

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral

(I . S . M . A . L)

Mémoire en vue d'obtention du diplôme d'études

universitaires appliquées

D . E . U . A

en Sciences de la Mer

Option : *AQUACULTURE*

Thème

**ESSAI DE CULTURE DE L'ESPECE DE
MICROALGUES Chlorella sp. DANS DIFFERENTS
MILIEUX**

Présenté par : Mr. HADJADJI Nabil

Devant la commission du jury :

- | | | | |
|-----------------|------|-------|--------------|
| - Mr. ZIANI | M. | | Président |
| - Mr. BELHASNET | K. | | Promoteur |
| - Mr KERZABI | F. | | Examinateur |
| - Mme KORICHI | H-S. | | Examinatrice |
| - Mlle LOUANCHI | F. | | Examinatrice |

Janvier 2002

SOMMAIRE

Introduction	3
I - Généralités	4
1- Systématique et morphologie	5
1.1- Systématique	5
1.2- Morphologie	5
2- Ecologie générale	6
2.1- Répartition géographique	6
2.2- Température	6
2.3- Lumière	6
2.4- Sels nutritifs	7
3- Biologie	7
3.1- Reproduction	7
3.2- Photosynthèse	7
II - Matériels et méthodes	
1- Prélèvement des échantillons	8
2- Isolement des cellules et mise en culture	8
2.1- Isolement sur milieu solide	8
2.2- Isolement sur milieu liquide	8
2.3- Purification	9
3- Matériels de culture	9
3.1- Equipement	9
3.2- Verrerie et petit matériel	10
3.3- Milieux de culture	10
3.3.1- Milieu de culture AGRISPON	10
3.3.2- Milieu de culture de PROVASOLI	11
3.3.3- Milieu de culture de MEYER	11

4- Méthodes de culture

4.1- Les types de culture

4.1.1- La culture en continu

4.1.2- La culture successive

4.2- Contrôle des paramètres physico-chimiques

4.2.1- Environnement physique

4.2.2- Environnement chimique

4.3- Contrôle de croissance

4.3.1- Le développement de la culture

4.3.2- Contrôle du développement algal

III - Résultats et discussion

1- Résultats de la croissance de la chlorelle dans différents milieux

1.1- Résultats de petits volumes

1.2- Résultats de gros volumes

2- Interprétation des résultats

2.1- Les petits volumes

2.2- Les gros volumes

3- Discussion

CONCLUSION

Introduction

Les innombrables Algues, la plupart microscopiques, qui peuplent nos eaux, ont un intérêt puissant en pisciculture ; ce sont elles qui forment presque entièrement la nourriture des animaux du plancton et de Benthos (VIVIER et MANGUIN, 1943).

En milieu naturel, qu'il s'agisse d'eau de mer ou d'eau douce ; les premiers maillons des réseaux trophiques sont planctoniques. L'homme s'est intéressé aux échelons planctoniques à la fois dans le cadre de contrôle des écosystèmes aquatiques dans leur intégralité et dans celui, plus limite, du contrôle de chaque maillon trophique (BARNABE, 1991)

La culture de microalgues a été, et encore l'objet de nombreux travaux, dont on peut citer :

- PRVASOLI et Col, (1957) ont fait un grand pas dans le développement des milieux artificiels pour la culture des microalgues.
- BERLAND (1966) sur l'étude de la culture des diatomées.
- GUERIN et Col, (1978) ont intéressé sur l'utilisation d'engrais agricole pour la culture des microalgues.
- PINCEMIN (1971) a travaillé sur l'action de facteurs physiques, chimiques et biotiques sur quelques Dinoflagellés et Diatomées en culture.
- HUSSEIN, AKATSU et EL ZAHAR (1981) sur les facteurs qui affectent la production semi-continue de *Tetraselmis suecica*.

L'objectif de ce travail consiste à tester trois milieux de culture pour la culture de l'espèce de microalgue *Chlorella sp.* et de voir laquelle de ces milieux est la plus favorable pour le développement de l'espèce. On distingue trois parties ; la première qui traite sur des généralités d'écologie et de biologie de microalgues, la deuxième qui présente le matériel et les méthodes utilisées. Et en fin, une troisième partie qui analyse et interprète les résultats obtenus.

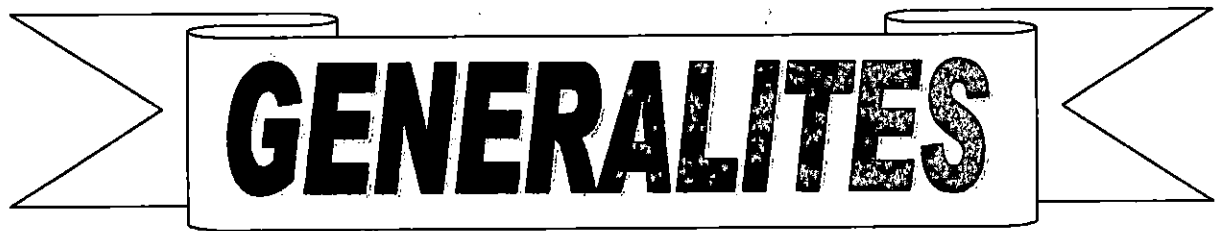
Selon, GAYRAL (1975), MANGUI N (1943), DAVIS (1955) ; le terme d'algues , qui comprend tous les thallophytes pourvus de chlorophylle, qu'ils soient marins ou d'eau douce, se divise en trois groupes ou phylums , selon les caractères des pigments élaborés par les chlorophylles on distingue :

Les Chlorophytes: présence de chlorophylles **a** et **b**, sont associées à des *caroténoïdes*, le produit de leur activité photosynthétique est l'amidon qui est toujours d'origine interplastidiale.

Les Chrysophytes : renferment des chlorophylles **a** et **c** (ou **a** et **e**) et un excès de *caroténoïdes* qui leur confère une couleur brun, n'élaborent jamais d'amidon mais il existe un polysaccharide.

Les Rhodophytes : ont un appareil plastidial dans lequel les chlorophylles **a**, **d** et les *caroténoïdes* sont associés à des pigments d'une autre catégorie chimique, les *bilichromoprotéines*, les réserves sont constituées par de l' *amidon floridéen*

En fin, malgré l'absence de plastes et de noyau différencié, ils définirent un quatrième groupe rattaché au Algues, celui des **Cyanophycées** ou **Cyanobacters** ; le nucléoplasme est diffus au sein du cytoplasme et non limité par une membrane différenciée . Il renferme de la chlorophylle **a** et des *phycobiliprotéines*. Les réserves sont du glycogène et des protéines (MANGIUN, 1943)

A horizontal banner with a central rectangular box containing the word "GENERALITES" in a bold, black, sans-serif font. The banner has a ribbon-like appearance with pointed ends on both sides.

GENERALITES

1- Systématique et morphologie :

1.1- Systématique :

Phylum :	<i>Chlorophytes</i>
Embranchement :	<i>Chlorophycophytes</i>
Classe :	<i>Chlorophycées</i>
Sous classe :	<i>Chlorophycidaes</i>
Ordre :	<i>Chlorococcales</i>
Famille :	<i>Oocytacées</i>
Genre :	<i>Chlorella</i>
Espèce :	<u><i>Chlorella sp.</i></u>

1.2- Morphologie :

Les Chlorelles sont des cellules de petite taille, leur diamètre varie de quelques microns à 20 μ au maximum, toujours solitaire, de forme sphérique ou ellipsoïdale, plus rarement réniformes ou asymétriques, à membrane nue, lisse bien distincte avec 1 ou rarement 2 plastes, parfois un pyrénioïde . (BOURRELLY, 1990) (Voir Figure n° 01)

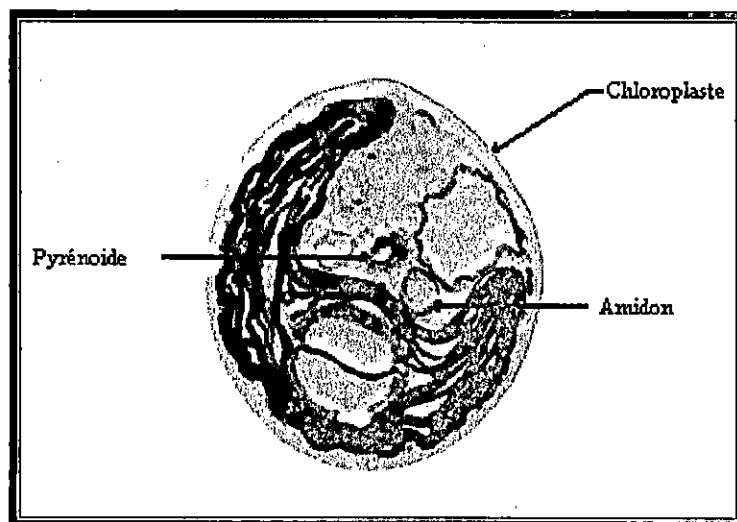


Figure n° 01 : Morphologie de Chlorella. Chloroplaste (TAMARU, 2001)

2- Écologie générale :

2.1- Répartition géographiques :

Les algues en général, autant qu'organismes chlorophylliens, ont toujours besoin d'eau ou d'humidité, d'air, de lumière et de sels minéraux pour pouvoir se développer, ainsi qu'elles prospéreront là où ces conditions sont réunies.

Les microalgues proprement dite ont presque une distribution universelle, dans les masses d'eau convenablement éclairées, qu'elles soient douces ou salées (DAVIS, 1955)

Les Chlorelles sont des Algues subaériennes vivant sur la terre humide, les écorces d'arbres, dans les écoulements des sèves d'arbres, ou en symbiose avec des animaux aquatiques (Ciliés, Eponges, Hydres, ... etc.). (BOURRELLY, 1990)

2.2- Température :

La température est, bien évidemment, l'un des facteurs parmi les plus importants qui conditionnent la répartition géographique des microalgues. (GAYRAL, 1975)

La majorité des espèces qui vivent près des côtes tolèrent des variations de températures saisonnières de grande amplitude et sont dites *Eurythermes*, par opposition aux espèces *Sténothermes* qui ne supportent qu'un faible échauffement ou refroidissement des eaux. (ALZIEU, 1986)

On retrouve ainsi une période hivernale et une période estivale pauvres, entre lesquelles prennent place une phase printanière puis une phase automnale où interviennent des proliférations abondantes. (RINCE, 1979)

2.3- Lumière :

L'énergie lumineuse disponible varie suivant la latitude mais elle varie aussi en fonction des saisons. (BARNABE, 1991). Seules les radiations visibles du spectre solaire (400-700 nm) sont utilisables pour la photosynthèse (GOLDMAN, 1979).

Il existe pour chaque espèce de micro algues, une illumination maximale, minimale et optimale pour son développement. (BELKOURA et Col, 1994).

La lumière joue un rôle essentiel dans la répartition verticale du micro algues. (DAVIS, 1955)

2.4 - Sels nutritifs :

C'est un facteur limitant du taux de croissance. Les besoins majeurs renferment le carbone, phosphore, azote, soufre, potassium, et magnésium. Le fer et le manganèse sont assimilés en petite quantité. Les éléments traces comme le *Co*, *Zn*, *Cu*, *B* et *Mo*, en plus de certaines substances organiques (vitamines, acides nucléiques, facteurs de croissance) sont nécessaire pour les formes qui ont recours à l'hétérotrophie (BECKER, 1994)

3- Biologie :

3.1- Reproduction :

Elles se multiplient par 2, 4, 8, 16 autospores qui se libèrent par rupture de la membrane maternelle. (Voir Figure n° 02)

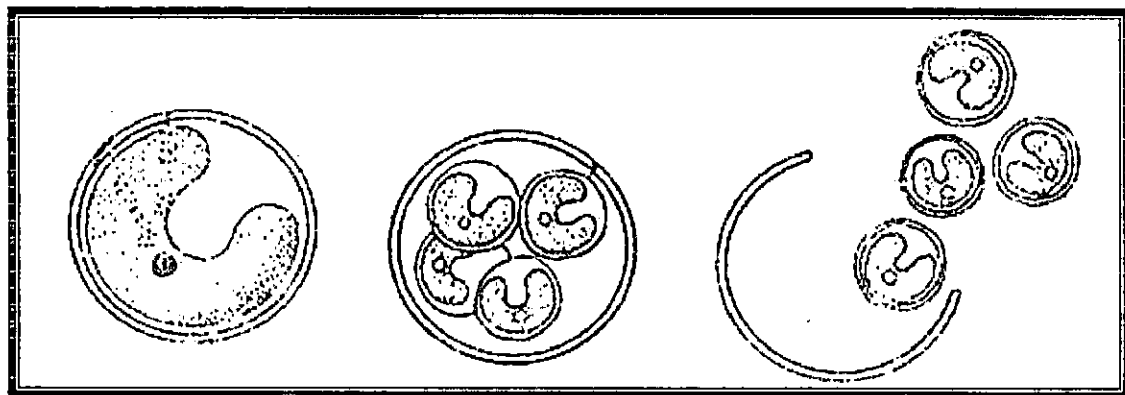
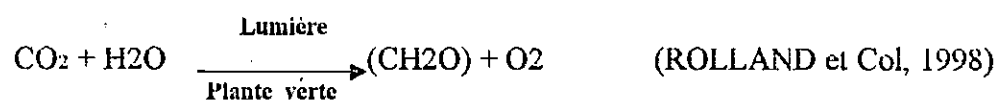


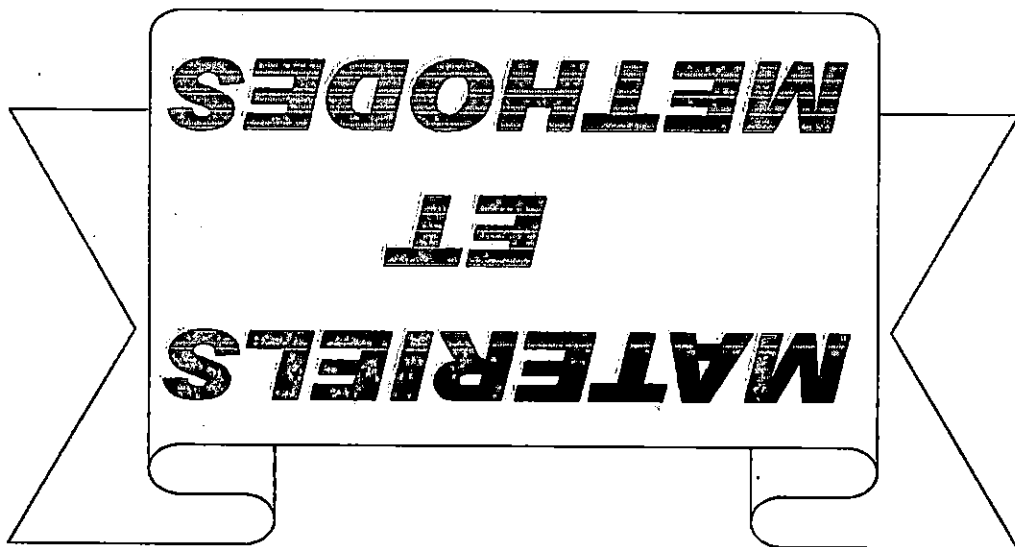
Figure n° 02 : Autosporelation de *Chlorella sp.* (BOURRELLY, 1990)

3.2- Photosynthèse :

La photosynthèse est le processus biologique par lequel les êtres vivants utilisent l'énergie solaire pour leur croissance et développement. La photosynthèse se manifeste par une absorption de gaz carbonique pour la synthèse de molécules carbonées et par un dégagement d'oxygène. (MATHIS, 1996)

La réaction générale de la photosynthèse est comme suite :





MATERIELS
ET
METHODES

1- Prélèvement des échantillons :

Le prélèvement des échantillons d'eau douce a été réalisé au niveau des bassins de l'ISMAL réservé pour la culture de microalgues. La filtration a été réalisée par des filtres de 50 μm et 30 μm a fin d'éliminer une grande partie de zooplancton, le filtrat est récupéré dans des ballons d'un litre stériles.

2- Isolement des cellules et mise en culture :

Le but est d'obtenir des cultures monospécifiques. Plusieurs méthodes peuvent être employées

2.1- Isolement sur milieu solide :

La méthode est identique à celle appliquée pour les bactéries. Elle peut se pratiquer à certains organismes à paroi résistante (appliqué ainsi pour des *Chlorella*) qui poussent bien sur milieu Erdschereiber solidifié par 1.5 % d'Agar mélangé avec le milieu nutritif choisi dans une boîte à pétri, l'ensemencement de l'échantillon se fait grâce à une boucle métallique traînée en zigzag, on fait répéter l'expérience sur la colonie de l'espèce choisie jusqu'à possibilité d'isoler une espèce qui est mise en culture dans un milieu liquide. (PINCEMIN-1971, FIALA-1978)

2.2- Isolement sur milieu liquide :

Les cultures sont transférées, sous loupe binoculaire ou microscope inversé, dans des bains successifs avec une micro-pipette. Peu de liquide doit être transféré de façon que le taux de dilution soit important. Les gouttes sont déposées dans des verres de montre, sur une lame creuse ou, tout simplement, sur une lame porte-objet protégée par une boîte à pétri. Le tout étant stérile. (DROOP-1954, LE BORGNE-1986)

Les micro-pipettes sont faites à partir de pipettes pasteur dont l'extrémité est effilée à la flamme d'un bec bunsen ; leur diamètre dépend de la taille de l'espèce de microalgue à isoler, mais doit être supérieur à 30 μm pour permettre au liquide d'entrer par capillarité. (FIALA, 1978)

2.3- Purification :

Quand les cultures unialgales sont développées, on cherche ensuite à éliminer les bactéries pour les rendre axéniques. Pour cela, on peut les laver par migration dans un milieu contenant des antibiotiques.

Des cultures sur milieux solides contenant des antibiotiques peuvent servir également à obtenir des colonies algales débarrassées des bactéries. (LE BORGNE, 1986)

Le tableau ci-dessous montre les quantités nécessaires (en mg/ml) des trois antibiotiques les plus souvent employés dans les mélanges d'antibiotiques.

	Diatomées	Rotifères Noctiluca Micromonas
Pénicilline sulfate	5	8
Streptomycine sulfate	1.6	2
Chloramphénicol	0.2	0.008

Tableau n° 01 : Mélange d'antibiotiques ; quantité en mg/ml
(DROOP-1967 in FIALA-1978)

Pour notre travail nous avons utilisé la méthode la plus facile et la plus convenable pour l'ensemble du matériel disponible au niveau du laboratoire, qui consiste à réaliser l'isolement dans un milieu liquide.

3- Matériel de culture :

Le matériel indispensable aux cultures d'algues n'est pas fondamentalement différent de celui utilisé en bactériologie.

3.1- Equipement :

- Une armoire vitrée avec une armature en inox
- Microscope optique (type, ZEISS)
- Microscope inversé (type, ZEISS)
- Balance de précision

a- Verrerie et petit matériel :

- Tubes à essais de 20ml
- Erlenmyer de 250 ml et 500 ml
- Ballons de 1L
- Pipettes pasteur
- Pipettes graduées de 1 ml, 20 ml
- Cellule de comptage (type Nageotte)
- Pissette
- Cotton cardré
- Filtres de 50 μm et de 30 μm

b- Nettoyage de la verrerie :

La verrerie a été nettoyée avec avec un grand soin afin d'éviter toute sorte de contamination car beaucoup d'échecs peuvent provenir de vaisselle douteuse.

Avant chaque utilisation il a été procédé à la stérilisation des verreries, par une solution sulfochronique pendant 24 heures, puis rincées abondamment à l'eau courante et ensuite à l'eau distillée ; puis elles ont été mises à l'étuve pendant deux heures à 60 °C.

3.2- Milieux de culture :

Il existe plusieurs milieux de culture destinées à la culture de microalgues (voir annexe), mais, vu le manque de matériel et quelques produits introuvables sur le marché, nos essais ont été limités sur ces trois milieux.

3.2.1- Milieu de culture *AGRISPON* :

D'après le rapport d'AGRI-TEC, *AGRISPON* est un fertilisant biologique liquide, utilisé en agriculture, qui joue un rôle de stimulant métabolique. Il contient des éléments minéraux et organiques.

a- Eléments minéraux :

Il contient environ 0,22 % de composés minérales (voir tableau ci-dessous)

Tableau n° 02 : Composition minérale d'AGRISPON en mg/litre (AGRI-TEC, 1988)

Elément	Concentration	Elément	Concentration	Elément	Concentration
Potassium	2,200	Chloride	700	Silice	72
Sodium	207	Nitrate	700	Fer	23
Bore	60	Sulfate	110	Calcium	4
Magnésium	7,6	Aluminium	26	Sélénium	0,295
Cuivre	2,8	Phosphore	5	Antimoine	0,036
Nickel	0,288	Manganèse	0,4	Zinc	0,012
Chrome	0,0204	Cobalt	0,057	Molybdène	Traces
Argent	0,005	Baryum	0,020		

b- Eléments organiques :

AGRISPON contient environ 0,40% de matière organique constitué de dérivés d'extraits végétaux provenant de tissus de plantes essentiellement :

- Acide nucléique (ARN, AND)
- Régulateurs de croissance
- Glucosides
- Porphyrines
- Morphogène
- Vitamines

L'utilisation d'AGRISPON :

- Agiter fortement le flacon, pour réactiver le produit
- La dilution est de 300 litre pour 1 litre d'AGRISPON (= 0.3 %)
- Utiliser dans les six heures qui suivent sa dilution dans l'eau

3.2.2- Milieu de culture de *PROVASOLI* :

Selon *PROVASOLI*, Mc *LANGHLIN* et *DROOP*-(1956) ; le milieu de *PROVASOLI* est un milieu synthétique composé de éléments suivants :

Tableau n° 03 : Composition de milieu de *PROVASOLI*, pour un litre d'eau il faut :

Elément	Concentration
Nitrate de sodium	56,10 mg/l
Na ₂ glycérophosphate	07,65 mg/l
Fe-EDTA	02,50 mg/l
Cyanocobalamine	01,60 µg/l
Biotine	0,80 µg/l
Thiamine-HCL	20,00 µg/l
Tris	20,00 mg/l
Zinc	15,90 mg/l
Mn	02,60 mg/l
EDTA	02,68 mg/l
Bore	18,27 mg/l

3.2.3- Milieu de culture de *MEYER*:

D'après (*VENKATARMAN*, 1969), c'est un milieu synthétique composé de :

Tableau n° 04 : Composition de milieu *MEYER*

Elément	Concentration
KNO ₃ (nitrate de potassium)	1,210 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O (sulfate de magnésium)	2,460 g/l
K ₂ HPO ₄ (phosphate dipotassique)	1,230 g/l
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (sulfate de fer)	0,052 g/l
Sodium citraté	0,195 g/l
Eau distillée	1,000 litre

Pour la préparation de milieu de culture on a procédé comme suite :

- Le milieu *AGRISPON* est utilisé par simple dilution on suivant la règle de 1L/300litres d'eau cité dans le rapport d'AGRI-TEC.
- Pour les deux autres milieux *PROVASOLI* et *MEYER*, les pesés des produits chimiques des contenus des milieux ont été réalisés par une microbalance de type « Mettler AE 163 » au laboratoire de chimie.
- L'eau douce qu'on a utilisée pour les cultures de *Chlorella.sp* à subie une stérilisation par autoclave puis une filtration pour éliminer toute contamination par bactéries et pour éliminer les autres organismes qui peuvent êtres existés.

4- Méthodes de culture :

4.1- Les types de culture :

Les deux types de culture pour les volumes dépassant 18 litres sont :

4.1.2- La culture en continu :

Dans le cas de culture d'Algues en volume clos, les éléments nutritifs assurent la croissance jusqu'à leur épuisement. Quand un ou plusieurs éléments deviennent limitants, les organismes meurent d'où la nécessité de repiquer la culture dans un milieu neuf pour en assurer la survie. Si on réduit l'intervalle de temps entre deux repiquages, on arrive, à la limite, à une *culture continue* : apport régulier de milieu nutritif et élimination d'un volume égal de culture ce qui maintient un état d'équilibre. (MONOD, 1949)

Deux générations d'appareils de culture continue existent :

- Le *Turbidostat* qui permet de conserver une densité constante d'organismes en régulant l'arrivée du flux d'éléments nutritifs.
- Le *Chémostat* qui utilise un flux constant du milieu dans lequel un élément limitant joue le rôle de régulateur. (DE BILLY, 1978) (Voir Figure n° 03)

4.1.2- La culture successive :

A partir d'une culture pure maintenue en tube à essai et repiquée « dédoublée » tous les 15 jours, on inocule un nouveau tube auquel est ajoutée le milieu de culture. Pour l'inoculation on prélève dans un erlenmyer de 250 à 500 ml, 20 ml de cette culture et on ajuste avec de l'eau douce. On passe de la même façon à l'erenmayer de 2 litres, en eau stagnante. Le volume suivant est le ballon de 20 litres aéré en air chargé de 2 % de CO₂. Les ballons servent à leur tour à inoculer des gaines de matière plastique transparente de 80 à 120 litres, unité finale de production. (Voir Figure n° 04)

Il faut une vingtaine de jours, à partir du tube à essai pour obtenir les premières productions. (BARNABE, 1991)

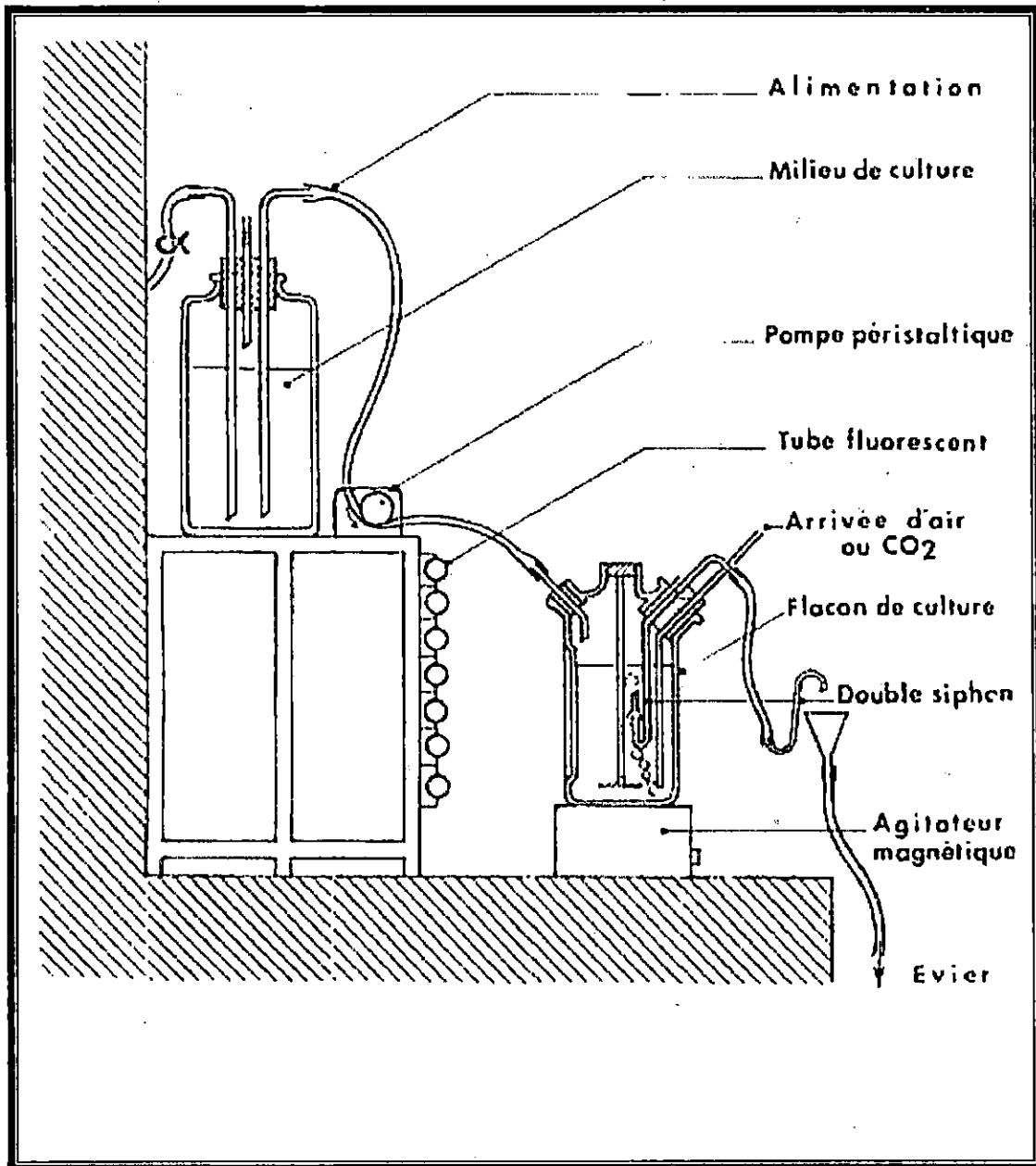


Figure n° 03 : Vue schématique de l'installation d'un Chémostat. (DE BILLY, 1978)

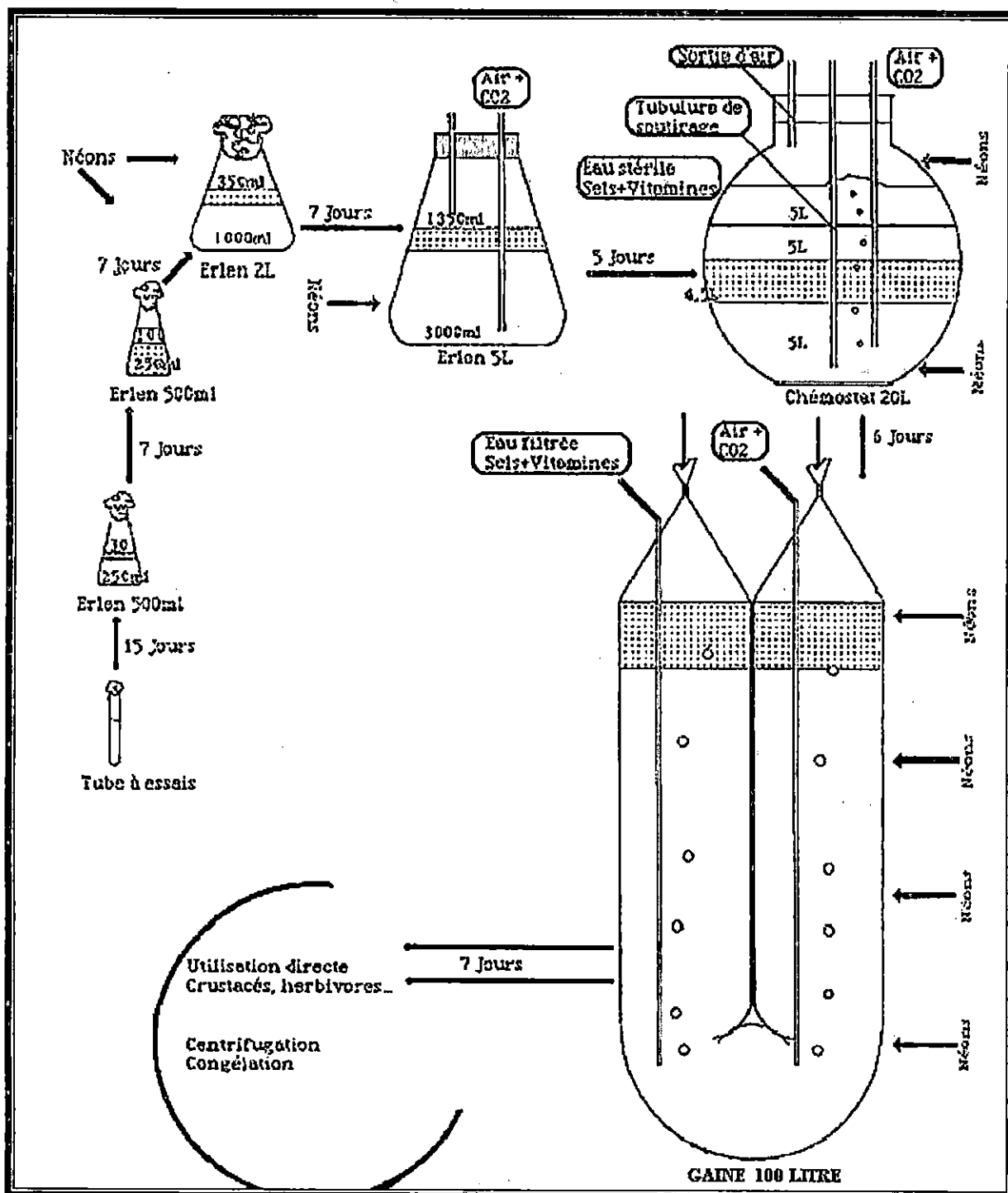


Figure n° 04 : Représentation schématique de processus de déroulement d'une culture de microalgues d'après BARNABE (1991)

4.2- Contrôle des paramètres physico-chimiques :

4.2.1- Environnement physique :

a- *Lumière* :

On peut utiliser la lumière naturelle mais on devient alors très dépendant des variations climatiques. (LE BORGNE, 1986)

La lumière artificielle est préférée à la lumière solaire. Les tubes fluorescents sont presque universellement utilisés car ils ne chauffent pas et certains peuvent avoir un spectre d'émission proche du spectre des plantes. (FIALA, 1978)

Nos cultures ont été soumises à un éclairage artificielle des tubes fluorescents produisant une intensité lumineuse de 4000 lux. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un luxmètre.

b- *Température* :

Comme les éclairages fluorescents apportent de la chaleur, il est nécessaire de réfrigérer les cultures, surtout en petit volume, on peut faire circuler de l'eau froide autour des récipients de culture ou plus simplement refroidir l'air de la pièce où il se trouvent nos cultures à l'aide d'un climatiseur pour essayer de maintenir la température autour de 20 ± 2 °C.

c- *Agitation* :

Les cultures de la Chlorelle ont tendance à sédimenter. Il est donc nécessaire de les agiter quotidiennement, manuellement en ce qui concerne les petits volumes jusqu'à 1 ou 2 litres, tandis que pour les volumes plus importants, on a utilisé l'agitation par bullage d'air à l'aide d'une pompe à air, qui a l'avantage d'apporter du gaz carbonique.

4.2.2- Environnement chimique :

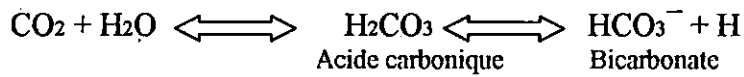
a- *Les sels minéraux* :

Le besoin majeur en sels minéraux est basé sur ces trois éléments : nitrate, phosphate et sodium, en plus d'autres éléments plus ou moins importants, et c'est à partir de milieu de culture utilisé qu'on peut définir leur concentrations nécessaires .

b- *Le gaz carbonique et pH* :

On peut dire que le gaz carbonique apporté à la culture par bullage est suffisant pour garder un métabolisme photosynthétique sain pour les souches en culture. Cependant, pour les cultures en grands volumes et pour assurer une bonne fertilisation carbonique, il est conseillé d'apporter 1% du gaz carbonique de volume total d'air. (BARNABE, 1991)

Le contrôle du pH est réalisé grâce à un ph-mètre. Le pH optimal pour la culture de microalgues se situe autour de 7,5-8,5. (ARRIGNON, 1991)



Le CO₂ 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. (AUDINEAU et BLANCHETON, 1986)

4.3- Contrôle de croissance :

4.3.1- Le développement de la culture :

En général, les étapes de la croissance d'une culture en volume clos sont identiques à celles des bactéries, et on peut distinguer quatre phases essentielles (Voire Figure n° 05) :

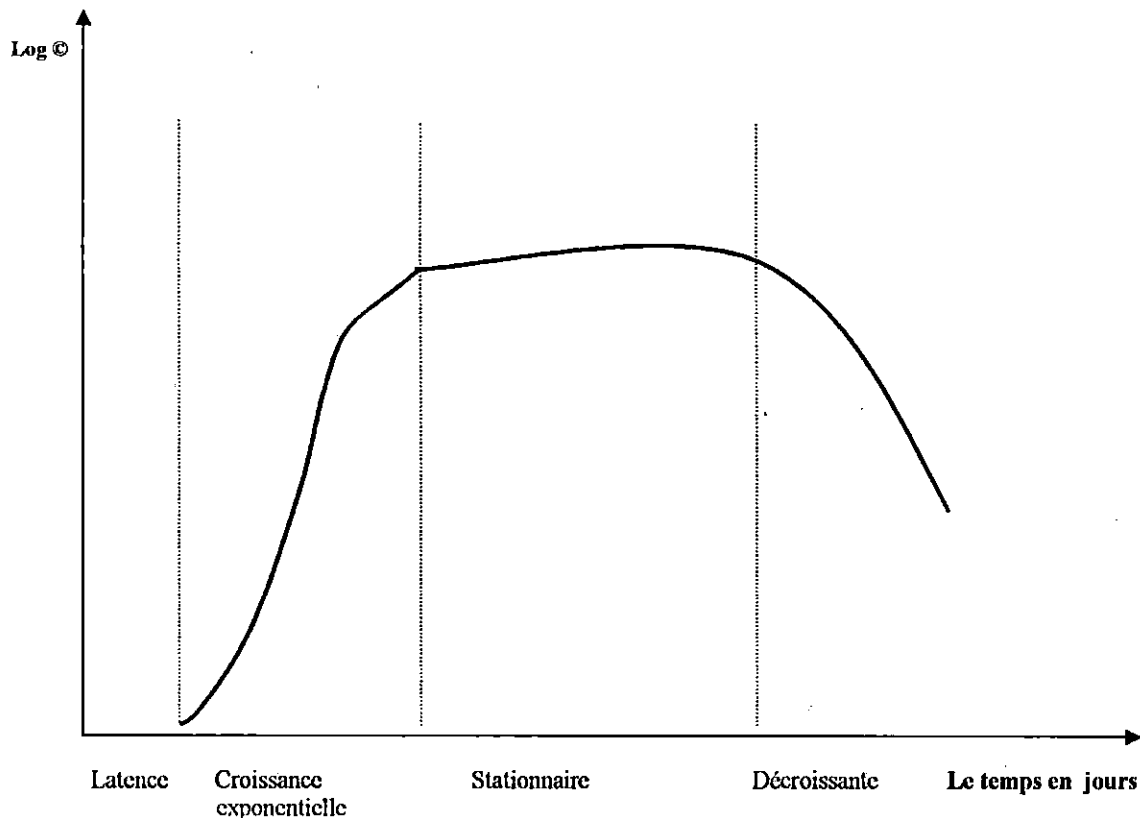


Figure n° 05 : Courbe de croissance d'une algue en culture montrant les différentes phases de culture.

a- Phase de latence :

Durant laquelle, le nombre de cellules diminue ou reste stationnaire. Ceci est dû au fait que toutes les cellules inoculées ne sont pas viables et que les cellules viables ne sont pas en condition optimale pour se diviser. La phase de latence est d'autant plus longue que l'inoculum est âgé et que sa taille est petite. Cette phase est plus courte quand la culture est repiquée dans la première partie de la phase exponentielle. (SPENCER, 1954)

b- Phase exponentielle :

Dans cette phase, les cellules se divisent dans un temps caractéristique appelé *temps de division*. Le développement de la population est de la forme :

$$N_t = N_0 e^{K_e t} \quad (\text{FIALA, 1978})$$

Où : N_t : le nombre d cellules au temps t_1
 N_0 : le nombre d cellules au temps t_0
 K_e : la constante de croissance

Avec : $t = t_1 - t_0$

$$K_e = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

c- Phase stationnaire :

Une phase où le nombre de cellules ne varie pratiquement pas ; il peut y avoir une modification chimique du contenu cellulaire par suite du vieillissement. Cette phase peut durer plusieurs semaines s'il n'y a pas de contamination. (LE BORGNE, 1986)

d- Phase létale :

Avec un arrêt total des divisions cellulaires ; les cellules qui meurent ne sont pas remplacées (FERNANDEZ-REIRIZ et Col, 1989)

4.3.2- Contrôle du développement algal :

Plusieurs méthodes permettent de suivre la croissance des algues en culture, soit par :

- **Mesure de poids sec :** C'est une mesure précise pour comparer plusieurs cultures entre elles, elle consiste à sécher au four après centrifugation d'un volume important de l'échantillon à mesurer. mais le processus est long et ne permet pas un diagnostic rapide. (JACQUE, 1978)
- **Mesure de la densité optique :** Par un spectrophotomètre qui mesure la pénétration de radiation d'une longueur d'onde de 680 nm et 750 nm, à travers un échantillon contenu dans une cuve en quartz. On peut établir une correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaire ; une variation consiste à mesurer la teneur en chlorophylle. (NEVEUX, 1978)
- **Mesure de volume cellulaire :** On fait passer les échantillons dans une centrifugeuse et on mesure le volume de culot ; la mesure est facilitée si le fond des bols de centrifugation est long et étroit. (LE BORGNE, 1978)

A côté de ces méthodes classiques, il est souvent nécessaire de connaître les variations du nombre de cellules. Ces numérations nécessitent des cellules ou des chambres de comptage ou, éventuellement, un compteur électronique de particules.

De nombreuses cellules et chambres de comptages sont commercialisées, leur volume varie dans une gamme comprise entre 1 ml pour la chambre de Sedgwick-Rafter et 10^{-4} ml pour la cellule de Thoma (LUND et Col, 1958 ; McALICE, 1971) (Voir tableau n° 05 et Figure n° 06 ci-dessous)

Tableau n° 05 : Caractéristiques des principales cellules et chambres de comptage.

Type de cellule	Dimensions du quadrillage L x I x P (mm)	Volume (ml)
Thoma	1 x 1 x 0,1	10^{-4}
Agasse Lafont	1 x 1 x 0,1	10^{-4}
Neubauer et Neubauer modifié	3 x 3 x 0,1	9.10^{-4}
Mallassez	2,5 x 2 x 0,2	10^{-3}
Fushs Rosenthal	4 x 4 x 0,2	32.10^{-4}
Agasse Lafont B	5 x 4 x 0,5	10^{-2}
Lemaur	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

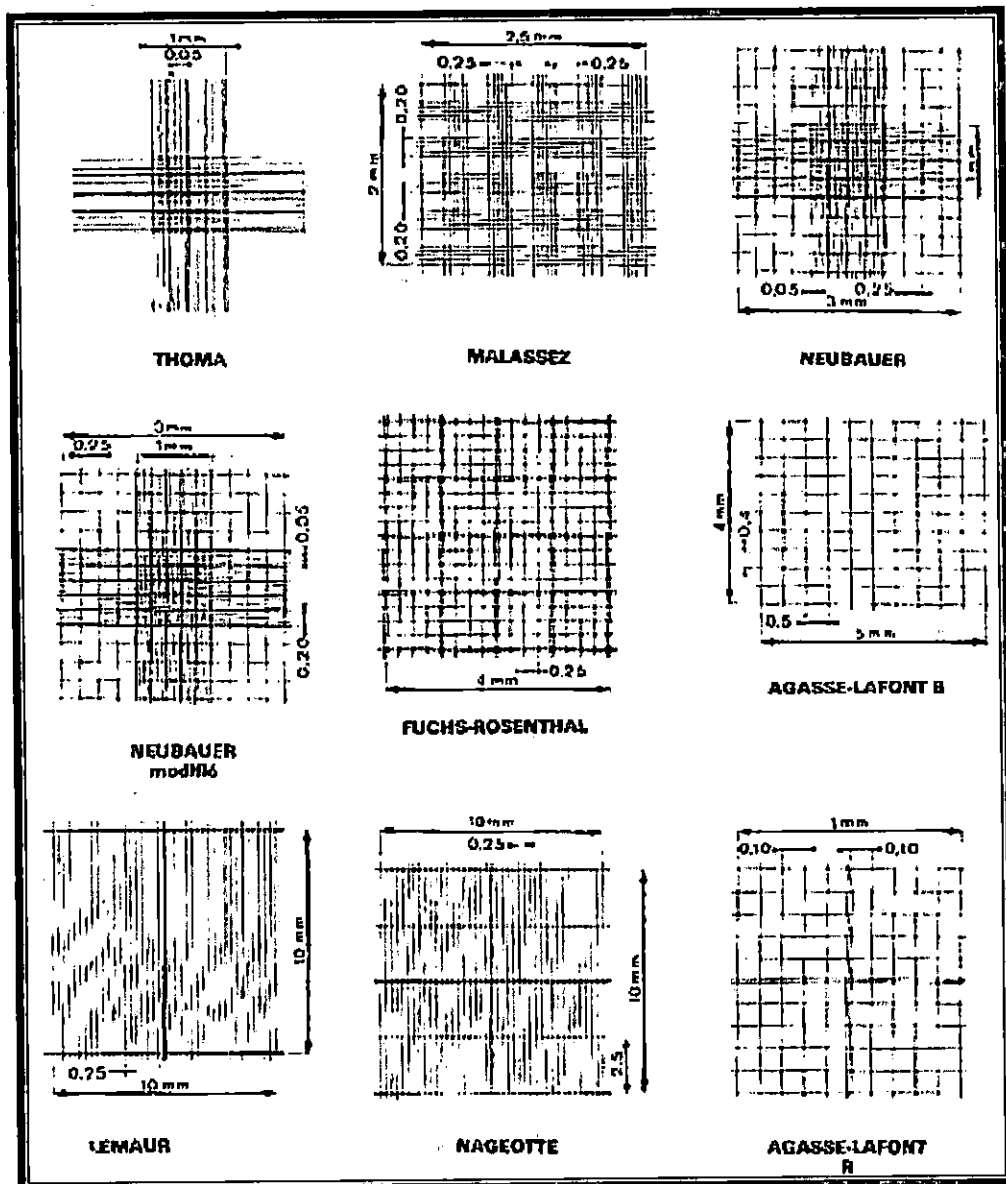


Figure n° 06 : Quadrillage de quelques cellules de numération. (FIALA, 1978)

Pour nos cultures on a réalisé le comptage à l'aide d'une cellule de type Nageotte. La procédure suivie pour l'utilisation de cette cellule est la suivant :

- Après homogénéisation les algues sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur, puit une à plusieurs gouttes sont déposées sur la cellule.
- Humecter les zones de support avec de la salive.
- La lamelle est déposée sur la cellule en évitant d'emprisonner les bulles d'air, puis une légère pression est exercée sur les bords assurant une adhérence parfaite entre cellule et lamelle. (Voir Figure n° 07)

Le comptage a été effectué les jours (samedi, lundi et mercredi) pendant une durée de 17 jours.

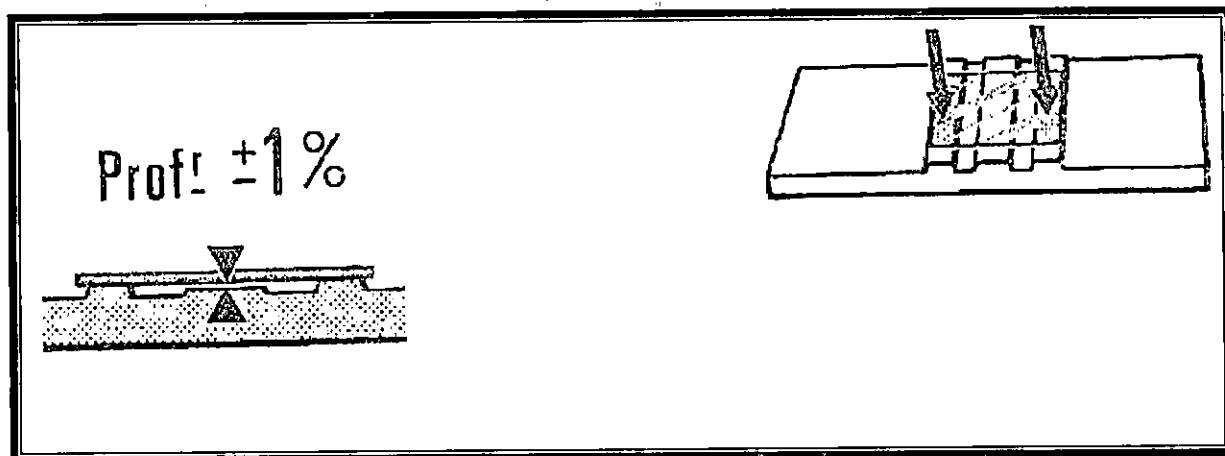


Figure n° 07 : Description d'une cellule de Nageotte. (FIALA.1978)



RESULTATS
ET
DISCUSSION

1- Résultats de la croissance de *Chlorella.sp.* dans les différents milieux :

1.1 Les petits volumes : (02 litres)

Tableau n° 06 : Variation de la concentration cellulaire de *Chlorella.sp.* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans les différents milieux.

Milieu	AGRISPON		PROVASOLI		MEYER	
	Nombre de Cell./ml. 10^3	Log_2 (nbre cell/ml)	Nombre de Cell./ml. 10^3	Log_2 (nbre. cell/ml)	Nombre de Cell./ml. 10^3	Log_2 (nbre. cell/ml)
08/07/2000	126	16,9430	281	18,1002	97	16,5656
10/07/2000	312	18,2511	793	19,5969	286	18,1256
12/07/2000	423	18,6902	1527	20,5422	357	18,4455
15/07/2000	1145	20,1269	5769	22,4598	835	19,5714
17/07/2000	1564	20,5768	10331	23,3004	1209	20,2053
19/07/2000	2043	20,9622	11682	23,4777	1792	20,7731
22/07/2000	1475	20,4922	8623	23,0397	1943	20,8898
24/07/2000	741	19,4991	5746	22,4541	1321	20,3331
26/07/2000	226	17,7859	1483	20,5000	948	19,8545

Tableau n° 07 : Taux de croissance de *Chlorella.sp.* dans les différents milieux dans les conditions expérimentales (température, luminosité) .

Milieu de culture	Luminosité (Lux)	Température (°C)	Concentr. Max. (Cell./ml. 10^3)	Temps (jour)	Taux de croissance (j^{-1})
AGRISPON	4000	26 ± 2	2043	17	0,278
PROVASOLI	4000	26 ± 2	11682	17	0,372
MEYER	4000	26 ± 2	1943	17	0,230

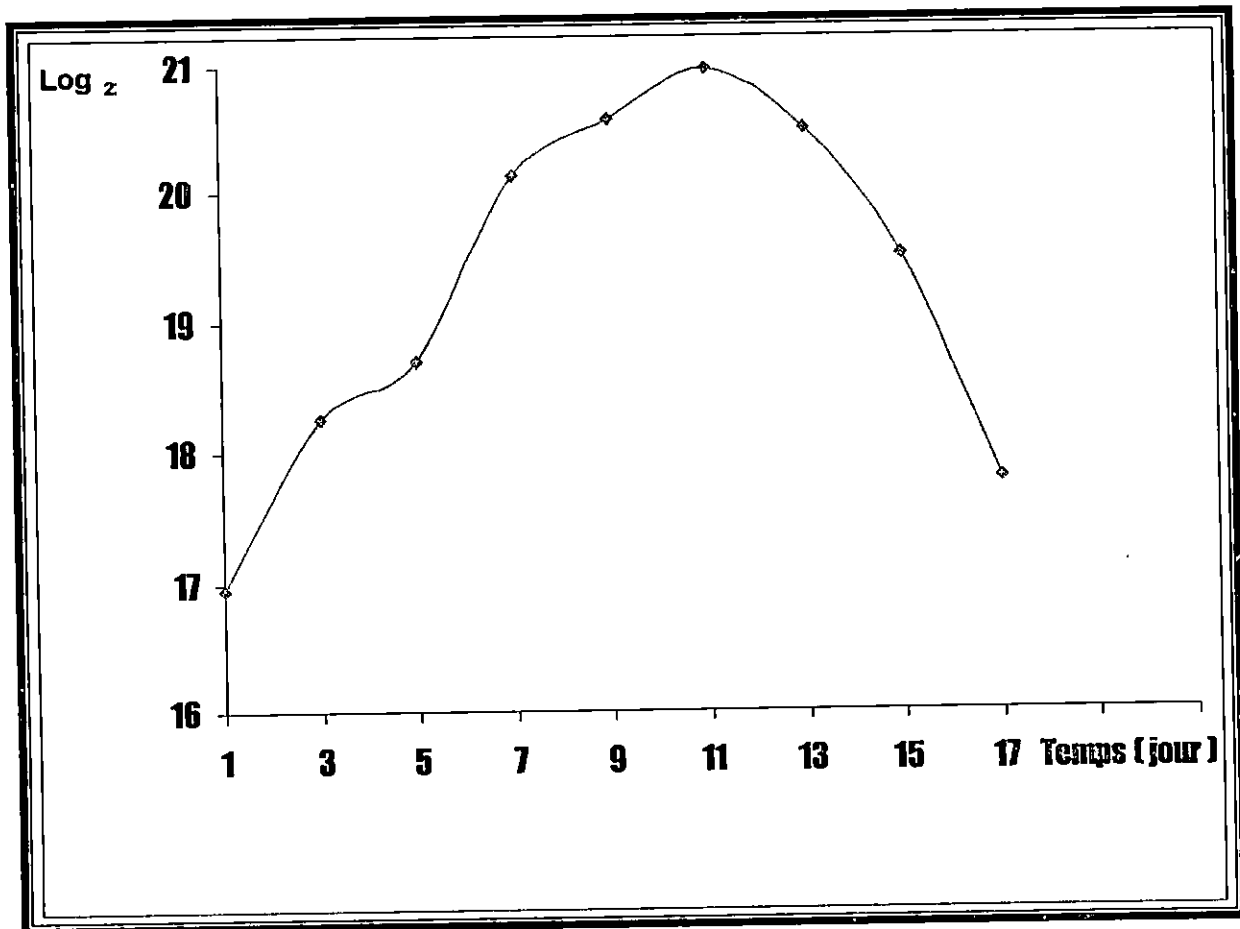


Figure n° 08 : Variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans le milieu AGRISPON .
exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml) .

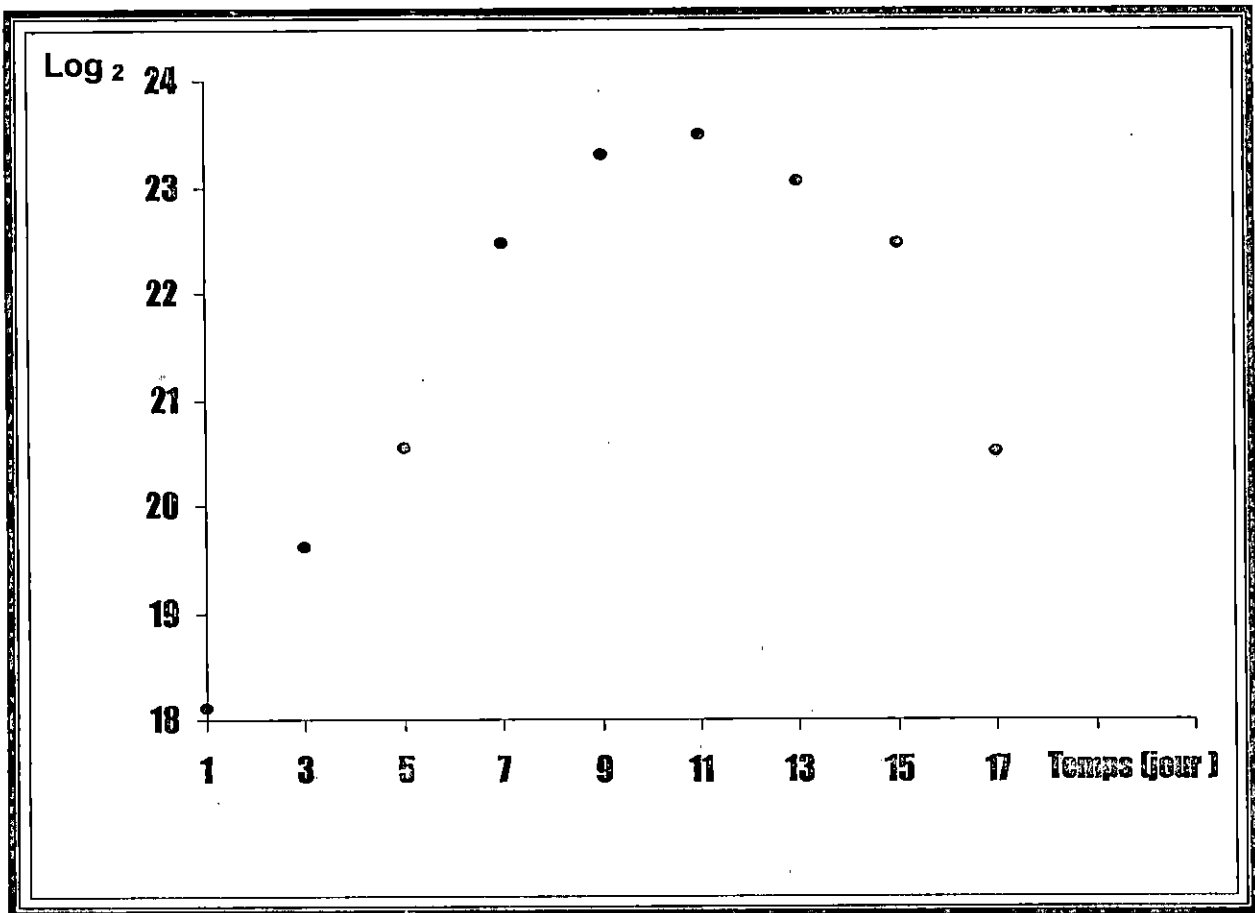


Figure n° 09 : Variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans le milieu *PROVASOLI* exprimée en Log₂ (nombre de cellule/ml) .

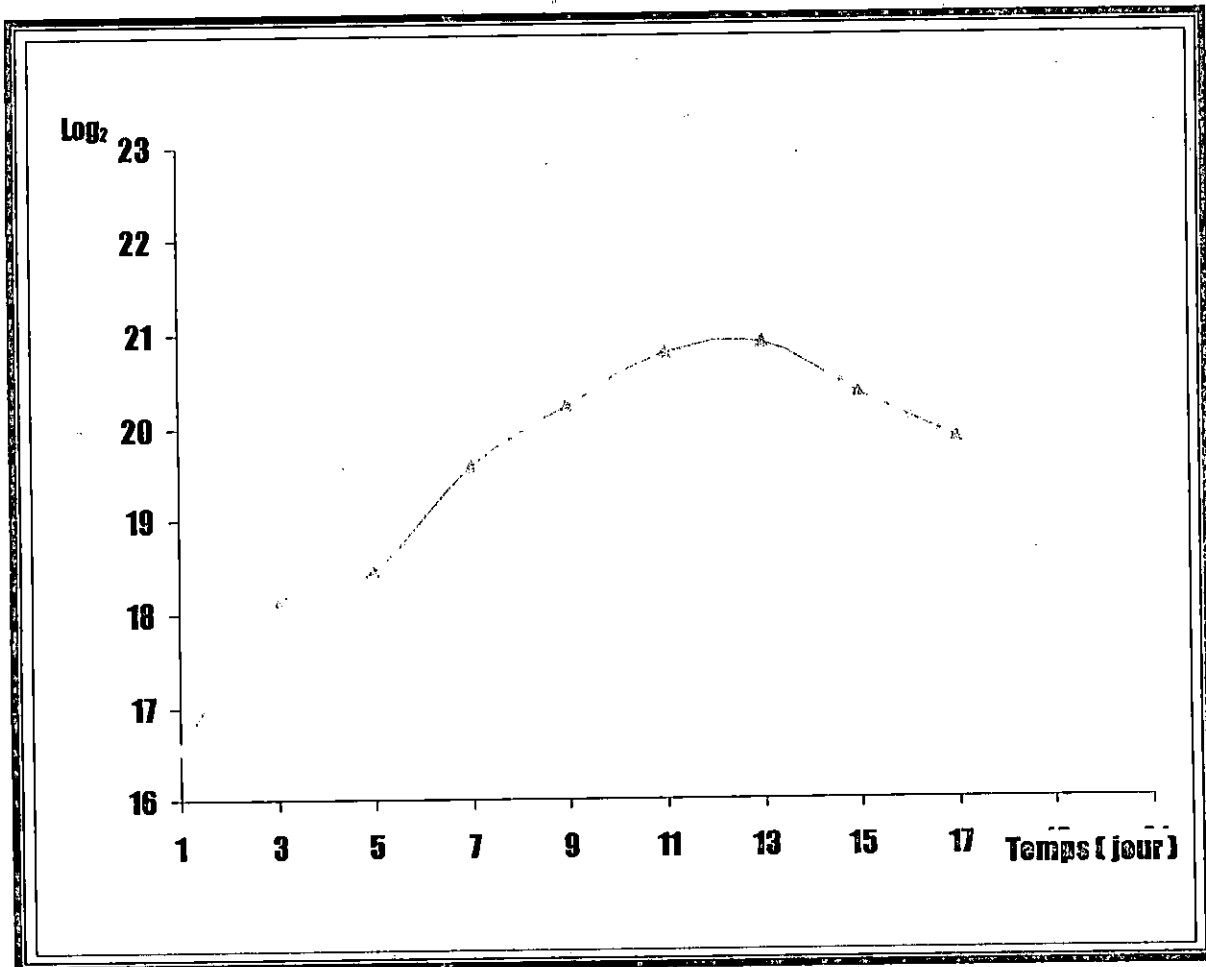


Figure n° 10 : Variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans le milieu MEYER exprimée en Log₂ (nombre de cellule/ml) .

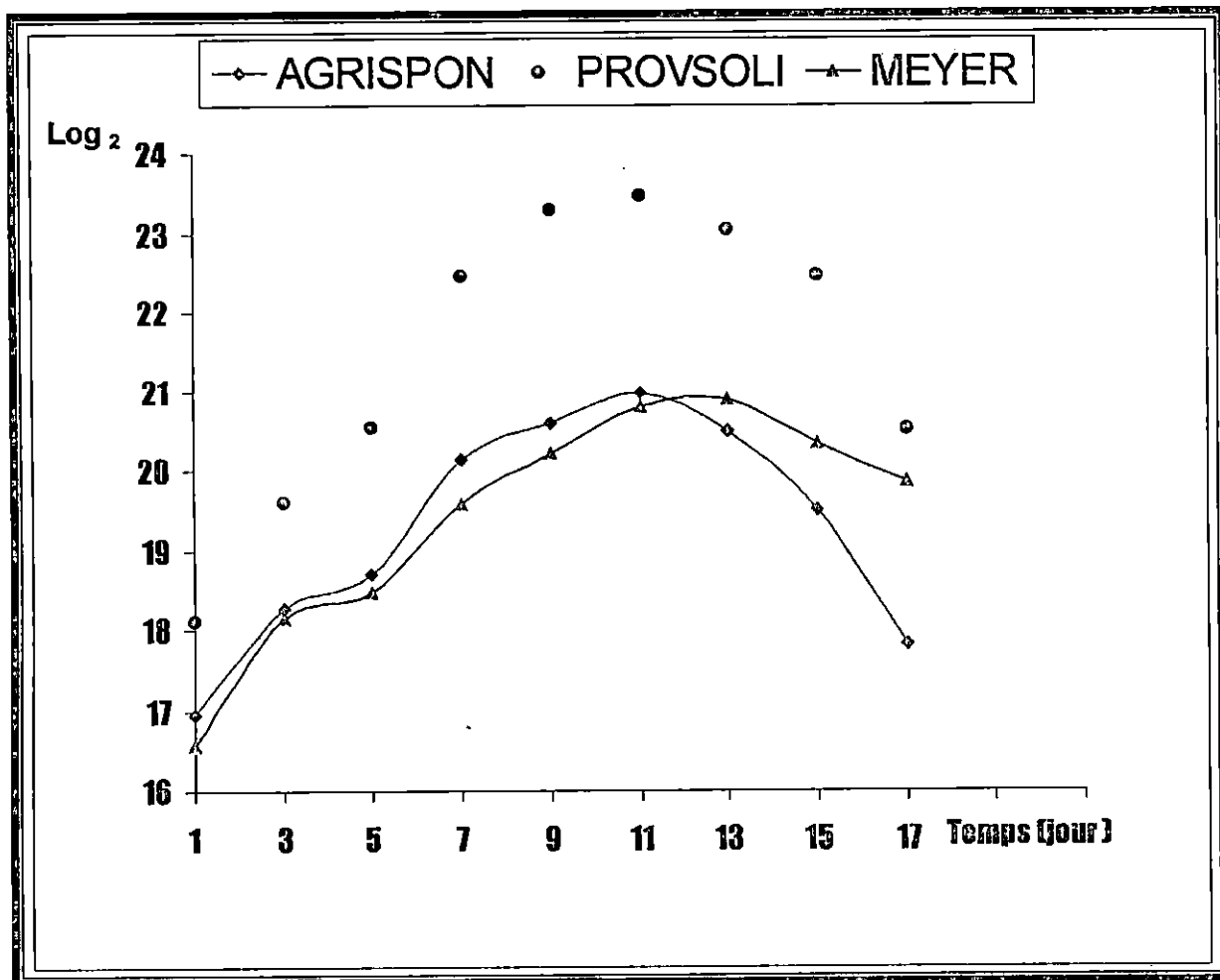


Figure n° 11 : Comparaison entre les variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans les différents milieux exprimée en Log₂ (nombre de cellule/ml) .

1.2- Les gros volumes : (> 02 litres)

Tableau n°08 : Variation de la concentration cellulaire de *Chlorella.sp.* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans les différents milieux .

Milieu	AGRISPON		PROVASOLI		MEYER	
	Nombre de Cell./ml. 10^3	Log_2 (nbre cell/ml)	Nombre de Cell./ml. 10^3	Log_2 (nbre. cell/ml)	Nombre de Cell./ml. 10^3	Log_2 (nbre. cell/ml)
17/07/2000	254	17,9544	407	18,6346	152	17,2137
19/07/2000	518	18,9825	942	19,8453	361	18,4616
22/07/2000	961	19,8741	2625	21,3238	829	19,6610
24/07/2000	1429	20,4465	6298	22,5864	1371	20,3867
26/07/2000	2107	21,0067	11871	23,5009	1738	20,7289
29/07/2000	2843	21,4389	13670	23,7045	2235	21,0918
31/07/2000	2387	21,1867	8692	23,0512	1873	20,8369
02/08/2000	1458	20,4755	4034	21,9437	1218	20,2160
05/08./2000	814	19,6346	1358	20,3730	869	19,7289

Tableau n° 09 : Taux de croissance de *Chlorella.sp.* dans les différents milieux dans les conditions expérimentales (température, luminosité) .

Milieu de culture	Luminosité (Lux)	Température (°C)	Concentr. Max. (Cell./ml. 10^3)	Temps (jour)	Taux de croissance (j^{-1})
AGRISPON	4000	27 ± 2	2843	17	0,219
PROVASOLI	4000	27 ± 2	13670	17	0,319
MEYER	4000	27 ± 2	2235	17	0,243

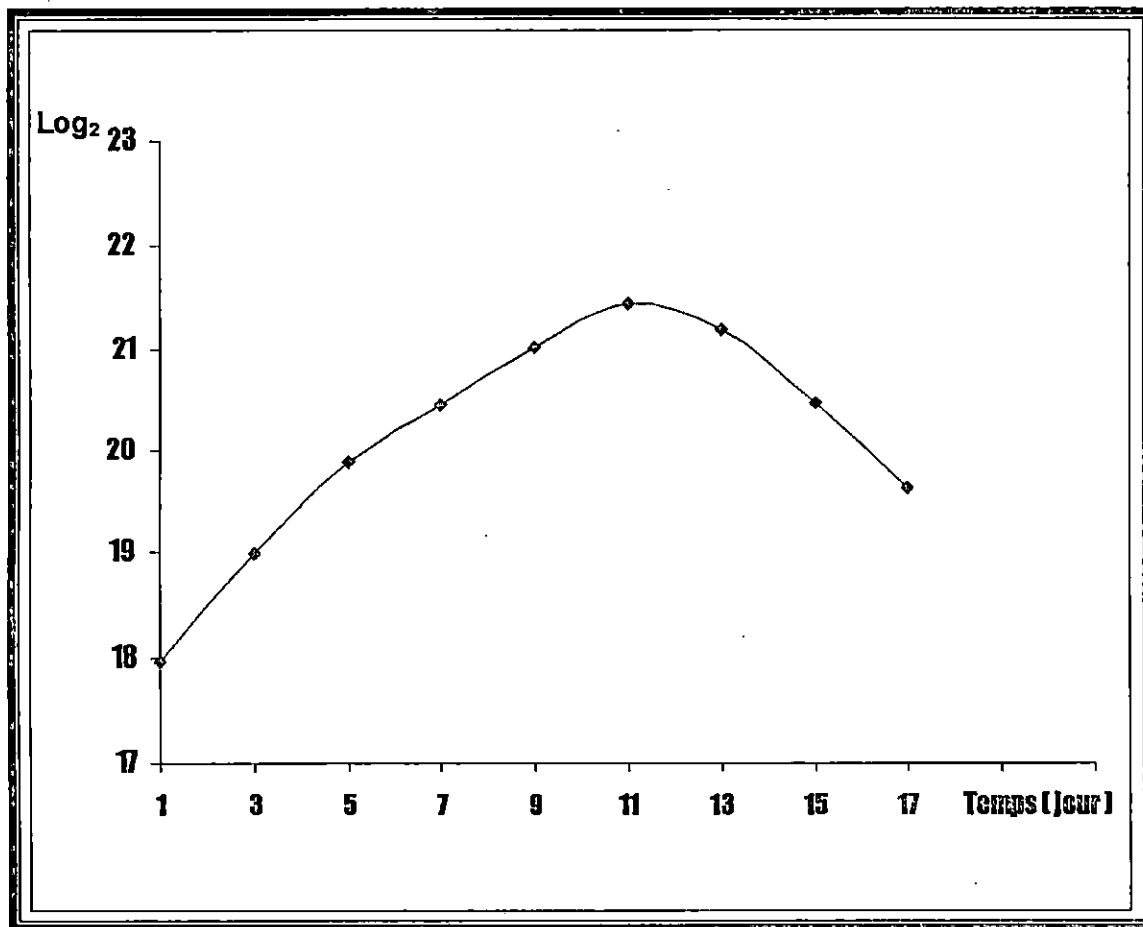


Figure n° 12 : Variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans le milieu AGRISPON exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).

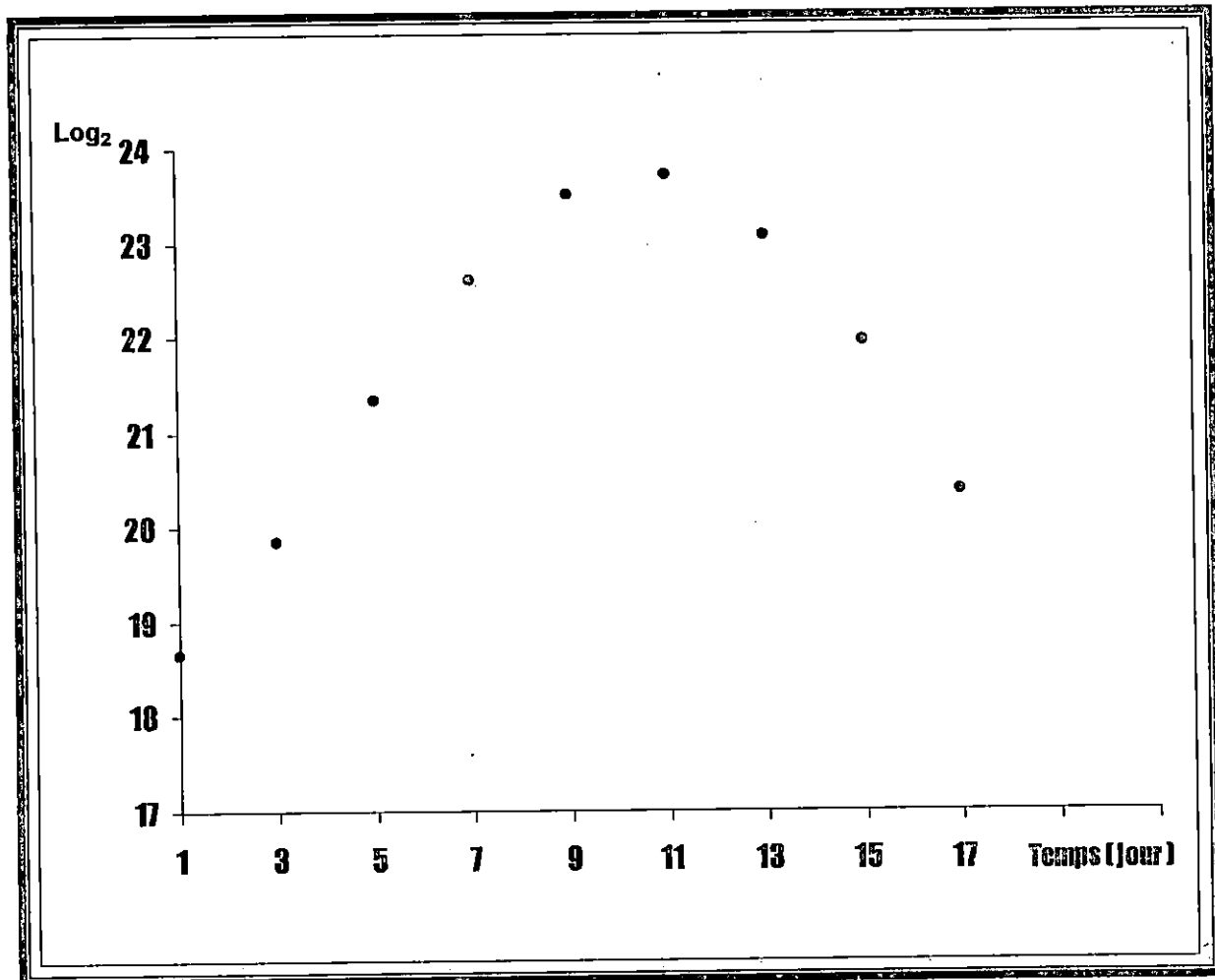


Figure n° 13 : Variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans le milieu *PROVASOLI* exprimée en Log₂ (nombre de cellule/ml) .

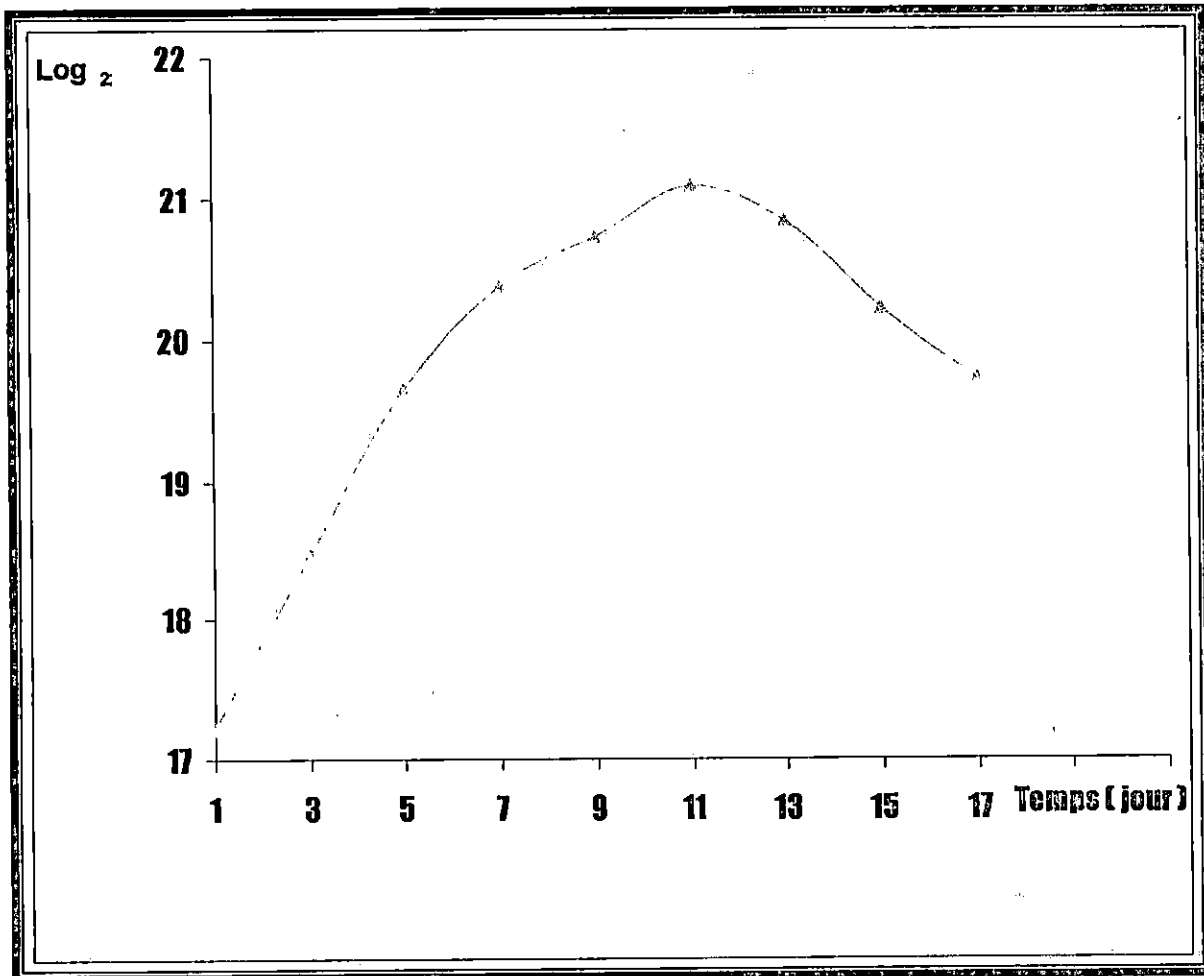


Figure n° 14 : Variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans le milieu MEYER exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).

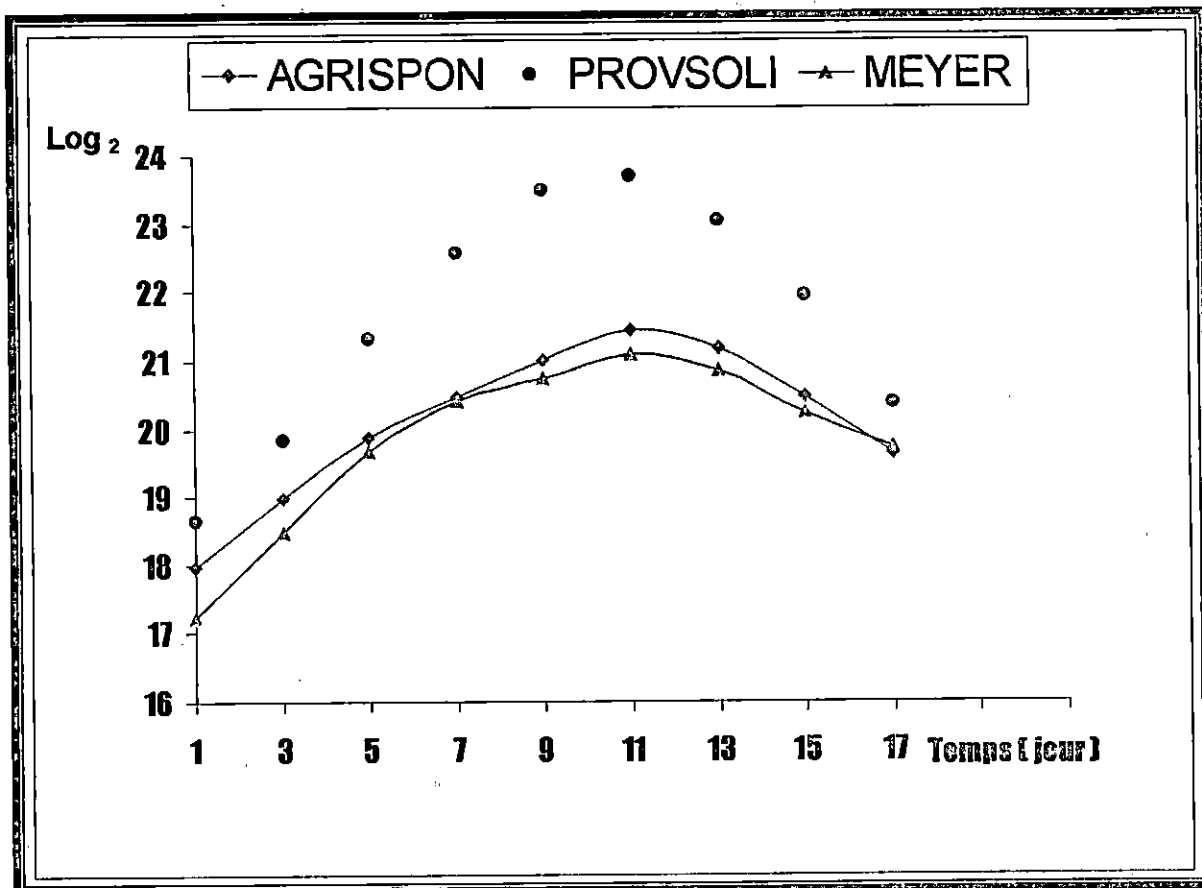


Figure n° 15 : Comparaison entre les variations de concentration de *Chlorella.sp.* dans les différents milieux exprimée en Log₂ (nombre de cellule/ml) .

2- Interprétation des résultats :

2.1- les petits volumes :

Selon le graphe (Figure n° 08), le développement de *Chlorella sp.* dans le milieu AGRISPON révèle une phase de croissance rapide de deux jours passant d'une concentration de 126.10^3 cell./ml à 312.10^3 cell./ml. Elle est directement suivie d'une phase de deux jours caractérisée par une croissance lente qui mène la concentration à 423.10^3 cell./ml.

Après le 5^{ème} jour, le développement s'accélère de nouveau et arrive à une concentration maximale de 2043.10^3 cell./ml pendant une phase de 06 jours marquée par un taux de croissance de $0,278 J^{-1}$.

Une phase de décroissance qui s'installe juste après, montre une chute de croissance rapide pendant le reste de temps de la culture.

La croissance de *Chlorella sp.* dans le milieu PROVASOLI est représentée par le graphe (Figure n° 09). On observe une phase de croissance exponentielle de 08 jours qui arrive à une concentration maximale de 11682.10^3 cell./ml avec un taux de croissance de $0,372 J^{-1}$. Une phase de latence de 02 jours de faible production. En fin, une phase de décroissement qui indique une chute de développement.

Dans le milieu MAYER la croissance de *Chlorella sp.* exprimée dans le graphe (Figure n° 10) montre une phase de croissance plus ou moins régulière, qui s'accélère les deux premiers jours (la croissance passe de 97.10^3 à 286.10^3). Elle ralentie après le 3^{ème} jour et pendant deux jours pour atteindre une concentration de 357.10^3 cell./ml. Le reste de cette phase exponentielle est accéléré de nouveau et regagne un développement maximal de 1943.10^3 cell./ml au 13^{ème} jour avec un taux de croissance de $0,230 J^{-1}$. Puis après, on remarque une phase de déclin plus ou moins lente.

2.2- Les gros volumes :

En ce qui concerne le développement de *Chlorella sp.* dans le milieu AGRISPON, le graphe (Figure n° 12) indique une phase exponentielle de 10 jours, la croissance passe d'une concentration de 254.10^3 cell./ml à une maximale marquée par 2843.10^3 cell./ml à la fin de cette phase. Le taux de croissance est estimé à $0,219 J^{-1}$. La phase de déclin vient juste après pour montrer une chute de croissance.

La croissance de *Chlorella sp.* dans le milieu PROVASOLI d'après le graphe (Figure n° 13) présente une phase de développement exponentielle accéléré pendant 08 jours, la croissance remonte de 407.10^3 cell./ml à 11871.10^3 cell./ml, avec un taux de croissance de $0,319 J^{-1}$. Après, le développement est ralenti jusqu'à l'arrivée à une croissance maximale de 13670.10^3 cell./ml. Puis, et après le 11^{ème} jour, la croissance chute rapidement.

D'après le graphe (Figure n° 14), le développement de *Chlorella sp.* dans le milieu MEYER, montre une phase de croissance exponentielle de 10 jours, la concentration passe de 152.10^3 cell./ml à 2235.10^3 cell./ml comme une concentration maximale par un taux de croissance de $0,243 J^{-1}$. La dernière s'est traduite par une courbe de croissance décroissante.

3- Discussion :

Selon les graphes (Figures n° 11 et n° 15), puis les résultats obtenus, on peut dire que l'espèce *Chlorella sp.* montre un développement optimal dans le milieu PROVASOLI avec des concentrations maximales bien significatives, avec la présence d'une phase de latence. Néanmoins, dans les deux milieux AGRISPON et MEYER, il y'a un faible développement, une phase exponentielle longue et absence de la phase stationnaire.

On peut expliquer ça par le fait que le milieu PROVASOLI est un milieu synthétique, il a été bien préparé pour avoir des concentrations ni en excès ni en déficit d'éléments nutritifs nécessaire à la culture des microalgues.

Le milieu AGRISPON est un fertilisant biologique, il contient des concentrations élevées en composés organiques, qui ont probablement un effet inhibiteur à cette concentration, cet effet peut être diminué si on pratique des dilutions du milieu. (SYLTET, 1985. in rapport AGRI-TEC)

Le milieu MEYER est un milieu synthétique simple à préparer de fait qu'il contient peu d'éléments nutritifs, et vu le manque en substances minérales et vitaminiques surtout comparés au milieu PROVASOLI, il ne favorise pas le développement de *Chlorella sp.*

L'absence d'une phase de croissance stationnaire pour la plupart de cas de culture s'explique par les variations de la température, l'expérience a été réalisée aux mois de Juillet et Août dans un milieu non thermo régulé (absence d'une salle climatisée)

Conclusion

D'après les résultats obtenues, il en re-sort que le milieu de culture PROVASOLI est plus favorable pour la culture de Chlorella sp.

Ce milieu nécessite des préparations souvent difficiles pour l'aquaculture (nécessite de certain matériel : Balance de précision et produits) et aussi son coût est élevé par rapport au milieu de culture AGRISPON qui est disponible dans le commerce prêt à l'emploi.

Vu les conditions d'expérimentation, ce travail nécessite un deuxième test pour confirmer les résultats.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIE

- AUDINEAU, P. et BLANCHETON, G., 1986 .Production d'algues unicellulaires.
IFREMER., Equipe MERE.A., station : DEVA-SUD : 1-19
- ALZIEU, C., 1986. L'eau – milieu de culture in BARNABE, G., Aquaculture I: 15-41
- ARRIGNON, J., 1991. Aménagement piscicole des eaux douces. 4^{ème} éd. Tech&DOC.
Lavoisier : 631 p
- BARNABE, G., 1991. Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Les cultures
planctoniques : 67-83
- BECKER, E. W., 1994 . MICROALGAE: Biotechnology and microbiology.
CAMBRIDGE University Press: 9-40
- BELKOURA, M. et DAUTA, A., 1994. Caractéristiques photosynthétiques de
Chlorella sorokiniana (Shihira et Krauss), en relation avec lumineuse
et la température corrélation avec le taux de croissance . Annls.
Limnols. 28 (2) : 101-107
- BOURRELLY, P., 1990. Les Algues d'eau douce, initiation à la systématique.
I- Les algues vertes. 1 : 572 p
- BERLAND, B., 1966. Contribution à l'étude des cultures de diatomées marines.
Recueil des travaux de la station marine d'ENDOUME,
40 (56): 316 p
- DAVIS, C. C., 1955. The marine and fresh-water. Michigan Station University
Press: 53-68
- DE BILLY, G., 1978. Culture en continu in, JACQUES, G., Phytoplankton ; biomasse,
production, numération et culture . Ed. du castillet : 90-91
- DROOP, M. R., 1954 . A note on the isolation of small marine algae and flagellates for
pure routine . J. Mar. Biol. Ass. U. K., 33: 511-541
- FERNANDEZ, REIRIZ, M. J., PEREZ – CAMACHO, A., FERREIRO, M. J.,
BLANCO, J., PLANAS, M., CAMPOS, M. J. et LABARATA,
U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical
profile (Total protein, Carbohydrates, RNA, Lipids, and Fatty
Acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture.
83 : 17-37
- FIALA, M., 1978. Culture d'algue in, JACQUES, G., Phytoplankton ; biomasse,
Production, numération et culture. Ed. du castillet : 77-87

- GAYRAL, P., 1975.** Les Algues ; morphologie, cytologie, reproduction et écologie.
DOIN éditeur : 165 p
- GOLDMAN, J., 1979.** Out door algae mass culture. II . Photosynthetic yield limitation.
Water Research. 13: 119-136
- GUERIN-ANCE, Y. O., MAESTRINI, S. Y., BEKER, L., 1978.** Utilisation d'engrais agricoles comme source de nutrition pour la culture massives de quelques algues marines, Pub. Sci. Tech. CNEXO; actes Colloq., n° 07 : 285-304
- HELM, M. M., LAING, I. et JONES, E., 1979.** The development of a 200 L alga culture vessel at Conway . Fish. Res. Techn. Rep., 53: 1-12
- HUSSEIN, N., AKATSU, S. et EL ZAHR, C., 1981 .** Factors affecting the semi continue production of *Tetraselmis suecica* (kyllin) Butch in, 200 L vessels :
IN : Aquaculture volume 22 n° 1,2 : 125-138
- JACQUES, G., 1978.** Phytoplankton ; biomasse, production, numération et culture
Ed . du castillet : 21-38
- LAVENS, P., SARGELOOS, P., 1996 .** Manual on the production use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. N° 3361. Rome, FAO: 295 p
- LE BORGNE, Y., 1986.** La culture des microalgues in, **BARNABE, G.,** Aquaculture. TEC&DOC-Lavoisier. 1 : 181-192
- LUND, J.W.G., KIPPLING, C. et LE GREN, E. D., 1958.** The inverted microscope method of estimating algae numbers and the statistical basis of estimations by counting . Hydrobiologia. 11 : 143-170
- MANGUIN, E. et VIVIER, P., 1943.** Les algues d'eau douce et leur intérêt en Pisciculture. Bull. Française de pisciculture, première année n° 192 : 137-155
- MATHIS, P., 1996.** Comment les êtres vivants utilisent l'énergie solaire. Texte du Colloque. Palais des Congrès – Aix – en - Provence (CEA).
- McALICE, B. J., 1971.** Phytoplankton sampling with the Sedgwick – Rafter cell.
Limnol. Oceangr. 16 : 19-28
- MONOD, J., 1949.** The growth of bacterial culture. Ann. Rev. Microbiol .3 : 371-394

- NEVEUX, J., 1978.** Biomasse in, **JACQUES, G.,** Phytoplancton ; biomasse, production, numération et culture . Ed. du castillet : 21-38
- PROVASOLI, L., McLAUGHLIN, J. J. A., et DROOP, M. R., 1957.** The development of artificial media for marine algae . Arch. Mikrobiol. 25 : 392-428
- PINCEMIN, J. M., 1971.** Action de facteurs physiques, chimiques et biotiques sur quelques Dinoflagellés et Diatomées en culture . Thèse de Doctorat, Université d'Aix – Marseille I : 119 p
- RINCE, Y., 1979.** Cycle saisonnier des peuplements phytoplanctoniques et microphyto-benthiques . Revue Algologique. Tome XIV. Phase 4. Laboratoire de Cryptogamie – Paris : p 312
- ROLLAND, N., DORME, A. J., et JOYARD, J., 1998.** Avancées scientifiques ; Le chloroplaste en pleine lumière. URA 576 CNRS-CEA-Université Grenoble I
- SPENCER, C. P., 1954.** Studies on the culture of a marine diatom. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 33: 265-290
- TAMARU, C., S., 2001.** Use of *Chlorella vulgaris* for the culture of *Moina micrura*. Sea Grant Extension Service/Aquaculture Development Program.
- VENKATARAMAN, G. S., 1969.** The cultivation of algae ICAR (Indian Council of Agricultural Research): 237-245
- Rapport :** AGRI-TEC (Agence Algérienne d'Appui Technique et Technologique à l'Agriculture). 1985. Programme AGRISPON : 105p