

Direction des Ressources Vivantes
Département Valorisation des Produits
Laboratoire de Production et de Biotechnologie des Algues
Rue de l'Île d'Yeu – BP 21105
44311 NANTES cedex 3

Gaël Bougaran
Loïc Le Déan
Ewa Lukomska
Marie-Lise Picquet
Raymond Kaas
Arnaud Muller-Feuga

04 2001 - R.INT.DRV/VP/PBA 2001/001

ifremer



Culture en continu
de *Isochrysis galbana affinis*
Tahiti

Avril 2001

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	2
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	4
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	5
3.1. FAISABILITÉ DES CULTURES EN CONTINU À LONG TERME.....	5
3.2. COMPARAISON DE 2 TECHNIQUES DE LANCEMENT DES CULTURES EN CONTINU.....	8
3.3. LIMITATION PAR L'AZOTE.....	11
3.4. TECHNOLOGIE DE POMPAGE.....	16
3.5. PRODUCTIVITÉ ET CONSOMMATIONS DES CULTURES EN CONTINU EN BIORÉACTEURS DE 2 LITRES.....	17
3.6. GESTION DE LA LUMIÈRE POUR LA PRODUCTION D'ALGUES EN CONTINU.....	18
4. CONCLUSION.....	20

1. Introduction

La prymnésiofycée *Isochrysis galbana* affinis *Tahiti* (T-iso) est une microalgue marine classiquement utilisée comme nourriture de larves de mollusques et de proies vivantes de poissons d'aquaculture dans la plupart des écloséries produisant des juvéniles de ces espèces. Aujourd'hui, de nombreuses écloséries de mollusques et de poissons l'utilisent en association avec d'autres espèces telles que *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* et *Skeletonema costatum*.

Isolée à Tahiti par JL Martin en 1975 (comm. pers.), cette algue s'est rapidement imposée dans la nutrition larvaire des crevettes et des mollusques en raison de sa croissance rapide en conditions tropicales et de ses qualités nutritionnelles, en relation avec sa forte teneur en acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

Cependant les profils lipidiques et leur concentration varient selon les souches et la composition biochimique peut être modifiée en réponse aux facteurs environnementaux comme l'irradiance, la concentration en nutriments, la procédure de conservation, le taux de croissance, le cycle solaire (Zhu, 1997), la composition du milieu, la température, le pH, la photopériode et le stade de récolte (Brown, 1993).

L'un des principaux problèmes auquel les laboratoires et écloséries, produisant des stades larvaires de mollusques et de crustacés, ont à faire face est le coût élevé de production de la biomasse vivante d'algues, qui contribue jusqu'à 30% du coût total de production (Enrique Valenzuela-Espinoza *et al.* 1999). La production de biomasse d'algues est considérée comme le « goulot d'étranglement » majeur dans la culture des mollusques en éclosérie (Fabregas *et al.*, 1986).

La substitution de la technique de culture en continu à celle du batch pourrait permettre d'apporter des réponses aux deux points de blocage soulevés précédemment. La stabilisation des paramètres environnementaux devrait diminuer significativement la variabilité de la qualité biochimique des algues produites. L'économie de main d'œuvre devrait réduire les coûts de production.

L'intérêt que suscite la culture en continu de T-iso en aquaculture nous a conduits à étudier la faisabilité de ce type de cultures à long terme, à comparer deux modes de lancement des cultures et à caractériser l'influence de la limitation par l'azote.

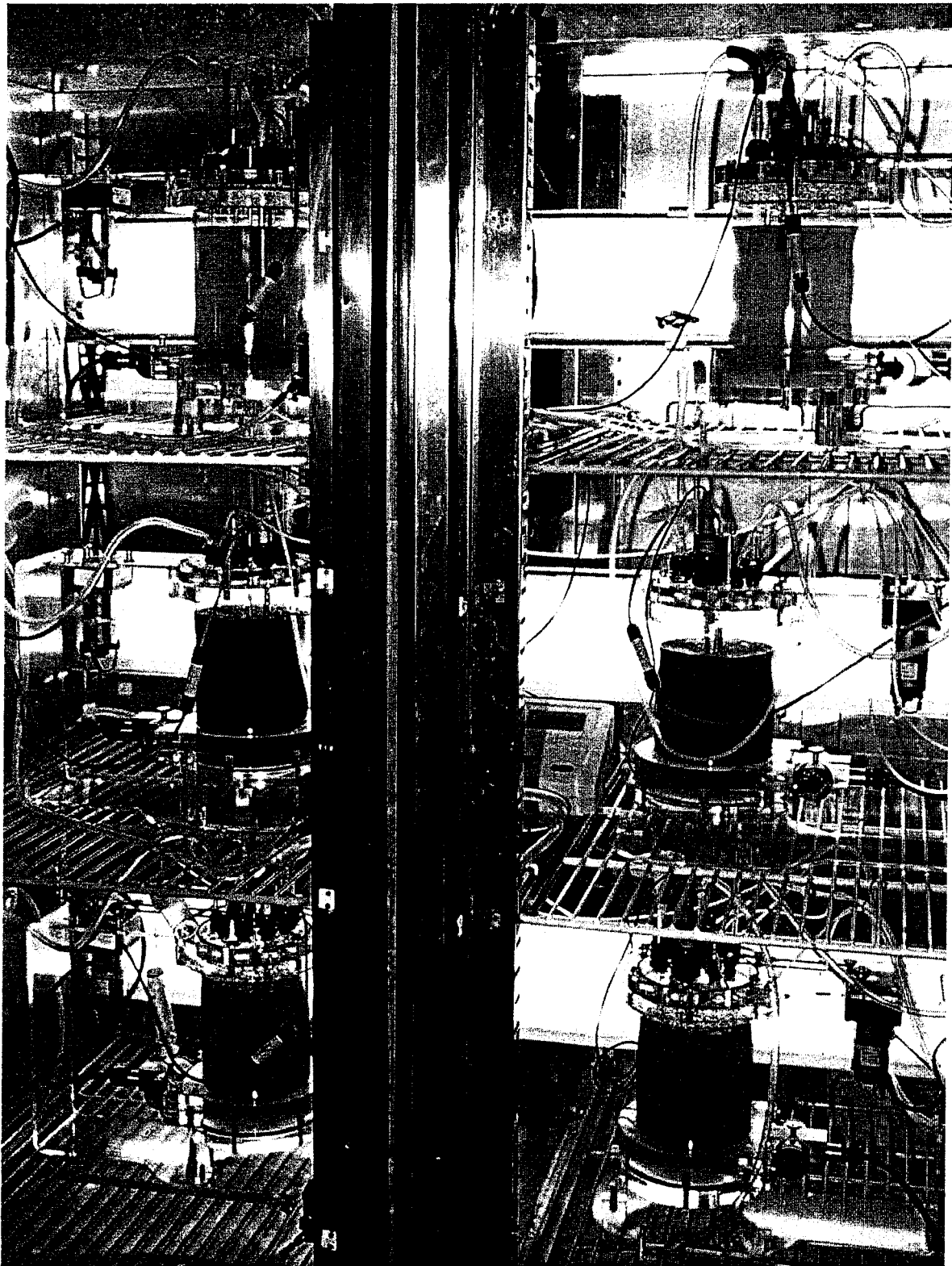


Fig. 1. Dispositif comportant six photobioréacteurs, placés dans l'enceinte thermorégulée, destiné aux études de physiologie. Chacun des réacteur est équipé pour la culture en continu.

2. Matériel et Méthodes

Les cultures en continu de T-iso ont été réalisées sur une souche acquise auprès de la station d'Argenton en 1998 et conservée depuis au laboratoire PBA.

Le dispositif expérimental de culture en continu a été développé, en interne, par le laboratoire (Fig. 1). Il comprend six réacteurs de 2 litres, placés dans une enceinte thermorégulée et contrôlés par le logiciel de supervision PHYSIO, également développé en interne. L'intérêt d'un tel dispositif est d'offrir la possibilité de réaliser des répliquats dans l'espace et dans le temps, ainsi que de préfigurer la production à plus grande échelle, grâce aux contrôles des paramètres.

Sur chacun des réacteurs, le logiciel enregistre le pH, la température, le débit de gaz (CO₂ et air ou azote) et l'absorption lumineuse (mesure indirecte de la biomasse). Le pH est, en outre, régulé autour d'une valeur de consigne par injection de CO₂ et la vitesse de rotation de la turbine est modulable, selon la sensibilité aux cisaillements de l'espèce cultivée.

Dans le cadre de l'étude des cultures en continu, l'apport de nutriments et la récolte par surverse forcée sont assurés par différents types de pompes. Le très faible volume de renouvellement (de l'ordre de 0.4 à 1.5 ml.min⁻¹), lié au volume réduit des réacteurs, nécessite l'emploi de pompes de précision pour l'apport de la solution nutritive. Trois technologies différentes de pompes ont été testées : la pompe péristaltique IPC (Société Ismatec) à mouvement planétaire, la pompe doseuse à piston rotatif REGLO (Société Ismatec), ainsi que la pompe doseuse à membrane STEPDOS (Société KNF). La surverse est assurée par une pompe péristaltique IPC, dont le débit est très supérieur au débit de l'apport.

La stérilisation des réacteurs est réalisée à l'aide d'acide peroxyacétique, à 5%, pendant 15 min. La lumière est distribuée par deux tubes fluorescents de 36W, de type lumière du jour, à chaque étage de l'enceinte thermorégulée. L'intensité lumineuse incidente, mesurée au centre des réacteurs vides, à l'aide d'un capteur sphérique LI-COR, atteint $110 \pm 10 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les paramètres de culture contrôlés sont fixés aux valeurs de consigne suivantes :

- pH = 7.2 ± 0.05
- température = $27 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$
- débit de gaz = $0.2 \pm 0.05 \text{ L.min}^{-1}$
- vitesse de rotation de la turbine = 120 tpm

L'eau de mer synthétique Reef-Crystals a été retenue pour le cadre de ces expériences, après validation préalable de son potentiel, afin de garantir la stabilité et la reproductibilité des résultats. Lors de la reconstitution de cette eau de mer, à l'aide d'eau osmosée ELGA, il est nécessaire d'abaisser le pH à une valeur voisine de 7,5, afin d'éviter la précipitation du carbonate de calcium. Ceci est obtenu, après enrichissement à l'aide de 1 ml.L^{-1} de milieu de

Conway standard (annexe 1), par acidification avec une solution diluée de HCl 0.01 N. Le dosage du sel, apporté à 382 g.L^{-1} , permet d'obtenir une salinité de 34 ‰.

L'inoculum de l'essai de culture à long terme provient d'une culture en erlenmeyer en batch. La récolte de cette culture en a servi à ensemercer les autres réacteurs. Dans tous les cas, les réacteurs sont inoculés à une concentration de $5.10^5 \text{ cellules.ml}^{-1}$. Selon les expériences, le lancement de la culture en continu est précédé ou non d'une phase de culture en batch.

L'évolution de la biomasse dans les réacteurs est suivie par absorption lumineuse et par numération cellulaire. Le signal renvoyé par le capteur d'absorption permet un suivi en temps réel et en continu de la biomasse. Cependant, ce type de capteur est sujet à des dérives dues à la colonisation des surfaces optiques par les algues. La numération cellulaire est réalisée sur cellule de Malassez, par analyse d'image, avec le logiciel SAMBA.

La composition du milieu est déterminée par chromatographie ionique, sur un analyseur Dionex 500. Seuls les anions majeurs (nitrate et phosphate) sont analysés. La préparation des échantillons consiste en une filtration à $0,22 \mu\text{m}$ puis en une dilution au $1/15^{\text{e}}$ avec de l'eau ultra-pure (produite par un Maxima ELGA et dont la résistivité est égale $18,2 \text{ M}\Omega$). L'objectif de la dilution est d'adapter la concentration des chlorures aux capacités de la colonne AS9-HC.

Le traitement des résultats expérimentaux est effectué à l'aide de la fonction Splin cubique de MATLAB. Cette fonction permet le lissage préalable des données de croissance et de concentration résiduelle des nutriments. La reproductibilité de cette méthode a été évaluée et confirmée, dans le cadre de notre application, pour un intervalle de confiance de 85% (Pruvost *et al.*, 1999).

3. Résultats et discussion

3.1. Faisabilité des cultures en continu à long terme

La baisse du coût de production des algues, par l'utilisation de la technique en continu, nécessite le maintien de la culture sur une durée suffisante, évaluée à 3 mois. En raison du besoin initial en main d'œuvre élevé, la culture en continu ne devient économiquement rentable, en comparaison de la culture en batch, qu'après le premier mois de fonctionnement (Robert, comm. pers.). Il a donc fallu mener, dans un premier temps, une culture en continu au-delà de ce terme de rentabilité.

Pour cette première expérience, la culture a été directement lancée en continu, pour ne pas induire de déséquilibre temporaire du milieu nutritif. Le taux de renouvellement relativement faible, de $0,33 \text{ j}^{-1}$, supporte une concentration cellulaire de l'ordre de $20.10^6 \text{ cellules.ml}^{-1}$ et permet de simuler des conditions d'exploitation envisageables en éclosérie. En effet, les taux de renouvellement élevés sont très consommateurs de substrat : même dans l'hypothèse d'un apport de nutriments adapté, le débit important d'eau de mer peut constituer un frein à l'emploi routinier de tels taux de renouvellement.

La cinétique de population (Fig. 2) indique une augmentation rapide de la concentration cellulaire ($\mu_{\text{max}} = 1,7$), puis l'amorce de l'équilibre, après environ 15 à 20 jours de culture, à une concentration de $20.10^6 \text{ cellules.ml}^{-1}$. Au-delà de 45 jours, la population cellulaire décroît régulièrement et se stabilise à nouveau à $17.10^6 \text{ cellules.ml}^{-1}$, au bout de 120 jours.

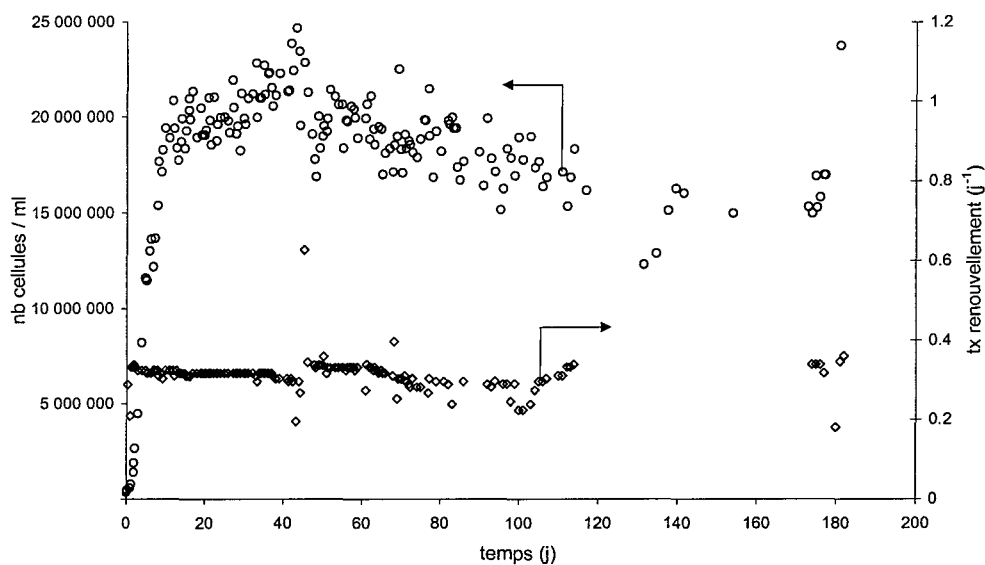


Fig. 2. Suivi de la population cellulaire et du taux de renouvellement sur une culture en continu de *T-iso*, pendant six mois.

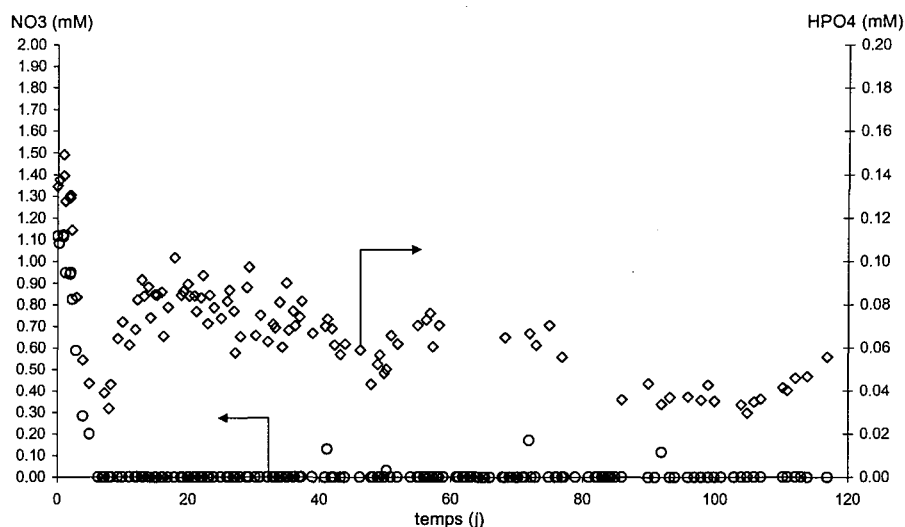


Fig. 3. Evolution des concentrations résiduelles de HPO_4^{2-} et NO_3^- , pendant les 120 premiers jours de la culture.

Cette baisse de performance de la culture ne peut s'expliquer par les variations de taux de renouvellement. Tous les facteurs du milieu contrôlés (température, pH, débit de gaz, composition du milieu) étant demeurés stables par ailleurs, il a été vérifié que le vieillissement des tubes fluorescents, à l'échelle de plusieurs mois, intervient dans cette baisse de concentration cellulaire (§ 3.6). Cela signifie que, sous $100 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la lumière semble être le premier facteur limitant la croissance, à ce taux de renouvellement.

Les analyses des anions majeurs (Fig. 3) n'ont été réalisées qu'au cours des quatre premiers mois de culture. Les nitrates sont consommés en 6 jours, jusqu'à total épuisement de leur concentration résiduelle dans le réacteur. La cinétique de consommation des phosphates est comparable à celle des nitrates, tant que la concentration résiduelle de ces derniers demeure détectable par l'analyse (seuil de détection $N = 15.10^{-3} \text{ mM}$). Après disparition des nitrates, la

consommation des phosphates ralentit brusquement, puis leur concentration résiduelle augmente dans le réacteur jusqu'à stabilisation numérique de la culture. Les oscillations ultérieures de la concentration résiduelle en phosphate doivent être rapprochées des variations de débit, chaque modification du débit entrant se soldant par une variation du même type pour les phosphates. Ces variations ne sont donc pas le résultat d'une modification physiologique de la culture mais plutôt du phénomène physique de dilution.

Pendant la phase initiale de culture, l'accélération de la croissance (jusqu'à $\mu_{\max} = 1,8 \text{ j}^{-1}$) se traduit par une augmentation de la consommation des nutriments, atteignant des valeurs maximales de l'ordre de $350 \text{ fmol N.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et $35 \text{ fmol P.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Ces valeurs sont comparables aux consommations maximales de $300 \text{ fmol N.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et $25 \text{ fmol P.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$ relevées par Elrifi et Turpin, en 1985, sur *Selenastrum minutum*. Après établissement de l'équilibre, les consommations se stabilisent à $\rho_N = 18 \pm 2 \text{ fmol N.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et $\rho_P = 0,9 \pm 0,4 \text{ fmol P.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Les faibles taux de renouvellement, en culture continue, supportent des concentrations cellulaires élevées, diminuent la consommation de la base eau de mer et nécessitent moins de main d'œuvre que les renouvellements plus rapides. En revanche, la productivité de telles cultures n'est pas optimisée, notamment en ce qui concerne l'utilisation des nutriments apportés par les solutions d'enrichissement classiques. En effet, bien qu'une consommation de luxe de certains éléments (particulièrement les phosphates) puisse persister quel que soit le taux de croissance, les possibilités de constitution de quotas cellulaires sont d'autant plus larges que la croissance est faible (Elrifi et Turpin, 1985). La rentabilité économique des faibles taux de renouvellement est donc soumise plus encore à l'adéquation entre les apports en nutriments et les besoins des cellules pour leur seule croissance. Dans les 15 dernières années, plusieurs auteurs sont parvenus à réduire le coût de solutions d'enrichissement pour les microalgues, en utilisant des solutions organiques d'origine animale ou végétale, des engrais agricoles (Fabregas *et al.*, 1987) ou bien des sels de qualité "réactif". Cependant, rares sont ceux qui ont poussé les investigations sur la consommation des nutriments par les algues, bien qu'elle influe sur des paramètres cellulaires tels que le taux de croissance, la composition biochimique et la concentration de chlorophylle (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999).

Cette expérience a permis de démontrer la faisabilité de cultures en continu à long terme de T-iso, en conditions non axéniques. Elle a également permis de tester le matériel mis en œuvre :

- au terme des 6 mois de culture, les parois du réacteur et de ses périphériques sont recouvertes de salissures. Celles-ci se mettent en place progressivement et ne devraient pas constituer un frein à la conduite de cultures sur les durées envisagées qui sont de 3 mois.
- Les pompes d'alimentation de type péristaltique ne sont pas adaptées pour maintenir un débit constant sur de telles durées. Il est indispensable d'opter pour une technologie de pompes doseuses, dont les pièces mécaniques en mouvement sont moins soumises à l'usure.
- L'électrode pilotant la régulation pH s'avère particulièrement stable : au terme de l'expérience, la dérive constatée est de l'ordre de 0,2 unités pH. Cette électrode en verre Inlab 420 Mettler-Toléro est dotée d'un rodage Téflon qui augmente la surface de contact avec le milieu environnant et évite la colonisation par les algues de cette zone d'échange, comme c'est le cas avec les électrodes équipées d'un fritté en verre.

3.2. Comparaison de 2 techniques de lancement des cultures en continu

La technique couramment employée, pour démarrer une culture en continu, consiste en une culture en batch préalable, permettant d'atteindre la concentration cellulaire désirée. Selon la durée de cette première phase, la consommation des nutriments peut aboutir à des concentrations résiduelles limitantes pour certains d'entre eux. Afin d'éviter ce déséquilibre initial, il est possible d'appliquer le débit de renouvellement souhaité dès le démarrage de la culture. Pour tester l'intérêt de cette seconde technique, une première culture a été initiée avec une phase de batch et comparée à deux cultures lancées directement en continu. Dans chaque cas, l'inoculum a été prélevé dans la culture en continu présentée précédemment, dans un souci de standardisation des conditions expérimentales.

La culture en batch (Fig. 4a) a été conduite pendant 6 jours, jusqu'à une concentration cellulaire de $15 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$, puis lancée en continu à un taux de dilution de $0,7 \text{ j}^{-1}$. Lancée concomitamment, la première culture en "continu direct" (Fig. 4b), présente un temps de latence de 8 jours. L'absence de cette phase de latence, dans la seconde culture en continu (Fig. 4c), permet d'argumenter en faveur de conditions de culture initialement défavorables dans la culture (b). Si l'on excepte cette phase de latence anormalement longue, les cultures (a) et (b) parviennent en une dizaine de jours à une concentration cellulaire équivalente, de l'ordre de $8 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. En raison de difficultés techniques, l'équilibre réel des cultures est obtenu tardivement, après 40 jours de culture, avec une concentration cellulaire de l'ordre de $10 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. Ces résultats s'avèrent comparables avec ceux de la culture (c), dans laquelle la stabilisation s'opère au bout d'une dizaine de jours, à une concentration cellulaire de $11 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. Il apparaît ainsi que les deux techniques de lancement d'un continu sont équivalentes quant à la concentration cellulaire d'équilibre atteinte.

Les analyses des anions HPO_4^{2-} et NO_3^- révèlent leur consommation rapide dans la phase batch de la culture (a) (Fig. 5a). Des résultats antérieurs (Bougaran *et al.*, 2000) ont montré que les nitrates et les phosphates sont totalement consommés, respectivement, au bout de 3 et 4 jours de culture en batch, dans des conditions similaires. Aussi, malgré l'absence d'analyses pendant les derniers jours du batch, il est probable que ces deux anions majeurs ont totalement disparu à cette période. Au contraire, dans les cultures lancées en "continu direct", les cinétiques de consommation de ces nutriments sont douces et n'engendrent pas de limitation passagère pour les cellules. Le Tableau 1 présente les consommations de N et P, calculées à l'équilibre dans les trois cultures.

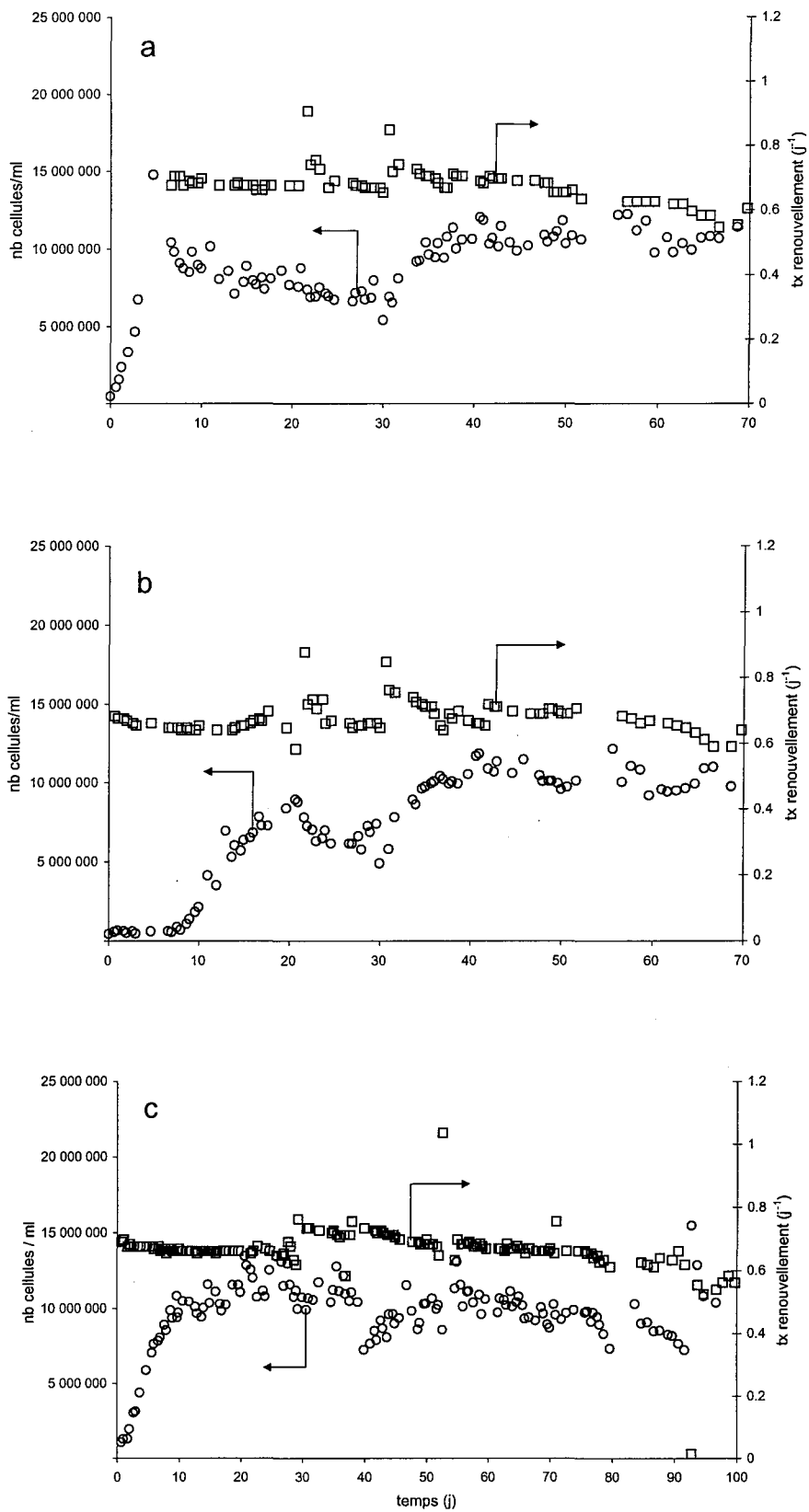


Fig. 4. Suivi de la population cellulaire et du taux de renouvellement sur trois cultures en continu. (a) avec batch initial ; (b) et (c) "continu direct".

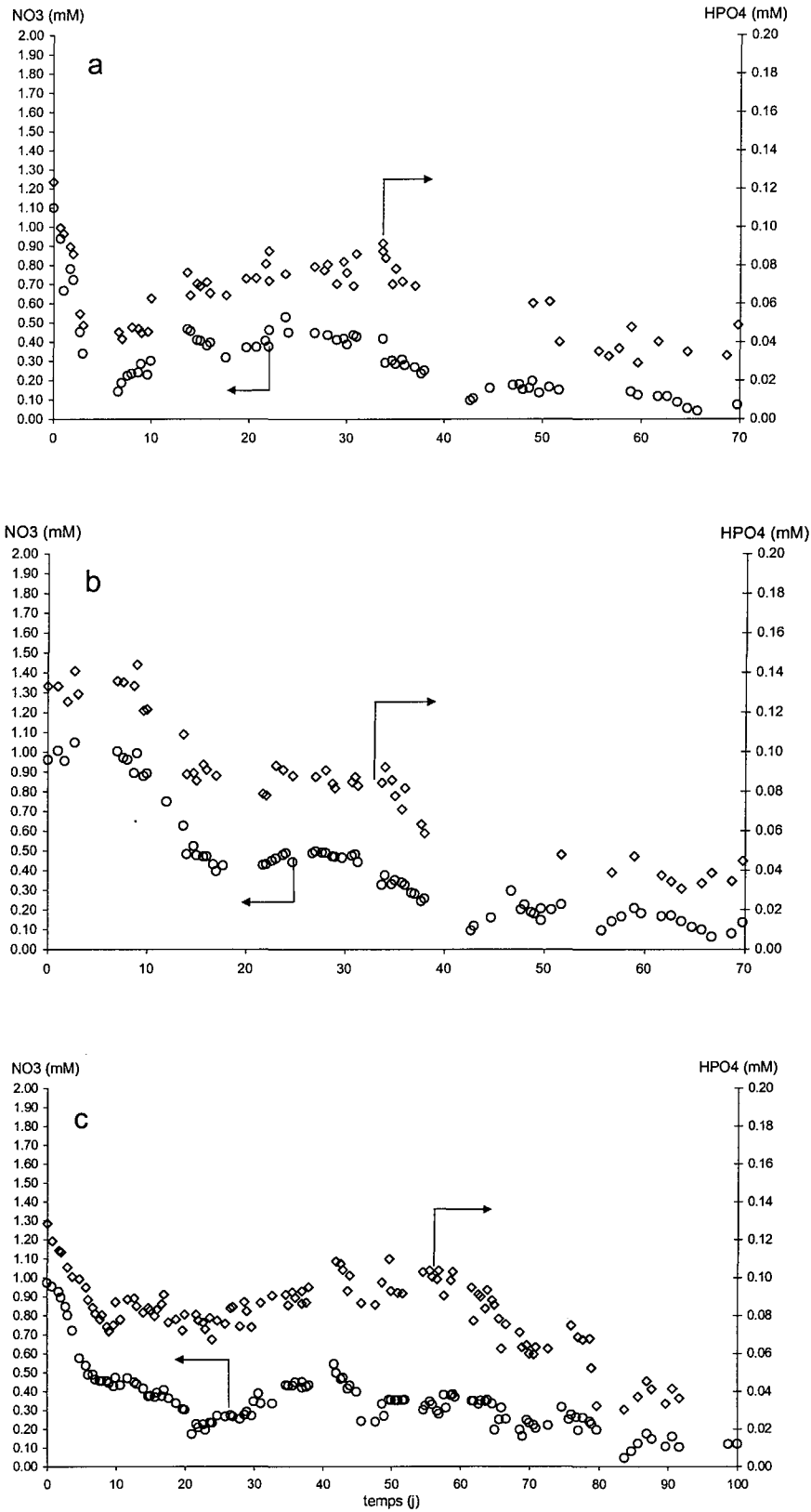


Fig. 5. Evolution des concentrations résiduelles de HPO_4^{2-} et NO_3^- , dans les trois cultures en continu. (a) avec batch initial ; (b) et (c) "continu direct".

Tableau 1. Consommations à l'équilibre de nitrate et de phosphate (exprimées en $\text{fmole}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$), calculées dans les trois cultures. L'intervalle de confiance à 95% est précisé entre parenthèses. $\mu = 0,7 \text{ j}^{-1}$

NO_3^-			HPO_4^{2-}		
Culture (a)	Culture (b)	Culture (c)	Culture (a)	Culture (b)	Culture (c)
63 (8)	63 (6)	50 (14)	6 (2)	7 (2)	3 (2)

Dans le cadre des études écophysiologiques, la technique dite de "continu direct" présente des avantages certains, parmi lesquels, l'absence d'intervention humaine apparaît primordial tant du point de vue économique que de la standardisation des conditions expérimentales. L'intervention humaine nécessaire au déclenchement de la culture en continu, après une phase batch, peut difficilement être assujettie à l'évolution très rapide de la culture dans ces conditions. Avec la technique du batch, il est nécessaire de posséder une connaissance a priori des niveaux d'équilibre, à moins de mener la culture en batch à une concentration cellulaire telle que le niveau d'équilibre recherché lui soit très inférieur. Dans cette dernière hypothèse, les risques de déséquilibres et limitations par les nutriments augmentent significativement. Cependant et c'est, sans doute, la seule restriction à l'adoption du "continu direct" en production, cette technique est plus consommatrice d'eau de mer et de solutions d'enrichissement au départ.

3.3. limitation par l'azote

Les modèles de croissance cellulaire liée aux nutriments constituent des outils descriptifs et prédictifs pour la conduite de cultures en continu. En condition de limitation par un nutriment, le modèle de Droop (Droop 1973, 1983) décrit fidèlement la croissance de nombreuses espèces d'algues, telles que *Monochrysis Lutheri* (Droop, 1974), *Selenastrum minutum* (Elrifi et Turpin, 1985), *Ankistrodesmus falcatus*, *Asterionella formosa* et *Fragilaria crotonensis* (Gotham et Rhee, 1981), *Pavlova lutheri* (Terry et al., 1985), et diverses populations naturelles (Sommer, 1991). La littérature ne fournissant pas de données appliquées au cas de T-iso, la capacité du modèle de Droop à décrire le comportement de cette algue, en réponse à une limitation par l'azote, a été testée.

Dans cette optique, deux cultures en continu ont été conduites à une dilution de 1 j^{-1} et avec des enrichissements décroissants en N, successivement 1,1 mM, 0,83 mM et 0,56 mM.

La diminution de l'enrichissement en N, de 1,1 à 0,83 mM, n'entraîne pas de modification détectable du taux de croissance, dans les deux cultures (Fig. 6). En revanche, la baisse de 0,83 à 0,56 mM se solde par une diminution de la concentration cellulaire, celle-ci passant de $5,0 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10^6$ à $3,5 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{ml}^{-1}$. A un taux de dilution de 1 j^{-1} et dans ces conditions expérimentales, le seuil de limitation par N apparaît donc pour des enrichissements en N compris entre 0,83 et 0,56 mM.

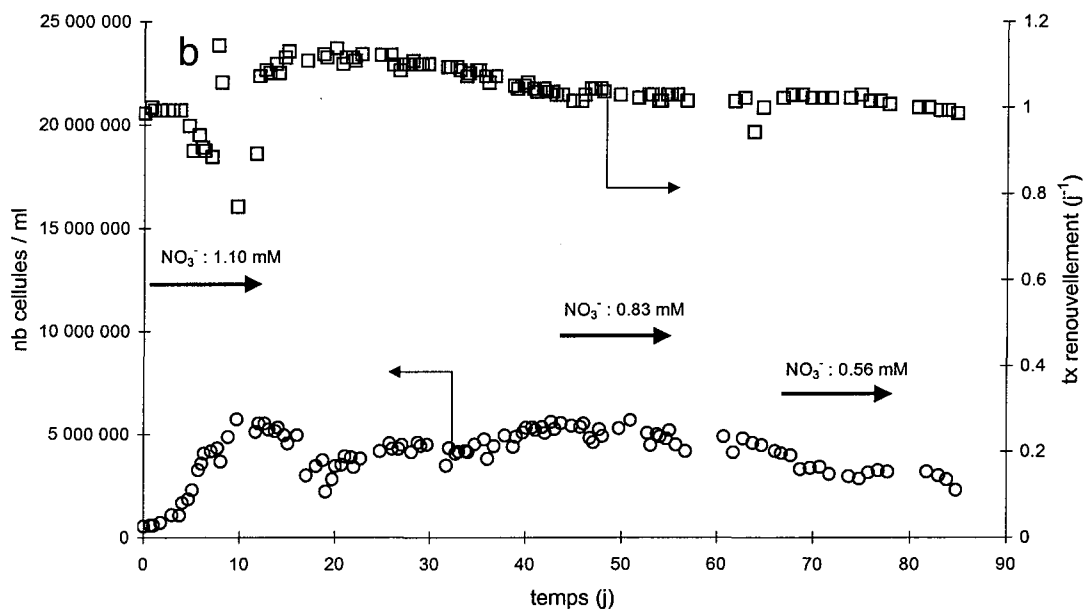
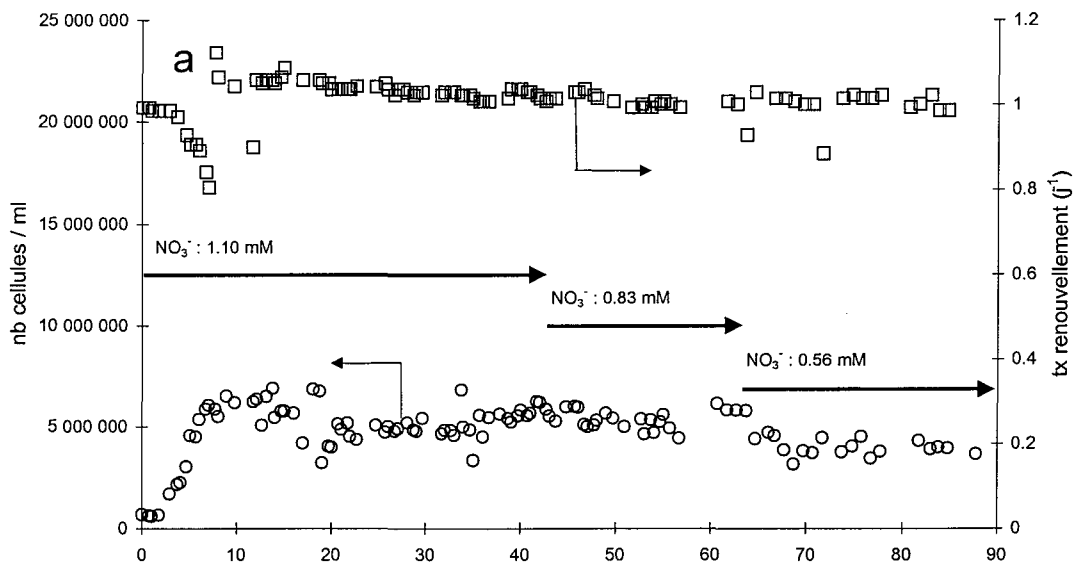


Fig. 6. Suivi de la population cellulaire et du taux de renouvellement sur les deux cultures en continu. L'enrichissement en N de la solution de renouvellement est successivement diminué de 1,1 mM à 0,83 mM, puis 0,56 mM.

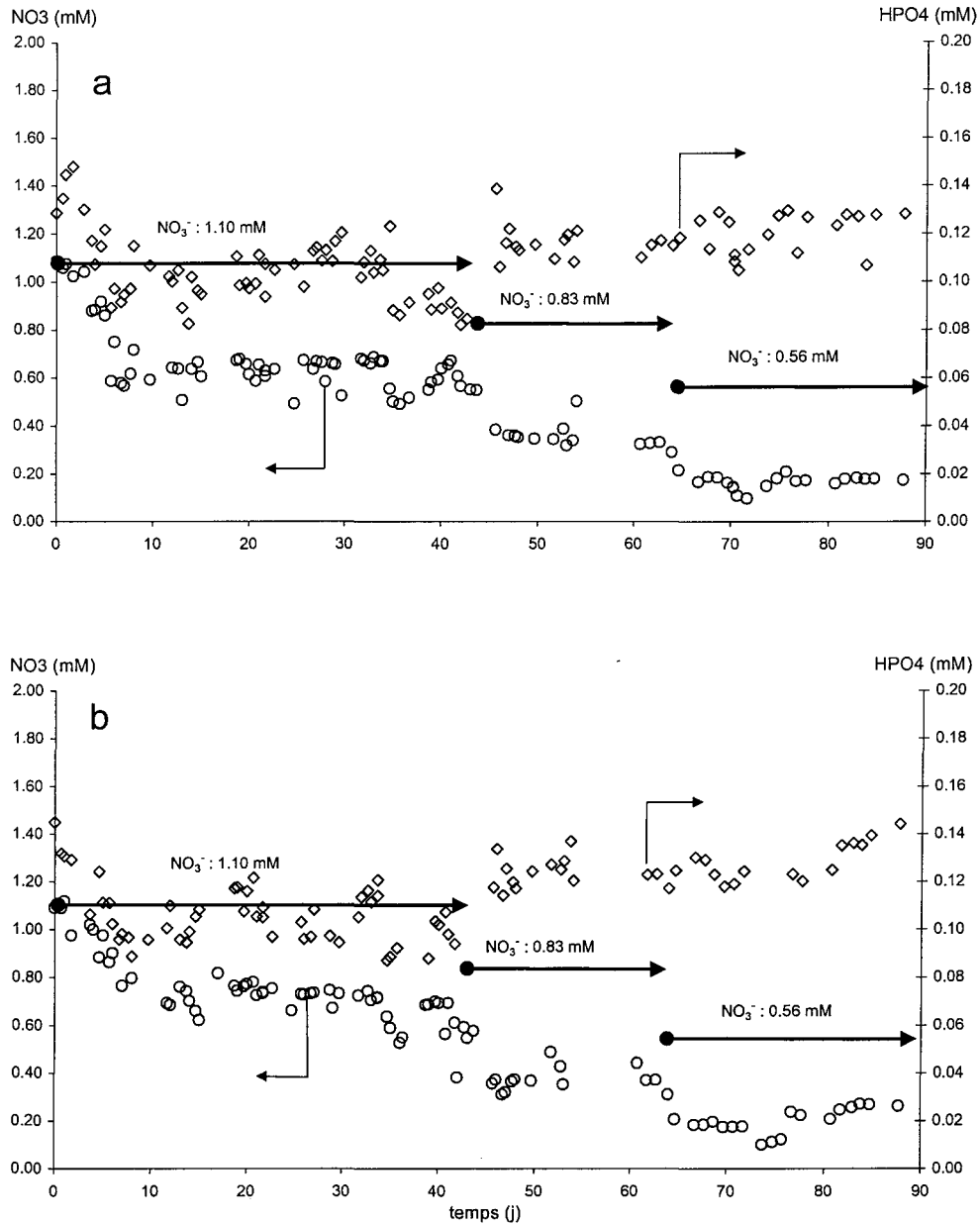


Fig. 7. Evolution des concentrations résiduelles de HPO_4^{2-} et NO_3^- , dans les deux cultures en continu

Les analyses des anions majeurs montrent une répercussion directe des baisses de concentration d'apport sur les concentrations résiduelles de N dans les réacteurs (Fig. 7). Inversement, les concentrations résiduelles de P tendent à augmenter au cours du déroulement de l'expérience. Lorsqu'une limitation se met en place, les cultures s'adaptent à ce nouveau régime par une baisse transitoire du taux de croissance, conduisant à un nouvel état d'équilibre, en terme de concentration cellulaire. Durant cette phase transitoire et en raison du lien direct existant entre la consommation de l'élément limitant et μ (Gotham, 1981), la consommation par cellule passe par un minimum. En revanche, si l'on considère les régimes établis en culture continue, les résultats indiquent que la limitation par N n'induit pas de variation sensible des consommations de N et P par cellule (Tableau 2).

L'apparition d'une limitation de la croissance par NO_3^- dans ces deux cultures, alors que les concentrations résiduelles de NO_3^- se stabilisent à 0,2 mM, semble indiquer l'existence d'un seuil au-dessous duquel les cellules ne parviennent pas, ou plus difficilement, à puiser NO_3^- dans le milieu. Les analyses effectuées dans la culture en continu à long terme (§ 3.1) apportent la preuve que cette concentration de NO_3^- de 0,2 mM n'est pas un seuil absolu, puisqu'au taux de dilution de $0,33 \text{ j}^{-1}$, les cellules épuisent totalement NO_3^- (Fig. 3). Il semble que la capacité d'assimilation de NO_3^- par les cellules est dépendante du taux de dilution imposé à la culture.

Tableau 2. Consommations de nitrate et de phosphate (exprimées en $\text{fmol.cell}^{-1}.\text{j}^{-1}$), calculées pour les trois niveaux d'enrichissement en N testés. L'intervalle de confiance à 95% est précisé entre parenthèses.

Elément	Culture	Enrichissement en N (fM)		
		$1,10.10^{12}$	$0,84.10^{12}$	$0,56.10^{12}$
NO_3^-	(a)	90 (10)	130 (20)	100 (20)
	(b)	100 (20)	100 (30)	140 (30)
HPO_4^{2-}	(a)	7 (2)	7 (2)	6 (2)
	(b)	10 (2)	4 (2)	9 (2)

De nombreux travaux ont montré que, dans les racines des végétaux terrestres, l'assimilation (par transport actif secondaire) de NO_3^- est assurée par au moins trois systèmes de transporteurs membranaires (Forde, 2000 ; Crawford et Glass, 1998). Ceux-ci possèdent des caractéristiques de cinétique différentes et sont classés en fonction de leur affinité pour le substrat et de leur caractère "constitutif" ou "inductible". Chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, deux systèmes à forte affinité (HATS) pour NO_3^- ont pu être mis en évidence (Galvan *et al.*, 1996 ; Zhou *et al.*, 1999). Machin *et al.* (2000) ont pu montrer, chez la levure *Hansenula polymorpha*, l'existence de systèmes multiples d'assimilation de NO_3^- et décrivent, en particulier, un système à faible affinité (LATS) dont la vitesse de transport diminue d'un facteur 4 lorsque la concentration externe de NO_3^- décroît de 1 à 0,1 mM. De la même manière, Cerezo *et al.* (2000) relèvent que dans les racines du Citrus, le taux d'assimilation de NO_3^- par le système HATS représente 16% de celui des LATS à 5 mM de $[\text{NO}_3^-]$ externe et seulement 4% à 50 mM.

L'ensemble de ces observations conduit à s'interroger sur la possibilité de rencontrer de tels systèmes de transport chez la microalgue T-iso. Le fait que la limitation par NO_3^- semble dépendante du taux de dilution pourrait trouver une explication à travers la mise en œuvre de systèmes à faible affinité, lorsque l'algue est en présence de concentrations résiduelles de NO_3^- supérieures à 0,20 mM. En effet, Crawford et Glass (1998) soulignent, que, dans les racines de végétaux terrestres, ce type de transporteur peut significativement contribuer au transport pour des concentrations externes en NO_3^- supérieures à 0,25 mM. Au-dessous de ces concentrations, la vitesse de transport de NO_3^- pourrait s'avérer limitante face au taux de dilution imposé. Il serait intéressant, pour mieux cerner ce phénomène, de poursuivre cette expérience à des taux de dilution plus élevés et de vérifier la relation supposée entre la limitation par NO_3^- et le taux de dilution. Si une telle relation devait se confirmer, cela pourrait entraîner des conséquences sur la formulation et l'utilisation des milieux de culture à forts taux de renouvellement.

La notion de quota interne de nutriments, développée par Droop (1968), a permis à Burmaster (1979) d'écrire un modèle, fréquemment utilisé dans la littérature, simulant le comportement des microalgues, en réponse à la composition du milieu de culture. Ce modèle, dit de Droop, est décrit par le système d'équations différentielles suivant :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_i - S) - \rho_m \frac{S \cdot X}{S + k_s}$$

$$\frac{dX}{dt} = \left[\mu^* \left(1 - \frac{k_q}{Q}\right) - D \right] X$$

$$\frac{dQ}{dt} = \rho_m \frac{S}{S + k_s} - \mu^* (Q - k_q)$$

où :

S : concentration dans le milieu de culture

S_i : concentration dans le milieu entrant

D : taux de dilution

X : biomasse

μ^* : taux de croissance maximal hypothétique. μ^* n'a pas de signification biologique, puisqu'il correspond au taux de croissance pour $Q = +\infty$

Q : quota interne. C'est la quantité d'élément limitant E par unité de biomasse

ρ_m : absorption maximale par unité de biomasse

k_s : constante de demi-saturation

k_q : quota de subsistance. Il représente le contenu minimal en élément E par unité de biomasse, en dessous duquel il n'y a pas de croissance

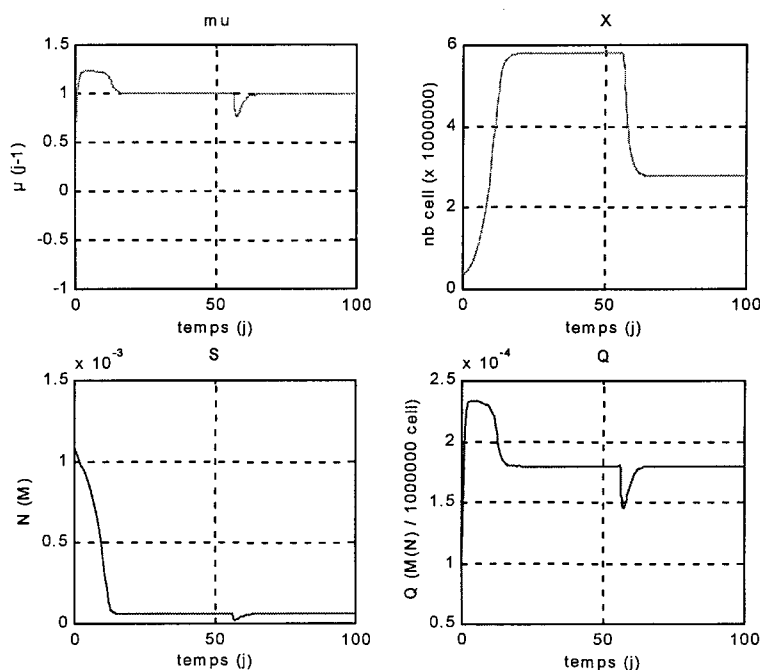


Fig. 8. Simulation d'une limitation par le substrat, à l'aide du modèle de Droop : comme dans les conditions expérimentales, à 56 jours, la concentration de S_i a été diminuée de 1,1 à 0,56 mM. Ici, $K_s = 40 \text{ fM}$, $K_q = 90 \text{ fM} \cdot \text{cell}^{-1}$, $Q_0 = 70 \text{ fM} \cdot \text{cell}^{-1}$, $\rho_m = 300 \text{ fM} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

Les simulations du comportement d'une culture de T-iso, par le modèle de Droop (Fig. 8), confirment les résultats expérimentaux, selon lesquels un substrat peut devenir limitant pour la croissance à des concentrations résiduelles non nulles. Le modèle indique également une influence directe du taux de dilution sur la concentration résiduelle de substrat. Les cellules épuisent d'autant plus le milieu que le taux de dilution est faible (simulation non présentée ici). Les tendances générales, observées sur les six cultures expérimentales, sont donc correctement décrites.

En revanche, le comportement des deux cultures expérimentales, en réponse à la limitation imposée par N, n'est pas reproduit par le modèle de Droop. Selon ce modèle, le substrat résiduel, après avoir subi une baisse transitoire, retrouve sa concentration antérieure. Il apparaît clairement que ce n'est pas le cas dans les deux cultures expérimentales limitées par N (Fig. 7), puisque la concentration d'équilibre de N résiduel chute de 0,36 ($\pm 10\%$) à 0,17 ($\pm 15\%$) mM, lorsque N devient limitant pour la croissance. Il en découle que les cellules sont susceptibles d'utiliser le substrat limitant au-delà des prédictions du modèle, qui a donc tendance à sous-estimer la productivité d'une culture de T-iso. Burmaster (1979) relève, de la même manière, que ce modèle sous-estime la population cellulaire de *Monochrysis lutheri*, à l'équilibre, dans des conditions de limitation par le phosphate,.

Comme le soulignent Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999), peu d'auteurs se sont intéressés à la consommation des nutriments dans le milieu. L'essentiel des études porte sur la relation existant entre le quota interne d'un élément et le taux de croissance. Il est donc difficile de confronter nos résultats à ceux d'une étude similaire.

3.4. Technologie de pompage

La stabilité d'une culture en continu dépend, en grande partie, de la régularité de débit de la pompe d'alimentation en milieu de culture. Au cours des expériences, il a été possible de tester trois technologies différentes de pompes, sur le long terme, aux faibles débits recherchés (0,4 à 1,4 ml.min⁻¹).

Les pompes péristaltiques ISMATEC IPC utilisées possèdent un mouvement de rotation planétaire, destiné à limiter les frottements du tube sur les galets et, donc, à accroître la longévité des tubes. L'intérêt majeur de ce type de pompe tient dans le fait qu'à aucun moment le liquide n'est en contact avec la mécanique de la pompe. Les pompes doseuses à piston rotatif ISMATEC sont d'une technologie nouvelle : le piston, en céramique, est animé d'un mouvement de translation, combiné à un mouvement de rotation qui permettent d'obtenir des débits faibles et précis (0,08 à 0,45 ml.min⁻¹). En dehors de leur entraînement par moteur pas à pas, les pompes doseuses à membrane KNF STEPDOS sont d'une technologie classique et autorisent des débits compris entre 0,08 à 80 ml.min⁻¹.

Les performances de ces différents types de pompes, présentées dans le Tableau 3 indiquent une meilleure stabilité des pompes STEPDOS, avec un coefficient de variation compris entre 3 et 5 % (calcul effectué en considérant un débit constant sur la période de référence). Le coefficient de variation des pompes péristaltiques ne traduit pas la nature des problèmes rencontrés. La stabilité du débit de ces pompes est en effet excellente tant que la structure du tube demeure intacte. Après remplacement du tube, il est en revanche difficile de retrouver un débit identique au débit antérieur. Il en résulte des perturbations importantes sur la densité de population qui nécessitent un allongement de la durée des expériences. Les performances médiocres des pompes à piston rotatif doivent, enfin, être nuancées par des résultats plus récents, montrant une stabilité de débit équivalente à celle obtenue à l'aide des STEPDOS.

Tableau 3 comparaison des performances de débit des trois types de pompes testés. Les coefficients de variation ont été calculés sur deux réacteurs, pour chaque type de pompe

	Pompe péristaltique à mouvement planétaire ISMATEC	Pompe doseuse à piston rotatif ISMATEC	Pompe doseuse à membrane STEPDOS
Coefficient de variation	11 - 14 %	9 - 17 %	3 - 5 %

Pour des raisons de fiabilité, de maintenance et d'indice de protection, les pompes présentant les meilleures caractéristiques pour alimenter une culture en continu à des débits de l'ordre de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ sont les pompes STEPDOS, commercialisées par la société KNF. Ces pompes disposent, en outre, de systèmes de connexion UNF $\frac{1}{4}$ " qui permettent l'adaptation de tubes Teflon pourvus d'épanouis. L'utilisation de ce matériau réduit considérablement les dépôts sur les parois des tubes.

3.5. Productivité et consommations des cultures en continu en bioréacteurs de 2 litres

Dans les conditions du dispositif expérimental, la courbe de productivité des cultures de T-iso présente un maximum de l'ordre de $7 \cdot 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, pour un taux de dilution de $0,6 \text{ j}^{-1}$ (Fig. 9). La baisse de productivité pour des taux de dilution plus faibles est relativement modérée, puisque l'on conserve une productivité supérieure à $6 \cdot 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ au taux de dilution de $0,3 \text{ j}^{-1}$. D'un point de vue pratique, l'adoption de faibles taux de dilution aurait plusieurs conséquences :

- meilleure utilisation de la solution d'enrichissement par les cellules et effluents moins polluants ;
- pour une production équivalente, consommation d'eau de mer moindre, générant une économie, comme dans le point précédent ;
- obtention de cultures plus concentrées, ce qui peut constituer un avantage, lorsqu'il est nécessaire de séparer la biomasse produite du milieu de culture.

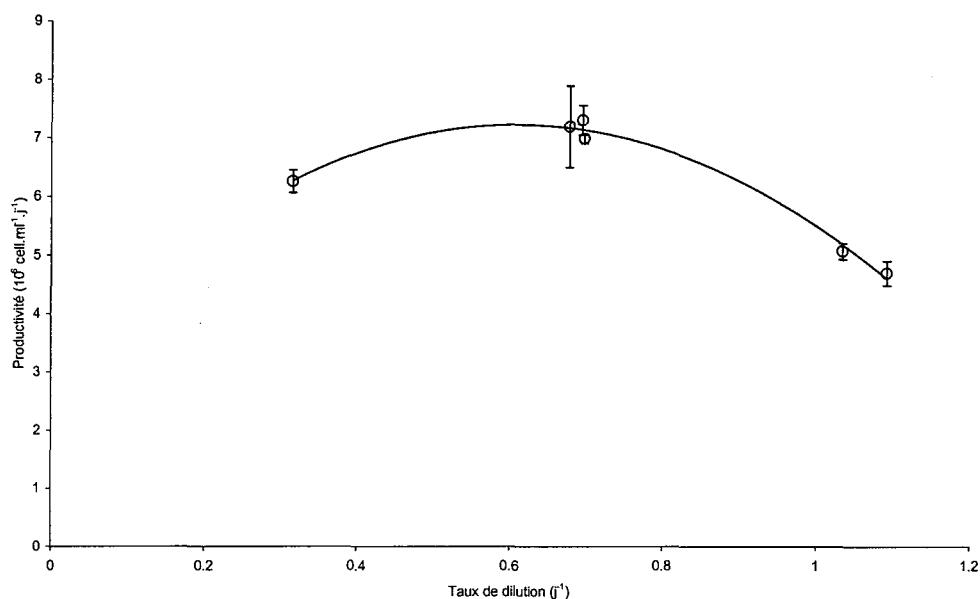


Fig. 9. Productivité des cultures en continu de T-iso en bioréacteurs de 2 litres, en fonction du taux de dilution.

Les consommations de N et P, calculées par cellule (Fig. 10), augmentent avec le taux de croissance. Terry *et al.* (1985) décrivent une relation de type hyperbolique entre les quotas cellulaires de N et P et le taux de croissance chez *Scenedesmus sp.*, *Phaeodactylum tricornutum* et *Pavlova lutheri*. En absence de consommation luxueuse, l'augmentation de la consommation par cellule de N ou de P tend à accroître le quota cellulaire de l'élément, jusqu'à un maximum, atteint pour la valeur maximale du taux de croissance (Elrifi et Turpin, 1985). Pour T-iso, il est intéressant de noter que le rapport de consommation N/P évolue peu, autour de 10, pour la gamme de taux de dilution explorée.

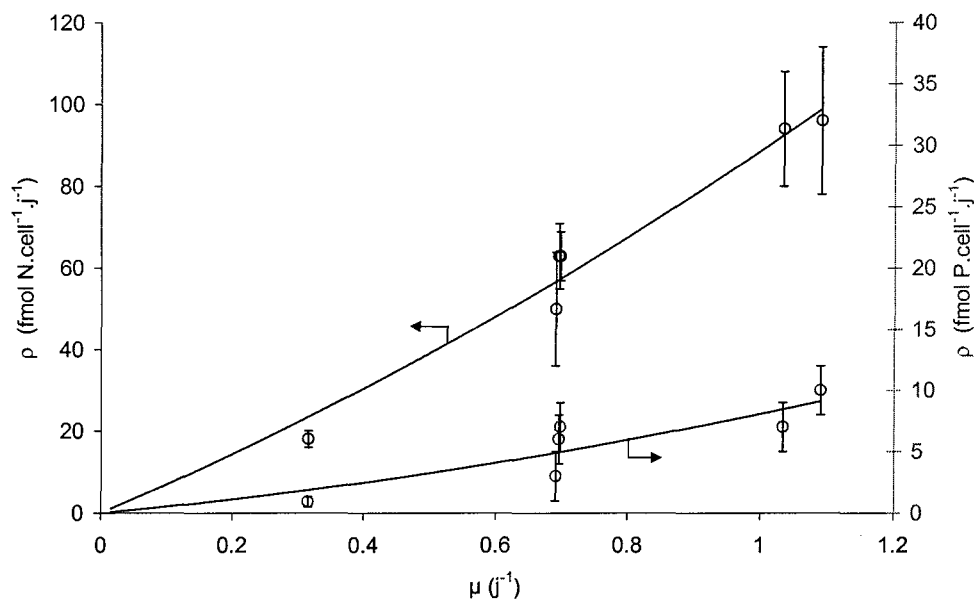


Fig. 10. Consommations (ρ) de NO_3^- et de HPO_4^{2-} , en culture continue et à l'équilibre, en fonction de la croissance spécifique.

3.6. Gestion de la lumière pour la production d'algues en continu

La concentration cellulaire des cultures en continu sur plusieurs mois montre une décroissance lente et régulière. Le suivi de l'énergie lumineuse, fournie par des tubes fluorescents initialement neufs (Fig. 11 a), à l'aide d'un capteur sphérique Li-COR, révèle une décroissance linéaire du flux de photons dans le temps, avec une pente de $-0,2$. Pour mettre en évidence l'influence du vieillissement des tubes fluorescents, au terme de la culture de six mois (§ 3.1), une nouvelle culture a été lancée dans les mêmes conditions (Fig. 11 b).

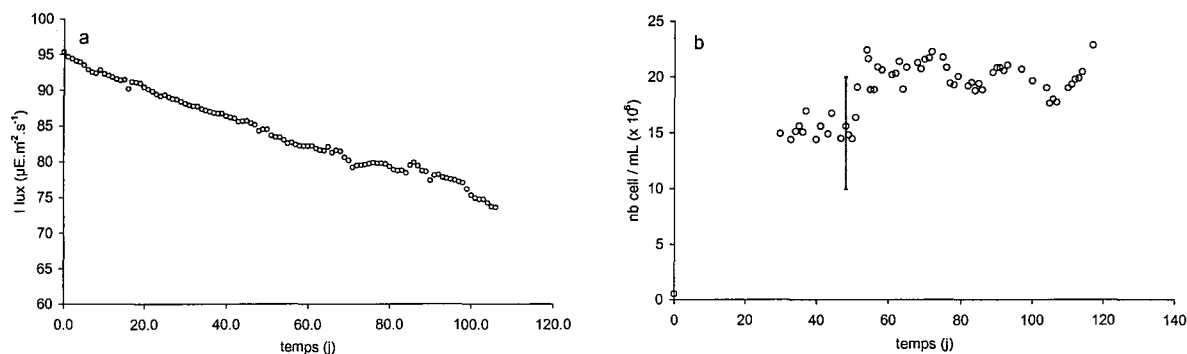


Fig. 11. (a) perte d'efficacité d'un tube fluorescent : la baisse journalière du flux de photons s'élève à $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. (b) influence de l'installation de tubes fluorescents neufs sur la productivité d'une culture en continu. La barre verticale situe le remplacement du couple de néons usagés.

La concentration cellulaire de cette nouvelle culture se stabilise à un niveau équivalent à celui atteint à la fin de culture précédente, soit $15.10^6 \pm 2.10^6$ cell.ml⁻¹. Le remplacement des tubes fluorescents provoque une augmentation du taux de croissance et une nouvelle stabilisation de la culture à une concentration cellulaire de $20.10^6 \pm 2.10^6$ cell.ml⁻¹. La baisse de rendement des tubes fluorescents est donc, au moins en partie, responsable de la diminution progressive des performances des cultures.

Les cultures en continu, principalement lorsque la lumière est le premier facteur limitant, nécessitent la constance de l'énergie lumineuse disponible. Une stratégie possible pour réduire l'impact du vieillissement des tubes sur les cultures, consiste à renouveler alternativement l'un des deux tubes fluorescents éclairant une culture. Pour une période de remplacement de 15 jours (Fig. 12 a), l'énergie lumineuse disponible pour les cultures se stabilise à une valeur moyenne de 96% de l'énergie maximale, avec des écarts maximaux à la moyenne de 2%.

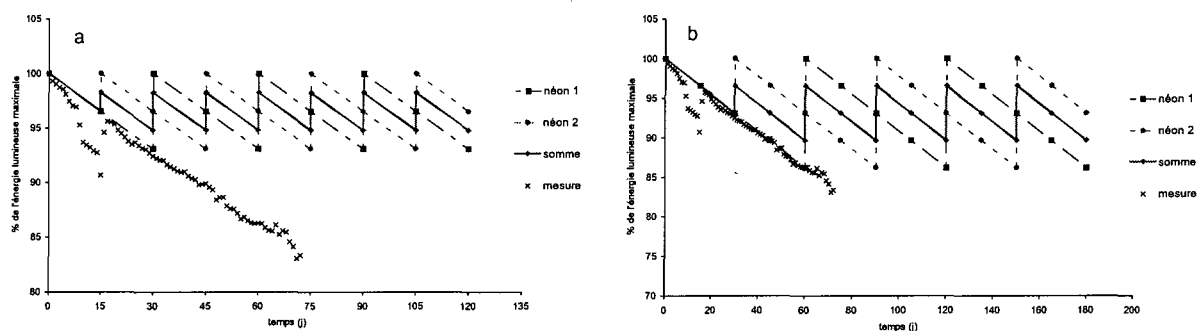


Fig. 12. Propositions de gestion de l'énergie lumineuse disponible pour les cultures. Période de remplacement d'un tube fluorescent sur deux: (a) 15 j ; (b) 30 j.

Avec une période de remplacement de 30 jours (Fig. 12 b), l'énergie moyenne n'est plus que de 93%, avec des écarts maximaux à la moyenne de 4%. Les deux stratégies présentées n'engendrent pas de différences importantes en terme d'énergie moyenne ni de stabilité. Face aux coûts et à la main d'œuvre nécessaires au remplacement des tubes, il semble qu'une période de 30 jours soit satisfaisante. Une période plus courte ne devrait être envisagée que pour des expérimentations très dépendantes de la lumière.

4. Conclusion

Les travaux menés sur la culture en continu de T-iso en petits volumes ont montré la possibilité de mener des cultures sur des durées supérieures à trois mois, dans des conditions proches de celles prévalant en éclosérie.

D'un point de vue technologique, les choix sont désormais arrêtés sur des électrodes pH à rodage Teflon et des pompes doseuses à membrane de type STEPDOS. La gestion de la lumière apparaît également comme un facteur déterminant de la stabilité d'une culture en continu. Le renouvellement périodique de la moitié du nombre de tubes fluorescents pourrait être une stratégie de stabilisation de l'énergie lumineuse.

La technique dite de "continu direct" constitue une alternative intéressante à la phase de batch préalable, utilisée classiquement. Cette méthode permet de supprimer toute intervention humaine dès le démarrage de la culture et pourrait contribuer à la réduction des coûts initiaux de la culture en continu.

La productivité volumique maximale des cultures en continu de T-iso, dans les bioréacteurs de deux litres, s'élève à $7.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}.\text{j}^{-1}$, soit $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ sur la base d'un poids cellulaire moyen de 20 pg. La productivité baisse modérément en fonction du taux de dilution lorsque l'on s'éloigne d'un optimum situé aux alentours de $0,6 \text{ j}^{-1}$. Dans les conditions d'exploitation des réacteurs utilisés ici, il est donc envisageable de pratiquer des taux de renouvellement plus faibles (jusqu'à $0,4 \text{ j}^{-1}$), moins consommateurs de substrats.

Le comportement des cellules de T-iso, face à une limitation par l'azote, soulève des interrogations quant à l'expression et aux cinétiques des transporteurs de NO_3^- . Si la dépendance supposée, entre le taux de renouvellement et la capacité d'assimilation, devait se confirmer, cela pourrait conduire à modifier les raisonnements d'optimisation de l'apport des substrats nutritifs en culture continue. L'utilisation du modèle de Droop ne permet pas de décrire les phénomènes observés.

Le transfert de la technique de culture en continu de T-iso dans les conditions d'exploitation d'une éclosérie nécessite, au préalable, de compléter les recherches sur la chimie du milieu ainsi que sur les paramètres environnementaux :

- l'optimisation de l'apport relatif des divers éléments ou classes d'éléments composant le milieu de culture, entreprise dans le cadre de la culture en batch, devra être confirmée pour la culture en continu.
- il apparaît nécessaire d'étudier les moyens d'adapter les apports de substrat nutritif aux besoins réels des cellules, en fonction des conditions de culture en continu (taux de renouvellement et concentration cellulaire). Dans ce cadre, la caractérisation des phénomènes de limitation liés à l'activité des transporteurs membranaires de NO_3^- devra être entreprise.
- enfin, parallèlement à l'optimisation du milieu de culture, les travaux porteront sur la recherche de l'optimum de croissance, pour les principaux facteurs du milieu que sont la température, le pH, la salinité et la lumière. Ces travaux seront menés dans le cadre du programme "amélioration des productions phytoplanctoniques en écloséries".

Bibliographie

- Burmester D. E., (1979). The unsteady continuous culture of phosphate-limited *Monochrysis lutheri* Droop : experimental and theoretical analysis. *J.exp. mar. Biol. Ecol.*, 39 : 167-186.
- Bougaran G., Decobecq S., Le Déan L., Lukomska E., Picquet M. L., Kaas R., Muller-Feuga, 2000. Ecophysiologie et culture en continu de *Isochrysis galbana affinis Tahiti*. R. Int. DRV/VP/PBA 2000/003, pp 28.
- Brown M R, 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of applied phycology.*, 5 : 285-296.
- Cerezo M., Flors V., Legaz F., Garcia-Agustin P., 2000. Characterization of the low affinity transport system for NO₃⁻ uptake by *Citrus* roots. *Plant Science*, 160 : 95-104.
- Crawford N. M. and Glass A. D. M., 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *in : trends in plant science*. Vol 3, No 10 : 389-395.
- Droop M. R., 1968. Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*.. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 48 : 689-733.
- Droop M. R., 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.*, 9 : 264-272.
- Droop M. R., 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 54 : 825-855.
- Droop M. R., 1983. 25 years of algal growth kinetics. A personal view. *Botanica Marina*, 26 : 99-112.
- Elrifi I. R. et Turpin D. H., 1985. Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios : a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 21 : 592-602.
- Fabregas J., Herrero C., Cabezas B., Abalde J., 1986. Biomass production and biochemical composition in mass culture of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53 : 101-113.
- Fabregas J., Toribio L., Abalde J., Cabezas B., Herrero C., 1987. Approach to biomass production of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch culture. *Aquaculture*, 36 : 245-256.
- Forde B. G., 2000. Nitrate transporters in plants : structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465 : 219-235.
- Galvan A., Quesada A., Fernandez E., 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, 271 : 2088-2092.
- Gotham I. J. et Rhee G. Y., 1981. Comparative kinetic studies of nitrate-limited growth and nitrate uptake in phytoplankton in continuous culture. *J. Phycol.*, 17 : 309-314.
- Machin F., Perdomo G., Perez M. D., Brito N., Siverio J. M., 2001. Evidence for multiple nitrate systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS microbiology letters*, 194 : 171-174.

Pruvost J., 1999. Comparison of three methods to determine the specific growth rate in batch photobioreactors. 1st International Conference on Simulation in Food and Bio industries.

Sommer U., 1991. A comparison of the Droop and the Monod models of nutrient limited growth applied to natural populations of phytoplankton. *Functional Ecology*, 5 : 535-544.

Terry K. L., Laws E. A., Burns D. J., 1985. Growth rate variation in the N:P requirement ration of phytoplankton. *J. Phycol.*, 21 : 323-329.

Valenzuela-Espinoza E., Millan-Nunez R., Nunez-Cebrero F., 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculture engineering*, 20 : 135-147.

Zhou J. J., Fernandez E. Galvan A., Miller A. J., 1999. A high affinity transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Lett.*, 466 : 225-227.

Zhu C.J., 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of applied phycology.*, 9 : 451-457.

ANNEXE

produit de base	poids moléculaire produit (g)	quantité produit (g pour 2l)	concentration finale prdt (g/l)	élément	concentration finale élément (g/l)	concentration finale (mole/l)
Sol principale						
FeCl ₃ .6H ₂ O	269	2.6	1.30E-03	Fe	2.71E-04	4.83E-06
FeCl ₃ .6H ₂ O	269			Cl	5.07E-04	1.45E-05
MnCl ₂ .4H ₂ O	197	0.72	3.60E-04	Mn	1.01E-04	1.83E-06
MnCl ₂ .4H ₂ O	197			Cl	1.28E-04	3.65E-06
H ₃ BO ₃	62	67.2	3.36E-02	B	5.96E-03	5.42E-04
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372.24	99.6	4.98E-02	Na	3.08E-03	2.68E-04
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372.24			EDTA	3.88E-02	1.34E-04
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	156	52	2.60E-02	Na	3.83E-03	1.67E-04
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	156			PO ₄	1.58E-02	1.67E-04
NaNO ₃	85	200	1.00E-01	NO ₃	7.29E-02	1.18E-03
NaNO ₃	85			Na	2.71E-02	1.18E-03
Métaux						
ZnCl ₂	135	2.1	2.10E-05	Zn	1.01E-05	1.56E-07
ZnCl ₂	135			Cl	1.09E-05	3.11E-07
CoCl ₂ .6H ₂ O	237	2	2.00E-05	Co	4.98E-06	8.44E-08
CoCl ₂ .6H ₂ O	237			Cl	5.91E-06	1.69E-07
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1236	0.9	9.00E-06	NH ₄	7.86E-07	4.37E-08
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1236			Mo	4.89E-06	5.10E-08
CuSO ₄ .5H ₂ O	250	2	2.00E-05	Cu	5.12E-06	8.00E-08
CuSO ₄ .5H ₂ O	250			SO ₄	7.68E-06	8.00E-08
Vitamines						
B1		0.2				2.96E-07
B12		0.01				3.69E-09