

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDES
UNIVERSITAIRES APPLIQUEES (D. E. U. A) EN SCIENCES DE LA MER

Option : Aquaculture

Sujet :

Culture des microalgues

Préparé par :

BOUSSEHLA Mohammed Akli

DJEBLI Mourad

Examiné par :

Mr : LOURGUIOUI

Encadré par :

Mr : BELHASNET. K.....Promoteur

Session : Juillet 2012

A decorative border of palm trees surrounds the text. The border consists of a top row of 15 palm trees, a bottom row of 15 palm trees, and vertical columns of 15 palm trees on the left and right sides.

REMERCIEMENT

Nous rendons grâce à dieu, pour nous avoir accordé santé et courage jusqu'à l'aboutissement de nos études, et l'accomplissement de ce modeste travail.

D'abords nous tenons à remercier Mr BELHASNET. K., pour avoir accepté, de diriger et de suivre constamment le progrès de ce travail, par ses suggestions et ses critiques constructives qui ont été très précieuses pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.

Nous tenons à exprimer nos vives gratitudes à tous nos enseignants depuis la première année fondamentale, jusqu'à la troisième année universitaire.

Tous nos sincères remerciements s'adressent à Mr LOURGUIOUI, pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Finalement, nous tenons vivement à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce présent mémoire.



Dédicaces

Mohammed Akli

Je dédie ce mémoire tous d'abords a : mes très chers parents qui m'ont aidé durant toute mes années d'étude, je les souhaite une longue vie pleine de joie et de bonheur.

A mes chers frères TARIK et HALIM, ainsi que toute ma grande famille.

A mes chers amis RACHID, MASSI, HOCINE, DAHDOUH, DJAHID, KARIM, et à mon binôme MOURAD, et a tous qui me connaît.

Mourad

Tout d'abords je dédie ce mémoire a mes très chers parents qui ont fait tout pour que je réussisse mes études durant toutes mes années d'études, je leur souhaite une longue vie pleine de joie et du bonheur.

A mes chers frères SAMIR, AHMED, MADJID, MOHAMMED et mes chers sœurs TASSADIT, HAFIDA et AMEL, ainsi a toute ma grande famille.

A mes chers amis MASSI, HOCINE, DJAHID, RABAH, RACHID, DAHDOUH

A mon binôme MOHAMMED AKLI avec qui j'ai passé des moments agréables.

A toute la promo DEUA 2012

A tout les travailleurs de l'ENSSMAL DJAMEL, YUCEF et KAMEL

Introduction	1
Chapitre I Généralités	
1-Principales microalgues utilisées en aquaculture	3
1-1 Systématique et morphologie.....	3
1-2 Critères de choix.....	6
2- Biologie	6
2-1 Reproduction.....	6
2-2 Croissance	7
2-2-2 Photosynthèse.....	9
2-2-2 Développement algal.....	9
➤ Phase de latence.....	9
➤ Phase exponentielle.....	9
➤ Phase stationnaire	9
➤ Phase de décroissance.....	9
2-3 Valeur alimentaire	9
3- Ecologie	11
3-1 Répartition géographique	11
3-2 Paramètres physico-chimiques	11
3-2-1 Paramètres physiques	11
➤ Température	11
➤ Lumière	12
➤ Agitation	12
3-2-2 Paramètres chimiques.	12
➤ Les sels nutritifs	12
➤ Le gaz carbonique	13
➤ Le pH	13

4- Conduite de culture	14
4-1- Méthodes de culture	14
4-1-1 Culture en continue	14
4-1-2 Culture successive	16
4-2 Purification des cultures	18

Chapitre II matériel et méthodes

1-Objectif	19
2-Equipement de culture	19
3-Espèces de microalgues utilisées	20
3-1 Prélèvement des échantillons et Identification des espèces	20
3-2 Obtention des souches unies algales	21
3-2-1 Isolement des souches	21
➤ Isolement sur un milieu liquide	21
➤ Isolement sur un milieu solide	21
4- Milieux de culture	22
➤ Milieu PROVASOLI	23
➤ Milieu MEYER	24
5- Condition de culture	25
6- Contrôle de développement algal	27
6-1 Méthode directe	27
➤ Volume cellulaire	27
➤ Comptage	27
6-2 Méthode indirecte	27
➤ Densité optique	27
6-3 Différentes cellules de comptage	28

6-4 Récoltes et distributions des microalgues	33
6-4-1 Centrifugation	33
6-4-2 Coagulation- floculation	33
6-4-3 Ultrafiltration	33
6-4-4 Sédimentation spontanée	33
6-4-5 Micro tamisage	34
6-4-6 Filtre à papier	34

Chapitre III Résultats et discussion

1-Paramètres physico chimiques.....	35
2- Croissance des microalgues.....	37
3-Interprétation	39

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Liste des tableaux

Tableau : 01	Quelques exemples d'algues.....	3
Tableau : 02	Analyse en pourcentage de poids sec, des différentes espèces d'algues unicellulaires cultivées..	10
Tableau: 03	Composition du milieu PROVASOLI pour 1 litre d'eau distillée.....	23
Tableau : 04	Composition du milieu MEYER pour un litre d'eau distillée.....	24
Tableau : 05	Les conditions de culture des deux milieux utilisés.....	25
Tableau : 06	Caractéristiques de quelques cellules de comptage.....	28
Tableau : 07	Contrôles des paramètres physico-chimiques de <i>Chlorella sp</i> dans les milieux MEYER et PROVASOLI.....	35
Tableau : 08	Croissances de la chlorelle dans deux milieux Différents.....	37

Liste des figures

Figure : 01	Différentes étapes de la croissance des microalgues.....	8
Figure : 02	Principe de fonctionnement de chémostat.....	15
Figure : 03	Représentation schématique du processus de production de microalgue.....	17
Figure : 04	Equipements de culture.....	19
Figure : 05	la cellule de <i>Chlorella sp</i>	20
Figure : 06	Préparation des milieux de culture.....	22
Figure : 07	pH mètre et le thermomètre.....	26
Figure : 08	Quadrillages de quelques cellules de comptages.....	29
Figure : 09	L'utilisation de la cellule Malassez	32
Figure : 10	Courbe de croissance de <i>Chlorella sp</i> deux milieux différents.....	38

INTRODUCTION

Le phytoplancton est constitué de micro organismes végétaux vivant en suspension dans l'eau, dans la zone euphotique son rôle est primordial par sa capacité synthétiser de la matière organique à partir de la lumière et d'éléments minéraux. Il est le point de départ des réseaux trophiques (DIDIER CHINZI, 1998).

Les microalgues sont des organismes autotrophes, elles constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire (RICHMOND, 1986).

Elles se présentent sous forme de cellules microscopiques isolées ou réunies en chaînes dont la taille varie de 0,2 à 100 microns, possédant normalement de la chlorophylle (BOULEKRAOUEY et ZOUGAR, 2006).

La classification des grands groupes d'algues est basée sur leur composition pigmentaire et leur coloration (BRUNO de REVIERS, 2002).

Selon GAYRAL (1975), SILVA (1982) et BOURRELLY (1990); on distingue les quatre phylums suivants :

Les chlorophycées (algues vertes)

Dépourvues de pigments surnuméraires, dont les chloroplastes colorés en vert, sont formés de même pigment que chez les végétaux supérieurs : chlorophylle, xanthophylle, caroténoïde

Les chromophycées (algues brunes).

Leurs chloroplastes contiennent non seulement la chlorophylle mais encore un pigment caroténoïde brune : la phycoxanthine

Pendant la vie de l'organisme ce pigment masque les précédents, mais il disparaît lorsque l'algue meurt.

Les rhodophycées (algues rouges) :

Chez lesquelles les pigments ordinaires sont mêlés au pigment surnuméraires de teinte rouge ; la phycoérythrine qui masque la chlorophylle.

Les cyanophycées (algues bleues)

Malgré l'absence de plaste, de noyaux différenciées et de l'amidon. Ce groupe est également rattaché aux algues, leur cytoplasme contient à l'état diffus de la chlorophylle.

L'objectif visé par notre travail consiste à maîtriser :

- L'identification des principales micro-algues utilisées en aquaculture
- Les conditions générales de culture
- Les techniques de culture, de contrôle du développement algal, de récolte et de distribution.

GENERALITE

1- Principales microalgues utilisées en aquaculture

1-1 Systématique

Tableau n°1 : Quelques exemples d'algues (BOURRELLY. P, 1985)


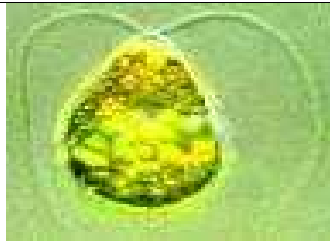


Systématique	Morphologie	Taille
<p>Embranchement: Chromophycophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Diatomophycées •Sous-classe : Centrophytidées •Ordre : Coscinodiscales •Famille : Coscinodiscaceae •Genre : <i>Skeletonema</i> •Espèce : <i>Skeletonema costatum</i> 	 <p>www.serc.si.edu/labs/phytoplankton/guide/VietNam.aspx</p>	3-5 μ
<ul style="list-style-type: none"> •Embranchement: Chlorophytes •Classe : Euchlorophycées •Ordre : Volvocales •Famille : Polyblépharidaceae •Genre : <i>Dunaliella</i> •Espèce : <i>Dunaliella salina</i> 	 <p>http://mytylus.com/mytylus cat/estudis.html</p>	6 μ
<p>Embranchement: Chlorophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Euchlorophycées •Ordre : Chlorococcale •Famille : Coccomyxaceae •Genre : <i>Diogene</i> •Espèce : <i>Nannochloris sp</i> 	 <p>http://tamug.edu/phytoplankton/Research/Phyto_Profiles.html</p>	1-2 μ
<p>Embranchement :Chromophycophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Diatomophycées •Sous-classe : Centrophytidées •Ordre : Coscinodiscales+ •Famille : Coscinodiscaceae •Genre : <i>Talassiosira</i> •Espèce : <i>Talassiosira pseudomona</i> 	 <p>http://goetgheluck.com/LE-TR%C3%89SOR-DES-MICRO-ALGUES-MARINES_34_12_RGP_.html</p>	10-20 μ

Tableau n°1 suite : Quelques exemples d'algues (BOURRELLY. P, 1985)

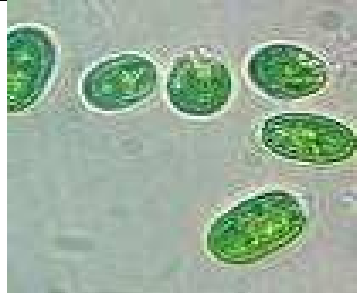
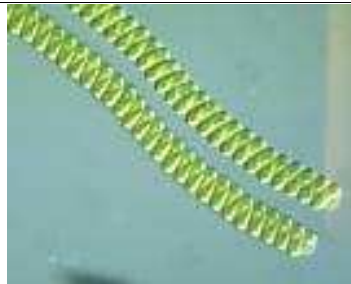
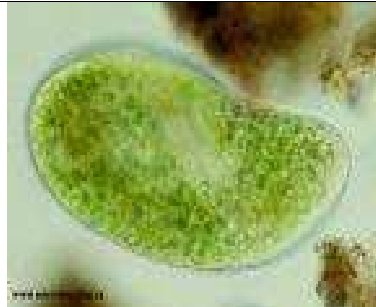

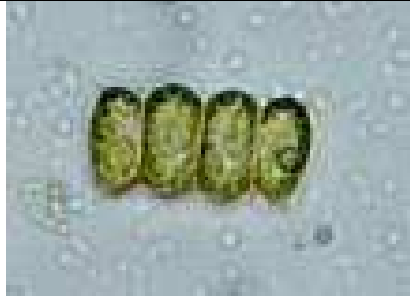

Systématique	Morphologie	Taille
<p>Embranchement: Chlorophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Parasinophycées •Sous-classe : Chlorophycidae •Ordre : Pyraminonadale •Famille : Pyraminonaceae •Genre : <i>Tetraselmis</i> •Espèce : <i>Tetraselmis suecica</i> 	 <p>http://nc3rs.org.uk/news.asp?id=912</p>	<p>5-7 μ</p>
<p>Embranchement : Cyanophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Cyanophycées •Ordre : Nostocales •Famille : Oscillatoriaceae •Genre : Spirulina •Espèce : <i>Spirulina plasentis</i> 	 <p>http://valorimer.com/contenu-337-fr.htm</p>	<p>35-50 μ</p>
<p>Embranchement: Chlorophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Euchlorophycées •Sous-classe : Chlorococcales •Ordre : Chlorococcales •Famille : Oocystaceae •Genre : Chlorella •Espèce : <i>Chlorella sp</i> 	 <p>http://microimaging.ca/protozoa.htm</p>	<p>1-3 μ</p>

Tableau n°1 : Quelques exemples d'algues (BOURRELLY. P, 1985)

Systématique	Morphologie	Taille
<p>Embranchement : Chlorophycophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Chlorophycées •Sous-classe : Chlorophycidae •Ordre : Volvocales •Famille : Chlamidomonadaceae •Genre : Chlamidomonas •Espèce : Chlamidomona 	 <p>http://goetgheluck.com/LE-TR%C3%89SOR-DES-MICRO-ALGUES-MARINES_34_12_RGP_.html</p>	<p>15-25 μ</p>
<ul style="list-style-type: none"> •Embranchement : Chlorophycophytes •Classe : Chlorophycées •Sous-classe : Chlorophyciadae •Ordre : Chlorococcales •Famille : Scenedesmaceae •Genre : Scenedesmus •Espèce : Scenedesmus sp 	 <p>http://scitec.uwichill.edu.bb/bcs/bl14apl/algae2.htm</p>	<p>8-10 μ</p>
<p>Embranchement : Chromophycophytes</p> <ul style="list-style-type: none"> •Classe : Diatomophycées •Sous-classe : Centrophycidées •Ordre : Biddlphiales •Famille : Chaetocerales •Genre : <i>Chaetoceras</i> •Espèce : <i>Chaetoceras calcitrans</i> 	 <p>http://finallyover.com/article-5323660.html</p>	<p>2-3 μ</p>

1-2 Les critères de choix :

Pour qu'une espèce soit considérée comme une bonne source d'alimentation doit répondre aux conditions suivantes :

- ✓ Taille adéquate des cellules : La dimension des cellules algales est un paramètre à titre d'exemple : le faible diamètre de la bouche et l'œsophage des larves empêche l'ingestion des particules de plus de 10 μ m. Cependant la taille recommandable est de 2 à 10 μ m. (BECHAGRA.A et al, 1997).
- ✓ La facilité de culture et un bon rendement sont aussi des facteurs très important. Valeur alimentaire riche en protéine, les lipides, et les vitamines qui sont indispensables à une bonne croissance des larves.
- ✓ Le faible coût énergétique, main d'œuvre, et structures.

(CHARMAT et DERRAB, 2009)

2- Biologie

2-1 Reproduction

La reproduction chez les microalgues se fait par deux voix, qui sont :

2-1-1 La reproduction asexuée

Elles se reproduisent soit par sporulation ; soit par multiplication cellulaire chez les cyanophycées et la mitose normale chez les eucaryotes.

2-1-2 La reproduction sexuée

Dans ce cas les microalgues se reproduisent par l'interaction des gamètes mâles et femelles. (GAYRAL, 1975)

2-2 Croissance

Dans une culture des microalgues, les étapes de croissance sont identiques à celle des bactéries (BECHAGRA et al, 1997).

On distingue donc quatre phases qui sont :

2-2-1 Phase de latence

Elle correspond à l'adaptation aux nouvelles conditions de culture; cette phase peut être courte, moins de 24h (LE BORGNE, 1986).

Plus la culture est âgée, plus la phase de latence est longue d'où la nécessité de repiquer la souche pendant la phase exponentielle (HELM et al, 1979 ; DAUTA, 1982).

2-2-2 Phase exponentielle

En cette phase, la croissance est la plus active où les cellules se divisent dans un temps caractéristique, appelé temps de division (FIALA, 1978).

2-2-3 Phase stationnaire

Pendant cette phase, la multiplication cellulaire est ralentie par un limitant (lumière, nutriment).

Le nombre de cellules est constant, ces dernières constituent leurs réserves intracellulaires (GREEN, 1973 : FERNANDEZ, 1989).

2-2-4 Phase de décroissance

Dans cette phase il y a un arrêt total des divisions cellulaires. Les cellules qui meurent ne sont plus remplacées.

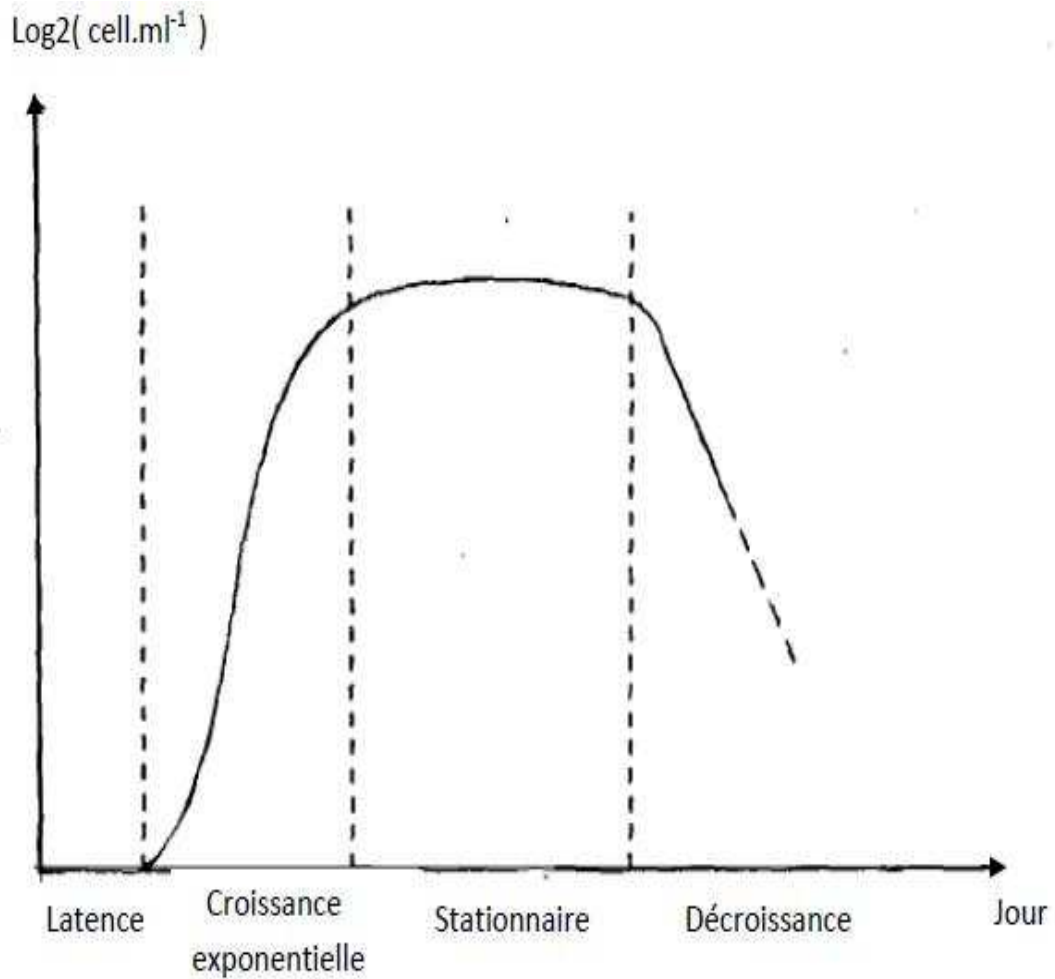


Figure n°1 : Différentes étapes de la croissance des microalgues

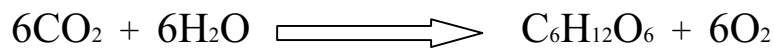
(HOFF. et SNELL, 1987)

2-3 Photosynthèse

Les microalgues utilisent la lumière comme source d'énergie pour fabriquer leurs propres substances des sels nutritifs par : photosynthèse

(JACQUES, 1975. HARRIS, 1978)

Equation de la photosynthèse



(ROLAND et al, 1998)

Résultat de la photosynthèse :

- Production de la matière organique ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- Libération d' O_2

(BOUGIS, 1974)

2-4 Valeur alimentaire

Les principaux constituants des algues de culture sont :

Les protéines, les hydrates de carbone et les lipides (BARNABE, 1991).

La valeur nutritive d'une algue est fonction de sa composition chimique, celle-ci étant variable d'une espèce à l'autre (voir tableau ci-dessous) (AUDINEAU et al, 1986).

Tableau n°2 : Analyse biochimique en pourcentage de poids sec, des différentes espèces d'algues unicellulaires cultivées (D'après PARSONS, STEPHENS & STRICKAND, 1961) (Audineau et Blancheton, 1986).

Espèces	Protéines	Hydrates de carbone	lipides	pigments	Cendres
<i>Tetraselmis Maculata</i>	52	15,0	2,9	2,1	23,8
<i>Dunaliella Salina</i>	57	31,6	6,4	3,0	7,6
<i>Monochrysis luthéri</i>	49	31,4	11,6	0,8	6,4
<i>Syracosphaera carterae</i>	56	17,8	4,6	1,1	36,5
<i>Chaetoceros sp.</i>	35	6,6	6,9	1,5	28,0
<i>Skeletonema costatum</i>	37	20,8	4,7	1,8	39,0
<i>Coscinodiscus sp.</i>	17	4,1	1,8	0,5	57,0
<i>Phaeodactylum tricornum</i>	33	24,0	6,6	2,9	7,6
<i>Amphidinium carteri</i>	28	30,5	18,0	2,4	14,1
<i>Exuviella sp.</i>	31	37,0	15,0	1,1	8,3
<i>Spiruline</i>	70	18,0	8	1,0	3,0

3- Ecologie

3-1 Répartition géographique

Les algues sont des organismes chlorophylliens se trouvant là où les conditions nécessaires pour leur développement sont réunies : l'eau, l'air, la lumière, et les sels nutritifs (BOURRELLY, 1990).

Elles se trouvent dans les colonnes d'eau, les lacs, les étangs, les mers, les ruisseaux et les rivières.

Pour pouvoir offrir au micro algues un milieu qui leur convienne parfaitement, il faut être au courant des conditions qui existent dans leur habitat naturelle, il faut donc réaliser un environnement physico-chimique qui favorise la croissance et la production (MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994).

3-1 Paramètres de culture

3-2-1 Paramètres physiques

➤ La température

L'optimum qui convient mieux pour la culture des microalgues se situent autour de 18 et 22°C, en dessous la croissance des cultures est ralenti, au-dessus les équilibres sont difficiles à maintenir et les cultures sont plus fragiles. (LE BORGNE, 1986)

Pour assurer la régulation thermique, une climatisation suffisamment puissante est nécessaire pour pallier le dégagement thermique dû à l'éclairage et maintenir une température moyenne qui satisfait les exigences des espèces cultivées (AUDINEAU et al, 1986).

➤ La lumière

La lumière est un facteur très important pour la photosynthèse, elle agit aussi sur la répartition verticale des microalgues en milieu naturel (GAYRAL, 1979).

Les cultures sont maintenues sous un éclairage de tubes fluorescents de 40 et 60 watts

Placés verticalement. Les tubes utilisés sont de type "blanc industrie" ou "Warm White".

Selon BLANCHETON.A (1986) L'intensité lumineuse préférentielle pour l'ensemble des espèces cultivées varie de 3.500 à 5.000 lux. Pour obtenir une production maximale l'énergie lumineuse est fournie 24 heures sur 24.

➤ L'agitation

Les cultures des microalgues en tendance à se sédimenter, il est utile de les agiter quotidiennement manuellement ; en ce qui concerne les petit volumes jusqu'à un litre ou deux litre. Tandis que pour les grands volumes on utilise : l'agitation par bullage d'air qui a l'avantage d'apporter du CO₂ et stabiliser le pH (FIALA, 1978).

3-2-2 Paramètres chimiques

➤ Sels nutritifs

Les sels nutritifs utilisés en culture sont bien supérieures à celles retrouvées en milieu naturel. Cette teneur est calculée en fonction de la vitesse d'absorption des microalgues qui dépend du taux de croissance de la population (BERNABE, 1991).

Éléments nutritifs majeurs

- Azote : qui est assimilé sous forme de NH₄
- Phosphate : est employé sous forme de Na H₂ PO₄
- Silice : pour les diatomées, elle est apportée sous forme de Na SiO₃.
- Micro éléments inorganiques : sous forme de sels (chlorure de sulfate)

- Les principaux métaux utilisés sont le fer, le cuivre, le manganèse, le molybdène, le zinc.
- Micro-éléments organiques :

Trois vitamines sont généralement employées :

Le cyan cobalamine B12

La thiamine B1

La biotine

Les vitamines sont stérilisées par filtration car elles sont détruites à la chaleur. Elles doivent être conservées à l'abri de la lumière et au frigidaire (ANDINEAU et al, 1986).

➤ **Gaz carbonique**

Le CO₂ est apporté par l'air du bullage pour les cultures très denses. Il est souhaitable d'ajouter un point de gaz carbonique (BARNABE, 1986).

➤ **pH**

Avec le développement d'une culture d'algue, on constate une élévation du pH qui passe de 7,5 à 9, ce qui limite la croissance (MOYSE, 1956).

Une augmentation du pH du milieu de culture par une modification de l'équilibre carbonaté de l'eau. Le pH des cultures concentrées peut ainsi dépasser 9,5. Ce pH peut devenir le facteur limitant, il est donc possible d'augmenter la densité des cultures en jouant sur ce paramètre. La méthode la plus simple à mettre en œuvre est l'ajout de dioxyde de carbone (gazeux) dans l'air qui sert à remuer les cultures. Une proportion de 0,5 à 1 % peut être conseillée. Il est aussi possible d'utiliser de l'acide chlorhydrique dans les cultures continues (<http://www.aquoa.net>)

4- Conduite de culture

4-1- Méthodes de culture

Il existe deux types de culture qui sont :

4-1-1 Culture en continue

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 limitant. 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 repiquage on arrive, a la limite a une culture continue : apport régulier de milieu nutritif et élimination d'un volume égale de culture se qui maintient un état d'équilibre (MONOD, J, 1949).

Les deux appareils de culture en continue sont :

- **Le chémostat** : Qui utilise un flux constant du milieu dans laquelle un élément limitant joue le rôle de régulateur (DE BYLLY, 1978).
- **Le turbidostat** : qui permet de conserver une densité constante d'organismes en régulant l'arrivé du flux d'éléments nutritifs.

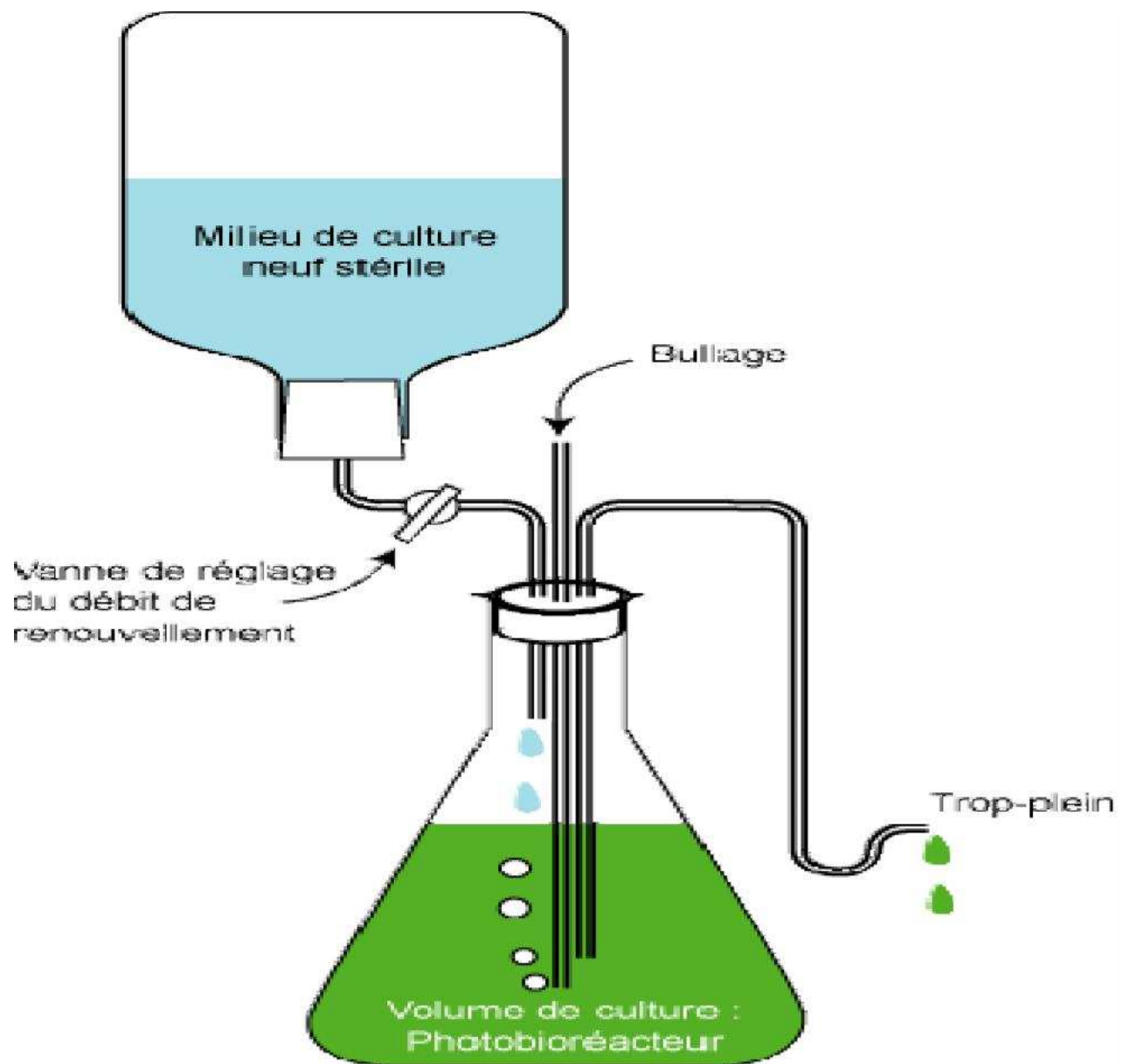


Figure n°2 : Principe de fonctionnement de chémostat (<http://www.aquoa.net>)

4-1-2 Culture successive

Dans ce procédé, la culture est récoltée en totalité à son stade de croissance maximale des animaux ou l'ensemencement d'autres cultures. (In CHARMAT et DERRAB, 2009)

4-1-3 Étapes pour le démarrage une culture des microalgues :

Tube a essai-Erlen 250 ml- Erlen 500ml- Erlen 2L- Erlen 5L- Chémostat 20L- Gaine 100L (BARNABE, 1991).

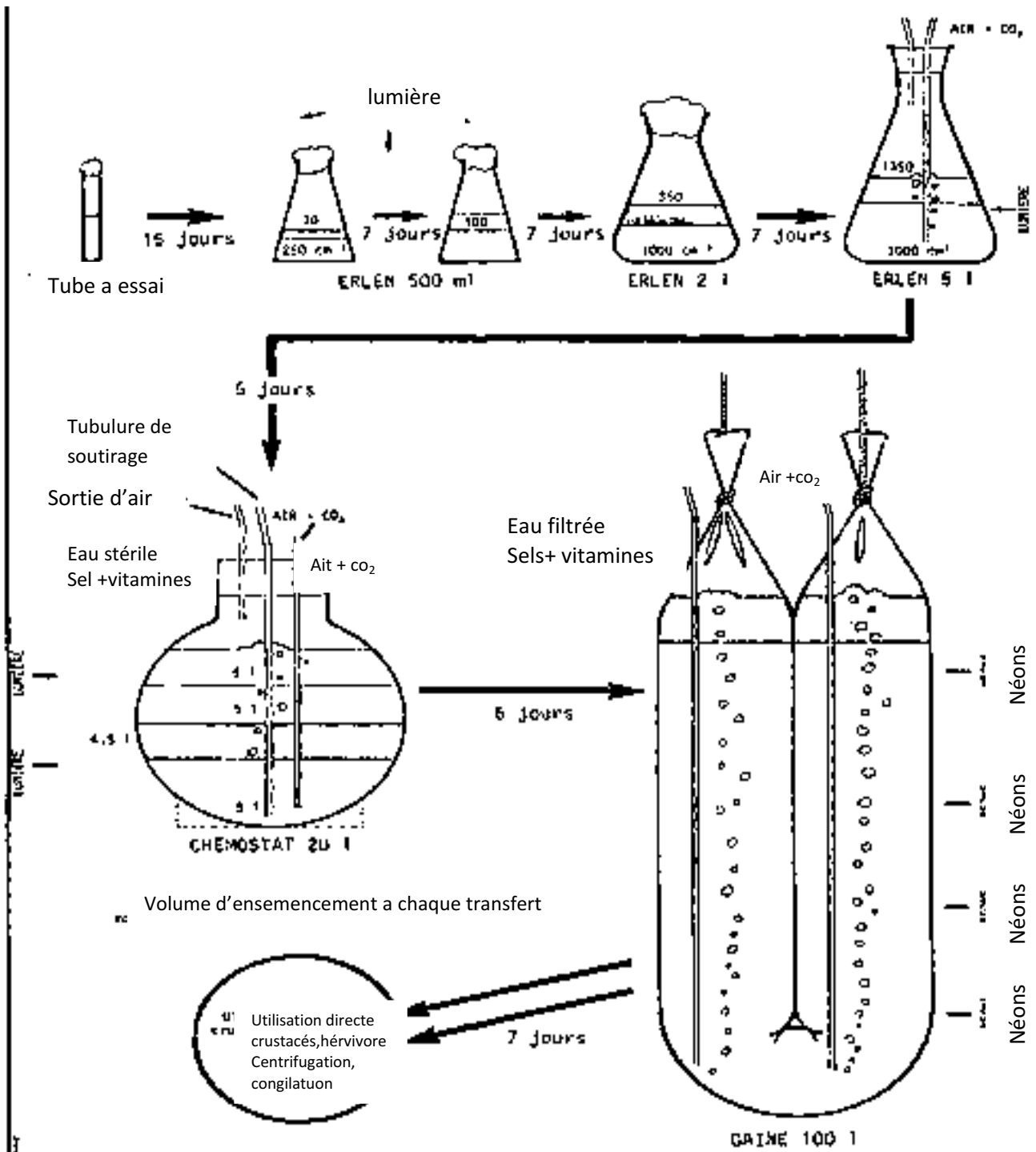


Figure n°3 : Représentation schématique du processus de production de microalgue (Audineau et Blancheton, 1985).

4-2 Purification des cultures

Il convient d'éliminer les organismes présents dans l'eau qui peuvent entrer en compétition avec les microalgues ; pour rendre les cultures axéniques. (LE BORGNE, 1986).

Pour cela on utilise différents types d'antibiotiques qui permettent de couvrir les spectres bactériens :

La pénicilline G agit sur les Gram-.

La streptomycine agit sur les Gram+.

Le chloramphénicol agit sur les deux.

(GUILLARD, 1973. AUDINEAU et al, 1986)

MATERIELS ET METHODES

The text 'MATERIELS ET METHODES' is rendered in a bold, green, sans-serif font. The letters are three-dimensional, casting shadows on a floor with a brown and white striped pattern. The perspective is from a slightly elevated angle, looking down at the text.

II. Matériels et méthodes

1- Objectifs

Notre objectif consiste à l'essai de deux milieux de culture MEYER et PROVASOLI pour la culture de *Chlorella sp*

A travers cette expérimentation on vise la maîtrise des techniques de culture de la chlorelle ; le contrôle de développement algal, les méthodes de récolte et de distribution.

2- Equipement de culture :

Les équipements utilisés pour la culture de la chlorelle sont très simple

L'armoire de culture est dotée de :

- Des tubes gros lux pour la lumière
- Des fioles pour la culture
- Des pompes à air pour l'aération et l'agitation



Figure n° 4 : Equipements de culture

3- Espèces de microalgues utilisées

➤ *Chlorella sp*

La chlorelle est une algue microscopique, unicellulaire d'eau douce sa taille varie entre 1 à 10 μm au maximum.

Elle se distingue des autres algues par sa concentration élevée en chlorophylle (BOURRELLY, 1989).

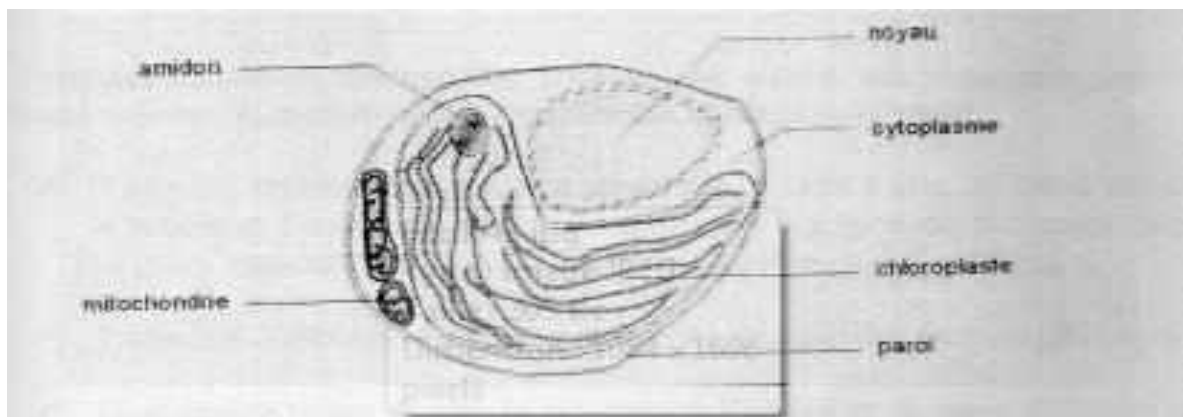


Figure n°5 : La cellule de *Chlorella sp*

3-1 Prélèvement des échantillons et Identification des espèces :

Les prélèvements ont été réalisés au niveau des bassins de Jardin d'essai, les bassins de la ferme bouchaoui, les bassins de la ferme staouali, et lac de Sidiabdellah (Mahalma). L'opération a été faite à l'aide d'une bassine et le zooplancton a été éliminé par filtration à l'aide des filtres de 45 μm , le filtrat est récupéré dans des bicher d'un litre.

II. Matériels et méthodes

L'identification a été faite à l'aide d'un microscope optique au laboratoire de l'aquaculture, (*ENSSMAL*).

3-2 Obtention des souches unies algales

3-2-1 Isolement des souches :

Deux méthodes sont généralement utilisées :

➤ Isolement sur un milieu liquide :

A partir d'un échantillon observé au microscope, on peut prélever une goutte du milieu contenant, parmi d'autre la cellule recherchée, en répétant cette opération plusieurs fois et on arrive à isoler une goutte uni algale (CHARMAT et DERRAB, 2009).

➤ Isolement sur un milieu solide :

La méthode est identique à 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 solidifier 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 zigzague, 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).

Dans notre cas on a utilisé l'isolement sur un milieu liquide.

4-Milieus de culture

Différents milieux sont destinés à la culture des microalgues ; on citera les milieux suivants :

- ❖ Le milieu ZERROUK (R. D FOX, 1999)
- ❖ Le milieu CONWAY (HELM, et COL, 1949)
- ❖ Le milieu EDERSCHERE (MC, 1973)
- ❖ Le milieu LEFEVRE (TASSIGUG, 1968)

Préparation des deux milieux de culture utilisés (MEYER et PROVASOLI)



Figure n°6: Préparation des milieux de culture

II. Matériels et méthodes

4-1 Milieu PROVASOLI

Tableau n°3: Composition du milieu PROVASOLI pour 1 litre d'eau distillée

(HOFF. et SNELL, 1987)

Solution	Elements	Concentration	Volume necessaries
1	Nitrate de sodium Na NO₃	7,5g pour 100ml	1ml
2	di-hydrogénophosphate de sodium Na H₂ PO₄	0,58 g pour 100ml	1ml
Métallique	Chlorure de fer Fe Cl₃	0,31 g pour 100ml	1ml
	Na EDTA	0,436 g pour 100ml	
	Sulfate de cuivre CuSO₄	1 g pour 100ml : 10ml	
	Molybdate de sodium Na₂ MO₄	0,63 g pour 100ml : 10ml	
	Sulfate de zinc Zn SO₄	2,2 g pour 100ml : 10ml	
	Sulfate de cobalt Co SO₄	1 g pour 100ml: 10ml	
	Chlorure de manganèse Mn Cl₂	18 g pour 100ml : 10ml	
Vitaminique	Tiamine (B1)	0,02	0,5ml
	Cyanocobalamine (B12)	Trace	
	Biotine (H)	Trace	

II. Matériels et méthodes

4-2 Milieu MEYER

Tableau n°4: composition du milieu MEYER pour un litre d'eau distillée

(VENKATARMAN, 1969)

Eléments	Concentration (g/l)
Nitrate de potassium K NO₃	1.210
Sulfate de manganèse Mg SO₄	2.460
Phosphate de potassium Monobasique KH₂ PO₄	1.230
Sulfate de fer Fe (SO₄)₃	0.052
Citrate de sodium	0.052

II. Matériels et méthodes

5- Condition de culture

Tableau n°5 : Les conditions de culture des deux milieux utilisés

Paramètre	Milieu MEYER	Milieu PROVASOLI
Température (°C)	18	18
Lumière (lux)	2000 à 4000	2000 à 4000
Ph	7,6	7,2
Salinité (PSU)	0,5	0,5

Les paramètres de culture ont été déterminés par :

Un thermomètre pour la température

Un pH mètre pour le pH (Ph211 micro processor pH meter)

Un salinomètre pour la salinité

Lumière : n'a pas été déterminée, défaut d'un luxmètre

II. Matériels et méthodes



Figure n°7 : pH mètre et le thermomètre

6- Contrôle du développement algal

6-1 Méthode directe

➤ Volume cellulaire

On fait passer les échantillons dans une centrifugeuse et on mesure le volume de la culture centrifugée (LE BORGNE, 1986).

➤ Comptage

On peut utiliser un compteur manuel (BARNABE, 1986) sous un microscope optique à l'aide d'une cellule préférable (AUDINEAU, 1986).

6-2 Méthode indirecte

➤ Densité optique

On a commencé par un volume d'eau de l'aquarium contenant des cellules pluri algal et au fur et à mesure on a obtenu des cellules purifiées.

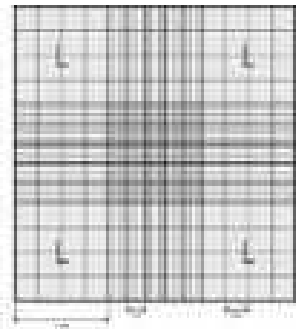
La correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaire est établie par la mesure de la teneur en chlorophylle (NEUVEUX, 1978).

6-3 Les différentes cellules de comptage

Il existe plusieurs types, on citera si dessus quelque exemple d'hématimètres :
MALESSEZ, NAGEOTE, LEMAU, NEUBAUER, FUSHS-ROSENTHAL,
THOMA

Tableau n° 6: Caractéristiques de quelques cellules de comptage (CHARMAT et DERRAB).

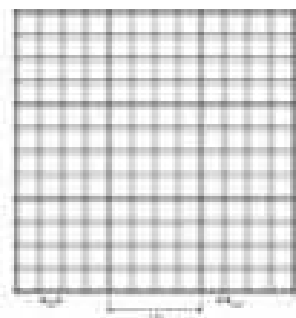
Types de cellules	Dimension L*I*P (mm)	Volume (ml)
Thomas	1*1*0,1	10 ⁻⁴
Malassez	2,5*2*0,2	10 ⁻³
Lemaur	10*10*0,4	4.10 ⁻²
Nageote	10*10*0,5	4.10 ⁻²
Neubauer et Naubauer modifie	3*3*0,1	9.10 ⁻⁴
Fushs Rosenthel	4*4*0,2	32.10 ⁻⁴



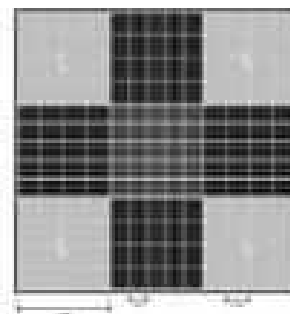
NEUBAUER



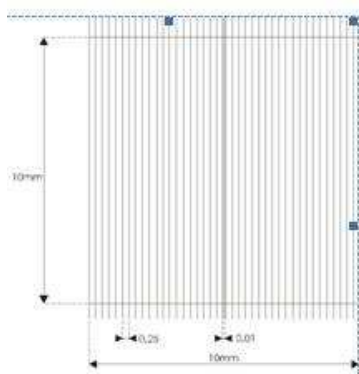
THOMA



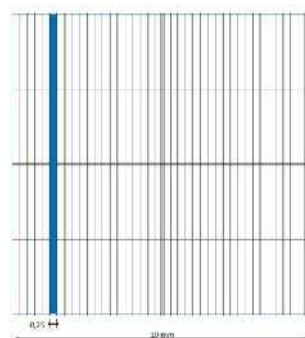
FUCHS-ROSENTHAL



NEUBAUER MODIFIEE



NAGEOTTE



LEMAUR

Figure n°8: Quadrillages de quelques cellules de comptage
(<http://www.ledamed.org/IMG/html/doc-10891.html>)

II. Matériels et méthodes

Dans notre travail on a utilisé : un compteur manuel, un microscope optique, et la cellule Malassez



Compteur manuel



Microscope optique



Cellule Malassez

II. Matériels et méthodes

Description de la cellule Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage (fig. 9) de volume connu. Il est composé de cases qui chacune, possède 4 lignes et 5 colonnes.

Le volume d'une case est de : $0,2 \times 0,25 \times 0,2 = 0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ ml}$

L'objectif du comptage

Il consiste à déterminer une concentration en cellules dans un ballon de culture des microalgues.

Remplissage de la cellule :

1. Prélever un échantillon de culture ;
2. Homogénéiser l'échantillon ;
3. Fixer avec du Lugo (2gouttes dans 1ml) ou de l'eau de javel diluée, les microalgues flagellées.
4. Humidifier les parties extérieures à la lamelle. Déposer la lamelle sur la cellule de Malassez faire adhérer la lamelle a la lame en faisant glisser plusieurs fois la lamelle sur la lame.
5. Déposer l'échantillon sur le bord de la lame à l'aide d'une pipette pasteur – le liquide remplit alors la cellule par capillarité ;
6. Mettre la lame au microscope. 0,2 mm

II. Matériels et méthodes

Dénombrement :

1. Faire une première mise au point à l'objectif x50 ;
2. Passez au grossissement x100 et faire la mise au point. Le quadrillage doit être bien visible
3. Compter le nombre de cellules pour 5 cases.
 - **Remarque** : pour les cellules positionnées sur les bords, on ne compte que celles situées sur 2 des 4 côtés de la case, par exemple, on compte les cellules sur les côtés a et b, mais pas sur c ni d ;

CELLULE DE MALASSEZ

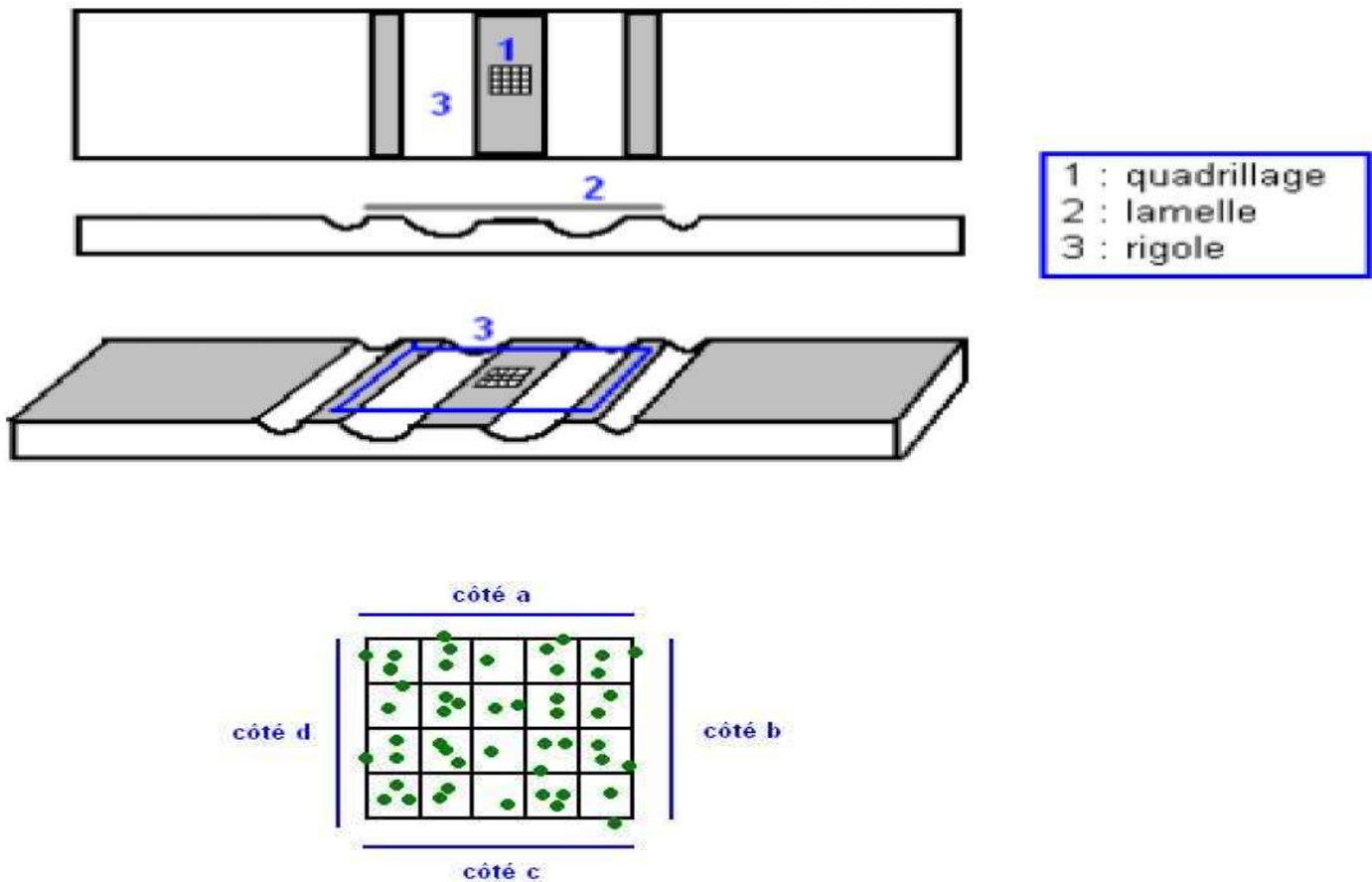


Figure n°9 : l'utilisation de la cellule Malassez (<http://tice.agrocampus-ouest.fr/file.php/163/Culture%20phytoplancton.pdf>).

6-4 La récolte des microalgues

La récolte peut se faire par plusieurs méthodes :

6-4-1 Centrifugation

Basé sur la légère différence de densité entre les algues et le milieu liquide, elle permet d'extraire 80 à 90% de ces végétaux, entre 2 à 5 minute a des accélérations de 500 à 1000 g (BARNABE, 1986).

Sans aucun additif, la centrifugation permet un taux de concentration, varie entre 100 et 150 avec une teneur en matières solides allant de 12 à 25% (MORAINE et al, 1980).

6-4-2 Coagulation- floculation

Les floccs d'algues qui se constituent au sein du milieu liquide sous l'action des additifs peuvent être amenés à la surface par les techniques de flottation ou décantés dans un décanteur traditionnel (BARNABE, 1986).

La récupération du flocculant peut être envisagé dans une opération à grande échelle (SHELF et al, 1977).

6-4-3 Ultrafiltration

Elle se faite sur séparateur à membrane est une solution sans doute efficace, mais actuellement plus couteuse que la première (LE BORGNE, 1986).

6-4-4 Sédimentation spontanée

Il s'agit d'un processus naturel qui retrouvé des applications très diverses comme :

La bio-floculation : La chlorella placée dans des bacs a tendance a se sédimenter (ULTERMOHL, 1931).

6-4-5 Micro tamisage

Il est réservé aux grandes quantités de liquide à traiter avec un faible cout, cette technique n'apporte pas une réponse vraiment satisfaisante (BARNABE, 1986).

6-4-6 Filtre à papier

Il s'agit d'une extrapolation des filtres à membrane de laboratoire (BARNABE, 1989).

Dans notre expérimentation on a utilisé la sédimentation spontanée.

On a placés la chlorelle dans des bacs, après un instant la chlorelle a tendance a se sédimenter.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. Résultats et discussions

1- Paramètres physico chimiques :

Tableau n°7 : Contrôle des paramètres physico-chimiques de *Chlorella sp* dans les milieux MEYER et PROVASOLI

Les paramètres	Températures (°C)	pH		Lumière (lux)
		Milieu MEYER	Milieu PROVASOLI	
Les dates				
11/06/12	20	6,92	7,18	2000 à 4000
13/06/12	21,6	7,2	7,2	
15/06/12	22	7,2	7,2	
17/06/12	22,9	7,7	7,42	
19/06/12	23,5	7,8	7,5	
21/06/12	23,7	8,05	7,8	
23/06/12	24,2	8,23	8,0	
25/06/12	26	8,47	8,24	
27/06/12	27	8,51	8,41	
28/06/12	30	8,5	8,53	

III. Résultats et discussions

Lumière :

Dans l'absence d'un luxmètre, on été obligé d'utilisé des néons, donc la valeur a été estimer au nombre de néons utilisé durant toute les expérimentations pour les deux milieux.

Température de l'eau :

Pour les deux milieux, la température a varié entre 19°C et 27°C, ce qui a dépassé légèrement l'optimum de croissance de la chlorelle.

Dans les derniers jours de notre expérimentation la température était 30°C ceci est du a l'effet des néons utilisés et la température atmosphérique.

pH :

Les microalgues consomment le CO₂ ce qui provoque l'élévation du pH.

Dans le milieu MEYER il varie entre 6.92 et 8.5 ; cette variation et en relation avec la croissance des microalgues (chlorelle).

Par contre dans l'autre milieu (PROVASOLI), le ph varie de 7.18 à 8.53.

.

III. Résultats et discussions

2- Croissance des microalgues :

Tableau n°8 : croissance de la chlorelle dans deux milieux différents

Les densités		
Les dates	Milieu MEYER (cellules/ml)*10⁵	Milieu PROVASOLI (cellules /ml)*10⁵
11/06/12	14 ,65	7
13/06/12	19,35	7,5
15/06/12	22,55	8 ,7
17/06/12	24,97	10,2
19/06/12	34,71	12,76
21/06/12	52	14,45
23/06/12	65 ,14	17
25/06/12	80 ,08	22,75
27/06/12	74,86	20,16
28/06/12	67,65	18,35

III. Résultats et discussions

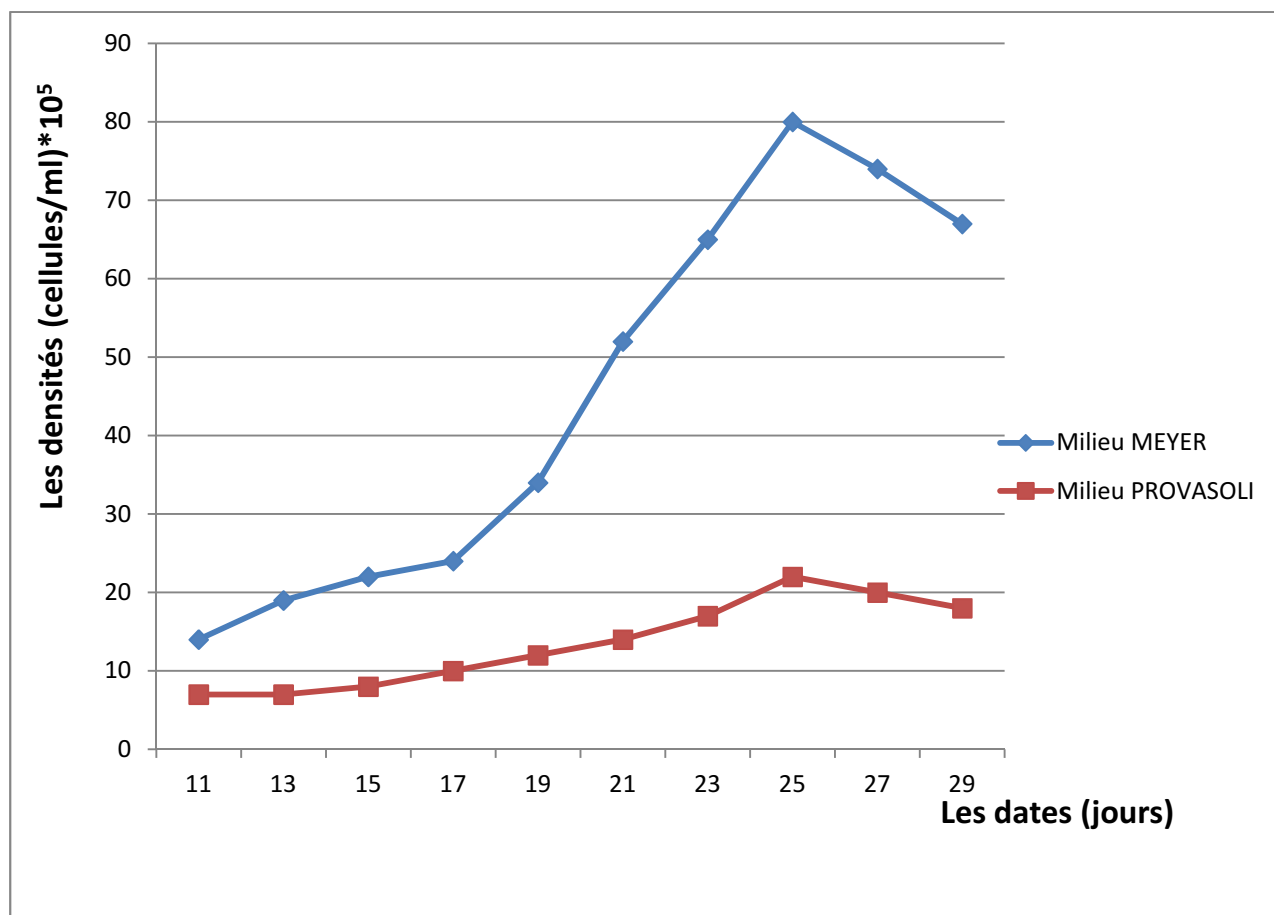


Figure n°10: Courbe de croissance de *Chlorella sp* dans deux milieux différents

III. Résultats et discussions

Chlorella dans le milieu PROVASOLI :

On voit d'après la courbe de croissance qu'il ya une faible différence entre les étapes de développement.

La phase exponentielle a débute après le septième jour de latence.

Durant la phase stationnaire, on a observé un pic de 2275000 cellules/ ml.

Dans le milieu MEYER :

D'après la figure 6 on voit que la phase de latence a durée 5 jours. Durant laquelle les microalgues s'adaptent aux conditions de culture.

Après on voit que la densité des cellules augmente c'est la phase exponentielle.

La phase stationnaire correspond à un pic de 8008000 cellules/ml.

La phase de décroissance vient juste après le pic.

CONCLUSION

Conclusion :

Les microalgues constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire donc leur utilisation dans les bassins d'élevage répond au problème de la nourriture des alevins.

L'essai de deux milieux (PROVASOLI et MEYER), nous a permis de montrer lequel de ces milieux est le plus favorable pour la croissance et le développement de la chlorelle.

Ces expériences nous ont permis de maîtriser les conditions et les différentes techniques de culture, du contrôle de développement algal, et de récolte des microalgues.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références bibliographiques

- AUDINEAU. P,** et **BLANCHETON. G. 1986.** Production d'algues unicellulaires IFREMER., équipe MERE.A., station : DEVA-SUD ; P1-19
- BARNABE. G, 1986.** Aquaculture, Tome 1; *Ed Lavoisier*; P: 181-192.
- BARNABE. G, 1991.** Base biologique et écologique de l'aquaculture
Edition Lavoisier Tec et Doc ; P : 67-83
- BECHAGRA. A et al. 1997.** Culture des microalgues, mémoire d'étude
Universitaire appliqué en aquaculture ISMAL
- BOUGIS. P, 1974.** Ecologie de plancton marin tome 1 ; P : 196
- BOULEKRAOUEt et ZOUGAR, 2006.** Culture des microalgues, mémoire
D'études universitaires appliquées en aquaculture *ISMAL*
- BOURRELLY. P, 1990.** Algues d'eau douce : algues vertes 1 ; P : 572
- BRUNO de REVIERS, 2002.** Biologie et phylogénie des algues tome 1 ;
Edition Belin ; P : 600
- CHARMAT. A et DERRAB. N, 2009.** Culture de deux microalgues : *chlorella sp* et *Spirulina Platensis* pour l'utilisation d'un élevage larvaire, mémoire d'étude universitaire appliqué (D.E.U.A) *ENSSMAL*.
- DIDIER. CHINZI. 1998.** Références aquaculture, *Edition synthèse agricole* ;
P : 291
- DAUTA. A, 1982.** Condition de développement du phytoplancton étude Comparative du comportement de huit espèces en culture rôle des nutriments : assimilation et stockage intracellulaire. *Annales. Limmol.* 18 (3) : 263-292.
- DE BYLLY. G, 1978.** Culture en continu in, **JACQUES, G.** phytoplancton,
biomasse, production, numérotation et culture. *Ed Du castillet*; P : 90-91
- FERNANDEZ, 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: P: 17-37.
- FIALA. M., 1978.** Culture d'algue in, **JACQUES, G.** Phytoplancton,
biomasse, production, numérotation et culture. *Ed Du castillet*; P: 90

Les références bibliographiques

- HOFF, et SNELL, 1987.** Plankton culture manual; *fifth Edition*; P: 159
- GAYRAL. P, 1975.** Les algues, morphologie, cytologie, reproduction et écologie ; *DOIN* éditeur ; P : 165.
- GREEN. P. B. 1973.** Intercellular growth rates in, phycological methods; P: 369-375.
- GUILLARD. R, 1973.** Methods for microflagellates and nannoplankton in, phycological methods; P: 69-86.
- HARRIS. G. P., 1978.** Photosynthetics, productivity and growth: the Physiology of phytoplankton. *Erybnisse de Limnologie*. P: 1-163.
- HELM, M. M., et al, 1979.** The développement of a 200L algae culture vessel at Conway. *Fish. Res. Techn. Rep* ; 53 : 1-12.
- JACQUES. G, 1975.** Phytoplankton ; production, biomasse, numération et culture ; *Ed. Du castillet* ; P : 21-38.
- LE BORGNE. Y, 1986.** La culture des microalgues in, BARNABE. G, aquaculture. *TEC& DOC – Lavoisier* ; P : 181-192.
- MCLACHLAN. J, 1973.** Growth media marine in, phycological methods; P: 25-51.
- MEKKID et YAHIA-CHEIKH, 1994.** La culture des microalgues : mémoire d'étude universitaire appliquée (D.E.U.A) en aquaculture *ISMAL*
- MOHN. F. H; 1980.** Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgues. P: 547-571
- MONOD. J, 1949.** The growth of bacterial culture. *Ann. Rev. Microbiol*; 3. P: 371-394
- MORAINE. R et SHELEF. G, 1980.** Recovery of sewage-born algae
- MOYSE. A,1956.** Les bases scientifiques perspectives nouvelles d'utilisation de la photosynthèse, la culture accélérée, d'algues *Année Biologique*, 32 ;(3-4) : 101-128 ;
- NEUVEUX. J,1978.** Biomasse in, JACQUES. J, 1975. Phytoplankton ; biomasse, production, numération et culture ; *Ed Du Castillet* ; P : 21-38

Les références bibliographiques

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 ; P : 312

RIPLEY. D. FOX., 1999. Spiruline: techniques, pratiques et promesses ; *EDISUD Edition*; P: 117-120.

ROLAND. N., DORME. A. J, et JOYARD. J., 1998. Avancées scientifiques ; Le chloroplaste en pleine lumière. URA 576 CNRS-CEA-Université Grenoble 1

SHELF. C, SOEDER. C, 1977. Algae biomass, production and use in, **BARNABE**, base biologique et écologique de *l'eau Edition Lavoisier Tec et Doc* ; P: 67-83

SILVA. P. C, 1982. Chlorophycota in *PARCKER*, synopsis and classification of living, in, **BOURRELY. P**, Algues d'eau douce (Algues vertes 1); P: 572.

TASSIGNY. M, 1968. Culture des algues In, l'élevage des Daphenies pour l'alimentation des poissons d'ornement. Bulletin SOC. NAT d'acclin de France; P : 127-129

ULTERMOHL. H, 1931. New wage in dear quantativen Erfassung of plankton. In **JACQUES.** P: 567-596

VENKATARMAN.G.S, 1969. The cultivation of algal ICAR (Indian Council of Agricultural Resach); P: 237-247

<http://www.aquoa.net>

<http://www.ledamed.org/IMG/html/doc-10891.html>

<http://tice.agrocampus-ouest.fr/file.php/163/Culture%20phytoplankton.pdf>.

ANNEXE

Les tableaux

Le milieu d'EDRSCHE (MC.NLACHLAN, 1973)

Eléments	Concentrations ($\mu\text{m/L}$)
Nitrate de sodium Na NO₃	1,18-2,35
Di hydrogénophosphate de sodium Na H₂ PO₄	56-140

Le milieu de LEFEVRE (YASSIGUG M, 1968 in CHARMAT et DERRAB, 2009).

Eléments	Concentration (mg)
Nitrate de potassium KNO₃	100
Phosphate de potassium monobasique K H₂ PO₄	40
Sulfate de manganèse Mg So₄	30
Les concentrations sont diluées dans 100 ml d'eau distillé	

Le milieu de GRAIG et TELEASSE (PRESCOTT, 1964 in CHAMAT et DERRAB, 2009).

Solutions	Eléments	Concentration (g/l)	Volume Nécessaire
1	Nitrate de potassium K No₃	7,6	10ml
	Sulfate de manganèse Mg So₄	14,8	
	Phosphate de potassium Monobasique KH₂ Po₄	7,4	
	Sulfate de fer FeSo₄	8	

Ajuster à 100ml de l'eau distillé

2	Sulfate de zinc Zn So₄	100	10ml
	Acide borique H₃ BO₃	100	
	Sulfate de manganèse Mn So₄	150	
	Sulfate de cuivre Cu So₄	3	

Ajuster à 100ml d'eau distillé

Le milieu de CONWAY (HELM et col, 1979)

Solutions	Eléments	Concentration (g)	Volume Nécessaire
Nutritive	Chlorure ferrique Fe Cl₃	1,30	1ml
	Chlorure de manganèse Mn Cl₂	0,36	
	Acide borique H₃ BO₃	33,6	
	Na₂ – EDTA	45,0	
	Di hydrogénophosphate de sodium Na H₂ Po₄	20	

Ajuster à 200ml d'eau distillé

Métallique	Chlorure de zinc Zn Cl₂	2,1	2ml
	Chlorure de cobalt Co Cl₂	2,0	
	Ammonium heptamolybdate 6(NH₄) Mo₇ O₂₄	0,9	
	Sulfate de cuivre Cu So₄	2,0	

Ajuster à 200ml d'eau distillé

vitaminique	Cyanocobalamine B₁₂	10ml	0,1ml
	Thiamine B₁	200ml	

Ajuster à 200ml d'eau distillé

Les annexes



Nutrition des alvins



Photo d'un Aquarium (jardin d'essai)



Préparation des milieux de culture