

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**Institut National des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral**



**Memoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Universitaires  
Appliquées en Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral.**



**Thème  
Culture de micro algue**

**Option  
AQUACULTURE**

**Présenté par :**

**BOULEKRAOUEZ Souhila  
ZOUGAR Nadia**

**Promoteur :**

**Mr BEHASNET.K**

2007/2006

## **Sommaire :**

**Introduction**

<b>Description des principales micro-algues utilise en aquaculture. ....</b>	<b>1</b>
1- Systématique et morphologie. ....	2
2- Valeur alimentaire . ....	5
<b>Conditions générales de culture . ....</b>	<b>6</b>
1) La thermorégulation . ....	6
2) La lumière . ....	6
3) L'aération . ....	7
4) Les éléments nutritifs majeur . ....	7
5) Milieu de culture . ....	8
a- Milieu à base d'eau de mer enrichie.	
b- Milieux synthétiques.	
<b>Techniques de culture . ....</b>	<b>10</b>
1) Isolement des souches . ....	10
1.1) Isolement en milieu liquide . ....	12
1.2) Isolement en milieu solide . ....	12
1.3) Isolement par dilution . ....	13
2) Stérilisation. ....	13
3) Entretien des souches. ....	14
3.1) principe . ....	14
3.2) Méthode. ....	14
4) Mise en route d'une culture. ....	15
4.1) Culture mono-spécifique en petit volume . ....	15
4.2) Locaux et équipement . ....	16
4.3) Description des différents locaux. ....	16
4.4) Méthodes d'utilisation . ....	18

5) Maintien d'une culture en continue. ....	22
<b>Contrôle de la croissance</b> .....	23
<b>Méthodes</b>	
• En méthodes directes .....	23
• En méthodes indirectes.....	23
<b>La Récolte</b> .....	26
Les différentes méthodes de collecte.....	26
<b>Conclusion</b> .....	28
<b>Bibliographie</b>	
<b>Annexes</b>	

## **Introduction :**

Les micro-algues sont des organismes qui ont un rôle primordial aussi bien dans les eaux douces qu'en milieu marin, car elles constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire dont l'établissement conditionne l'équilibre biologique aquatique.

Elles se présentent sous forme de cellules microscopiques autotrophes isolées ou réunies en chaînes dont la taille varie de 0,2 à 100 microns, possédant normalement de la chlorophylle dans toutes leurs cellules et croissant dans le milieu aquatique ou dans un milieu très humide.

Il est relativement aisé en faisant appel à deux critères, coloration et réserve cellulaire, de diviser les algues en; Cyanophytes, Rodophytes, Chromophytes, Chlorophytes.

La production de ces micro algues répond a la demande alimentaire des larves de bivalves, et de pénéidés. Elle permet aussi le développement de culture de rotifères (ENDINEAU et coll, 1989).

Compte tenu de leurs richesse en substances diverses,et leurs composition particulièrement intéressante si on la compare a la graine de soja dont la richesse et connue, ont ici un large marche, il faut remarquer que la productivités des micro algues par unité de surface et de temps est beaucoup plus élevée que celle des production agricoles traditionnelles surtout en pays chaud , et que ces cultures peuvent être installées dans des zones agricoles peu fertiles ou dans des zones désertique proches d'eaux marines (BARNABE, 1991).

L'algoculture consiste en la production de micro algues dans des conditions contrôlées et maîtrisées la culture nécessite des connaissances en fermentation. Le principe de culture est le même que pour des bactéries, levures, moisissures...; ce sont juste les compositions des milieux et les conditions de culture qui varient (Document anonyme ISMAL).

L'aquaculture extensive peut d'ailleurs être considérée comme un cas particulier de ce type de production puisque les micro-algues constituent le point de départ de ce processus. L'effet positif de l'incorporation de micro algues fraîches (Spiruline) dans la ration alimentaire des poissons, a d'ailleurs été démontré : 70% d'algues permettent une croissance du Tilapia identique à celle obtenue à l'aide de farine de Hareng (BECHAGRA. A *et al*, 1997).

L'objectif visé par notre travail consiste à maîtriser :

- Identification des principales micro-algues utilisées en aquaculture.
- Les conditions générales de culture.
- Les techniques de culture de contrôle du développement algales de récolte et de distribution.

**Description des principales micro-algues  
utilisées en aquaculture :**

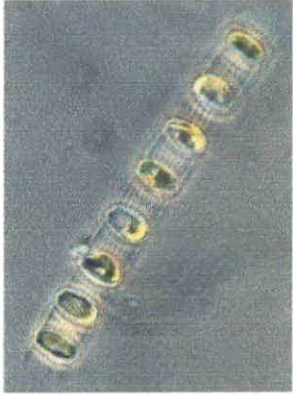
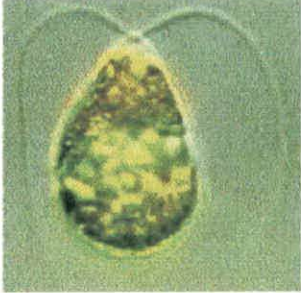

Certaines conditions doivent être remplies pour qu'une espèce soit considérée comme une bonne source alimentaire parmi :

- La taille des cellules algales est un paramètre limitant a titre d'exemple : Le faible diamètre de la bouche et de l'œsophage des larves de bivalves empêche l'ingestion des particules de plus de 10 micron (BECHAGRA.A *et al*, 1997), cependant la taille la plus recommandable est de : 2 – 10 micromètre.
- La facilite d'élevage et un bon rendement sont aussi des facteurs très importants.
- Le faible coût énergétique, main d'œuvre, matériel et structures.
- Digestibilité : Dans ce cas, la présence et l'épaisseur de paroi cellulaire sont des facteurs importants.
- Des métabolites toxiques sont produits par certaines algues, elles ne peuvent être utilisées comme aliment.
- Les micro-algues doivent fournir aux larves les carbohydrates, protéines, lipides et vitamines indispensables à leur bonne croissance.
- La mobilité n'est pas essentielle mais recommandation car certaines espèces en culture ont tendance à se sédimenter (in MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994).

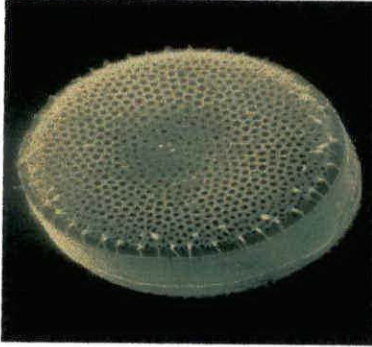

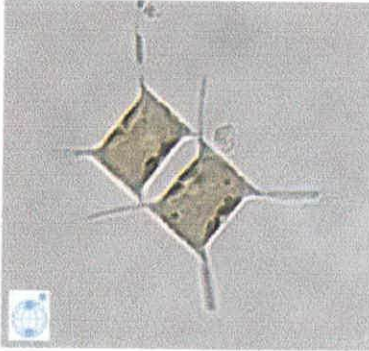
On citera si dessous quelques exemples :

**1- Systématique et morphologie :**

**Tableau 1 :** Quelques exemples d'algues marines

Systématique	Morphologie	Taille
Embranchement :Chromophycophyte Classe :Diatomophycées Sous- classe : Centrophycidées Ordre :Coccosinodiscales Famille : Coccosinodiscaceae Genre :Skeletonema Espèce : <u>Skeletonema costatum</u>		3+5 $\mu$
Embranchement :Chlorophyte Classe :Euchlorophycées Ordre : Volvocales Famille : Polyblépharidaceae Genre :Dunaliella Espèce : <u>Dunaliella salina</u>		6 $\mu$
Embranchement :Chloropytes Classe :Euchlorophycées Ordre :Chlorococcales Famille : Coccomyxaceae Genre : Diogenes(=Nannchloris) Espèce : <u>Nannochloris sp</u>		1-2 $\mu$





Bourrelly P. (1985). Vol 1, 2, 3.

Systématique	Morphologie	Taille
<p>Embranchement :Chromophycophyte                      Classe :Diatomophycées                      Sous- classe : Centrophycidées                      Ordre :Coscinodiscales                      Famille : Coscinodiscaceae                      Genre :Talassiosira                      Espèce :<u>Talassiosira pseudonana</u></p>		<p>20+10 μ</p>
<p>Embranchement :chlorophyte                      Classe :parasinophycée                      Sous-classe :chlorophycidae                      Ordre :Pyraminonadale                      Famille :pyraminonaceae                      Genre :tetraselmis                      Espèce :<u>Tetraselmis suecica (kylin) Butch</u></p>		<p>5+7 μ</p>
<p>Embranchement :Chromophycophyte                      Classe :Diatomophycées                      Sous- classe : Centrophycidées                      Ordre :Biddlphiales                      Famille : Chaetocéraceae                      Genre :Chaetoceros                      Espèce : <u>Chaetoceros calcitrans</u></p>		<p>2-3 μ</p>

Bourrelly P. (1985). Vol 1, 2, 3.

Image : Internet

**Tableau 2 :** Quelques exemples d'algues d'eau douce

Systématique	Morphologie	Taille
Embranchement : Cyanophyte Classe : Cyanophycées Ordre : Nostocales Famille : Oscillatoriaceae Genre : Spirulina Espèce : Spirulina plasentis		35 - 50 $\mu$
Embanchement : Chlorophytes Classe : Euchlorophycees Ordre : Chlorococcales Famille : Oocystaceae Genre : Chlorella Especies : <u>Chlorella</u> sp		1-3 $\mu$
Embanchement : Chlorophycophyte Classe : Chlorophycées Sous-classe : Chlorophycidae Ordre : Volvocales Famille : Chlamydomonadaceae Genre : Chlamydomonas Especies : <u>Chlamydomona</u>		15-25 $\mu$
Embanchement : Chlorophycophyte Classe : Chlorophycées Sous-classe : Chlorophycidae Ordre : Chlorococcales Famille : Scenedesmaceae Genre : Scenedesmus Especies : <u>Scenedesmus</u> sp		

Bourelly P. (1985). Vol 1, 2, 3.

## 2- Valeur alimentaire :

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

La valeur nutritive d'une algue est fonction de sa composition chimique, celle-ci étant variable d'une espèces a l'autre (voir Tableau 3 si dessous) (AUDINEAU et coll, 1986).

La valeur alimentaire des espèces peut changer selon l'age et même les bonnes espèces peuvent devenir toxiques à cause d'un développement bactérien.

Il est noter que les espèces de très bonne qualité nutritionnelle sont fragiles en culture (in MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994).

**Tableau 3 :** Analyse en pourcentage du poids sec, de différentes espèces d'algues unicellulaires.

Espèces	Protéines	Hydrates de carbone	Lipides	Pigments	Cendres
Skeletonema costatum	37	20,8	4,7	1,8	39,0
Dunaliella salina	57	31,6	6,4	3,0	7,6
Phaeodactylum tricornutum	33	24,0	6,6	2,9	7,6
Tetraselmis sp	37	20,8	4,7	1,8	39,0
Chaetocero sp	35	6,6	6,9	1,5	28,0
Spirulina platensis	70	18,0	8	1,0	3,0
Chlorella sp	45-50	30-35	10	-	3-4
Snedesmus sp	50-60	12-14	4-8	-	6-8

**Condition générale de culture :**

Pour pouvoir offrir aux 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 (in MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994).

### 1) La thermorégulation :

Les résultats obtenus par de nombreux auteurs montrent que l'on observe une lente augmentation du taux de croissance de la culture avec la température, un optimum spécifique, et une décroissance linéaire de la production avant son effondrement.

La plage des températures utilisable va de 5 à 40 ° mais la majorité des cultures sont réalisées entre 10 et 30° (BARNABE, 1991).

Pour assurée 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 coll, 1986).

### 2) La lumière :

Elle peut être assurée

- naturellement : éclairage solaire direct mais on devient alors très dépendant des variations climatiques (in HADJADJI .N *et al*, 2002)
- artificiellement : la lumière artificielle est préférée a la lumière solaire (in BECHAGRA.A *et al*, 1997).

Les cultures sont maintenues sous un éclairage de tubes fluorescents de 40 et 60 watts placés verticalement .Les tubes utilises sont de type " blanc industrie " (AUDINEAU et coll, 1986)

L'intensité lumineuse préférable pour l'ensemble des espèces cultivées est comprise entre :

- 4750 et 5250 lux (in BECHAGRA. A *et al*, 1997)
- 3500 lux pour les travaux physiologiques et 1000 lux pour la conservation des souches (FIALA-1978)

- 3000 LUX et 5000 lux (in BECHAGRA. A *et al*, 1997)
- 3500 et 5000 lux (AUDINEAU et coll, 1986)

Les espèces du phytoplancton cultivées habituellement se développent très normalement avec une illumination constante (in MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994) et pour obtenir une production maximale l'énergie lumineuse est fournie 24/24 heure (AUDINEAU et coll, 1986).

### 3) L'aération :

L'air surpressé est insufflé à une pression de 0,4 bars, ce qui permet l'agitation du milieu pour le maintien des micro algues en suspension .On y adjoint 2 à 3% de gaz carbonique (AUDINEAU et COL, 1986) qui :

- Est indispensable au processus de photosynthèse (in MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994) et pour obtenir des concentration importantes (AUDINEAU et coll, 1986).
- Mis en solution va réagir avec l'eau pour donner de l'acide carbonique puis s'ioniser pour donner du bicarbonate qui stabilisera le pH ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ), qui a tendance a augmenté (de 7,5 à 9) ce qui limite la croissance.
- Assure l'approvisionnement en carbone inorganique (AUDINEAU et coll, 1986).

### 4) Les éléments nutritifs majeur :

C'est un facteur limitant du taux de croissance .En culture on essaie de maintenir la concentration de sels nutritifs au-dessus du seuil optimal par un excès d'apport, afin d'utiliser au mieux l'énergie lumineuse.

Les teneurs en sels nutritifs utilisées en culture sont bien supérieures à celles que l'on rencontre en milieu naturel. Cette teneur est calculée en fonction de la vitesse d'absorption des micro algues qui dépend du taux de croissance de la population (lui-même régule par l'ensemble des facteurs environnementaux (BERNABE, 1991).

Les éléments nutritifs majeurs sont :

- Azote : qui est assimilé sous forme de  $\text{N.NH}_4$ .
- Phosphate : est employé sous forme de  $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ .

- La silice : pour les diatomées, elle est apportée sous forme de Na SiO<sub>3</sub>.
- Micro- éléments inorganiques : sous forme de sels (chlorure de sulfate)
- Les principaux métaux utilisés sont le fer, le cuivre, la manganèse, le molybdène, le zinc.
- Micro-éléments organiques :

Trois vitamines sont généralement employées :

La cyanocobalamine	B12
La thiamine	B1
La biotine	

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

## 5) Milieu de culture :

Il existe plusieurs milieux de cultures destinées à la culture de micro algues. Si on veut avoir un développement abondant lors d'une culture de micro algues.

Il est nécessaire de préparer les milieux de culture avec le plus grand soin possible (in MEKKID et YAHIA-CHEIKH ,1994). Les réactifs utilisés pour la préparation des milieux doivent être de pureté analytique reconnue, deux types de milieux peuvent être utilisés :

### a- Milieu à base d'eau de mer enrichie :

L'eau de mer utilisée doit être recueillie de préférence loin des côtes, et ce pour éviter toute source de contamination biologique ou chimique.

L'eau de mer ayant généralement des teneurs très faibles en éléments nutritifs, il est indispensable de l'enrichir pour permettre un bon développement des espèces cultivées.

3 types d'éléments sont rajoutés :

- Les sels nutritifs majeurs
- Les oligoéléments métalliques
- Les facteurs de croissance

b- Milieux synthétiques :

La préparation et l'utilisation d'eau de mer ou d'eau douce reconstituée est possible à petite échelle, celle-ci est préparée avec de l'eau distillée à laquelle on rajoute les constituants majeurs d'eau douce ou eau de mer, à savoir NaCl, les sels de Mg, K et Ca (Ca sous forme de CaCl), l'iode sous forme de NaI, le brome sous forme de NaBr ainsi que les éléments d'enrichissement inorganiques et organiques déjà cités. Cependant, cette méthode est trop coûteuse. D'après M. FIALA, 1979.

On cite comme exemple deux milieux de culture :

- **Milieu d'eau douce : Meyer (Meyer, 1947) d'après Venkataraman G.S, 1969**

Nitrate de potassium ( $KNO_3$ )	1,21g/l
Sulfate de Magnesium ( $MgSO_4, 7H_2O$ )	2,46g /l
Phosphate dipotassique ( $K_2HPO_4$ )	1,23g/l
Sulfate de fer ( $Fe_2(SO_4)_3$ )	0,052g/l
Citrate de sodium ( $Na_3C_6H_5O_7, 2H_2O$ )	0,195g/l
Eau distillée	1000ml

- **Milieu d'eau de mer : Erdschreider (Mc LACHLAN-1973)**

Na $NO_3$	1,18-2,35 mm/l
Na <sub>2</sub> $HPO_4$	56-140 $\mu$ m/l
Extrait de sol	50ml
Eau de mer	1000ml

Ils existent d'autres milieux de cultures (Voir annexe I).

**Technique de culture :**

### 1) Isolement des souches :

L'isolement des cellules permet d'obtenir des cultures monospécifiques. Il est conseillé d'utiliser des cultures en phase de croissance exponentielle (courbe de croissance Fig1) c'est -adire composées de cellules jeunes ayant un bon potentiel de multiplication (BECHAGRA. A *et al*, 1997).

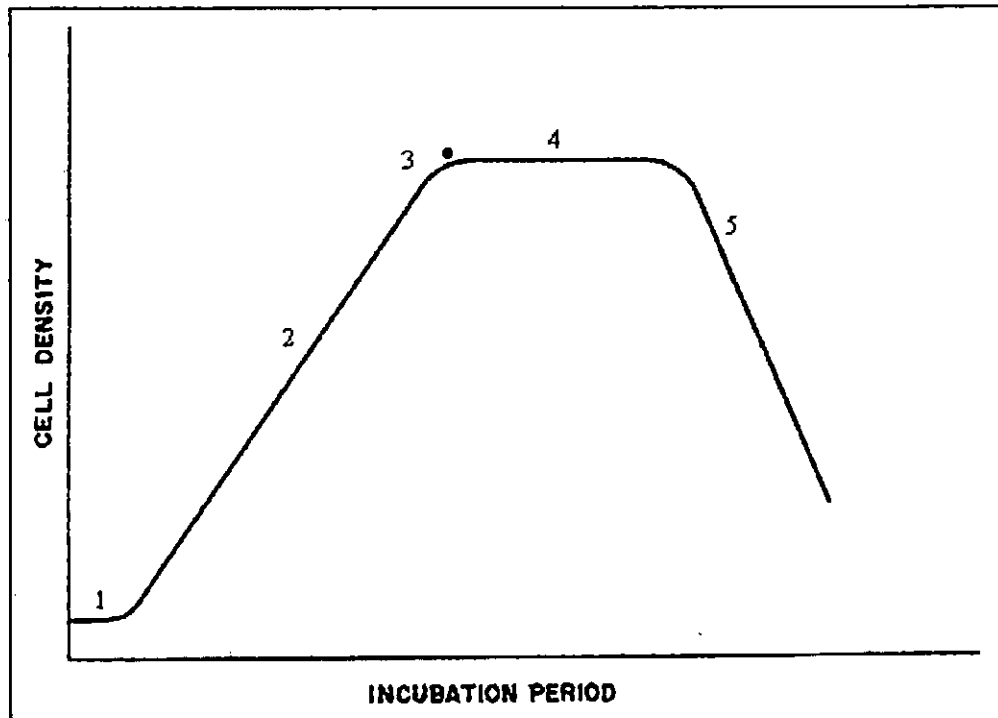


Fig1 : Courbe de développement des micro-algues

Les différentes phases du développement algal :

#### 1. Phase de latence :

Elle correspond à l'adaptation aux nouvelles conditions de culture, cette phase peut être très 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 coll, 1979).

**2. Phase exponentielle :**

En cette phase, la croissance est la plus active ou les cellules se divisent dans un temps caractéristiques, appelé "Temps de division". Le développement de la population est exprimé par un taux de croissance de la forme :

$$N_1 = N_0 \exp (K_e \times t)$$

Ou :  $N_1$  : le nombre de cellule au temps  $t_1$ .

$N_0$  : les nombre de cellule au temps  $t_0$ .

$K_e$  : la constante de croissance.

Avec  $t = t_1 - t_0$

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

(FIALA, 1978)

**3 et 4. Phase stationnaire :**

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

**5. Phase létale :**

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

Le choix des algues dans le milieu naturel est déterminant. Trois méthodes d'isolement sont généralement utilisées. (AUDINEAU et coll, 1986)

### **1.1) Isolement en milieu liquide :**

Cette méthode convient principalement aux cellules assez grosses.

A partir d'un échantillon observé au microscope on peut prélever une goutte du milieu contenant parmi, d'autres la culture recherchée répétant cette opération, plusieurs fois on arrive à isoler, une goutte uni algale, (LE BORGNE, 1973) à l'aide d'une fine pipette pasteur et introduites dans un tube à essai contenant le milieu de culture.

Une stérilisation de la souche sera effectuée ultérieurement par traitement antibiotique (AUDINEAU et coll, 1986).

### **1.2) Isolement en milieu solide :**

On utilise des boîtes de pétri remplies de gélose et enrichies en milieu de culture (AUDINEAU, 1986), ou Agar de 1 à 1,5 % (FIALA, 1978) on étale sur la gélose à l'aide d'une anse de platine, une goutte contenant des cellules algales (in BECHAGRA.A *et al*, 1997).

Un premier développement apparaît. On prélève à nouveau quelques cellules qu'on étale sur une nouvelle boîte de pétri .L'opération peut-être reproduite plusieurs fois (AUDINEAU et coll, 1986), en choisissant parmi les colonies qui se développent celles qui correspondent à la micro algue recherché (LE BORGNE, 1986), jusqu'à l'obtention d'un développement d'algues monospécifique(AUDINEAU et coll,1986).

Exemple :

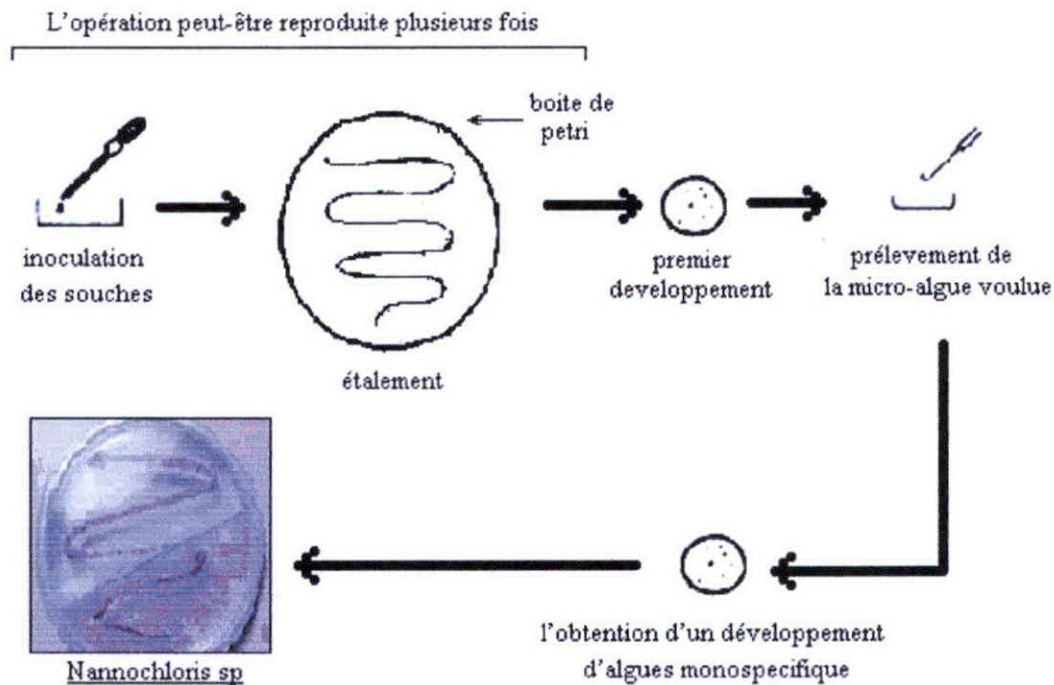


Fig 2: Technique d'isolement en milieu solide sur plat d'agar

### 1.3) Isolement par dilution :

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

### 2) Stérilisation :

Lorsque les cultures uni algales sont développées, on cherche ensuite à éliminer des bactéries pour rendre les cultures axéniques, on dispose pour cela de plusieurs méthodes.

On utilise généralement trois types d'antibiotiques qui permettent de découvrir tout les spectre bactérien.

La pénicilline agit sur les Gram+

La streptomycine agit sur les Gram<sup>-</sup>

Le chloramphénicol agit sur les deux.

Solution préparée à partir de certains antibiotiques :

Penicilline sulfate	5mg/ml
Streptomycine	1,6mg/ml
Chloramphénicol	0,2mg/ml

La technique consiste à préparer 10ml d'une solution d'antibiotiques que l'on filtre à 0,3 $\mu$ .

On verse 6ml de culture dans six tubes numérotés. Dans le premier on ajoute 6ml de la solution d'antibiotique, dans le deuxième 6ml provenant du tube n°1 (culture +antibiotiques), et ainsi de suite ...

On ajoute une goutte de milieu organique E6 (voir annexe II) pour augmenter l'efficacité de la pénicilline.

On laisse incuber 24 heures à 18°C pour vérifier la stérilité de chaque tube avec le milieu E6 : on ajoute une goutte de chacun des tubes de culture traités dans d'autres tubes contenant du milieu E6.

Les tubes qui deviennent opaques après quelques jours d'incubation sont ceux qui n'ont pas été décontaminés.

REMARQUE : La stérilisation par antibiotique ne doit s'utiliser que de façon ponctuelle afin d'éviter toute forme de résistance au niveau bactérien (AUDINEAU et COL, 1986).

### 3) Entretien des souches :

#### 3.1) principe :

Les souches doivent être repiquées tous les quinze jours afin de les maintenir en bonne condition. Cette durée entre chaque repiquage est idéale pour conserver des cellules jeunes avec un bon potentiel de multiplication. Le repiquage consiste à dédoubler une souche mère



#### **4) Mise en route d'une culture**

##### **4.1) Culture mono-spécifique en petit volume :**

La culture mono-spécifique de phytoplancton en petits volumes est utilisée pour la production intensive de larves d'invertébrés ou de vertèbres marins. Cette méthode a été créée afin d'atteindre une production élevée sur une surface limitée, ce qui demande une programmation très précise.

Les nombreuses recherches effectuées ont abouti progressivement à la simplification des méthodes de culture, à une plus grande diversification des souches d'algues utilisées, et surtout à un meilleur choix des espèces d'algue cultivées en fonction des conditions d'élevage et des exigences spécifiques vis-à-vis des valeurs nutritives.

##### **4.2) Locaux et équipement :**

Les cultures de phytoplancton sont effectuées en laboratoire ou dans des locaux spécialement aménagés, disposant d'un conditionnement d'air qui maintient une température ambiante constante.

##### **4.3) Description des différents locaux :**

###### **- Salle de repiquage :**

C'est le local où sont effectués tous les repiquages des cultures réalisées en conditions stériles (voir annexe III).

Il faut ici rappeler qu'on ne peut parler d'une stérilisation, dans le vrai sens du terme (destruction totale de la population microbienne) mais plutôt d'une "désinfection préventive" (réduction de la charge microbienne). En effet, il est fréquent de ne pas opérer dans des locaux stériles (de petites dimensions 3-5m<sup>2</sup> et équipés de lampes U.V.) ; dans quel cas on utilise une source de chaleur (bec bunsen) pour désinfecter le matériel utilisé tout en respectant une hygiène maximale et des méthodes correctes de travail (Voir annexe V).

- Laboratoire :

C'est le local où sont effectués tous les contrôles qualitatifs et quantitatifs sur les cultures en cours. Il sera donc équipé principalement d'un microscope, outre un plan de travail commode et un évier. Cette même pièce pourra contenir également un autoclave pour la stérilisation de la verrerie, l'étuve (jusqu'à 250°C), un frigidaire pour la conservation du milieu de culture (vitamines) et une armoire pour la verrerie.

- Salle de culture :

Les dimensions de la salle seront proportionnelles à la production désirée, et comme il a déjà été écrit, l'air devra y être conditionné (20-22°C).

D'autre part, on trouvera les étagères, généralement en verre, sur lesquelles sont placés les erlens et ballons contenant les cultures stériles et éclairées au moyen de lampes au néon. Ces lampes sont disposées de telle manière que les cultures soient exposées à des intensités lumineuses d'environ 3000 lux. Les cultures du stade successif sont prévues dans des sacs en polyéthylène soutenus par une structure adéquate, et également éclairés par des lampes au néon.

D'autre part, il faut y prévoir les circuits d'approvisionnement en eau et en air enrichi d'anhydride carbonique (CO<sub>2</sub>). L'eau de mer utilisée pour les cultures est préalablement traitée au moyen d'une filtration sur une séquence de cartouches (10,5 et 1µm) et d'une stérilisation par lampes U.V. il est souvent nécessaire d'équiper l'ensemble d'une petite pompe pour augmenter la pression dans le circuit d'eau.

L'air fourni aux cultures devra être enrichi de CO<sub>2</sub> (2% environ) servant à l'activité de photosynthèse du phytoplancton. Le flux d'anhydride carbonique, provenant d'une bombonne, règle au moyen d'un pressostat, devra confluer dans le circuit de distribution de l'air. Le CO<sub>2</sub> doit être mélangé à l'air avant d'arriver dans les cultures. Il faut prévoir, au niveau du circuit et en amont des cultures, un récipient de mélange, par turbulence, de l'air et le CO<sub>2</sub>. En effet, ce dernier étant plus lourd que l'air, il pourrait passer dans le circuit sans se mélanger correctement à l'air en faussant ainsi les dosages. Du circuit principal, l'air sera distribué aux ballons et sacs de culture au moyen de tuyaux en plastique.

- Terrain de culture :

La production de phytoplancton est basée sur l'induction artificielle des conditions eutrophiques qui entraîne un développement rapide, "bloom" de la population algale. Dans ce but, on a expérimenté et individualisé différents types de culture souvent spécifiques pour les différentes espèces élevées.

Dans un secteur de production, le terrain de culture choisi doit répondre à deux conditions ;

- a) avoir une composition simple,
- b) permettre la croissance des différentes souches algales (le même milieu ou avec de très faibles différences pour toutes les algues utilisées).

**4.4) Méthodes d'utilisation :**

La culture mono spécifique divisée en deux phases principales :

**a)- volumes de cultures qualitatifs :**

- petits volumes (éprouvettes et erlen meyer)... (2à3 espèces généralement).
  - Garantissent la disponibilité régulière en souches pures.
- But : conserver les souches des cultures monospécifiques.

**b)- volumes de culture quantitatifs :**

- volume supérieur à l'erlenmyer (de 2 à 60L)
- croissance rapide et progressive

\*les souches : la diversification est toujours une sécurité contre la chute brutale des cultures (2 à 3 espèces).

**Exemple :**

Dunaliella tertiolecta

Chlorella sp

Monochrysis lutheri

**conditions d'élevage :**

- ces conditions se réfèrent aux 3 espèces préalablement citées.
- La t° aux alentours de 20°C et l'illumination de 500 à 1000lux.
- Le repiquage des souches se fait tous les 20 à 30 jours en tenant compte de l'état de maturité de celle-ci.

**Exemple :**

Méthode pour le repiquage des souches (éprouvettes et erlenmeyer) :

**a)- matériel :**

- chambre stérile.
- Erlenmeyer, erlenmeyer préalablement rempli d'eau de mer et mis en autoclave et laisser refroidir.
- Pipettes et coton hydrophobe passés à l'étuve.
- Sur la table : porte pipettes, bunsen, les solutions du milieu de culture papier aluminium.

**b)- procédure :**

- déboucher l'éprouvette contenant l'algue et celle contenant l'eau de mer autoclavée.
- Passer les bords à la flamme du bunsen.
- Essuyer l'eau qui s'y trouve.
- Désinfecter.
- Ouvrir avec le papier aluminium passé à la flamme et laisser refroidir.
- Mettre les solutions fertilisantes à partir de la solution préparée.

Prélever :

- 1/10ml éprouvette → éprouvette.
- 1ml éprouvette → erlenmeyer.
- 1ml erlenmeyer → Erlenmeyer.

- Repasser le col à la flamme du bunsen :

- Refermer avec papier d'aluminium ou coton
- écrire la date et l'espèce.
- agiter régulièrement pendant le stockage.

**c)- remarque :**

- les souches doivent être maintenues en 3 exemplaires de chaque espèce et de même date.

- Il faudra conserver au moins une de ces 3 éprouvettes après repiquage.

**culture intensive :**

- ballons de 2 à 5L, sacs en polyéthylène de (20 à 60L).
- $T^{\circ} = 20^{\circ}\text{C}$ .
- L'intensité lumineuse (3000 et 6000 lux) pour les sacs de (25 à 60L).
- Oxygénation : mélange  $\text{CO}_2$  et air.
- La densité algale par ml se calcule en utilisant une cellule hémocytomètre.

Les ballons de 5L sont utilisés pour inoculer les volumes de 25 à 60L.

**a)- fertilisation et inoculation des ballons :**

**matériel :**

- dans la chambre stérile.
- Ballons préalablement d'eau de mer placée en autoclave.
- Porte pipette, bunsen, les solutions, papier d'aluminium.

**procédure :**

- décoller le papier aluminium et le coton.
- Stériliser à l'aide la flamme le pourtour et l'entrée du col.
- Couvrir l'ouverture des ballons par aluminium passer à la flamme.
- Fertiliser les ballons en utilisant 1ml de chaque solution par litre d'eau de mer.
- Diviser le volume d'algue dans ces ballons.
- Passer le bunsen sur le col des ballons.
- Refermer avec du coton.
- Ecrire la date et l'espèce.
- Porter les ballons dans la chambre de culture.
- Introduire le mélange air +  $\text{CO}_2$ .

**b)- fertilisation et inoculation des sacs :**

- stérilisation avec rayon U.V
- remplir les sacs avec l'eau quelques heures au par avant pour permettre à l'eau d'atteindre la température ambiante.
- Fertilisation : 1ml de chaque solution par litre d'eau de mer.
- Inoculer à partir d'un ballon.



A chaque nouvelle duplication de la souche (A') correspond a une nouvelle ligne productive (B') qui provient ainsi d'une culture maintenue en condition optimales\*

- chaque volume utilisé doit être à son tour dupliqué\*

##### **5) Maintien d'une 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 limitants, les organismes meurent d'où la nécessité de repiquer la culture dans un milieu neuf pour en assurer la survie in (HADJADJI .N *et al*, 2002).

Une culture en continu n'est possible que si le milieu n'est pas contaminé.

Pour cela les étapes précédentes auront été effectuées de façon la plus axénique possible. En général le maintien en culture continue ne dépasse pas trois semaines : au-delà des problèmes apparaissent soit de contamination, soit de vieillissement des cellules.

La culture en continu consiste à maintenir des algues jeunes à une concentration importante, c'est-à-dire de prélever chaque jour le quart de la culture (AUDINEAU et coll, 1986) et la remplacer par une quantité équivalente d'eau enrichie en élément nutritifs ce qui maintient un état d'équilibre (BARNABE, 1991). L'intérêt de la culture en continue est d'avoir à disposition :

- Des algues jeunes à fortes concentrations, pour l'ensemencement
- Des volumes plus importants (AUDINEAU et coll, 1986).

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 *Chemostat* qui utilise un flux constant du milieu dans lequel un élément limitant joue le rôle de régulateur. (DE BILLY, 1978).

## Contrôle de la croissance :

La croissance d'une culture est généralement exprimée comme l'augmentation d'une biomasse, d'un nombre de cellule ou d'un taux de chlorophylle par unité de temps (in BECHAGRA.A *et al*, 1997)

Il est utile, voir indispensable de contrôler régulièrement le développement algal afin de déterminer leur stade ou leur état physiologique, ce qui revient à déterminer la quantité des micro algues, il existe pour cela plusieurs moyens d'évaluation quantitative des cellules dans la culture.

### **Méthodes :**

Les méthodes d'évaluation de croissance peuvent être regroupées :

- **En méthodes directes :**

\*Par comptage ou numération au compteur de particules au microscope à l'aide d'une cellule de comptage (Hématocytomètre).

\*Par mesure de leur volume cellulaire après centrifugation, 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).

\*Par mesure du poids sec après centrifugation ou filtration d'un volume important, on peut sécher l'échantillon à l'étuve ou au four puis peser son poids sec c'est une mesure précise pour comparer les cultures entre-elles (M.FIALA, 1979), mais le processus est long et ne permet pas un diagnostic rapide (JACQUE, 1978).

- **En méthodes indirectes :**

\*Par mesure de la densité optique (Do), soit par mesure de la turbidité par photométrie ou de la chlorophylle par un spectrophotomètre (M.FIALA, 1979): 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).

\*Par mesure: des pigments, protéines, (ATP, CARBONE, Azote, etc....).

Il est souvent nécessaire de connaître les variations du nombre de cellules. Ces numérations nécessitent des cellules ou des chambres de comptage. Plusieurs types de celles ci existent, chacune d'elles fournissant une précision optimale pour une taille de cellule et une concentration donnée (FIALA-1978, AUDINEAU et coll,1986). (Voir tableau4)

**Tableau 4 :** Caractéristiques des principales cellules et cambres de comptage

Type de cellule	Dimensions du quadrillage Lx1xP (mm)	Volume (ml)
Thoma	1x1x0,1	$10^{-4}$
Agasse Lafont	1x1x0,1	$10^{-4}$
Neubauer et Neubauer modifié	3x3x0,1	$9.10^{-4}$
Mallassez	2,5x2x0,2	$10^{-3}$
Fushs Rosenthal	4x4x0,2	$32.10^{-4}$
Agasse Lafont B	5x4x0,5	$10^{-2}$
Lemaur	10x10x0,4	$4.10^{-2}$
Nageotte	10x10x0,5	$5.10^{-2}$
<b>Chambres</b>		
Palmer Maloney	$\Phi$ 17,9x0,4	$10^{-1}$
Sedgwich Rafter	50x20x1	1

Le comptage s'effectue sous le microscope à l'aide d'une cellule de profondeur connue et dont le quadrillage défini donne un volume déterminé.

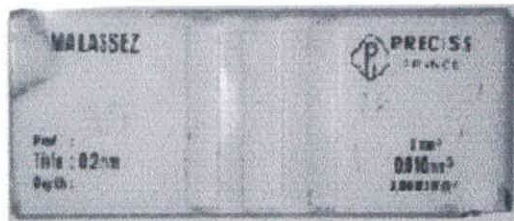
**Exemple :** Comptage avec cellule de Malassez

- Mode opératoire :

La méthode de comptage cellulaire sous microscope inverse à l'aide d'une cellule de Malassez s'effectue quotidiennement, prélevant une goutte de la culture algale à l'aide d'une pipette pasteur, stérilisée puis déposée sur la cellule de Malassez. Les espèces mobiles sont alors fixés par une goutte de glycérol (BECHAGRA.A *et al*, 1997), ou tuées avec du formol à 10% à la dose de 2 à 3 gouttes pour 20ml de culture cette préparation n'est pas nécessaire pour les algues statiques(diatomées)(AUDINEAU et coll,1986), une lamelle est déposées sur l'ensemble en évitant la formation des bulles d'air (BECHAGRA.A *et al*,1997).

Pour réaliser le remplissage de la cellule, il faut :

- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle
- Déposer la lamelle sur les rebords, celle-ci doit adhérer par un "effet ventouses"
- Placer l'extrémité de la pipette sur la partie 2 contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles.



- Longueur = 0,25 mm
- Largeur = 0,20 mm
- Profondeur = 0,20 mm

Le volume total de la cellule est de 1 mm<sup>3</sup> (2,5 x 2 x 0,20)

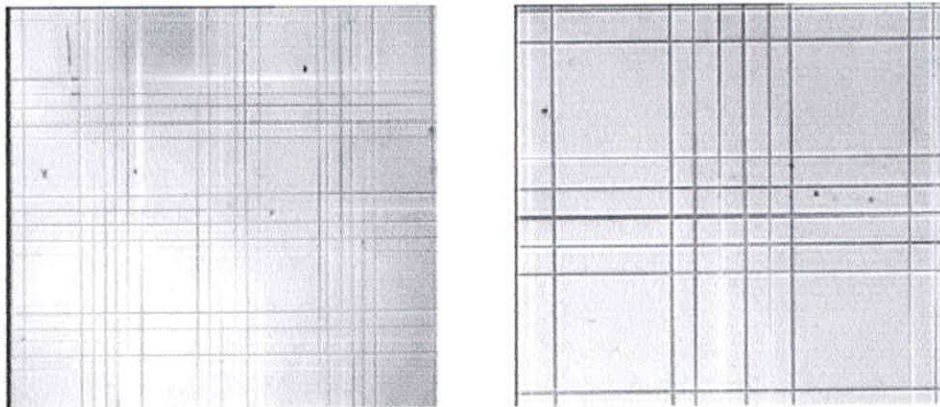


Fig4: Cellule de Malassez

La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont :  
Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales de 0,25 mm de large et de 10 bandes horizontales de 0,20 mm de large formant ainsi 100 rectangles

<http://www.ac-limoges.fr/svt/IMG/rtf/doc-12>

- Principe de comptage :

Les cellules comptées sont localisées dans les vingt petits carrés, l'opération est répétée dix fois sur les deux lignes médianes soit dix comptages.

Le nombre total de cellules ainsi dénombré est divisé par dix pour obtenir le nombre moyen dans chaque grille de vingt petits carrés.

La valeur obtenue est multipliée par 25, ceci correspond au nombre total de cellules contenues dans tout le volume de la cellule de Malassez soit 1000µl. Finalement le nombre est rapporté au millilitre en multipliant par 1000 (BECHAGRA.A *et al*, 1997).

**La récolte :**

La récolte se fait à un moment précis de la croissance, en fin de phase exponentielle ou les microalgues sont petites et riches en protéines (in BECHAGRA.A *et al*, 1997)) afin d'assurer aux consommateurs un aliment étant à son optimum physiologique et assurant un meilleur facteur de conversion

### **Les différentes méthodes de collecte :**

#### **a- La centrifugation :**

Il est important de savoir que toutes les cellules algales peuvent être centrifugées. Centrifugation varient de 2 à 6000 tours par minute pour un débit d'un m<sup>3</sup>/heure(AUDINEAU et coll,1986).Basée sur la légère différence de densité entre les algues et le milieu liquide, elle permet d'extraire 80 à 90% de ces végétaux, en 2 à 5 min,(BARNABE, 1986).Par exemple 100 litres de tetraselmis suecica a une concentration de deux millions de cellules par ml permettent d'obtenir ,après centrifugation ,100g de pâte humide et, après passage a l'étuve a 60 C pendant quatre jours , 36g de matière sèche(AUDINEAU et coll,1986).

Elle a comme avantage de maintenir le matériel vivant de facilite et rapidité d'utilisation.

Inconvénients : Elle est difficile pour certaines espèces, elle peut provoquer l'éclatement de certains organismes.

#### **b- L'ultrafiltration:**

D'après GILBERT BARNABE, 1986.

L'ultrafiltration sur séparateur à membrane est une solution sans doute efficace, mais actuellement plus coûteuse que la centrifugation.

#### **c- Le micro tamisage :**

Le micro tamisage proposé depuis longtemps par plusieurs auteurs, compte tenu des grandes quantités de liquide que l'on peut traiter à faible coût,n'apporte pas une réponse vraiment satisfaisante.

**d- La sédimentation :**

On note une très bonne reproductibilité et une préparation facile des échantillons (in MEKKID.A et YAHIA-CHEIKH, 1994)

**e- La coagulation- floculation :**

Les "flocs"d'algues qui se constituent au sein du milieu liquide sous l'action des additifs comme le sulfate d'aluminium, le chlorure ferrique, la chaux et certains polyélectrolytes ,peuvent être amenés à la surface par les techniques de flottation ou décantés dans un décanteur traditionnel.

La "farine" utilisable en alimentation animale d'algues ainsi obtenue est utilisable en alimentation animale (BERNABE, 1991).

**f- Filtre à pré-couche :**

Ils sont utilisés pour filtrer les levures. La pré-couche est engendré par la mise en rotation rapide du tamis et la filtration d'une solution d'amidon à 2% au débit de 0,6 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/h, pendant une heure. Une pré-couche de 2cm d'épaisseur est ainsi constituée. La culture est alors filtrée et une lame décolle les algues à la surface de la pré couche. Selon Mohn (1980), ce filtre serait le seul qui permettrait la collecte des *Snedesmus* à l'échelle technique.

**g- Filtre à papier :**

Il s'agit d'une extrapolation des filtres à membrane de laboratoire.

**Conclusion :**

La culture des micro algues est une procédure complexe et coûteuse aussi a-t-il été envisagé de les collecter dans le milieu naturel où elles sont parfois très abondantes. Les milieux les plus productifs sont, sans conteste, les systèmes d'épuration des eaux usées par lagunage où leur production varie, suivant la latitude, de quelques tonnes à 150 tonnes (poids sec)/ha/an, ce qui correspond à des densités de plusieurs millions de cellules/ml.

Elles constituent dans ces systèmes un sous-produit gratuit de l'épuration des eaux usées domestiques. On considère que leur abondance est due à l'action combinée de la richesse des eaux en substances minérales et organiques (issues de la transformation par la faune bactérienne des matières organiques des eaux usées) et de la pénétration de l'énergie solaire dans ces étangs peu profonds (1 à 1,5m) qui favorisent la photosynthèse (BARNABE, 1986).

Ces approches différentes montrent cependant que l'évolution des procédures est en train de bouleverser les perspectives de la culture des micro algues, ce ne sont pas les seules : (WONG et coll., 1972), ont montré que les eaux usées diluées et stérilisées pouvaient se révéler plus efficaces que les solutions de sels minéraux et de vitamines les plus complexes (milieu de Conway par exemple). De (Pauw et Leenheer., 1985) ont aussi constaté que de petites additions (0,1%) de fertilisant organique (lisier de porc) aux engrais inorganiques (de type engrais agricoles) augmentaient la production algale de 20%. Les mélanges complexes de sels nutritifs peuvent aussi être remplacés sans inconvénient par des engrais agricoles parfois plus performants et qui coûtent 100 fois moins cher (GONZALEZ-RODRIGUEZ et MAESTRINI, 1984). L'utilisation directe de déchets organiques par les micro algues (les *Nannochloris* sont par exemple avides d' $\text{NH}_4$ ) leur a ouvert depuis longtemps un très vaste domaine d'application, celui de l'épuration des eaux usées, qui n'est pas sans relations avec l'aquaculture.

## **Bibliographie :**

**AUDINEAU.P., et BLANCHETON. J., (1986).** Production d'algues unicellulaires.

IFREMER., Equipe MERE.A., Station : DEVA-SUD, P : 1-19

**BABAADDOUN. A., (1998).** Essais de culture de Spirulina sp sur des milieux naturels

**BECHAGRA. A et al., (1997).** Culture de micro-algues. Mémoire d'études universitaire appliquées (D.E.U.A) en aquaculture I.S.M.A.L.

**BARNABE .G, (1986) .** Aquaculture-TOME 1; P: 181-192- Ed. Lavoisier.

**BARNABE .G, (1991) .** Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture – Ed Lavoisier Tec et Doc.

**BOURELLY. P, (1972)-** Les algues d'eau douce. Algues vertes, jaunes et brunes-

Ed.N.boubee

Tome : II, III

**DAOUD. N., SOUALEM. N., (1989) :-** Essai de culture et de mise au point de techniques de conservation de proie vivante pour poisson cas de la Daphnie (Daphina magna) Mémoire ITPA.

**DE BILLY, G., 1978.** Culture en continu in, **JACQUES, G.,** Phytoplancton ; biomasse, production, numération et culture. Ed. Du castillet : 90-91

**FERNANDEZ, REIRIZ, M.J., PEREZ- CAMACHO, A., FERREIRO, M.J., BLANCO, J., PLANAS, M., CAMPOS, M.J. et LABARATA, U., 1989.** Biomasse production and variation in the biochemical profile (Totale protein, Carbohydrates, RNA, Lipids, and Fatty Acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture. 83 :17-37

**FIALA.M., (1978) : -** Culture d'algues. IN : Phytoplancton : Biomasse, production, numération et culture. Ed du castillet : 77-97

**GAYRAL. P., (1975)** : Les algues : morphologie, cytologie, reproduction et écologie. Ed Doin Paris VI : 165 p

**GUEROUL S., TOUAZI D., (2003)** .Thèse : Essai de culture de quelques espèces de micro algues et d'élevage de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) (L.M.K) en milieu fermé P 15.

**HADJADJI .N, et al (2002)**. Essai de culture de chlorella sp dans différents milieux de culture. Mémoire I.S.M.A.L. en aquaculture

**HELM, M.M., LAING,L et JONES,E.,1979**. The development of a 200 L alga culture vessel at Conway.Fish.Res.Techn.Rep., 53 :1-12

**JACQUES, G., 1978**. Phytoplancton ; biomasse, production, numération et culture Ed. Du castillet : 21-38

**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

**LE BORGNE, Y., 1986**. La culture des micro-algues in, **BARNABE, G.,** Aquaculture. TEC& DOC-Lavoisier.1 :181-192

**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

**MEKKID.A. et YAHIA-CHEIKH. I. Z., (1994)**. La culture des micro-algues Mémoire d'études universitaires appliquées (D.E.U.A) en aquaculture I.S.M.A.L.

**NEVEUX, J.,1978**. Biomasse in, **JACQUES, G.,** Phytoplancton ; biomasse, production, numération et culture. Ed. Du castillet : 21-38

**PRESCOTT .G.W., (1969):** - The algae: Areview Riverside studies in biology P375-381.

**PROVASOLI L., McLaughlin J.J .A . , et Droop M.R., (1957) :** The development of artificial media for marine algal. Arch. Microbiol.25 :392-428.

**SOEDER C.J., 1974.** Algal culture appendix 6 IN = A manual of methods for easuring primary production in aquatic environments second édition Richard.A

VOLLENWEIDER P : 178-195.

**TASSIGNY.M., (1968) :** Nourriture vivante pour poisson d'aquarium IV.Plancton et rotifères centre de recherches hydro biologiques du C.N.R.S GIF-Yvette IN : la pisciculture française aquariophilie N 16 4eme trimestre.

**TASSIGNY. M., (1968) :** Culture des algues IN : L'élevage des Daphnies pour l'alimentation des poisson d'ornement Bulletin SOC.NAT d'acclin de France P : 127-129.

**THEPENIER C., GUDIN C., (1989) :** La percée des micro algues avec quelles technologies de culture et pour quels produits ? IN : Equinoxe n°27 P. 16-23

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

**ZARROUK C. (1966).** Contribution à l'étude d'une Cyanophycées influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler  
Thèse présentée a la faculté des sciences de l'université de Paris.

<http://www.ac-limoges.fr/svt/IMG/rtf/doc-12>

<http://www.milian.com/catalog/chaps/02/0084-01.en.shtml>

<http://www.milian.com/catalog/chaps/02/0084-01.en.shtml>

**Document anonyme I.S.M.A.L**

## **Annexes :**

**Annexes I :****1) Milieu de warburg pour chlorella (warburg, 1919). D'après Venkataraman G.S 1969**

Nitrate de calcium	(Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	1,00 g/l
Nitrate de potassium	(KNO <sub>3</sub> )	0,25 g/l
Chlorure de sodium	(NaCl)	0,15 g/l
Phosphate dipotassique	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,20 g/l
Sulfate de magnésium	(MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	0,50 g/l
Sulfate de fer	(FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,20 g/l
Citrate de sodium	(Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,04 g/l
Eau distillée	-	1000 ml

**2) Milieu de Kolkwitz (Kolkwitz, 1922). D'après Venkataraman G.S, 1969**

Nitrate de potassium	(KNO <sub>3</sub> )	0,57 g/l
Sulfate de calcium	(CaSO <sub>4</sub> )	0,20 g/l
Phosphate dipotassique	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,14 g/l
Sulfate de magnésium	(MgSO <sub>4</sub> )	0,09 g/l
Chlorure de fer	(FeCl <sub>3</sub> )	0,003 g/l
Eau distillée	-	1000 ml

**3) Milieu de lefèvre (lefèvre, 1937) d'après Tassigny.M,1968**

Phosphate dipotassique	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	40 mg/l
Sulfate de magnésium	(MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	30 mg/l
Nitrate de calcium	(CaNO <sub>3</sub> )	100 mg/l
Nitrate de potassium	(KNO <sub>3</sub> )	100 mg/l
Eau distillée	-	1000 ml

Extrait liquide obtenu par ébullition de sphaignes : 20 ml/l

Extrait liquide obtenu par ébullition de terre : 40 ml/l

**4) Milieu de Graig et Telease (Graig et Telease, 1937) d'après Prescott G.W, 1969**

Nitrate de potassium	(KNO <sub>3</sub> )	07,60 g/l
Sulfate de magnésium	(MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	14,80 g/l
Phosphate dipotassique	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	07,40 g/l
Sulfate de fer	(FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	08,00 g/l
Solution d'élément mineur *	-	10,00 ml
Eau distillée	-	1000 ml

\* Elle contient par litre :

100 mg de sulfate de zinc (Zn SO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O)

100 mg d'acide borrique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)

150 mg de sulfate de Manganèse (MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O)

3 mg de sulfate de cuivre (CUSO<sub>4</sub>)

Pour son utilisation : une partie de la solution concentrée est diluée avec 2 parties d'eau distillée.

**5) Milieu de Chu (Chu, 1942) solution nutritive numéro 12. D'après Soeder C.J, 1974**

Eau distillée	-	1000 ml
Nitrate de calcium	(Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	30,00 mg/l
Phosphate dipotassique	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	05,00 mg/l
Sulfate de magnésium	(MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	75,00 mg/l
Silicate de dipotassique	(K <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> )	25,00 mg/l
Chlorure de potassium	(K Cl)	05,00 mg/l
Carbonate disodique	(Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	20,00 mg/l
Chlorure de fer	(FeCl.6H <sub>2</sub> O)	00,50 mg/l

1 ml de solution d'élément trace.

**6) Milieu de Meyer (Meyer, 1947) d'après Venkataraman G.S, 1969**

Nitrate de potassium	(KNO <sub>3</sub> )	1,21 g/l
Sulfate de magnésium	(MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	2,46 g/l
Phosphate dipotassique	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,23 g/l
Sulfate de fer	(Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> )	0,052 g/l
Citrate de sodium	(Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,195 g/l
Eau distillée	-	1000 ml

**7) Milieu de Gerloff, Fitzgerald et Skoog (Gerloff, Fitzgerald et Skoog, 1950) pour algues et vertes. D'après Prescott G.W, 1969**

Chlorure de calcium	(CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,0359 g/l
Acide Citrique	-	0,0030 g/l
Citrate ferrique	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Fe, 3H <sub>2</sub> O)	0,0030 g/l
Chlorure de potassium	(K Cl)	0,0086 g/l
Chlorure de magnésium	(MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0,0209 g/l
Carbonate de sodium	(NaCO <sub>3</sub> )	0,0200 g/l
Nitrate de sodium	(NaNO <sub>3</sub> )	0,0413 g/l
Phosphate de sodium	(Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,0820 g/l
Silicate disodique	(Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> )	0,2500 g/l
Sulfate de sodium	(Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,0146 g/l

**8) Milieu de Walne (Walne, 1956) d'après Daoud N, Soualem.N, 1989**

Eau distillée	-	1000 ml
Dihydrogenophosphate de sodium	(Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O)	5,000 mg/l
Chlorure de Manganèse	(MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O)	0,400 mg/l
Sulfate de fer	(Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O)	0,300 mg/l
Nitrate de sodium	(NaNO <sub>3</sub> )	30,00 mg/l

### 9) Milieu de Provasoli (Provasoli, 1968) d'après Daoud N, Soualem.N, 1989

Eau distillée	-	1000 ml
Nitrate de butane	(C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	5000 mg/l
Nitrate de sodium	(NaNO <sub>3</sub> )	3500 mg/l
Na-glycerophosphate	-	500 mg/l
Thiamine	-	5,00 mg/l
Vitamine B <sub>12</sub>	-	0,1 mg/l

A ces composés sont ajoutés 50 micro g de biotine et deux solutions A et B.

**Solution A :** Dans 1 litre d'eau distillée sont dissous les produits suivants :

Acide borique	(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	1140,00 mg
Edetate de sodium	(NaEDTA)	1000,00 mg
Sulfate de manganèse	(MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O)	164,00 mg
Chlorure de fer	(FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O)	49,00 mg
Sulfate de zinc	(ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	4,800 mg

**Solution B :** Dans 500 ml d'eau distillée sont dissous :

Sulfate de fer ammoniacal	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	351,00 mg
EDTA disodique	(Na <sub>2</sub> -EDTA)	330,00 mg

EDTA : Acide éthylène dinitrilo-tétraacétique (acide édétique).

### 10) Le milieu de Zarrouk :

Il est composé de trois solutions A9, A5 qui est la suivante :

A9	(g/l)	A9 (suite)	(g/l)
NaHCO <sub>3</sub> :	16	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O :	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	0,5	CaCL <sub>2</sub> :	0,04
Na NO <sub>4</sub> :	2,5	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O :	0.01
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	1,0	EDTA :	0,08
Na CL :	1,0		

On rajoute 1ml de chacune des solutions A5 et A6 a 1L de solution A9

A5 :	(g/l)	A6 :	(g/l)
H3 BO4 :	2,86	K2Cr(SO4).24H2O :	960.10-4
MnCL2.4H2O :	1,8	Ni SO4.7H2O :	477.10-4
ZnSO4.7H2O :	0,22	Ti (SO4)3 :	400.10-4
Cu SO4.5H2O :	0,08	NH4VO3 :	229.10-4
MoO3 :	0,01	Na2wo4 :	179.10-4
		CO (NO3).6H2O :	44.10-4

### 11) Le milieu d'AGRISPON in BABAADDOUN., (1998).

#### Sa Composition chimique

##### 1- Eléments minéraux :

##### Eléments inorganiques (m/l).

Potassium (K)	2200	Cuivre (Cu)	2,3
Chlore (CL)	700	Manganèse (Mn)	0,4
Nitrate (NO3)	700	Sélénium (Se)	0,295
Sodium (Na)	209	Nickel (Ni)	0,288
Sulfate (SO4)	100	Cobalt (Co)	0,057
Silicium (SiO2)	72	Antinomie (Sb)	0,036
Bore (B)	60	Chrome (Cr)	0,0204
Aluminium (Al)	26	Baryum (Ba)	0,0200
Fer (Fe)	23	Zinc (Zn)	0,0120
Magnesium (Mg)	7,2	Argent (Ag)	0,005
Phosphore (P)	5,0	Molybdène (Mo)	traces.
Calcium (Ca)	4,0		

##### 2- Composés organiques : (~ 130 mg/l)

- acides nucléiques (15,5µg ARN et 12,2 µg ADN)
- glycosides
- porphyrines
- morphogènes
- vitamines A 220 UI vit/l.

##### 3- Eau : 98%.

**Annexe II :****Milieu de culture bactérien E6 pour vérifier la stérilité des tubes :**

KNO <sub>3</sub>	0.050 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.005 g
Extrait de foie	0.250 g
Bacto tryptone	0.250 g
Glucose	0.250 g
Extrait de sol concentré	2.5 ml
Eau distillée	500 ml
Eau de mer filtrée	500 ml

Filtrer le milieu sur papier plissé. Répartir 10 ml par tube.

Passer à l'autoclave 10 minutes.

**Annexe III :**

Propreté et désinfection du matériel utilisé dans le secteur production d'aliment vivant

La production massive d'organismes tels que les algues, les rotifères... exige des conditions drastiques de propreté et d'hygiène dans le secteur de production. Nous décrivons ci-dessous les principales opérations à réaliser pour maintenir des conditions optimum d'élevage.

**Lavage normal de la verrerie**

- rincer à l'eau chaude toute verrerie immédiatement après l'usage,
- laisser tremper dans une solution de NaClO à 500 ppm,
- rincer abondamment avec de l'eau du robinet,
- rincer avec de l'eau déionisée (si disponible),
- sécher la verrerie dans une étuve.

**Désinfection et stérilisation**

La désinfection a pour but de réduire le nombre de bactéries, champignons... à un niveau arbitraire jugé suffisant.

La stérilisation, quant à elle, assure l'inactivation totale de toute la vie microbienne

**1 – la désinfection peut se faire à l'aide de :**

a) NaClO (hypochlorite de sodium = eau de javel) en solution 500 ppm, elle est la méthode la plus communément utilisée.

Désinfecter les surfaces de travail, verrerie... etc.

Ne pas oublier que l'eau de javel corrode le métal, et étant mis en présence de rayons U.V., libère du Cl<sub>2</sub> gazeux très toxique.

**b) alcool éthylique**

Utilisé pour désinfecter les surfaces délicates ou les mains.

## 2 – la stérilisation peut se faire :

### a) en autoclave

Stérilisation par vapeur à une température de 100 à 120°C et une pression de 1 atmosphère.

Lorsqu'on ne peut pas disposer d'un autoclave, on peut toujours utiliser une « casserole à pression ».

### b) l'étuve

La stérilisation se faisant à sec, demande une température plus élevée (160°C) et une durée plus importante (2 à 2 heures).

On limite donc son installation à un petit matériel (verrerie, coton hydrophobe...).

### c) flamme du bunzen

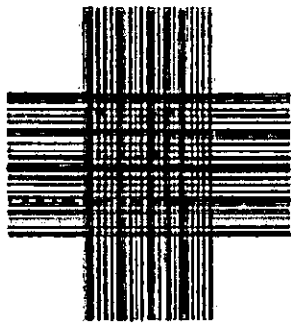
Stérilisation jusqu'à l'incandescence des pinces...

### d) rayons U.V.

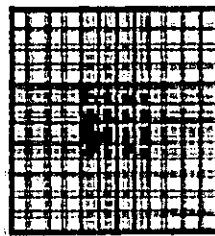
Ils sont utilisés pour la stérilisation de l'eau de mer, souvent à partir d'appareils construits par des sociétés spécialisées. On les emploie également pour la stérilisation de la chambre stérile.

Dans ce cas, on expose quelques heures la chambre aux rayons U.V. avant de faire les repiquages.

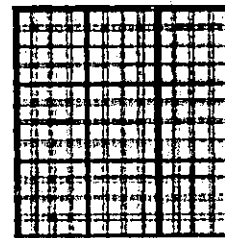
**Annexe IV :**



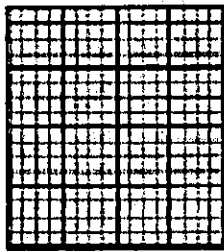
THOMA



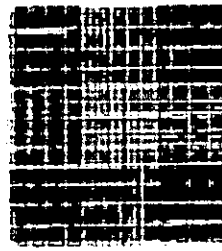
TÜRK



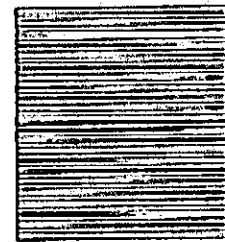
BÜRKER



FUCHS ROSENTHAL



NEUBAUER  
(improved bright lined)



NAGEOTTE

Quelques cellule de comptage

<http://www.miljan.com/catalog/chaps/02/0084-01.en.shtml>