



La culture de Phytoplancton

PLAN :

- I - Introduction.
- II - Choix des espèces
- III - Origine et traitement de l'eau
- IV - Salle d'algues
- V - Conditions de croissance optimale
- VI - Technique de culture
- VII- Protocole
- VIII - Evolution d'une culture de phytoplancton
- IX- Comptage
- X-Conclusion

OBJECTIFS :

BEP Travaux aquacole :

►capacités professionnels : C8 Réaliser les travaux liés à la conduite d'une production aquacole dans le respect des consignes des règles de sécurité et d'hygiène, du bien-être animal et dans le cadre de la réglementation environnementale.

- C8-2 Assurer les bonnes conditions d'élevage.
- C8-3 réaliser les opérations liées à la conduite de la production aquacole.



Bac professionnel Production aquacole

► **Module professionnel 63** Appropriation biologique et physico-chimique des pratiques aquacoles.

► **Module professionnel 64** technique de production aquacole

BTSA production Aquacole

► **M54 :Objectif3** Raisonner et mettre en œuvre les techniques nécessaires à la conduite du système de production.

3.3 Maîtrise du processus de production

PPAM ET BPREA Production aquacole

► **Ucare éclosionerie** : OTI Etre capable de produire des juvéniles de bivalves



1. Introduction

Le terme « phytoplancton » regroupe les organismes végétaux vivant sans attache directe avec le sol et passant une partie ou toute leur vie dans le milieu liquide. Ces végétaux flottent plus ou moins passivement dans le milieu.

Le phytoplancton constitue le point de départ du réseau trophique. Il est donc nécessaire d'en produire en écloserie pour l'alimentation de nombreuses espèces d'invertébrés, consommateurs primaires, tels que les larves et le jeune naissain de mollusques bivalves d'intérêt commerciale.

2- Choix des espèces

La sélection des espèces phytoplanctoniques cultivées est basée sur plusieurs critères :

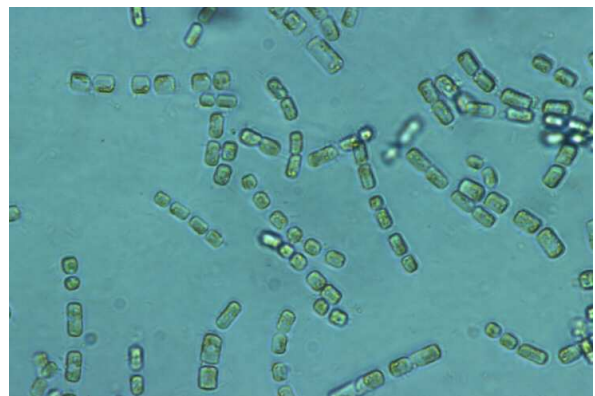
- les besoins des animaux élevés en écloserie,
- leur taille (adaptation à la bouche),
- leur mobilité et leur flottabilité
- leur qualité nutritionnelle
- leur facilité de culture

Trois espèces seront données pour exemple : *Skeletonema marinoi*, *T.Isochrysis aff. galbana* et *dunaliella tertiolecta*.

En ajoutant le *Chaetoceros gracillis* ou *calcitrans*, la culture de ces espèces permet de couvrir les besoins de l'ensemble des animaux phytoplanctonophages exploités en écloserie.

1. *Skeletonema marinoi*

Skeletonema marinoi est une **diatomée** (microalgue brune). C'est une algue unicellulaire entourée d'une enveloppe siliceuse (frustule) d'où l'intérêt d'ajouter de la silice dans le milieu nutritif. Elle a une forme cylindrique ou sphérique. Elle vit en colonie. Les cellules sont réunies par des prolongements siliceux. Cette espèce présente l'avantage de supporter de fortes variations de salinité. Les cellules ont une taille de l'ordre de **5 à 8 µm**. La culture de *Skeletonema marinoi* sert donc à nourrir les coquillages adultes (géniteurs) tels que les huîtres (*Crassostrea gigas*) et les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*). La concentration maximale en culture de *Skeletonema marinoi* est de **3 millions de cellules par millilitre**.



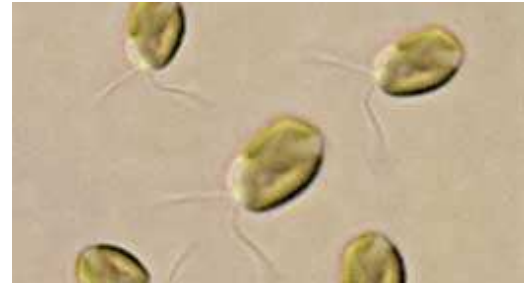


2. *T. Isochrysis*

T. Isochrysis fait partie de la famille des Haptophycées (microalgue brune).

Elle possède deux flagelles donc vit seule et peut se déplacer dans la masse d'eau. La cellule, de forme allongée, mesure **2 à 3 µm**.

T. Isochrysis est considérée comme une algue fourrage. Elle est utilisée à une concentration optimale de **17 millions de cellules par millilitre** au maximum. Elle permet de nourrir des larves de bivalves ; des géniteurs ou des proies vivantes d'où son utilisation en aquaculture.



3. *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta appartient à la famille des chlorophycées (microalgue verte). De forme ovoïde, la cellule mesure de **8 à 10 µm**.

La concentration optimale est de **2 millions de cellules par millilitre**. Elle sert essentiellement à la nutrition des larves d'oursins, des échinodermes. Sa grande taille n'est pas un obstacle pour l'alimentation des bivalves adultes mais est inadaptée aux larves de mollusques.



Tableau 1 : dosage de Conway et /ou de silice suivant l'espèce :

Espèces	Milieu de Conway (ml/litre)	Milieu de Silice (ml/litre)
<i>Skeletonemas marinoi</i>	1ml	1ml
<i>T. isochrysis</i>	1ml	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	1ml	
<i>Chaetoceros gracillis</i> ou <i>calcitrans</i> (culture en eau saumâtre 1/3 d'eau douce)	1ml	1ml



Tableau 2: composition en lipides de certaines espèces d'algues, couramment utilisées comme nourriture pour alimenter les larves et naissain de bivalves. Les espèces marquées d'un astérisque * sont relativement pauvres d'un point de vue valeur nutritive.

Espèces:	taille μm	Concentration maximale en culture 10^{-6} cells/ml	Lipides %
Flagellés:			
<i>Tetraselmis suecica</i>	8-10	2	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i> *	8-10	2	21
<i>Isochrysis galbana</i>	2-3	17	20-24
<i>Isochrysis (T-ISO)</i>			
<i>Pavlova lutherii</i>			
Diatomées:			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	4-5	5	17
<i>Chaetoceros gracilis</i>		9	19
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	12-40	5	24
<i>Skeletonema marinoi</i>	5-8	3-4	13
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	8	8-15	12

3- Origine et traitement de l'eau

L'eau de mer synthétisée peut être utilisée, mais vu son prix élevé son utilisation reste exceptionnelle et à petite échelle.

Le filtre à sable

Exemple :

L'eau de mer passe par un **filtre à sable** qui retient les particules d'un diamètre supérieur à $50 \mu\text{m}$. Ainsi, le zooplancton est retenu par le filtre. Cette eau filtrée à $5 \mu\text{m}$ alimente l'ensemble de l'exploitation.



50



Les filtres à cartouches

Une filtration supplémentaire est nécessaire pour alimenter la salle d'algues. En effet, l'eau ne doit pas présenter de cellules phytoplanctonique pour réaliser une culture mono spécifique d'algues de bonne qualité. Par conséquent, une série de **filtres** est utilisée : **cartouches** filtrantes à 25 μm , 10 μm , 5 μm , 1 μm et 0.45 μm (si nécessaire) successivement.



A la sortie du circuit, l'eau de mer ne comporte plus de particules d'un diamètre supérieur à 1 ou 0.45 μm . Cette eau peut être utilisée pour la culture du phytoplancton après stérilisation.

Pour une filtration optimale, chacun de ces filtres est nettoyé quotidiennement, avant la préparation des milieux de culture.

Suivant la qualité de l'eau pompée, on utilise des filtres à UV (détruisant l'ADN des cellules) pour optimiser la filtration.

Par précaution, les écloseries utilisent obligatoirement les UV.

4- Salle d'algues

La salle d'algues est relativement isolée. Elle ne sert qu'aux cultures phytoplanctoniques. L'élevage d'organismes animaux y est exclu pour des raisons d'hygiène et par rapport à l'enrichissement en CO₂ dans le circuit d'air.

Schéma d'une salle d'algues:

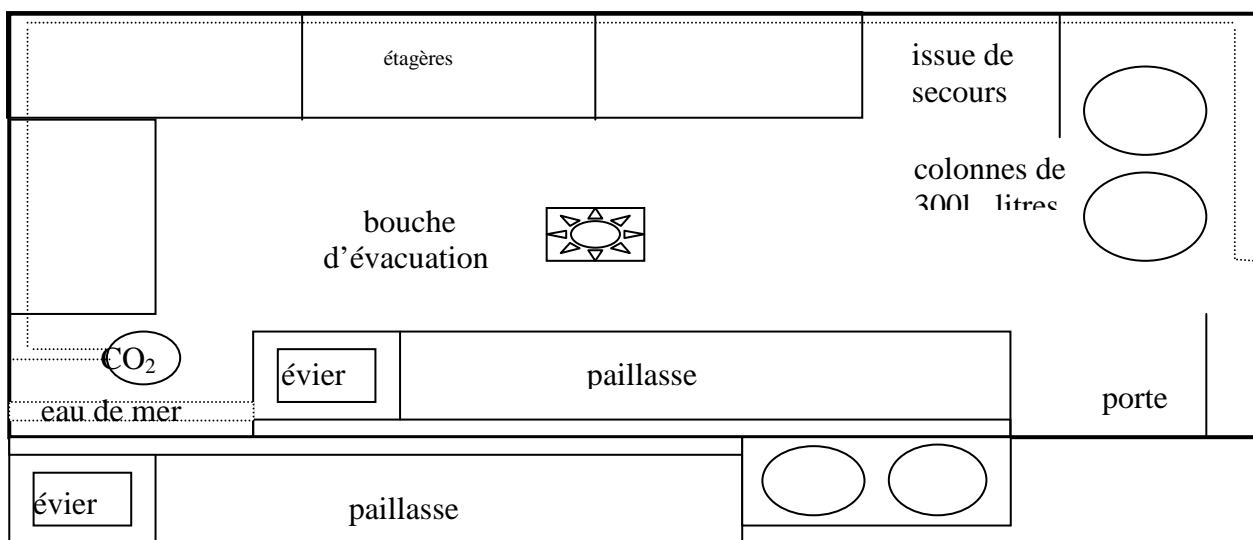




Photo salle de culture



Les milieux de culture sont préparés sur la paillasse de la salle d'algues (*cf fiche « préparation des milieux de culture »*). Dès lors, l'eau de mer qui arrive dans cette pièce est l'eau de mer filtrée à 1 ou 0.45 μm plus UV.

La salle d'algues est alimentée par un circuit d'air enrichi en dioxyde de carbone pour favoriser la croissance algale.

La salle d'algues contient des colonnes transparentes de 300 litres. Les étagères (en PVC) bénéficient comme les deux colonnes d'un éclairage permanent. Les étagères peuvent alors accueillir de nombreux chémostats de 2 à 20 litres. Le haut des étagères, moins éclairé, peut recevoir les souches, 500ml.

5- Conditions de croissance optimale

1. Lumière

Les cultures reçoivent une lumière blanche artificielle type «blanc industrie» diffusée par des tubes fluorescents d'une puissance de 40 à 60 Watts. Les tubes sont placés horizontalement pour que la lumière diffuse plus largement autour des chémostats. L'ensemble des espèces cultivées nécessite une intensité lumineuse de 3500 à 5000 lux. L'énergie lumineuse est fournie 24 heures sur 24 pour maximiser la production photosynthétique.



2. Température

La climatisation de la salle d'algues maintient une température de 18 à 20°C. C'est la température moyenne qui correspond aux besoins des espèces phytoplanctoniques exploitées. Une température inférieure entraînerait un ralentissement du métabolisme des algues. Une température trop élevée provoquerait une altération de l'équipement enzymatique des cellules avec un développement incontrôlé de celles-ci.

L'isolation thermique de la salle de culture limite les écarts de température en favorisant le maintien de la climatisation.

3. Dioxyde de carbone

Pour une production phytoplanctonique intensive, le dioxyde de carbone contenu dans l'air surpressé et filtré qui est diffusé dans la salle de culture est insuffisant. 1 à 2% de dioxyde de carbone sont alors adjoints à l'air surpressé.

La quantité de dioxyde de carbone est réglée grâce à un manomètre sur la bouteille de gaz.

Le dioxyde de carbone a plusieurs fonctions dans la culture de phytoplancton :

- Source de carbone pour la croissance, carbone convertible par photosynthèse,
- Brassage du milieu de culture évitant la sédimentation des microalgues
- Stabilisation du pH du milieu de culture. En effet, en solution, le dioxyde de carbone réagit avec l'eau et donne de l'acide carbonique qui s'ionise en bicarbonate. Le bicarbonate stabilise le pH (8.2)

4. Sels minéraux

Pour obtenir les concentrations optimales en phytoplancton pour la nutrition des animaux, les sels nutritifs présents dans l'eau de mer sont insuffisants. Il est donc nécessaire d'enrichir le milieu en nitrates, phosphates, métaux, oligo-éléments et vitamines. Dans le cas des diatomées, il faut ajouter de la silice pour la constitution de leur paroi cellulaire. (cf fiche »préparation milieu de Conway »)

5. Asepsie

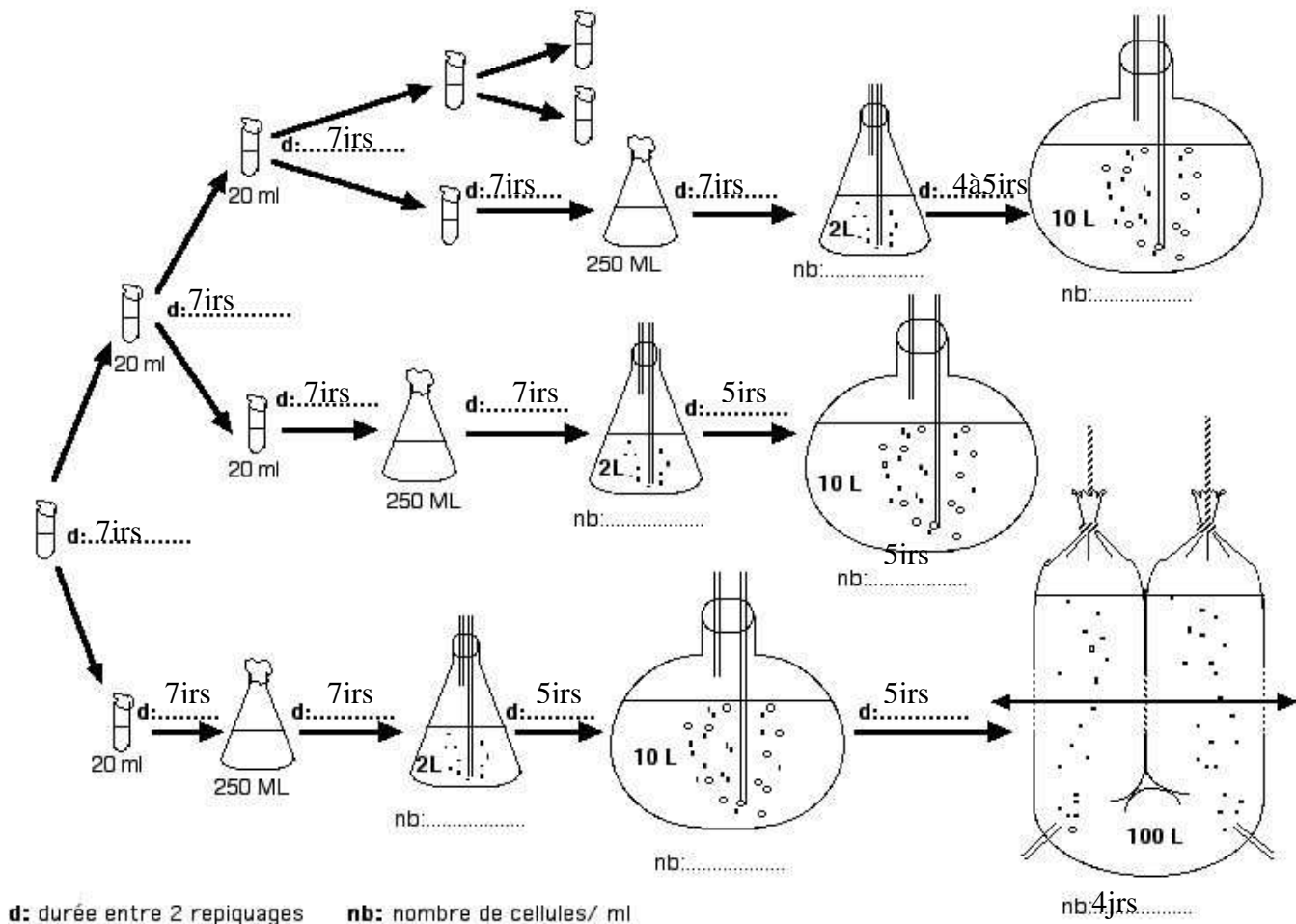
Il est important de travailler en conditions aseptiques (cf fiche tp **ensemencement/repiquage**) pour obtenir une culture monospécifique de phytoplancton et éviter toute contamination, par des bactéries, du phytoplancton et des animaux qui vont consommer ce phytoplancton. De plus, la garantie d'une culture monospécifique permet un contrôle rigoureux de l'alimentation des animaux élevés notamment lors du conditionnement pour la reproduction de certains bivalves.



6- Techniques de culture

Schéma du principe de culture (FAO techniques d'écloserie)

SCHEMA DE PRODUCTION DE PHYTOPLANKTON



❖ La culture en continu :

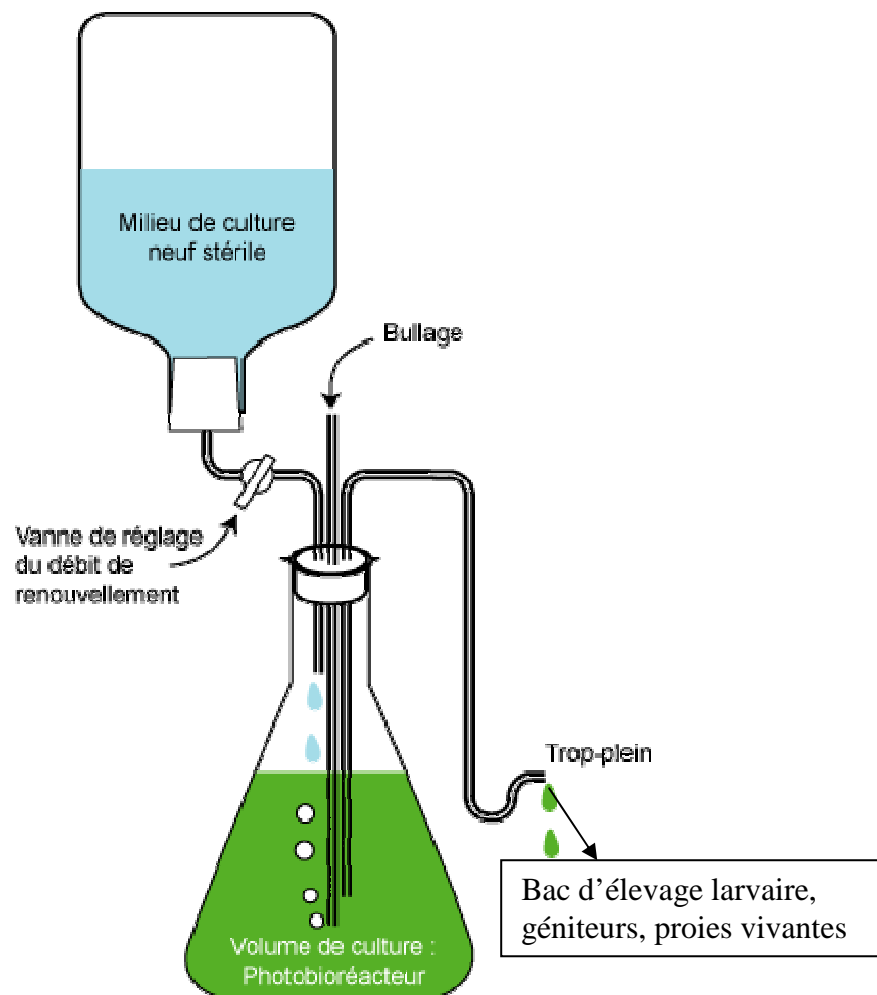
Le principe de la culture en continu est le maintien des jeunes cellules phytoplanctoniques en phase de croissance exponentielle. Pour cela, il faut renouveler quotidiennement le volume de culture.

Généralement, le maintien en culture continu n'excède pas trois semaines à cause des problèmes de vieillissement cellulaire et de contamination des milieux.



Culture en continue en « bioréacteur » :

La souche est introduite dans un "bioréacteur" réunissant toutes les conditions de croissance (éclairage, aération, température...) et après la phase d'adaptation de la souche, un débit constant de milieu de culture neuf est ajouté dans le récipient (par pompage ou par un système de goutte-à-goutte). Un trop-plein permet de maintenir le volume constant et de récupérer la culture pour son utilisation. Cette technique est utilisée en culture de micro algues pour la cosmétique par exemple mais peu en éclosion.





❖ La culture en volume croissants.

Cette technique permet d'obtenir rapidement (quelques jours) une concentration maximale de phytoplancton dans un volume de 300 litres. Le milieu est soutiré à 100% quand il atteint sa concentration maximale. Il est déconseillé de laisser trop longtemps les cultures à ce stade car elles vieillissent vite et meurent. La dégradation de la matière organique induit en général un développement bactérien, cette culture n'étant pas anéxique.

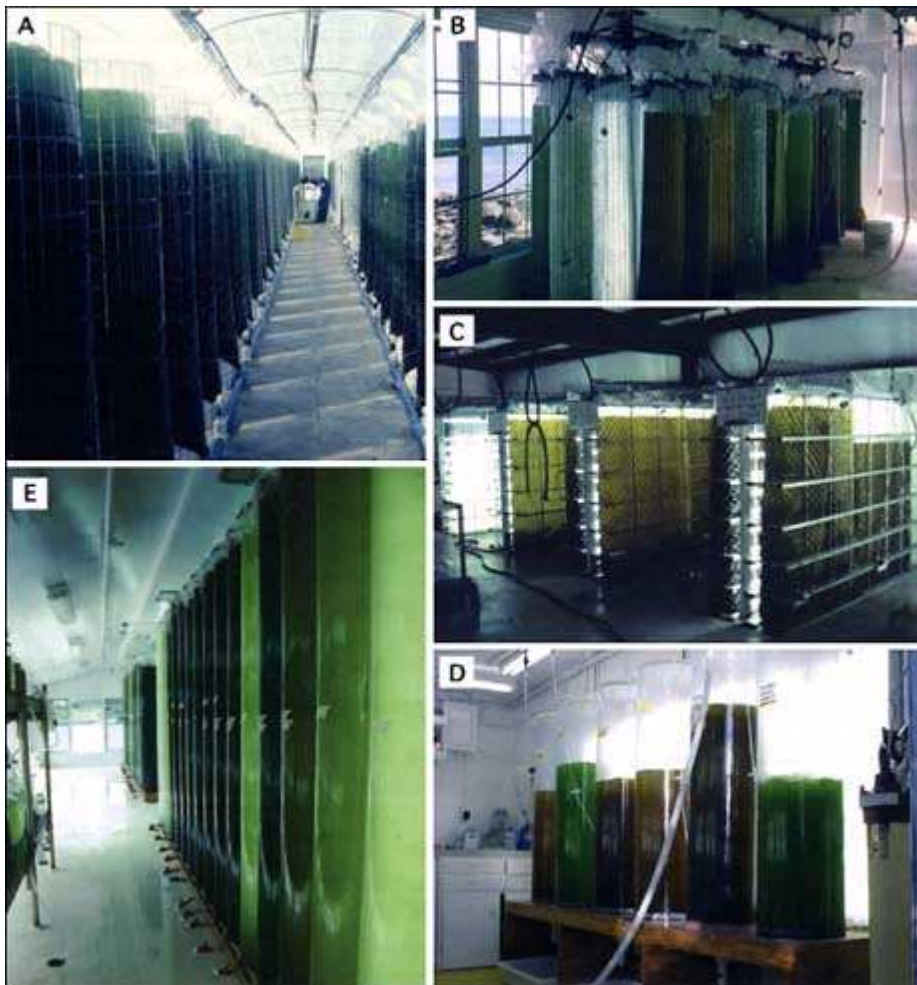


Figure : Exemples de sac en polyéthylène et type d'éclairage, et de systèmes cylindriques de culture algale en fibre de verre: **A** - Sacs de 480 litres en polyéthylène maintenus dans des cadres à maille d'acier et sous éclairage naturel dans une serre. **B** - Sacs de 80 litres suspendus autour d'un axe central grâce à un système rotatif fixé au plafond. Les lampes fluorescentes sont disposées en couronne au centre d'un cadre. **C** - Maillage en plastique soutenant des sacs rectangulaires en polyéthylène placés de part et d'autre d'une rangée de lampes fluorescentes. **D** - Type d'éclairage pour des cylindres en fibre de verre de 100 litres, adossés à une rangée de lampes fluorescentes verticales. **E** - Cylindres en fibre de verre de 2,4 m de hauteur et de 0,3 m de diamètre, éclairés extérieurement par des lampes fluorescentes de 2,4 m de longueur montées verticalement.

photos document FAO « éclosion de bivalves »



7. Les protocoles

7. 1. Préparation des milieux de culture

Le principal milieu de culture utilisé dans la production de micro algues marines est le **milieu de Conway**. Ce milieu est utilisable pour l'enrichissement de l'eau de mer naturelle. De plus, il convient à l'ensemble des espèces cultivées. Le milieu de Conway peut être préparé à l'avance car il est réalisé en conditions stériles et conservé au frigo.

On appelle milieu de Conway le mélange sels nutritifs /vitamines B1 ; B12

Voir fiche protocole : Préparation du milieu de Conway

La solution principale est composée d'un litre d'eau distillée. Les différents éléments doivent être introduits dans l'ordre. La dissolution est facilitée en chauffant légèrement (sans ébullition) le ballon dans un bain-marie.

SOLUTION PRINCIPALE	Nom usuel	Formule brute	Quantité
	Eau déminéralisée	H ₂ O	1000 ml
	EDTA Disodique *	Na ₂ EDTA	45 g
	Nitrate de sodium (ou de potassium)	Na NO ₃	100 g
	Acide Orthoborique	H ₃ BO ₃	33,75 g
	Dihydrogénophosphate de sodium	NaH ₂ PO ₄	26g
	Chlorure de manganèse	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,36 g
	Chlorure ferrique	FeCl ₃ H ₂ O	1,30 g

* L'EDTA est un chélateur qui empêche la précipitation de certains éléments.

SOLUTION TRACES DE METAUX	Nom usuel	Formule brute	Quantité
	Eau déminéralisée	H ₂ O	100 ml
	Chlorure de Zinc (ou sulfate de Zinc)	ZnCl ₂	2,10 g (2,5 g)
	Chlorure de Cobalt	CoCl ₂ 6H ₂ O	2,00 g
	Ammonium heptamolybdate	6(NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,90 g
	Sulfate de Cuivre	Cu SO ₄ 5H ₂ O	2,00 g



Pour une majorité de micro algues Le dosage utilisé est de 1 mL de milieu de Conway pour un litre d'eau de mer filtrée à 1 μm en général.

Une solution vitaminique est également apportée aux cellules. Elle favorise la croissance algale. Cette solution contient :

SOLUTION VITAMINIQUE	Nom usuel	Quantité
	Eau déminéralisée	100 ml
	Vitamine B1 (Thiamine aneusine hydrochloride)	400 mg
	Vitamine B12 (Cyanocobalamine)	20 mg

La solution principale enrichie avec la solution de métaux (1ml de trace de métaux par litre de solution), ainsi que les vitamines (50ml par litre de solution) constitue la solution de Conway.

La solution de Conway doit être préparée et manipulée en conditions stériles.

Pour la culture de diatomées, il faut ajouter une solution silicatée au milieu de culture. La silice est indispensable pour la synthèse de la paroi cellulaire (frustule).

SOLUTION SILICATE	Nom usuel	Formule brute	Quantité
	Eau déminéralisée	H ₂ O	100 ml
	MetaSilicate de sodium	Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O	10 mg (4g)

Cette solution peut être ajoutée au milieu de culture avant la stérilisation.

En général, le dosage utilisé est de 1 mL de solution de silicate pour un litre d'eau de mer filtrée à 1 μm .

7. 2. Techniques de stérilisation

Tout d'abord un contrôle régulier au microscope pour constater :



* l'état des cellules

*Contamination ou non par des bactéries, champignons ou d'autres phytoplancton.

La méthode de stérilisation dépend du volume de milieu de culture à traiter. L'autoclave (121°) est la technique la plus répandue, mais les chemostats (100°C) peuvent être aussi utilisés pour les « petits moyens financiers ».

* Pour de petits volumes, de **200 mL à 20 L**, la méthode physique est privilégiée. Les chemostats contenant les milieux de culture sont bouchés hermétiquement. Puis, ils sont placés dans un bain-marie, dans les stérilisateur, pendant une vingtaine de minutes pour les 10-20 litres et cinq minutes pour les petit volumes comme les 500ml. Après refroidissement, le milieu de culture peut être utilisé.

Volumes	Temps de stérilisation
200ml/500ml	5 minutes
2 litres	10minutes
4litres	20minutes
10 ;20litres	45minutes



*Les volumes de **300 litres** nécessitent une stérilisation chimique. La technique de chauffage n'est pas possible :

-Bien laver la gaine à l'eau chaude et à l'eau de javel.

-Un peu moins de 300 litres d'eau de mer filtrée à 1 μm est introduit dans la colonne.

-12 mL (40ml/l) d'eau de Javel **2.6%** et les sels nutritifs (conway et / ou silice) sont ajoutés dans les 300litres. L'eau de Javel doit agir pendant 45minutes.

- A l'issu de cette durée, 10,95 g (36mg/l) de thiosulfate de sodium dilué sont également ajoutés à l'eau de mer. Le thiosulfate de sodium neutralise les ions chlorure de l'eau de Javel. Son action dure une demi- heure.



7. 3. Entretien des souches

Les souches sont le point de départ de la production phytoplanctonique. Elles sont, par conséquent, très précieuses.

Voir fiche protocole : repiquage/ensemencement

Elles doivent donc être entretenues avec un grand soin.

En production, les souches **sont repiquées régulièrement**, toutes les semaines. Le repiquage régulier permet de garder des cellules jeunes avec un fort potentiel de croissance. Elles peuvent être contenues dans des ballons de 500 mL.

Pour contrôler la croissance des souches et ne pas favoriser leurs développement, les ballons sont placés dans la zone la moins éclairée de la salle d'algues.

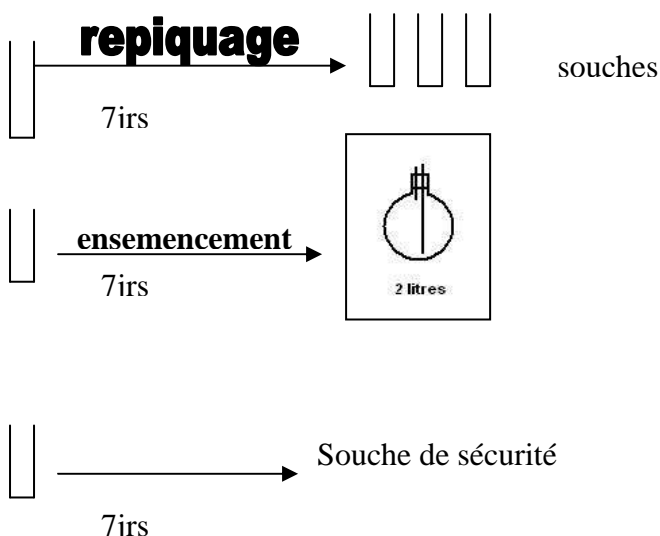
Les repiquages se font toutes les deux semaines en période de routine

Exemple : photo de souches



Schéma entretien des souches :

EXEMPLES 1 :

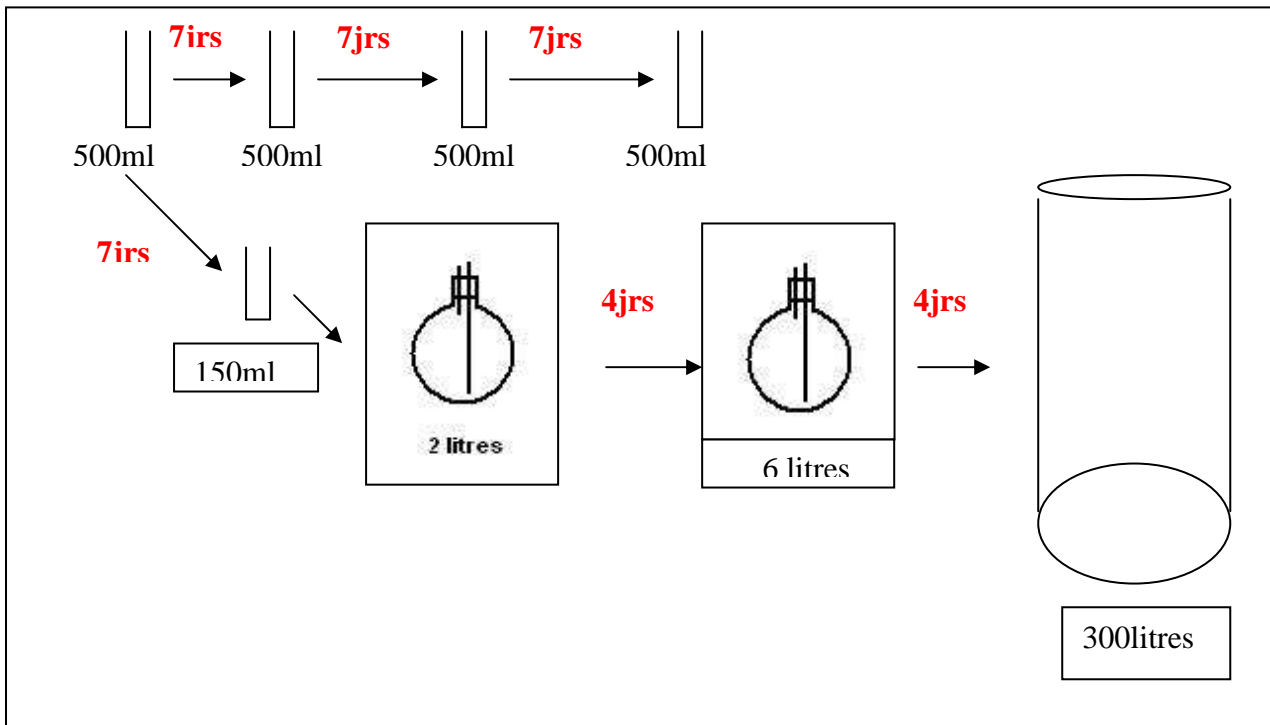


Le repiquage se fait en triplicat pour minimiser les risques d'échec. La souche la plus concentrée du triplicat précédent sert à l'ensemencement du nouveau triplicat. Le repiquage



a lieu en conditions stériles. Pour cela, trois ballons de 500mL contenant 200 à 300 mL de milieu de culture stérile sont utilisés. Ces ballons sontensemencés selon la méthode appliquée pour les volumes supérieurs. La seule différence au niveau de la technique d'ensemencement vient de l'apport de solution vitaminique. En effet, trois gouttes de cette solution sont ajoutées au milieu (c'est un exemple, les professionnels utilisent de la vitamines pour tous types de volume).

EXEMPLE2 :



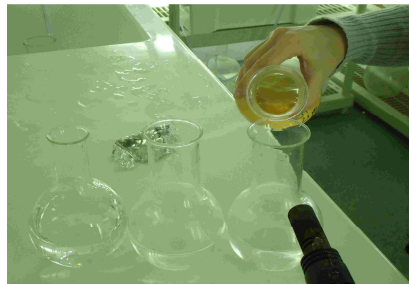


7. 4. Ensemencement

On appelle ensemencement les manipulations à partir du 2 litres.
Tous les ensemencements sont réalisés en conditions stériles à l'exception de celui de la colonne de 300 litres. En effet, l'asepsie n'est pas garantie dans la colonne.

Voir fiche protocole : repiquage/ensemencement

La manipulation a donc lieu à proximité d'une flamme. La flamme est produite par un brûleur à gaz. Elle crée autour d'elle une sphère stérile grâce à la chaleur qu'elle dégage (20 cm de diamètre). Il est alors possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.



Les milieux de culture sont préparés la veille pour qu'ils puissent refroidir naturellement après la stérilisation par chauffage. Les ballons qui vont recevoir un inoculum sont bouchés par un bouchon en élastomère traversé par des cannes de verre pour l'alimentation en air des milieux de culture.

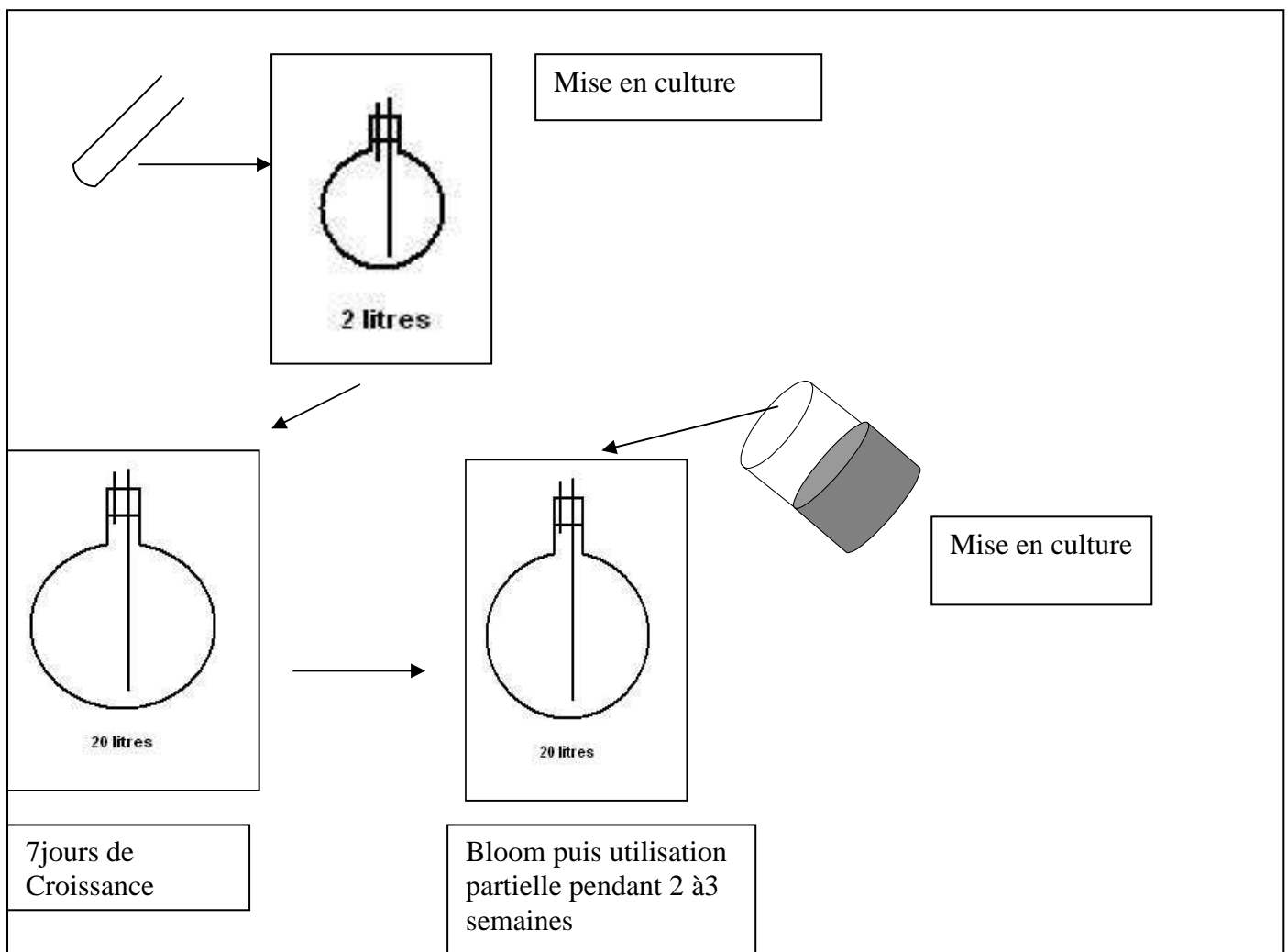
L'inoculum est soit un des ballons de souche qui ne sert pas au repiquage de celle-ci, soit un ballon qui a été inoculé quelques jours auparavant et de volume inférieur.



7. 5. Entretien des cultures

En pratique, la flamme est placée à 3-4 cm du col du ballon qui va êtreensemencé. Ce ballon est débouché dans la zone aseptique. Il en est de même pour l'inoculum. Il est versé dans le nouveau milieu de culture en restant bien dans la sphère stérile. Il faut prendre garde à ne pas verser le dépôt qui se trouve au fond du ballon d'inoculum. Ce dépôt est formé de cellules mortes qui pourraient freiner la croissance de la culture.

CULTURE EN SEMI-CONTINU





Le maintien des cultures en semi-continu (technique la plus facile pour préparer des tp avec les élèves) passe par l'augmentation progressive du volume de culture.

Cette étape est une des techniques qui permet de pouvoir utiliser le phytoplancton dans l'alimentation des invertébrés. Elle permet de garder les cellules en phase de croissance exponentielle pendant deux semaines.

1. Le point de départ est toujours constitué par les souches.
2. Un des ballons de repiquage des souches est utilisé pour ensemercer un ballon de 2 litres contenant 1 litre de milieu de culture ou un ballon de 4 litres contenant 2 litres de milieu.
3. Après quelques jours (4 à 7 jours) de développement dans ce volume, ces ballons servent à ensemercer des ballons de 10 ou 20 litres contenant 4 litres de milieu de culture. La concentration cellulaire augmente progressivement dans les ballons.
4. Avant qu'elle soit maximale, 4 litres de milieu de culture stérile sont ajoutés selon la technique utilisée pour l'ensemencement des milieux de culture. 4 autres litres sont ajoutés régulièrement jusqu'au remplissage du ballon.

Les ballons complets de 10 et 20 litres pourront servir à l'ensemencement d'une colonne de 300 litres ou être soutirés pour nourrir les animaux phytoplanctonophages.

Pour maintenir la phase de croissance exponentielle en gardant un volume constant de milieu de culture, il faut renouveler **un quart du volume de milieu régulièrement** (tous les jours pour *skeletonemas costatum* ou tous les deux jours pour les autres). Pour cela, 4 litres de culture sont soutirés dans les ballons. Puis, 4 litres de nouveau milieu de culture stérile sont ajoutés. Les manipulations se font toujours en conditions stériles.



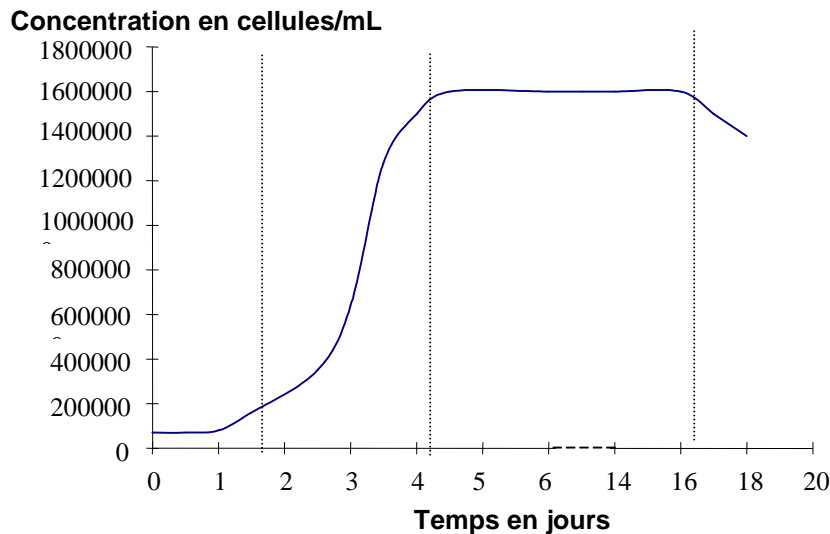
8- Evolution d'une culture de phytoplancton

La courbe de croissance d'une culture phytoplanctonique présente quatre phases.



Courbe de croissance d'une culture phytoplanctonique :

Cas particulier d'*T. Isochrysis*:



La première phase ou **phase de latence** ne montre pas d'évolution du nombre de cellules dans le milieu de culture. Aucune division cellulaire n'est observée. En effet, les cellules doivent s'adapter à leur nouveau milieu d'où une absence d'évolution de la concentration cellulaire. La durée de cette phase diffère selon les espèces phytoplanctonique pour un même milieu de culture.

Une fois que les cellules se sont adaptées au milieu. Leur nombre croît de manière considérable. Cela correspond à la **phase de croissance exponentielle**. Les cellules sont jeunes et elles possèdent un fort potentiel de division.

La phase suivante est marquée par un plateau de concentration. C'est la **phase stationnaire**. Ce plateau est lié à l'appauvrissement en sels nutritifs du milieu de culture.

La dernière phase de l'évolution de la culture de phytoplancton est une **phase de décroissance**. La concentration en cellules phytoplanctonique diminue. Cette décroissance est provoquée par la dégénérescence des cellules, les cellules meurent.

C'est la phase de croissance exponentielle qui est favorisée dans la méthode de culture utilisée.

9. Le comptage des cellules algales

Les différentes phases de la croissance ont été déterminées grâce à des comptages de cellules phytoplanctonique réguliers à l'aide d'une cellule de Malassez.

La cellule de comptage a une profondeur connue et un quadrillage défini qui donnent un volume déterminé.



CONCLUSION

La culture de phytoplancton est un travail rigoureux qui nécessite des précautions drastiques notamment pour le maintien des milieux en conditions aseptiques. La production de phytoplancton est coûteuse en main d'œuvre car elle doit faire l'objet d'un soin quotidien. La bonne qualité des cultures phytoplanctonique est la principale condition pour la réussite de l'élevage d'organismes marins consommateurs de ces algues.

D'autres applications que l'alimentation des larves de poissons ou coquillages sont en développement. La culture de *odontela aurita* et *spiruline* par exemple.



PREPARATION DU MILIEU DE CONWAY

Préparation en milieu stérile à coté d'une flamme.

La préparation se fait en plusieurs étapes :

1° : Préparer 1litre d'eau déminéralisée

Verser 500ml d'eau déminéralisée dans la verrerie ou vous faite les mélanges de solutions principale ; solution de traces de métaux et vitamines.

Ce récipient mettez le au bain marie pour faire dissoudre rapidement les éléments minéraux.

La plus part des éléments minéraux sont sous forme solide (poudre) les 500ml restant vont vous permettre de rincer les bords de la verrerie à la fin du

2° : Peser les **sels minéraux** qui seront autoclavés ou stérilisés au bain marie.

SOLUTION PRINCIPALE	Nom usuel	Formule brute	Quantité
	Eau déminéralisée	H ₂ O	1000 ml
	EDTA Disodique *	Na ₂ EDTA	45 g
	Nitrate de sodium (ou de potassium)	Na NO ₃	100 g
	Acide Orthoborique	H ₃ BO ₃	33,75 g
	Dihydrogénophosphate de sodium	NaH ₂ PO ₄	26g
	Chlorure de manganèse	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,36 g
	Chlorure ferrique	FeCl ₃ H ₂ O	1,30 g



3°. La solution de *traces de métaux* est réalisée pour 100ml de volume final.

SOLUTION TRACES DE MÉTAUX	Nom usuel	Formule brute	Quantité
	Eau déminéralisée	H ₂ O	100 ml
	Chlorure de Zinc (ou sulfate de Zinc)	ZnCl ₂	2,10 g (2,5 g)
	Chlorure de Cobalt	CoCl ₂ 6H ₂ O	2,00 g
	Ammonium heptamolybdate	6(NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,90 g
	Sulfate de Cuivre	Cu SO ₄ 5H ₂ O	2,00 g

Les traces de métaux sont versé dans la solution principale a raison de 1ml par litre de solution principale.

Un excès de métaux aurait un effet létal sur les cellules. Les métaux sont indispensables pour le métabolisme des végétaux (fonctionnement des enzymes) mais sont toxiques à de fortes concentrations

4° :Les vitamines

SOLUTION VITAMINIQUE	Nom usuel	Quantité
	Eau déminéralisée	100 ml
	Vitamine B1 (Thiamine aneusine hydrochloride)	400 mg
	Vitamine B12 (Cyanocobalamine)	20 mg

Ajouter le mélange de vitamines à raison de 50ml par litre de solution principale
L'introduction des vitamines dans le mélange de sels minéraux (à la flamme) peut éviter les pollutions a répétition.



Puis pour stériliser la solution au bain marie ou à l'autoclave.



Ensemencement/ Repiquage



La manipulation a lieu à proximité d'une flamme.
Passer la maillasse et les mains à l'alcool à 90° avant la manipe.

La flamme est produite par un brûleur à gaz. Elle crée autour d'elle une sphère stérile grâce à la chaleur qu'elle dégage (20 cm de diamètre). Il est alors possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.

Les milieux de culture sont préparés la veille (cf tableau doses pour les milieux nutritifs) pour qu'ils puissent refroidir naturellement après la stérilisation par chauffage. Les ballons qui vont recevoir un inoculum sont bouchés par un bouchon en élastomère traversé par des cannes de verre pour l'alimentation en air des milieux de culture.

Exemple de préparation :

Pour une mise en culture du 500ml au 2litres :

Vous préparez **1litre** d'eau de mer filtrée(1Microns ou 0,45microns plus UV dans le ballon de 2litres.

Pour *T.isochrysis* vous y ajouter **1ml de milieu de Conway.**

Vous stériliser le mélange 20 minutes à l'autoclave ou au bain marie.



L'ensemencement

**Exemple : Pour ensemer du 500ml au 2litres :
Cette technique concerne tous les volumes en
repiquage ou ensemencement.**

En pratique, la flamme est placée à 3-4 cm du col du ballon qui va être ensemer. Ce ballon est débouché dans la zone aseptique. Il en est de même pour l'inoculum. Il est versé dans le nouveau milieu de culture en restant bien dans la sphère stérile. Il faut prendre garde à ne pas verser le dépôt qui se trouve au fond du ballon d'inoculum. Ce dépôt est formé de cellules mortes qui pourraient freiner la croissance de la culture.





Calcul de concentrations cellulaires dans les cultures Utilisation de la cellule de Malassez.

De Helene Laguerre

But : déterminer une concentration en cellules dans un ballon de culture de microalgues.

Description : la cellule de Malassez possède un quadrillage (fig. 1) de volume connu. Il est composé de cases (fig. 2) qui, chacune, possède 4 lignes et 5 colonnes.

→ Le volume d'une case est de :

$$0,2 \times 0,25 \times 0,2 = 0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ ml}$$

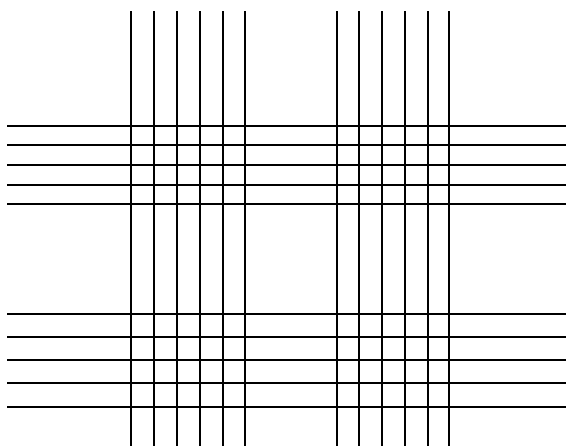
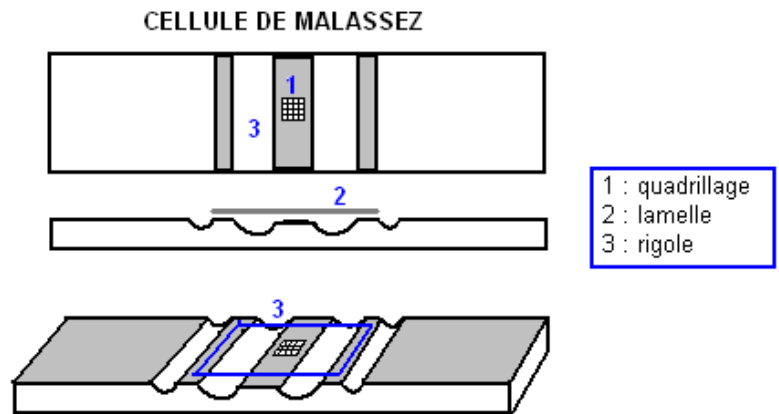


Figure 1 : quadrillage de la cellule de Malassez

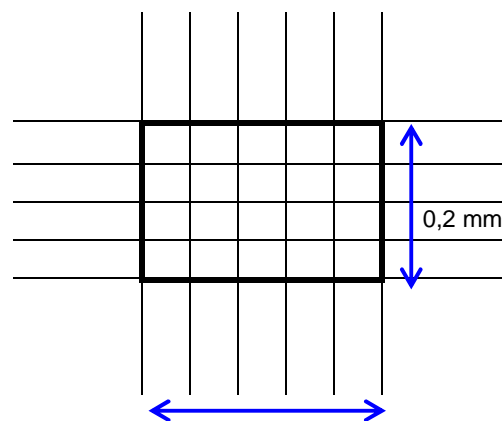
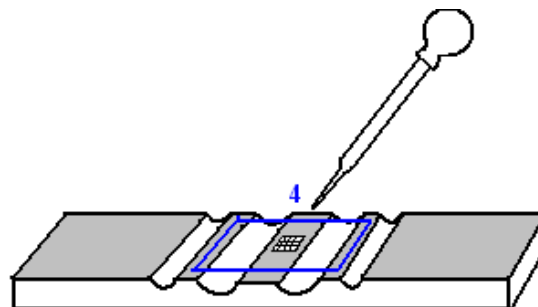


Figure 2 : Schéma d'une case

Remplissage de la cellule :

1. Prélever un échantillon de culture ;
2. Homogénéiser l'échantillon ;
3. fixer avec du lugol (2gouttes dans 1ml) ou de l'eau de javel diluée, les micro algues 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.



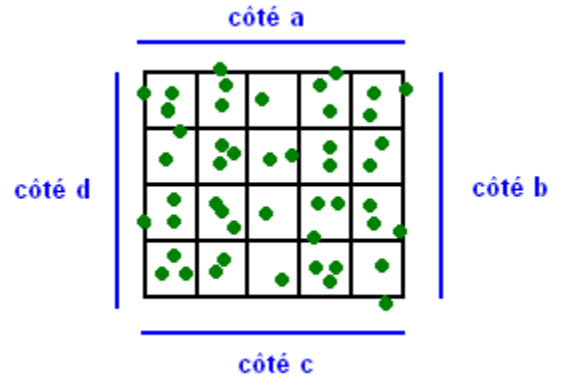
remplissage par le bord supérieur (4) - le liquide descend par capillarité



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.

Attention : pour les cellules positionnées sur les bord, 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 ;



	ligne 1	ligne 2	ligne 3	ligne 4	somme
case 1	12	11	12	10	45
case 2	10	10	11	12	43
case 3	9	13	14	14	50
case 4	12	8	9	13	42
case 5	13	13	10	9	45
				total	225

4. Calculer le nombre moyen de cellules par case :

Nombre de cellules moyen par case = $225 : 5 = 45$

On a 45 cellules \rightarrow 1 case

Soit : 45 cellules $\rightarrow 10^{-5}$ ml

5. Calculer la concentration cellulaire en cellules par ml :

45 cellules $\rightarrow 10^{-5}$ ml

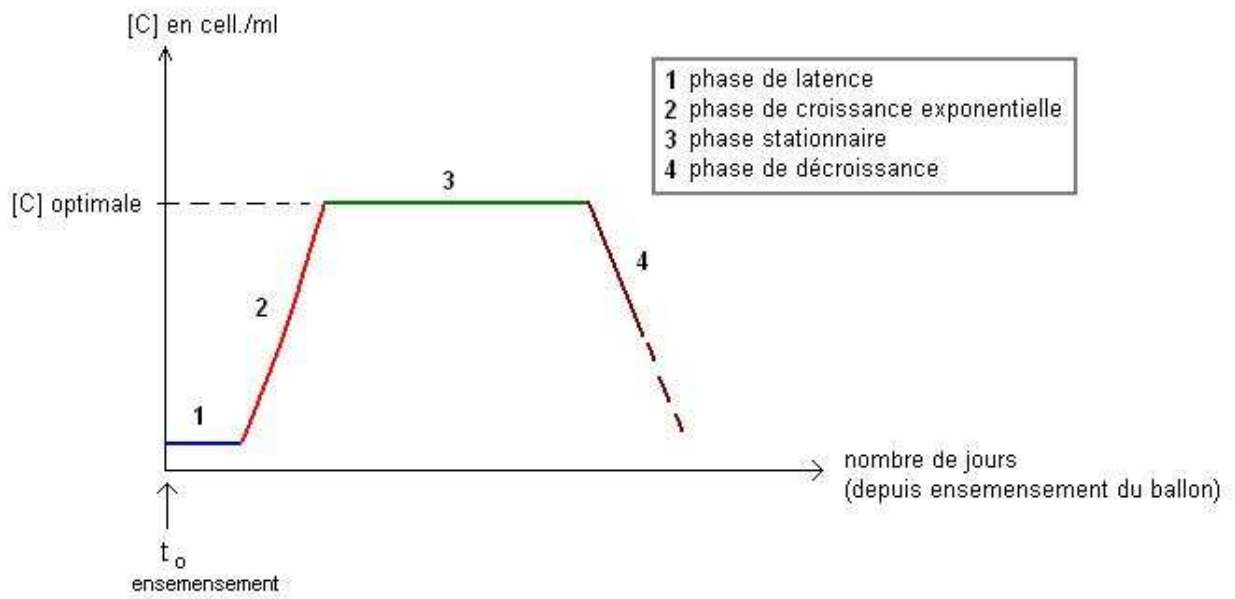
? cellules \rightarrow 1 ml

$$[C] = (45 \times 1) / 10^{-5} = 45 \times 10^5 = 4,5 \cdot 10^6 \text{ cellules/ml}$$

Interprétation :

1. Comparer cette valeur avec la [C] optimale

NB : cette [C] optimale varie en fonction de l'espèce phytoplanctonique concernée !



Courbe de croissance théorique d'une culture de phytoplancton

2. Interpréter par rapport à la courbe de croissance :

- si $[C] = [C]_{opt}$ → concentration idéale, phase stationnaire (3) ;
- si $[C] < [C]_{opt}$ → culture pas assez concentrée, phase 2 ou 4, on tranche avec l'âge du ballon ;
- si $[C] > [C]_{opt}$ → culture trop concentrée, il faut la diluer sinon il y a risque de décroissance.



Bibliographies

Ouvrages :

Audineau et Blancheton, 1986. Production d'algues unicellulaires. Rapport IFREMER. 20p.

Chrétiennot-Dinet M.J., 1990. Atlas du phytoplancton marin-vol.3. Editions du CNRS. 260p.

ENITA de Bordeaux, 1998. Aquaculture. 310p.

Menu M., 1991. Microalgues, rotifères, artémia et aquaculture. CREUFOP.

Ricard M., 1987. Atlas du phytoplancton marin-vol.2. Editions du CNRS. 300p.

Rapport Claude YVEN CEMPAMA- 2001

ifremer/DAC/RST.2007-04

Rapport éclosion des bivalves par la FAO p184

Aquafilia n°35-oct 2009 et n°36-Dec 2009

@ Sites internet : Ifremer.fr

👁 Crédit photos : Helene.laquerre@educagri.fr

Remerciements

Nous remercions Isabelle Queau (responsable des cultures de phytoplancton à la station Ifremer de Argenton(29)) et Isabelle Cancre (Enseignante en biologie et en aquaculture) pour leur conseil dans la construction sur le fond et la forme de cette fiche pédagogique.