide d'une trompe à vide.
 - Rincer la tulipe du support-filtre avec un peu d'eau de mer filtrée.
 - Laisser fluer l'air quelques instants en fin de filtration.
- L'échantillon obtenu peut être congelé jusqu'à l'analyse.

● Extraction des pigments:

- Placer le filtre dans un tube contenant 5 ml d'acétone à 90% (technique, pur ou ultrapur).
- Broyer le filtre avec une baguette de verre à embout coupant permettant, par mouvements de rotation et déplacements verticaux, de dilacérer le filtre et d'homogénéiser l'extrait.
- Laisser l'extraction se poursuivre 1 à 4 h à l'obscurité et au réfrigérateur.

- Laisser revenir à la température du laboratoire (à l'obscurité).
- Agiter le tube pour homogénéiser l'extrait.
- Centrifuger à 4000-5000 tours/minute pendant 5 minutes sur un appareil à rotor libre.

● **Mesure de la fluorescence :**

- Allumer le générateur du fluorimètre et la lampe une heure avant les mesures.
- Régler le zéro du fluorimètre avec un tube témoin contenant un filtre vierge ayant subi les mêmes traitements que les échantillons, excepté la filtration du plancton.
- Mesurer la fluorescence F_0 des tubes échantillons.
- Ajouter deux gouttes d'HCl 1 mol/l , attendre 10min puis lire la fluorescence F_A .

● **Étalonnage du fluorimètre**

La meilleure solution est l'étalonnage à partir de chlorophylle a purifiée par chromatographie qui est fournie dans le commerce. Cet étalonnage peut aussi être effectué à partir de culture d'algues (ex: Diatomées ou Chrysophycées) en phase exponentielle de croissance. Cette solution est la moins conseillée .

On peut également utiliser la chlorophylle a du commerce.

c) **Calculs de F et r**

A partir des mesures effectuées, les formules suivantes nous permettent de calculer la teneur en $\mu\text{g/l}$ de chlorophylle a et phéotynine.

$$[\text{Chla}]/Z = F * r / (r-1) * (F_a - F_b) \quad \text{en } \mu\text{g/ml d'acétone}$$

$$[\text{Phéoa}]/Z = F * r / (r-1) * (r * F_b - F_a) \quad \text{en } \mu\text{g/ml d'acétone}$$

A partir de ce système de deux équations à deux inconnues, on calcule :

$$r = (F_a * (Q+1) - F_b) / Q * F_b$$

On remplace r par sa valeur dans une des équations et on peut en déduire F.

On calcule alors pour les échantillons:

$$[\text{Chla}] = F * r / (r-1) * (F_a - F_b) * (V_a/V_f) * 1000$$

en μg de chlorophylle a par litre d'eau de mer

où V_a est le volume d'acétone (5 ml dans ce cas) et V_f le volume filtré (100 ml ou 20 ml)

$$[\text{Phéoa}] = F * r / (r-1) * (r * F_b - F_a) * (V_a/V_f) * 1000$$

en μg de phéophytinine a par litre d'eau de mer

Sources : -Chlorophylle-fluorimètre (J.NEVEUX 1976)

- URAPC/INT 96-02

3..Résultats et discussions

3-1- Etude de la production

Cette étude doit nous permettre dans un premier temps de caractériser et quantifier la production de microalgues de l'écloserie. Dans cette phase de travail, le dénombrement de cellules est utilisé puisqu'on travaille avec des concentrations importantes. J'ai effectué plusieurs séries de dénombrements réparties dans un intervalle de temps situé entre le 28 janvier et le 12 avril 2002 pour établir des moyennes.

3-1-1 Culture semi-continue de *Skeletonema costatum*

Cette culture s'effectue en système de 4 bassins. Durant mon étude, je suis la croissance de deux bassins parmi les 4 bassins car le cycle de la culture dans un bassin dure 4 jours. Je réalise mes dénombrements 5 jours sur 7.

Pour étudier cette culture, on tient compte de deux paramètres qui se révèlent très importants dans le déroulement de la culture puisque le dispositif de production est en extérieur:

- les conditions météorologiques (ensoleillement, température extérieure).
- l'inoculum du départ (temps d'ensemencement, culture de départ).

a) Etude du système de production :

Cette étude a été répétée à quatre périodes pendant lesquelles un de ces deux facteurs ou les deux ont évolué.

- **Première période** (semaine du 28/01/02): on inocule un bassin durant 10 minutes à partir d'une culture de 2 jours et la culture est soumise à une température extérieure très basse 4°C et le temps est couvert. La température de culture passe en 3 jours de 17°C (eau de forage) à 10°C.
- **Deuxième période:** Afin d'augmenter la concentration initiale, on prolonge le temps d'ensemencement. Les conditions de cultures sont les mêmes que précédemment. On a suivi les croissances de *Skeletonema costatum* de deux bassins (Bassin N°1 et Bassin N°2) pendant la semaine de 18/02/02.
- **Troisième période** (semaine de 4 mars et 11 mars 2002): C'est une période qui nous amène à la phase critique de notre culture. Alors que les paramètres de cultures sont plus favorables (ensoleillement, radoucissement de la température ambiante) on maintient le même temps d'inoculation. Cette période doit permettre de déterminer le point critique de notre culture. Ce suivi est effectué du 25 février au 4 mars 2002.

- **Quatrième période:** Elle correspond à une période pendant laquelle on a lancé notre nouvelle culture suite à l'arrêt brutal de la précédente. Dans un premier temps, on a laissé pousser un inoculum de 200 l environ dans 1/4 du bassin (soit 5 m³) avec la dose d'engrais adaptée. Dans un deuxième temps, à partir de cette culture on a inoculé pendant 18 minutes un nouveau bassin sur le quel j'ai fait un suivi de croissance du 21 au 24/03/02. Nous avons défini de nouvelles conditions d'ensemencement pour cette nouvelle période : 10 minutes d'ensemencement à partir de la culture préparée la veille.

Tableau n°1 : Concentrations moyenne de *Skeletonema Costatum* au cours des 4 périodes

Temps (jour)	Concentration moyenne cellules/ml 1 ^{ère} période	Concentration moyenne cellules/ml 2 ^{ème} période	Concentration moyenne cellules/ml 3 ^{ème} période	Concentration moyenne cellules/ml 4 ^{ème} période
J0	20 322	117852	128100	182440
J1	36496	245952	208844	366448
J2	78920	310812	335704	581656
J3	112728	379176	302316	665790
μ (cellules/J)	0,57	0,39	0,23	0,43
G (J)	1,21	1,78	0,76	1,61

μ : Vitesse spécifique de croissance d'une espèce de microalgue.

G: Temps de génération

J: Jour de culture depuis l'ensemencement.

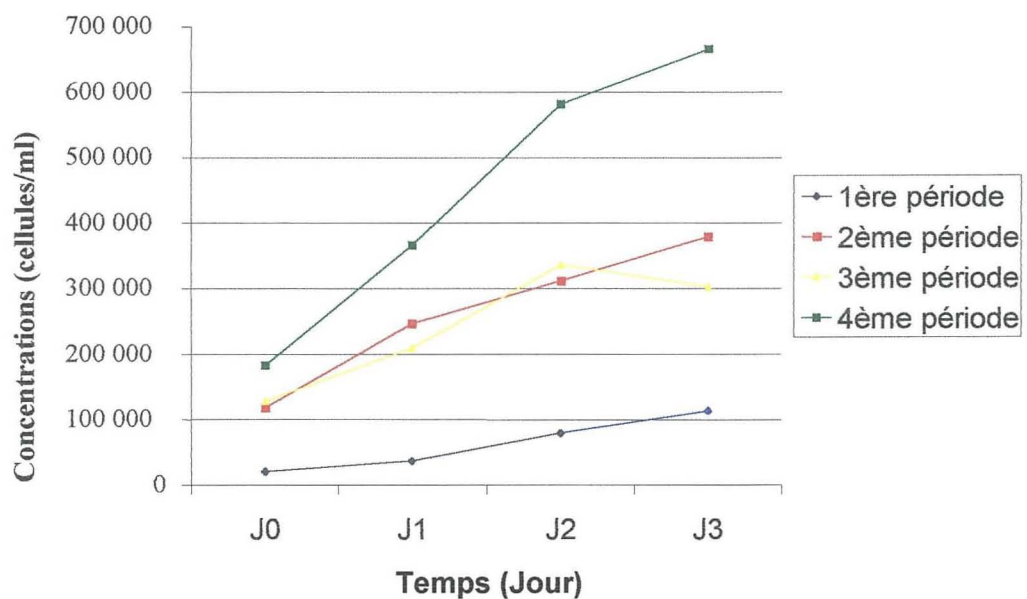


Figure n°3: Courbes de croissance de *Skeletonema costatum* pour chaque période

L'allure de courbe permet de constater une faible concentration cellulaire en production finale (à J3) et on n'atteint pas de plateau de fin de phase exponentielle. Le volume

d'inoculum au départ est insuffisant pour permettre à la culture d'atteindre une concentration importante en 4 jours. A partir de ces données, on a choisit d'augmenter le temps d'inoculation de 10 minutes à 18 minutes.

Pendant la seconde étape de mise en place de la culture (semaine de 28/02/02), l'injection d'un nombre de cellules plus grand assure une croissance rapide dès les premiers jours. La concentration moyenne cellulaire à J3 est multipliée par 4 par rapport à celle de la première période. Cela signifie que la concentration finale à J3 dépend de l'apport en inoculum du départ c'est à dire la concentration de culture à J0. Par contre la valeur moyenne de vitesse spécifique de croissance est moins élevée pour de raison de variation de conditions météorologiques entre les deux cultures suivies. Ceci favorise également la qualité des inoculums suivants puisque les cultures nouvellement préparées sont à leur tour le support d'une nouvelle production lorsqu'elles parviennent à J2.

La montée en puissance du système de production de phytoplancton se poursuit jusqu'à la troisième partie de ce suivi. L'allure de courbe indique une chute de culture dont l'explication est la suivante:

Entre l'intervalle d'une semaine séparant les 2 périodes, on avait des cultures dont les biomasses finales étaient élevées. Donc les concentrations de l'inoculum utilisé ont augmenté entre temps. Ceci conduit à une augmentation de la vitesse spécifique de croissance (supérieur à 0,45 cellules/J). En supposant que les cultures atteignent la phase stationnaire au deuxième jour de mise en culture, nous mettons en culture des cellules en phase d'arrêt de multiplication.

Donc en laissant vieillir notre culture, on perd la capacité des microalgues à se multiplier très rapidement et dans un système de production semi-continu d'algue de la famille des diatomées, il s'avère très difficile de faire redémarrer la culture sur la base de cellules dégénèrescentes.

Cette étape est très intéressante car elle nous a permis de déterminer la concentration maximum qu'on peut atteindre en cette période et qu'on peut approcher pour contrôler notre production.

Il faut signaler que pendant cette dernière période, on avait des paramètres physico-chimiques favorables à la culture. On a atteint à nouveau une vitesse spécifique de croissance égale à 0,43 cellules/J, dont la conséquence est la présence dans les inoculums de cellules vieilles.

Pour éviter la chute de notre culture à nouveau, on a réduit le temps d'inoculation pour les cultures suivantes. Le nouveau schéma de production est un ensemencement de 10 minutes à partir de la culture préparée le jour précédent.

b) Production moyenne à l'extérieur et conclusion

Tableau n°2 : Les concentrations finales moyennes de chaque période

Période de comptage	Concentration à J3 (cellules/ml)
Première période	112728
Deuxième période	379176
Troisième période	302316
Quatrième période	665790
Production moyenne	365003

Ce tableau montre les concentrations mesurées. Bien que la moyenne soit d'environ 350000 cellules par ml, on peut espérer atteindre plus régulièrement une concentration supérieure en améliorant le contrôle de la culture. Cette surveillance permettrait de moduler les temps d'inoculum pour l'adapter aux conditions météo et maintenir ainsi une culture saine et performante.

Si le temps d'inoculation à J0 a un important rôle sur l'évolution de nos cultures, l'influence des conditions météorologiques est loin d'être négligeables.

3-1-2- Culture en Batch (intérieure) :

Il s'agit des cultures aux volumes croissants (de 2 l jusqu'à 300 litres) : Pour bien illustrer les modes de production du phytoplancton à l'intérieur, on a étudié l'évolution de culture pour chaque volume approprié des différents milieux (2 l, 10 l, 300 l).

Notre étude concerne les 4 espèces du phytoplancton produites à la Tremblade à savoir :

- *Isochrysis galbana affinis* (A.ISO),
- *Tetraselmis suecica* (TETRA),
- *Chaetoceros calcitrans* (CAL),
- *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* (EXTUBO).

Trois de ces espèces sont produites en grand volume de 300l : TETRA, A.ISO, CAL. Elles sont destinées aux animaux en élevage à différents stades : maturation, micronurserie. En parallèle, certaines sont produites spécialement pour nourrir les larves et dans ce cas la production finale est le 10l. Il s'agit de A.ISO, EXTUBO et TETRA.

Il existe aussi une autre espèce (*Pavlova lutheri* ou PAVLO) produite normalement et destinée aux élevages larvaires. Elle n'a pas l'objet de notre étude car la souche m'est parvenue tardivement et la culture n'a pas pu être lancée dans les temps.

3-1-2-1- Suivis de croissance en ballons de 2 litres :

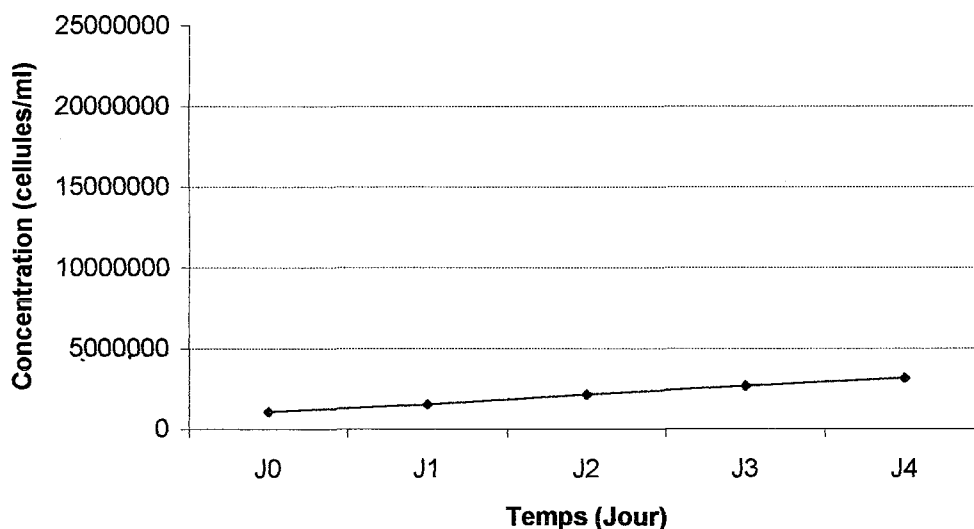


Figure n°4 : Courbe de croissance du *Tetraselmis suecica*

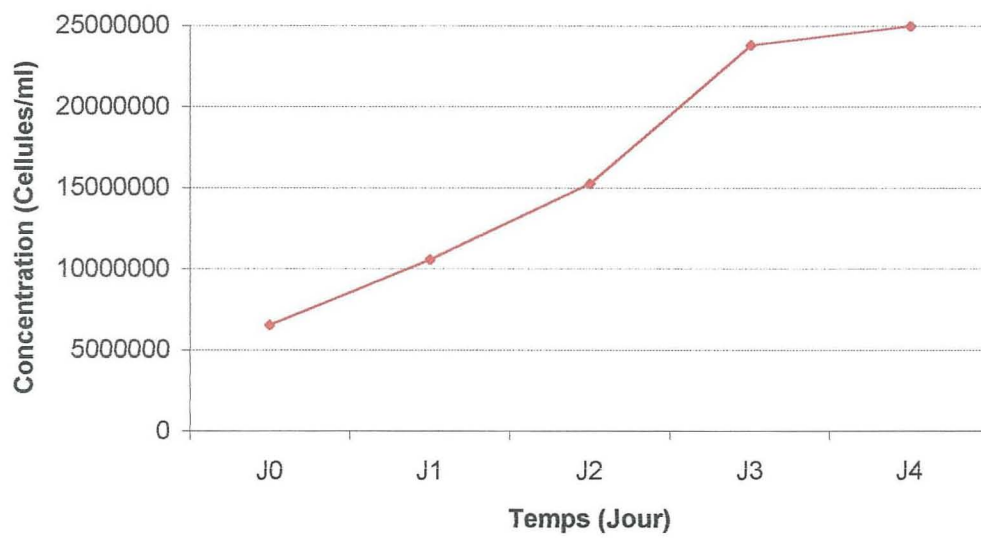


Figure n°5 : Courbe de croissance du *Chaetoceros calcitrans*

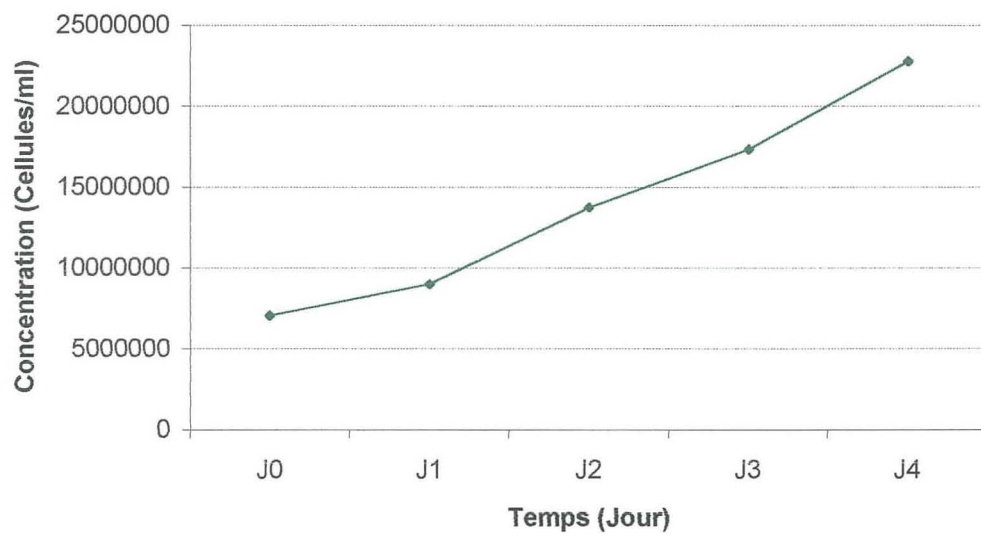


Figure n°6 : Courbe de croissance d'*Isochrysis aff. galbana*

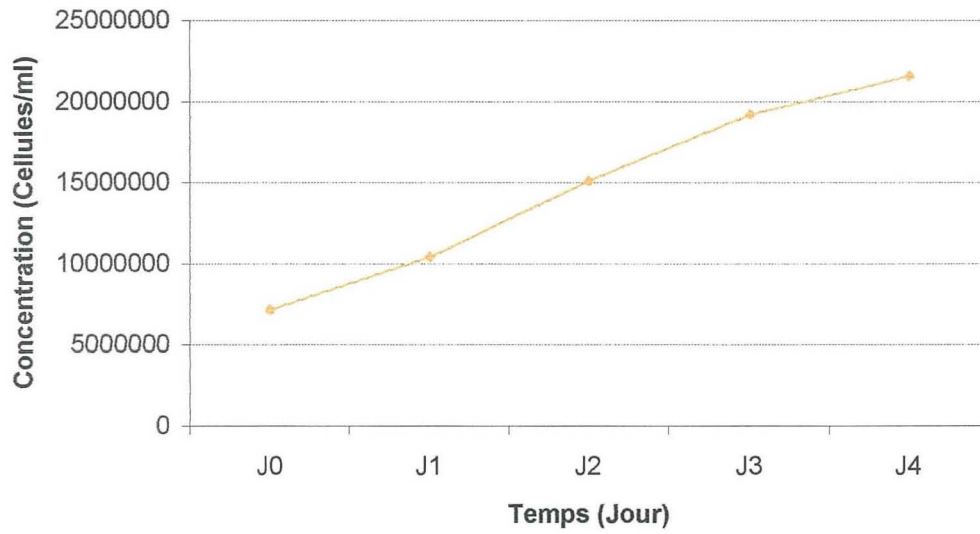


Figure n°7 : Courbe de croissance de *Chaetoceros calcitrans forma pumillum* souche extubo

3-1-2-2- Courbes de croissance de 4 espèces du phytoplancton en ballons de 10 litres :

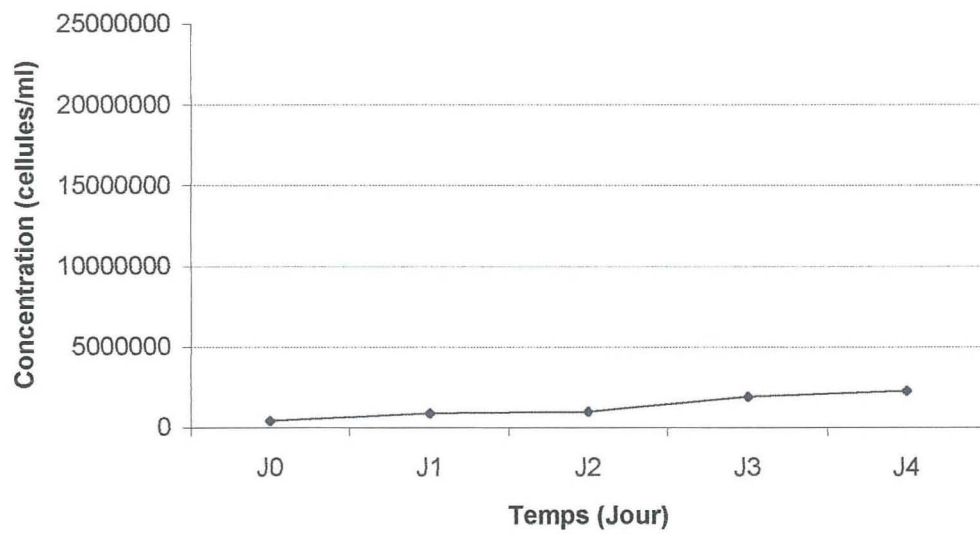


Figure n°8 : Courbe de croissance de *Tetraselmis suecica*

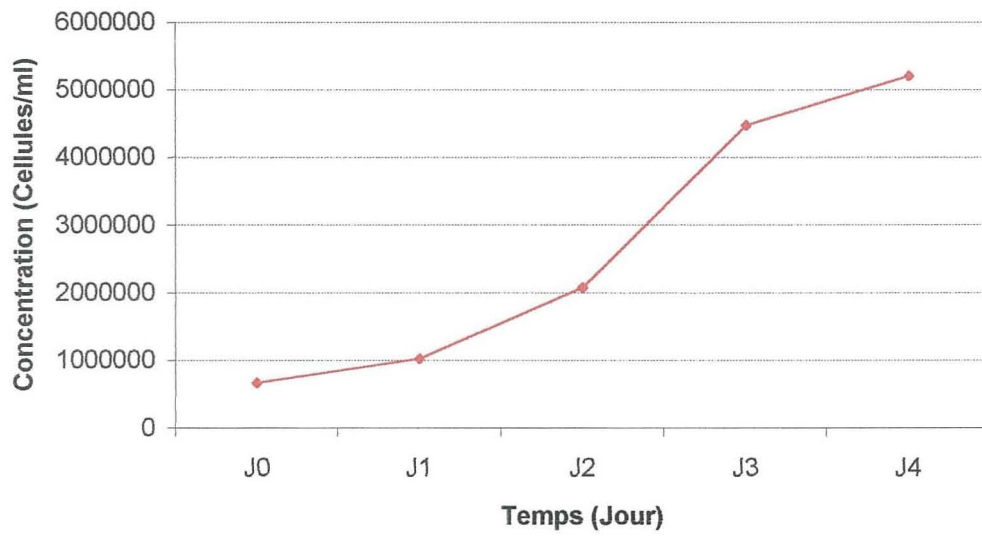


Figure n°9 : Courbe de croissance de *Chaetoceros calcitrans*

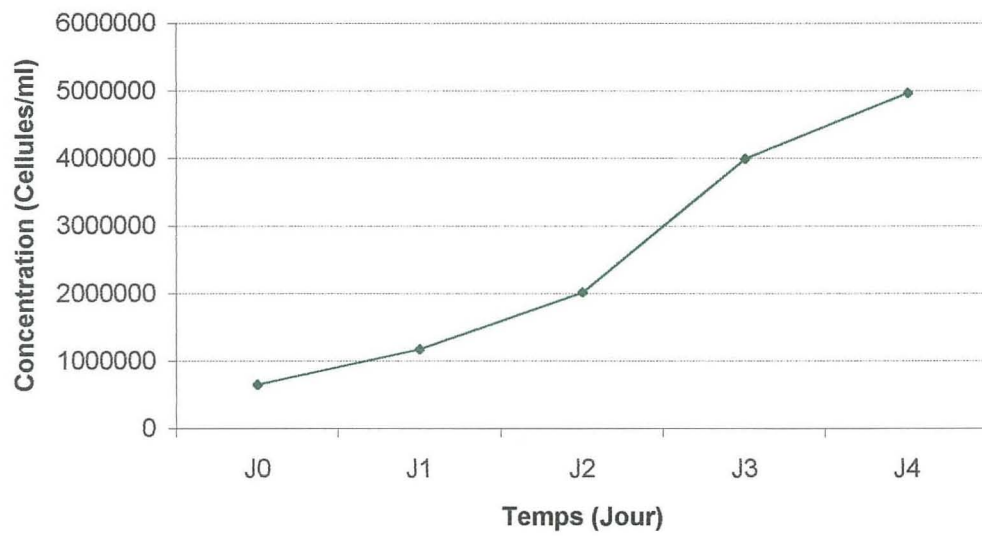


Figure n°10 : Courbe de croissance de *Isochrysis galbana affinis*

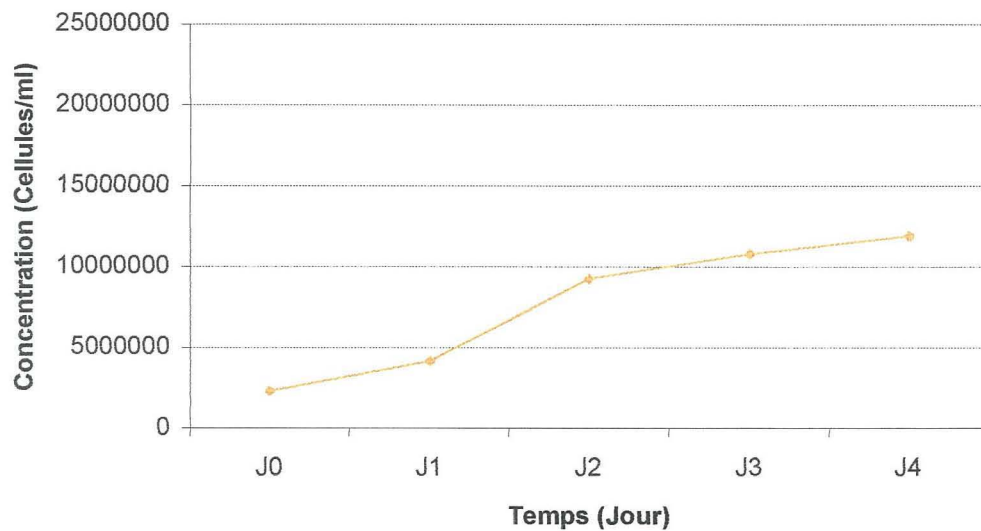


Figure n°10 : Courbe de croissance de *Chaetoceros calcitrans forma pumilum*

3-1-2-2- Suivis de croissance de 3 espèces de phytoplancton dans la cuve cylindro-conique de 300 l :

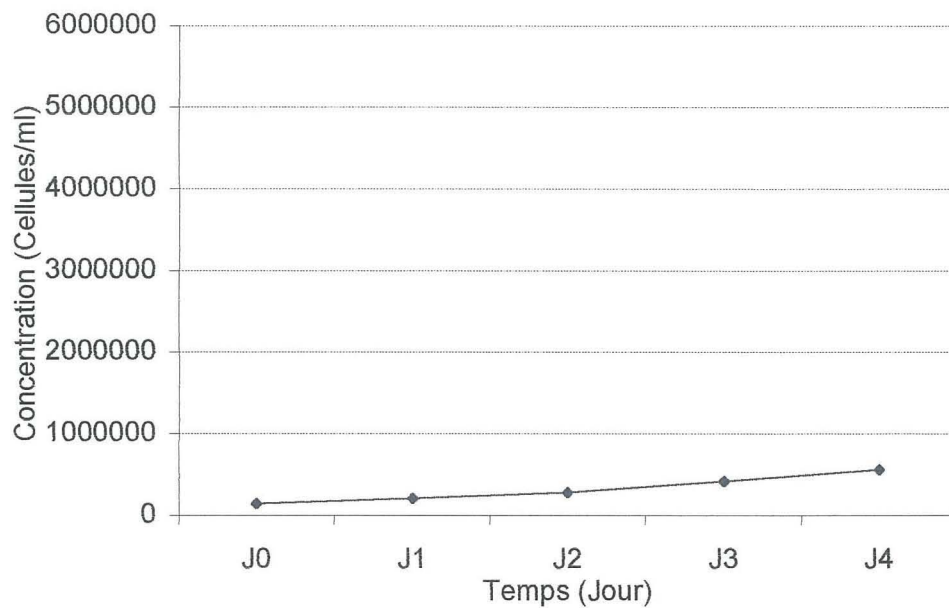


Figure n°11 : Courbe de croissance de *Tetraselmis suecica*

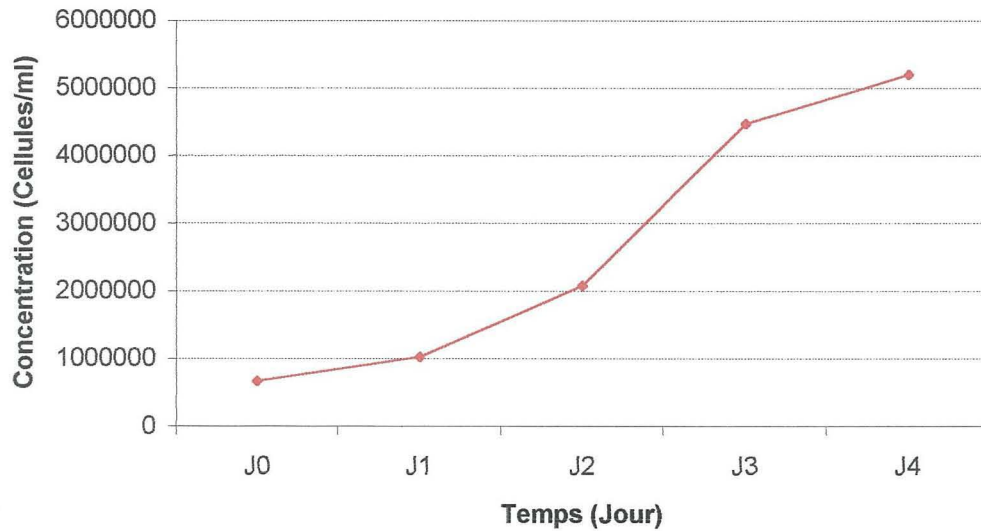


Figure n°12 : Courbe de croissance de l'*Isochrysis galbana affinis*

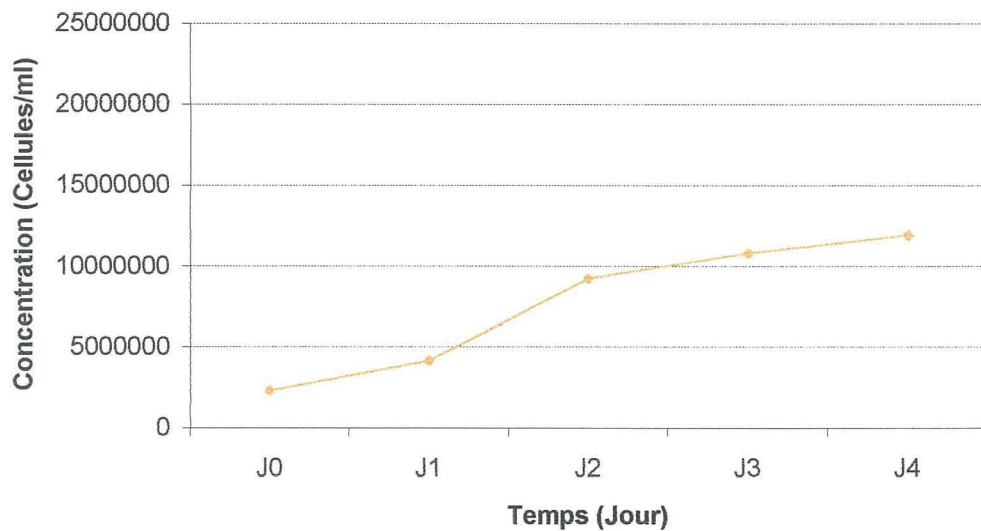


Figure n°13 : Courbe de croissance de *Chaetoceros calcitrans*

Tableau n°3 : Valeurs moyennes de vitesse spécifique de croissance, du temps de générations et de concentration finale de 4 espèce distinctes (Cultures dans le ballon de 2 l).

Variables	TETRA	CAL	AISO	EXTUBO
μ (cellules/J)	0,37	0,33	0,29	0,28
G (J)	2,57	2,07	2,37	2,51
Concentration moyenne finale (cellules/ml)	$3.1 \cdot 10^6$	$25.0 \cdot 10^6$	$22.8 \cdot 10^6$	$21.6 \cdot 10^6$

On remarque que chaque espèce a sa propre vitesse spécifique de croissance et le temps de génération varie d'une espèce à l'autre.

En analysant les courbes de croissance de chaque espèce (figures 4, 5, 6, 7) on constate que la phase de latence est plus courte chez *Chaetoceros calcitrans* et *Chaetoceros calcitrans forma pumilum* par rapport aux deux autres. On remarque ainsi que les espèces *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis suecica* arrivent plus vite à la fin de leur phase exponentielle de croissance que les espèces *Isochrysis aff galban* et *Chaetoceros calcitrans forma pumilum*.

Tableau n°4 : Valeurs moyennes de vitesse spécifique de croissance, du temps de générations et de concentration finale de 4 espèces distinctes dans le ballon de 10 l.

Variables	TETRA	CAL	AISO	EXTUBO
μ (cellules/J)	0,42	0,35	0,39	0,41
G (J)	1,65	1,99	1,79	1,69
Concentration moyenne finale cellules/ml)	$2.3 \cdot 10^6$	$21.5 \cdot 10^6$	$21.4 \cdot 10^6$	$16.9 \cdot 10^6$

Les valeurs ci-dessus montrent que la vitesse spécifique de croissance de chaque espèce augmente avec le volume de culture d'un côté, d'un autre côté le temps de génération diminue. Ces différences s'expliquent par les influences de certains paramètres physico-chimiques comme le CO₂ libre, la pression, la pénétration de la lumière et la disponibilité des éléments nutritifs...

Malgré les variations des vitesses spécifiques de croissance entre les 2 volumes de culture, on remarque comme dans le cas du ballon de 2 l que l'espèce *Chaetoceros calcitrans* atteint plus vite sa phase stationnaire que les autres espèces.

Tableau n°5 : Valeurs moyennes de vitesse spécifique de croissance, du temps de générations et de concentration finale de 3 espèces distinctes dans la cuve cylindro-conique de 300 l :

Temps(jour)	Concentration (cellules/ml) TETRA	Concentration (cellules/ml) CAL	Concentration (cellules/ml) AISO
μ (cellules/J)	0,44	0,51	0,51
G (J)	2,01	1,35	1,36
Concentration moyenne finale (cellules/ml)	$0.56 \cdot 10^6$	$5.2 \cdot 10^6$	$4.9 \cdot 10^6$

Les valeurs présentées dans ce tableau montrent encore une fois que les vitesses spécifiques de croissance augmentent parallèlement avec les volumes de culture.

Si on fait la moyenne de vitesse spécifique de croissance de chaque espèce pour les 3 volumes de culture, on peut dire que c'est l'espèce *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis suecica* qui représentent les vitesses spécifiques de croissance les plus élevées par rapport aux autres.

Puisque leur développement est plus rapide que les 2 autres espèces, les espèces *Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans* peuvent être mise en culture un jour de moins.

Tableau n°6 : Vitesse spécifique moyenne pour chaque espèce

	TETRA	CAL	AISO	EXTUBO
μ moyen (cellules /J)	0,41	0,40	0,39	0,34

En résumé, en dehors des facteurs physico-chimiques, il existe un paramètre très important qui influence beaucoup les vitesses spécifique de culture. Il s'agit de l'inoculum lui même à savoir la concentration d'inoculum et l'espèce.

3.2 Production moyenne:

Donc la productivité varie d'une culture à une autre. Afin de connaître notre production moyenne en 300 l pour l'écloserie et 10 l pour l'élevage larvaire, pour chaque espèce, on a essayé dénombrer les cellules les productions journalières.

3-2-1- Cuve cylindro-conique de 300 l

Il s'agit des production qui seront réparties dans l'ensemble de l'écloserie.

Afin de connaître les concentrations cellulaires de leur production normale, j'ai effectué de dénombrements journaliers dans les 3 cuves distribués chaque jour, entre le 4 février et le 11 février.

Tableau 7 : Production moyenne et les concentrations des cellules disponibles en fonction des individus à nourrir.

Variables	Concentration (cellules/ml) TETRA	Concentration (cellules/ml) AISO	Concentration (cellules/ml) CAL	Concentration (cellules/ml) Skeleto
Concentration finale moyenne en cellules/ml	570 000	5 700 000	5 500 000	360000
Volume produit quotidiennement en litres	300	300	300	20000
Nombre de cellules produites	$1,71 \cdot 10^{11}$	$1,71 \cdot 10^{12}$	$1,65 \cdot 10^{12}$	$7 \cdot 10^{12}$
Nombre total de cellules produites	$10,53 \cdot 10^{12}$			
Nombre d'individus nourris a raison de $2 \cdot 10^9$ cellules/jour	3465 géniteurs			

Sur le plan pratique, deux hypothèses sont susceptibles d'être à l'origine de la variation de concentrations de notre production journalière en phytoplancton:

- Les concentrations cellulaires d'inoculum du départ.
- Les facteurs physico-chimiques en particulier les bullages.

Néanmoins, on produit suffisamment de phytoplancton nécessaire pour alimenter l'écloserie. Mais en sachant que la part provenant du milieu naturel à la période de démarrage de l'écloserie en décembre et janvier de chaque année est très limitée et que les travaux de l'écloserie continuent d'augmenter chaque année, notre objectif est de produire de façon plus régulière pour avoir une marge suffisante. C'est cela qu'on a réalisé quelques tests en faisant varier certains paramètres.

3-2-2- Ballons de 10 litres :

C'est à partir de ballons réservés spécialement au nourrissage des larves qu'on prélève la ration composée de TETRA, de A.ISO et d'EXTUBO.

En fonction de la concentration de culture en J4 pour chaque espèce, on calcule le volume à prélever pour les rationnements de manière à obtenir une concentration définies dans les bacs d'élevage larvaire.

Tableau n°8: tableau des rationnements de larves de *Crassostrea gigas*

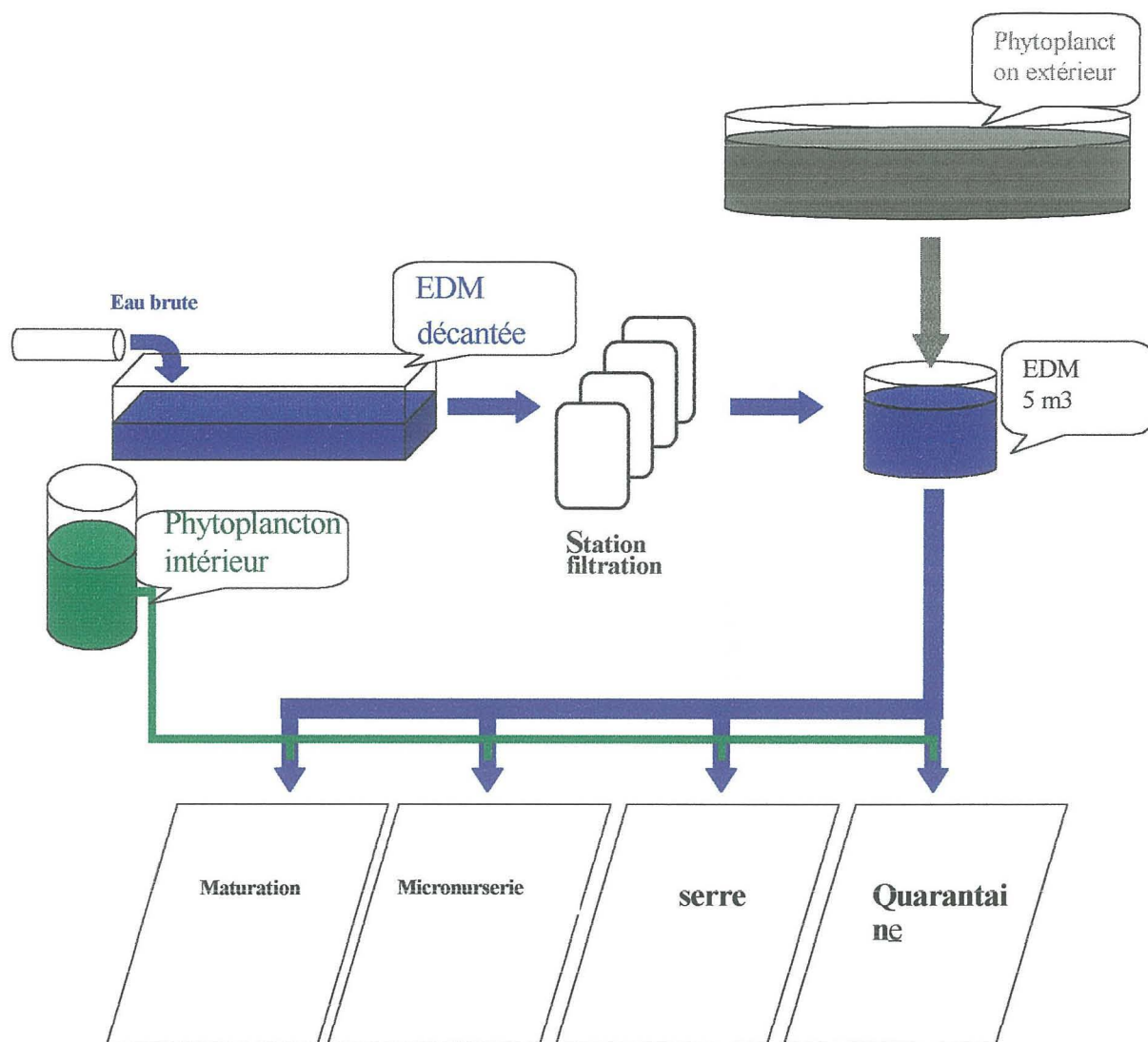
	Concentration par espèce en élevage selon la ration et les différentes phases de l'élevage en cellules/ μ l de volume		
	Iso	Extubo	Tetra
Ration d'écloserie	25	25	2
Ration progressive phase 1 (J1-J6)	3,25	3,25	0,3
Ration progressive phase 2 (J7-J12)	16,25	16,25	1,3
Ration progressive phase 3 (J13-Fin)	32,5	32,5	3

3-3- Répartition du phytoplancton dans l'ensemble de l'écloserie et la quantité consommée :

En plus de phytoplancton produit à l'extérieur et à l'intérieur, il existe de phytoplancton apporté par les différentes eaux de mer qui alimente notre écloserie.

A fin de connaître la répartition exacte de phytoplancton à l'écloserie et la quantité exacte consommée, on a recouru à la méthode de fluorimétrie puisque les concentrations auxquelles on a à faire sont en dessous du seuil de fiabilité des cellules de Malassez.

Pour cela, on a essayé de doser les chlorophylles (chlorophylle a et phéophytine a) dans différentes eau de mer de l'écloserie.f
Voici une représentation schématique de l'adduction d'eau en écloserie :



Phytoplancton intérieur : AISO+CAL+TETRA
Phytoplancton intérieur : *Skeletonema costatum*

Figure 14 : Schéma d'adduction d'eau dans l'écloserie

Résultats de dosages de chlorophylle a et phéophytine a par fluorimètre :(21 mars 2002)

Tableau n°9 : Les teneur en chlorophylle a et phéotynine a qui sont issus d'une moyenne sur 3 échantillonnages.

Naturedeséchantillons	Chlorophylle a (µg/l)	Phéophytinine a (µg/l)
EDM brute	2,15	0,11
EDM décantée	15,76	0
EDM 5 m ³	5,17	0
EDM d'écloserie en arrivée de maturation	53,42	0
EDM en sortie de bac de maturation	17,74	0
EDM sortie de maturation (extérieur)	16,73	0

Sigles :

EDM : **eau de mer**

EDM d'écloserie est constituée de : EDM 5m³ + EDM décantée + *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis aff galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*. En sachant que l'ensemble de ces constituants subissent de dilution afin de faciliter les répartitions et les conduites à travers l'écloserie.

EDM sortie de maturation (extérieur) constitue l'ensemble des EDM sortie de bac de maturation. Donc ils sont quasiment égaux, mais pour mes calculs j'utiliserai plutôt les valeurs référant à l'EDM sortie de maturation.

Les concentrations volumiques des chlorophylles consommés : Chl a co

Chl a consommée = Chl a d'EDM d'écloserie – Chl a d'EDM de sortie de maturation

Chl a co= 36,6912 µg/l qui représentent 69% de phytoplancton présent dans l'eau d'arrivée.

Ce qui veut dire que 31% du phytoplancton sont rejetés.

Pour éviter ces pertes, Il faut mieux contrôler le débit d'EDM en maturation d'écloserie afin de prolonger les temps de transit d'eau dans le bac d'élevage.

- On peut également effectuer de dilution 3/2 de l'eau d'écloserie en question.

3-4-Tests d'optimisation de production en phytoplancton réalisés

Pour optimiser notre production, on a réalisé 3 études expérimentales :

-Détermination du teneur en conway adéquat pour un bonne croissance d'un culture.

- Etude de productivité en phytoplancton en faisant varier le volume d'inoculum du départ.
- Mise à l'essai d'une culture semi-continue au volume 300 l.

3-4-1- Détermination de la teneur en Conway adéquat au bon développement d'*Isochrysis aff galbana*

Espèce étudiée: *Isochrysis galbana affinis*

Milieu utilisé :Ballon de 2 l

Notre teste consiste à varier le volume de conway apporté au milieu de culture.

- Culture N°1 : on a ajouté 2ml de Conway dans 2 l de culture, qui équivaut à la teneur(V/V%)= 0,1% de conway par rapport au milieu.
- Culture N°2 : on a ajouté 3 ml de Conway dans 2 l de culture : 0,15% de Conway.
- Culture N°3 : on ajouter 4 ml de Conway dans 2 l de culture : 0,2% de Conway
- Culture N°4 : on ajouter 5 ml de Conway dans 2 l de culture : 0.25% de Conway.

Cette dernière sert un témoin car elle représente la teneur qu'on a fixé pour la culture à 2 l.

Tableau n°10 : Suivi de croissance des cultures testées

Temps (Jour)	concentration (cellules/ml) Culture N°1	concentration (cellules/ml) Culture N°2	concentration (cellules/ml) Culture N°3	concentration (cellules/ml) Culture N°4
J0	829470	8034430	8239390	7808980
J1	7737240	12297600	11713500	10883400
J2	18118500	3754900	15167000	15156800
J3	20424300	24137300	19338000	22924800
J4	23621600	25076900	26214400	21664300
J5				
μ (cellules/J)	0,28	0,28	0,29	0,26
G (J)	2,51	2,44	2,40	2,72

Le tableau 10 montre qu'on a la meilleure vitesse spécifique de croissance à la culture N°3.

Tableau n°11 : : Deuxième test

Temps (Jour)	concentration (cellules/ml) Culture N°1	concentration (cellules/ml) Culture N°2	concentration (cellules/ml) Culture N°3	concentration (cellules/ml) Culture N°4
J0	4949780	5277720	6159050	5759380
J1	8372620	8895270	7757740	6784180
J2	15954500	16222600	13619600	12902200
J3	18968020	20940600	18487400	16487400
J4	20496000	24953900	22781300	20342300
J5				
μ (cellules/J)	0,36	0,39	0,33	0,32
G (J)	1,95	1,78	2,12	2,20

Les valeurs ci dessus affirme qu'on a meilleure vitesse spécifique de croissance à la culture N°2.

► Pour une culture dont la concentration initiale à J0 plus ou moins égale 8000000 cellules/ml, on doit utiliser la teneur 0.2% en Conway (ajouter dans la culture de 2 l un volume de 4 ml de conway pour l'espèce *Isochrysis aff galbana*).

► quant à la culture dont la concentration initiale environ 5000000 cellules/ml, on doit don ajouter 4 ml de Conway.

Milieu utilisé :Ballon de 10 l

Tableau n°12 : Suivi de croissance de cultures testées

Temps (Jour)	Concentration (cellules/ml) Culture N°1	Concentration (cellules/ml) Culture N°2
J0	5277725	5277720
J1	7824350	8726170
J2	12041400	13214800
J3	14881750	18392150
J4	20724900	22314400
J5		
μ (cellules/J)	0,34	0,36
G (J)	2,03	1,92

Culture N°1: Sur un milieu de 10 l, on ajoute 10 ml de Conway: ce qui représente 0,10% de Conway par milieu de culture.

Culture N°2: 15 ml de conway par 10 l de culture = 0.15% de conway par milieu de culture.

En comparant les vitesses spécifiques de croissance de deux cultures, on peut affirmer qu'en partant d'une concentration initiale plus ou moins égale à 5000000 cellules/ml il faut apporter 0.15% de conway par milieu de culture. Donc le teneur standard qu'on utilise est acceptable.

A partir de ces tests on peut déduire le teneur en conway favorable pour les cultures à 300 l.

On sait qu' en inoculant 10 l d'espèce *Isochrysis galbana affinis* dans culture 300 l, on arrive à une concentration initiale environ 800000 cellules/ml: donc, il faut apporter 0.024% de conway., qui équivaut à 72 ml de conway dans la culture à 300 l.

Pourtant, on apporte 300 ml de conway dans notre mode de culture qui est largement au dessus de valeur théorique.

Selon mes études, je propose de réduire à 4 ml de conway pour la culture à 2 l d'*Isochrysis aff galbana*. Quant à culture 300 l d'*Isochrysis aff galbana* , je propose de revoir le teneur de Conway utilisé actuellement.

3-4-2- Etude de variation de production à 300 l en apportant 20 l d'inoculum

Espèces étudiées: *Isochrysis galbana affini*, *Tetraselmis suecica*

Tableau n°13 : Suivi de croissance de 2 espèces distinctes ,les concentrations suivantes sont la moyenne de trois essais.

Temps (Jour)	Concentration moyenne (cellules/ml) AISO	Concentration moyenne (cellules/ml) TETRA
J0	1655540	149322
J1	2304560	212594
J2	6784180	306236
J3	8167660	492286
J4	10191430	702460
J5		
μ (cellules/J)	0,45	0,39
G (J)	1,53	1,79

Premièrement on constate une croissance multipliée par 2 par rapport à la moyenne de production pour l'espèce *Isochrysis aff. Galbana* et une forte vitesse spécifique de croissance. Parcontre la vitesses spécifique de croissance est faible pour l'espèce *Tetraselmis calcitrans*. On n'arrive pas au double de concentration de notre production moyenne mais on remarque une augmentation de productivité. La longue période d'adaptation de *Tetraselmis suecica* dans le milieu peut expliquer les croissances différentes entre les deux espèces.

3-4-3- Mise en application d'une culture semi-continue à l'intérieur (300 l)

Pour mes études j'ai essayé de varier le volume d'inoculum:

Première étude: on inocule à partir de 150 l de l'ancienne culture

Deuxième étude: on inocule à partir de 100 l de l'ancienne culture

Espèce mise en œuvre : *Tetraselmis suecica*

Pour mon étude, j'ai utilisé comme inoculum la culture à 4 jours

Tableau n°14 : suivi de croissance en semi-continue

Temps (Jour)	Concentration (cellules/ml) 150 l d'inoculum	Concentration (cellules/ml) 100 l d'inoculum
J0	225363	189816
J1	336560	283458
J2	561855	384693
J3	703584	623330
J4	883460	789660
J5		
μ (cellules/J)	0,34	0,36
G (J)	2,03	1,94

Pour les deux cas de culture, on a de vitesses spécifiques de croissance inférieures à la vitesse spécifique de croissance moyenne ($\mu = 0,41$ cellules/J). On remarque les cultures ont du mal à démarrer aux 2 premiers jours, c'est à dire les cellules ont de longue période d'adaptation sur le milieu. La raison est la présence de quantité importante des cellules vieilles dans l'inoculum. Pour ce genre d'étude il vaut mieux utiliser l'inoculum de 2 jours que de quatre jours mais faute de moyen qu'on dispose celui ci n'était pas réalisable.

Théoriquement, avec une concentration initiale $X_0 = 225363$ cellules, on doit arriver à J4 à concentration finale $X = 1161784$ cellules

Soit $\mu = 0,41$ et T (durée de culture) = 4 jours

$$X = X_0 * e^{\mu T}$$

Donc, en culture semi-continu on produit deux fois plus de la production moyenne.

4..Conclusion et perspectives

Pour l'ensemble de mes études tout au long de ce stage la notion de répétabilité a été évoquée et respectée. Quant à la notion de la reproductibilité, elle ne peut pas être confirmée car aucune étude a été faite sur le phytoplancton avant mon arrivée à la station.

Dans le cadre d'une étude expérimentale comme celle que j'ai effectuée, 3 mois sont trop courts pour réaliser une étude complète. Afin de bien illustrer les résultats que je vous ai présenté des approches pour chaque étape des études sont avancées.

Selon les différentes étapes, les résultats de mes études peuvent être vus sous plusieurs angles.

Culture extérieure

Grâce aux suivis de croissance par les dénombrements cellulaires qu'on a réalisés, on a pu mettre en relation la notion du temps d'inoculation et le devenir de nos cultures. Les concentrations d'inoculum de départ influencent beaucoup les concentrations finales distribuées. Plus que la concentration initiale est élevée, plus la croissance s'accélère. Comme la disponibilité en éléments nutritifs est limitée, ces derniers peuvent devenir un facteur limitant d'une croissance du phytoplancton à partir d'un certain seuil de concentration en cellules/ml.

Il faut rappeler que les conditions météorologiques ont beaucoup d'influence pour ce genre de culture. Il est plutôt conseillé de procéder à des suivis régulièrement surtout quand on passe d'une condition climatique à une autre. Malgré, la fréquence de mes dénombrements, il est important de suivre les cultures au rythme des saisons de manière à déceler les variations de productivité du système et adapter les conditions de productions. Le dénombrement seul sur cellules de Malassez n'est pas suffisant. Mais cette méthode reste la plus rapide pour obtenir une réponse dans un délai court.

Culture intérieure

On s'est fixé le même objectif que la culture précédente, sauf par le fait que la culture est à l'intérieur et les conditions expérimentales sont mieux contrôlées et donc plus favorables, on a pu faire certains tests en vue d'optimiser les productions. Grâce aux résultats de mes suivis, on propose de réduire la durée du cycle de culture pour l'espèce *Chaetoceros calcitrans* et l'espèce *Tetraselmis suecica*. Sur le plan pratique, on doit passer de 5 jours du cycle à 4 jours du cycle pour la première espèce et 4 à 3 pour la deuxième.

On a remarqué aussi que la vitesse spécifique de croissance pour chaque espèce augmente avec le volume du milieu. Des résultats sur les tests d'optimisation m'a permis de tirer certaines conclusions :

- On doit utiliser le teneur à 0,15% du conway pour les cultures au 2 l, on ajoute 4 ml du conway au lieu de 5 ml.
- On doit réduire le teneur pour le cuve de 300 l, le calcul montre que 100 ml de conway est suffisant pour assurer la croissance de cette culture.
- En apportant 20 l d'inoculum, on arrive au double de concentration de production moyenne pour l'espèce *Isochrysis galbana affinis*. Selon cette hypothèse la culture semi-continue est conseillée.

Néanmoins, comme la culture précédente, le suivi de croissance avec dénombrement seul n'est fiable dans la mesure où la solution prélevée n'est pas forcément homogène et on utilise qu'une seul appareil de mesure.

Afin d'augmenter notre production, il existe des paramètres qu'on doit améliorer qui pourront apporter de résultats significatifs :

On peut régulariser le débit en CO₂ en fonction de l'âge de culture et en fonction de l'espèce concernée.

On peut également maintenir la température d'eau forage qu'on utilise à la même température que la salle de production.

Donc, le renouvellement de certains équipements de culture est conseillé sur les points critiques cités ci dessus.

ANNEXES

BIOVAL TAUNAY-CHARENTE

ANALYSE CHIMIQUES D'EAU DE FORAGE 2001

Composants chimiques	Teneur en mg/l
NITRITES	0,044
NITRATES	3,081
FER	0,078
MANGANESE	0,422
Azoteammoniacal	2,658

Milieu de culture pour les souches d'algues

Produits GRAMMES (pour 10 l eau distillée)

NaCl	200 g
MgCl	87,0 g
Na ₂ SO ₄	32,4 g
CaCl ₂	18 g
KCl	5,5 g
NaHCO ₃	1,6 g
NaSiO ₃	0,88 g
KBr	0,8 g
SrCl ₂	0,5 g
H ₃ BO ₃	0,33 g
NaH ₂ PO ₄	0,21 g
FeCl ₃	0,069 g
NaF	0,027 g
NH ₄ NO ₃	0,024 g
MnSO ₄	0,016 g
TRIS	0,011 g

ZnSO₄
Na₂MoO₄
CuSO₄
EDTA

Ajuster à pH 7,4

MILIEU DE CONWAY. (pour 10 l)

Nitrate de sodium	1000 g
Dihydrogénophosphate de sodium	200 g
EDTA (acide éthylènediaminetetracétique)	450 g
Acide borique	336 g
Fer	10 g
Chlorure de manganèse	0,6 g

5 ml pour 2 litres
15 ml pour 10 litres
250.300 ml pour 300 litres

Pour notre conway modifié, on supprime le fer et le chlorure de manganèse

VITAMINES (solution de 1 l)

Thiamin	5 g
Vit B12	0,02 g
Biotine	0,01 g

Lexiques

Ecloserie : Etablissement d'aquaculture destiné à la reproduction des géniteurs et à l'obtention de jeunes larves et alevins.

Phytoplancton : C'est une autre appellation des micro-algues ou de plancton végétal.

Conway : Eléments nutritifs du milieu de culture des algues.

Batch : Une mode de culture discontinue

Semi-continue : Une mode de culture regroupant une mode de culture continue et une mode de culture en Batch.

Chlorophylle a et Phéphytinine a : Pigments synthétisés par le phytoplancton.

Extraction : est un moyen de purification d'un échantillon voulu.

Autoclave : moyen de stérilisation utilisant le vapeur d'eau.

Inoculer : ensemençer

Isolement : Séparation d'un échantillon voulu parmi le mélange de nombreux lots d'échantillons.

Temps de génération : Le temps pendant lequel une cellule se double.

Eau de mer brute : eau de mer issue d'une marée haute à la suite d'un pompage.

Eau décantée : L'eau de mer qu'on laisse stagner pendant quelques jours pour que le phytoplancton se prolifère.

Eau 5 m³ : Eau de mer provenant d'une filtration d'eau décantée qui sert à diluer le phytoplancton produit.

Biomasse : Une appellation qui rassemble toutes les mesures référant à une matière vivante qui est exprimée en cellules/ml pour notre cas.

Bibliographie

- TRINTIGNAC 1996
- Optimisation de l'enrichissement nutritif pour la culture d'*Isochrysis galbana* affinis.
- Atlas du phytoplancton marin VOL I, II, III
- URAPC/INT 96-02
- Chlorophylle – fluorimètre (J.NEVEUX 1976)
- Aquaculture 2^{ème} édition Gilbert BARNABE
- Rapport d'activité 2001 LGP IFREMER La Tremblade André GERARD

*A revoir
la notation
et rédaction.*

Résumé

Entre janvier et avril, j'ai effectué un stage pendant le quel j'ai étudié la production du phytoplancton au sein de l'écloserie de la station de L'IFREMER de La Tremblade. Mes études expérimentales nous ont permis de faire des approches par rapport à certains paramètres. En connaissant la quantité moyenne produite en phytoplancton par jour, on a pu déterminer le nombre des individus élevés nourris au sein de l'écloserie. Seul 69% du phytoplancton produit est consommé par les géniteurs, et les 31% restant sont rejetés.

Grâce aux résultats, on a pu également établir une relation entre le temps d'inoculation et la concentration de production finale en *Skeletonema costatum* afin d'éviter une éventuelle chute de culture quant à la culture extérieure. Pour la culture intérieure, on a tenu compte de certaines mesures :

Premièrement on doit réduire la durée du cycle de mise en culture pour les espèces *Chatoceros calcitrans* et *Tetraselmis suecica*.

Deuxièmement, on propose de changer la teneur des éléments nutritifs (Conway) apportés aux cultures dans le ballon de 2 L et la cuve de 300 L.

Troisièmement, on a démontré d'une manière expérimentale qu'en apportant plus d'inoculum on peut améliorer la production finale en phytoplancton.

Abstract

Between January and April, I spent my training course in hatching of IFREMER station of La Tremblade. During my training course, I learnt the phytoplankton product. My study leads us to suggest some change of direction for use phytoplankton growing.

In knowing, the middle quantity of phytoplankton products by day, We determined the number of fed individual in hatching. Only 69% of phytoplankton product is consummated by genitor, and the 31% staying are pier. Through result, we established equally a relation between the inoculation times and the final concentration of growing in *Skeletonema costatum* in order to outside growing fall. For the inside growing , we must be careful to different things:

Firstly, we must reduce the period of the growing of *Chatoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica*.

Secondly, we suggest to change the quantity of the food (Conway) given to growing in 2l tank and the 300 l tank..

Thirdly, we demonstrated with an experimental method that we can improve the final production of phytoplankton if we bring more inoculum .