

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE VÉNAM  
VÉGÉTAL ENVIRONNEMENT NUTRITION AGRO-ALIMENTAIRE MER

Année 2013

Interactions microalgues-bactéries en système  
expérimental bispécifique :  
effets sur la croissance de *Dunaliella* sp.

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie, biologie des organismes et des populations, interactions

Spécialité : Phycologie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Myriam LE CHEVANTON**

*le 23 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous*

*Président du jury : M. Joël FLEURENCE, Professeur, UNIVERSITÉ DE NANTES*

*Rapporteur : M. Erwan AR GALL, Maître de conférence, CNRS/UBO/IRD/IFREMER, BREST*

*Rapporteur : M<sup>me</sup> Claire HELLIO, Reader, UNIVERSITÉ DE PORTSMOUTH*

*Examineur : M. Behzad MOSTAJIR, Directeur de recherche, UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER/CNRS/IFREMER/IRD*

*Membre invité : M. Gaël BOUGARAN, Cadre de recherche, IFREMER NANTES*

*Directeur de thèse : M. Jean-Paul CADORET, Directeur de recherche, IFREMER NANTES*







## Remerciements

---

*Ce travail n'est pas l'œuvre d'une seule personne mais représente le fruit d'une forte collaboration et cohésion au sein de l'équipe du laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues. Je tiens donc à les remercier très chaleureusement :*

*Je tiens particulièrement à remercier **Jean-Paul CADORET** (chef !), directeur du laboratoire et directeur de thèse, de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de ton équipe. Je te remercie pour m'avoir donné cette chance et surtout pour ta confiance et ton soutien sans faille tout au long de cette aventure qu'est la thèse. J'ai tant de bons souvenirs de ces années passées au laboratoire. Je resterai toujours dans mon cœur une PBA et une ambassadrice du laboratoire ! MERSI BRAS CHEF! C'était super chef!*

*Un très grand merci à **Gaël BOUGARAN**, (the Gaëlinou !) qui était mon encadrant à moi et responsable scientifique de cette thèse. Depuis mon stage de master 2 en 2008, tu m'as appris tant de choses ! Tu m'as toujours soutenue et encouragée depuis le départ. C'est aussi toi qui m'as dit de croire en mon projet de thèse ! Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir accordé beaucoup de ton temps précieux durant ces années (incluant notamment de nombreux week-ends). Merci infiniment pour ta gentillesse, ton aide, tes conseils avisés et ton dévouement. Tu as aussi fait preuve de patience avec moi, la Bretonne un peu têtue et légèrement stressée sur les bords... Tu as aussi essuyé tant de larmichettes pour, la plus part du temps, de faux problèmes (cela dit bien réels dans ma tête) ! Tes encouragements étaient toujours d'un grand réconfort! Un apprenti ne pourrait espérer meilleur maître et modèle! Et j'ajouterai aussi que «l'idéal est pour nous, ce qu'une étoile est pour un marin : il ne peut être atteint mais demeure un guide» (Albert Schweitzer). Mille mercis Gaëlinou !*

*Je voudrais aussi remercier sincèrement **Matthieu GARNIER**. Sur ce sujet pluridisciplinaire, ton expertise en microbiologie et ton aide fut précieuse. Merci pour ton soutien, tes idées, ton aide et tes nombreux encouragements. Tu t'es montré toujours disponible pour discuter des résultats, des difficultés rencontrées ou pour me remonter le moral. J'ai apprécié aussi ton regard critique et sincère. Je te remercie également pour ta simplicité et ta sympathie ! Entre ex-Brestoïis on ne pouvait que bien s'entendre ! Bonne continuation et bon courage pour ta thèse !*

*Que serais-je sans **Nathalie Schreiber** et **Ewa Lukomska** ! Je voudrais vous remercier chaleureusement pour le travail que vous avez réalisé pour cette thèse. Tout s'est enchaîné très vite mais vous avez su vous rendre disponibles (même les week-ends) pour m'aider et toujours avec le sourire ! Vous êtes toutes les deux très discrètes et pourtant vous avez accompli un gros travail durant ces trois années. Ce fut un plaisir pour moi de travailler avec vous. Merci beaucoup les filles !*

Il me reste à remercier la fine équipe du laboratoire ! Il est difficile de trouver les mots justes pour vous exprimer correctement toute ma gratitude. Grâce à vous tous, il est possible de travailler dans une ambiance agréable. Vos taquineries, blagues et autres jeux de mots, dont vous êtes spécialistes, vont tellement me manquer... A un moment ou un autre, vous avez tous contribué à m'aider au niveau expérimental, administratif, rédactionnel, offert vos conseils avisés ou tout simplement vous m'avez aidée à me sentir bien et heureuse parmi vous. Je me sens chez moi avec vous à mes côtés ! De ce fait, vous avez, vous aussi contribué à la réussite de cette thèse. Je resterai toujours votre Cocotte (y a intérêt !) ! J'espère tellement que nous continuerons à nous croiser régulièrement et que vous ne m'oublierez pas ! Merci donc à **Loïc LE DEAN** (la Tahitienne), **Raymond KAAS** (l'inspecteur gadget), **Bruno SAINT-JEAN** (Bubu l'Andalou alias Pruno Paint-Pean), **Noémie COULOMBIER** (ma copine Normande), **Catherine ROUXEL** (la maman du labo), **Isabelle RICHARD** (Catwoman), **Jean-Baptiste BERARD** (l'AQ coucou) et **Marilyse PICQUET** (la miss St Pierre et Miquelon). Une pensée aussi aux personnes de passage parmi nous : **Marine, Quentin, Thierry, Greg...**

Une pensée particulière à mon jumeau et colloc' de bureau **Benoît SERIVE** : merci pour ton soutien et nos délires! Cette thèse ne serait pas la même sans mon acolyte ! Le fait d'évoluer dans cette aventure ensemble a renforcé notre amitié ! Bonne route à toi et j'espère que nous nous recroiserons!

Je voudrais ensuite exprimer mes remerciements à **Erwan AR GALL, Joël FLEURENCE, Behzad MOSTAJIR, Sébastien LEFEBVRE** et **Claire HELLIO** examinateurs, rapporteurs et président du jury de cette thèse pour avoir accepté de juger ce travail. Un grand merci aux deux rapporteurs **Erwan AR GALL** et **Claire HELLIO** pour le temps consacré à la lecture du manuscrit. Erwan, j'ai beaucoup apprécié les stages réalisés sous ton encadrement et qui sont à l'origine de mon envie de faire une thèse. C'est toi qui m'as permis de découvrir pour la première fois le milieu de la recherche !

Je tiens à remercier également **Eric FOUILLAND** et **Olivier BERNARD** pour avoir pris part au comité de suivi de thèse. Je vous remercie de m'avoir accordé de votre temps. Merci aussi pour vos précieux conseils, la simplicité de nos échanges et aussi pour votre sympathie.

Cette thèse est née grâce au projet **Symbiose**, je remercie donc l'**IFREMER** et l'**ANR** pour le financement de ces travaux. J'ai bien sûr une pensée chaleureuse pour l'ensemble des collaborateurs du projet avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler: les personnes du **LBE** (Narbonne), de **BIOCORE** (Sophia Antipolis), d'**ECOSYM** (Sète) notamment aussi pour m'avoir permis de faire un stage au sein de votre équipe, la société **NASKEO**... Je pense particulièrement aux très bonnes relations entretenues avec **Bruno SIALVE, Jean-Philippe STEYER, Christophe VASSEUR, Monique RAS, Pierre COLLET** et j'en oublie d'autres ... Merci pour votre accueil et votre sympathie !

*Pour terminer (les meilleurs pour la fin ;-)), je voudrais remercier mon **Erwan, ma famille et ma belle-famille** pour leur soutien et leur compréhension. Je vous ai beaucoup négligé ces dernières années. Il n'est pas toujours facile d'imaginer ce que vit un doctorant : on vit dans notre bulle avec des centres d'intérêts parfois diamétralement opposés à ceux des autres, mais vous m'avez toujours compris, encouragé et aidé à relativiser les choses. La fierté que je lis dans vos yeux est la plus belle des récompenses ! Je remercie également mes amis **Coralie (ma Coco), les Christs : Christelle, Christophe, Romane** et mon p'tit **Arthur adoré, Julie et Francis, Sabine et Hansy, Larissa, Audrey, Anne-Sophie...***

*Merci à tous,*

*Kenavo,*





# Table des matières

---

Introduction générale.....	25
Introduction .....	27
Contexte de l'étude : le projet Symbiose.....	28
Les microalgues et <i>Dunaliella salina</i> .....	30
1. Origine et classification .....	30
2. Reproduction.....	33
3. Besoins fondamentaux et physiologie.....	35
○ Nutriments .....	35
○ Conditions de croissance .....	35
4. Modes de culture.....	38
○ Culture en batch.....	38
○ Culture continue .....	39
5. Systèmes de culture.....	40
6. Production mondiale et domaines de valorisation .....	43
Les bactéries .....	47
Interactions microalgues-bactéries.....	50
1. Approche théorique.....	50
○ Interactions négatives .....	51
○ Interactions neutres .....	51
○ Interactions positives .....	51
2. Approche expérimentale .....	51
○ Effets constatés chez les bactéries.....	52
○ Effets constatés chez les microalgues .....	52
3. Mécanismes d'interactions.....	54
○ Phycosphère.....	54

○ Métabolites primaires et nutriments .....	56
○ Allelopathie.....	57
○ Facteurs principaux influençant la nature des interactions.....	57
4. Applications potentielles de cultures mixtes microalgues-bactéries .....	60
Objectifs de l'étude.....	63

Partie 1- Organismes modèles pour l'étude et préambule..... 65

Obtention d'une souche microalgale axénique ..... 67

1. Introduction.....	67
2. Matériels et méthodes .....	69
○ Culture de <i>Dunaliella sp.</i> et maintien .....	69
○ Purification de la culture .....	69
○ Contrôle des populations bactériennes.....	71
3. Résultats et discussion .....	73

Souches bactériennes : Mise en place d'une collection..... 77

1. Introduction.....	77
2. Matériel et méthode .....	78
○ Isolement des souches bactériennes .....	78
○ Extraction de l'ADN bactérien .....	78
○ Amplification de l'ADN r16S.....	80
○ Séquençage et analyse phylogénétique .....	80
3. Résultats et discussion .....	80

Conclusion ..... 86

Partie 2- Influence de bactéries sur la croissance et le métabolisme de <i>Dunaliella sp.</i> .....	87
Sélection de bactéries stimulant la croissance de <i>Dunaliella sp.</i> en microplaques .....	89
1. Introduction .....	89
2. Matériel et méthode.....	91
○ Préparation des cultures mixtes <i>Dunaliella sp.</i> -bactéries .....	92
○ Criblage en microplaques .....	92
○ Suivi de la croissance algale.....	94
○ Contrôle des contaminations bactériennes.....	94
○ Calcul des paramètres de croissance et statistiques.....	95
3. Résultats.....	97
○ Suivi de la croissance algale en culture mixte : influence des populations bactériennes par plan factoriel.....	97
○ Effets des bactéries sur le taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) et le gain en biomasse ( $\Delta X_{max}$ ) de <i>Dunaliella sp.</i> .....	97
4. Discussion.....	101
○ Suivi de la croissance algale en culture mixte .....	101
○ Outil de sélection d'associations à haut débit .....	101
○ Effets des bactéries sur la croissance de <i>Dunaliella sp.</i> .....	102
○ Souches axénique et xénique de <i>Dunaliella sp.</i> .....	104
5. Conclusion .....	104
Effet de bactéries sur la croissance de <i>Dunaliella sp.</i> en photobioréacteur .....	105
1. Introduction .....	105
2. Matériel et méthode.....	106
○ Dispositif expérimental et conditions de culture.....	106
○ Matériels biologiques et préparation des <i>inocula</i> .....	106
○ Suivi des populations microalgales et bactériennes .....	108
○ Contrôle des contaminations bactériennes (isolements et RAPD).....	108

○ Dosage du carbone (COP) et de l'azote (NOP) organique particulaire par analyseur élémentaire.....	109
○ Calculs et statistiques.....	110
3. Résultats .....	111
○ Contrôle des contaminations bactériennes .....	111
○ Dynamique de population bactérienne, COP et NOP bactériens.....	112
○ Taux de croissance maximal de <i>Dunaliella sp.</i> .....	114
○ Gain de biomasse de <i>Dunaliella sp.</i> en phase stationnaire.....	115
○ Biovolume et quota cellulaire de <i>Dunaliella sp.</i> .....	117
4. Discussion .....	119
○ Outils et méthodes de sélection de cultures mixtes <i>Dunaliella sp.</i> -bactéries .....	119
○ Suivi des populations bactériennes .....	120
○ Contribution des bactéries au carbone et à l'azote organique particulaire.....	120
○ Effets des bactéries sur la croissance algale.....	121
○ Interactions <i>Dunaliella sp.</i> -bactéries négatives : compétition et amensalisme.....	122
○ Interactions <i>Dunaliella sp.</i> -bactéries positives : mutualisme.....	123
5. Conclusion.....	124

Partie 3- Étude des flux d'azote en culture continue d'un système bispécifique .....

<i>Dunaliella sp.</i> -bactéries .....	125
1. Introduction.....	127
2. Matériel et méthode .....	128
○ Dispositif expérimental .....	128
○ Modèles biologiques et préparations des <i>inocula</i> .....	131
○ Conditions de culture.....	131
○ Suivi des populations.....	132
○ Contrôle des contaminations bactériennes (isolements et RAPD) .....	132

○ Dosage du carbone (COP) et de l'azote particulaire (NOP) par analyseur élémentaire (CHN) .....	133
○ Dosage de l'azote organique (NOD) et inorganique (NID) dissous.....	135
○ Calculs et statistiques .....	136
3. Résultats.....	137
○ Rétention cellulaire différentielle sur filtre pour analyse élémentaire C et N.....	137
○ Contrôle des contaminations bactériennes.....	138
○ États d'équilibres et taux de dilution .....	139
○ Dynamiques de populations microalgales et bactériennes .....	139
○ Évolution du carbone organique particulaire (COP) et du quota cellulaire de carbone (Qc) .....	141
○ Évolution de l'azote organique particulaire (NOP) .....	142
○ Évolution de l'azote organique et inorganique dissous (NOD et NID) .....	143
4. Discussion.....	147
○ Etude des interactions en culture continue et méthode .....	147
○ Population bactérienne et croissance en culture continue .....	148
○ Compétition entre <i>Dunaliella sp.</i> et <i>Alteromonas sp.</i> SY007 pour l'azote minéral.....	150
○ Effet du taux de dilution .....	151
○ Interactions <i>Dunaliella sp.</i> - <i>Alteromonas sp.</i> : du mutualisme à la compétition .....	152
5. Conclusion .....	155
Conclusion Générale et perspectives .....	157
Références bibliographiques .....	163
Annexe .....	183
Liste des communications .....	185
Publication Algal Research 2013.....	187



## Liste des figures

---

Figure 1 : Organisation des trois unités au sein du système couplé Symbiose. ....	28
Figure 2 : Flux de matière entre les populations de microalgues et de bactéries dans les écosystèmes aquatiques naturels. ....	29
Figure 3: Représentation schématique de l'origine des Plantae et des Chromalvéolates. ....	31
Figure 4: Arbre phylogénétique présentant les principaux groupes d'Eucaryotes ....	31
Figure 5 : Planche de photographies de l'espèce <i>Dunaliella salina</i> . ....	32
Figure 6 : Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce <i>Dunaliella salina</i> . ....	34
Figure 7: Représentation schématique de l'influence de l'éclairement sur la photosynthèse chez les microalgues. ....	36
Figure 8 : Représentation schématique des différentes phases de croissance. ....	38
Figure 9: Photographies de systèmes de culture de microalgues ....	41
Figure 10: Photographies de deux modes de production industriel de l'espèce <i>Dunaliella salina</i> . ....	42
Figure 11: Arbre phylogénétique des <i>Bacteria</i> obtenu par comparaison des séquences d'ARN 16S. ...	47
Figure 12 : Observations des différentes formes d'interactions physiques microalgues-bactéries. ....	55
Figure 13 : Interactions microalgues-bactéries (synthèse) ....	59
Figure 14 : Représentation schématique du protocole appliqué pour l'axénisation de <i>Dunaliella sp.</i> ...	72
Figure 15 : Observation d'une culture de <i>Dunaliella sp.</i> avant et après traitement antibiotique. ....	74
Figure 16 : Nombre de souches bactériennes isolées, exprimé en pourcentage par embranchement algal et en nombre de souches par espèce algale ....	82
Figure 17: Répartition des souches bactériennes isolées, exprimée en pourcentage et par groupe taxonomique. ....	82
Figure 18 : Arbre phylogénétique (selon la méthode neighbor-joining) basé sur l'analyse comparée de séquences de l'ADN r16S de bactéries isolées à partir de cultures de microalgues. ....	84
Figure 19: Méthodologie du plan factoriel utilisé pour évaluer la sensibilité des proxys d'absorbance et de fluorescence de la chl <i>a</i> à la population bactérienne. ....	93
Figure 20 : Système de culture développé pour le criblage d'associations microalgue-bactérie. ....	93

Figure 21 : Effets des populations bactériennes et algales sur les mesures d'absorbance (680 nm) et de fluorescence.....	96
Figure 22: Graphiques en boîtes à moustaches présentant le taux de croissance maximal et gain en biomasse de <i>Dunaliella sp.</i> .....	100
Figure 23 : Représentation schématique et photographies du dispositif expérimental de culture. ....	107
Figure 24 : Profils d'électrophorèse des analyses RAPD 1 et 4 (random amplified polymorphic DNA) réalisés sur 2 colonies bactériennes par échantillon correspondant aux cultures mixtes. ....	113
Figure 25 : Concentration cellulaire bactérienne exprimée en cell.mL <sup>-1</sup> mesurée par cytométrie en flux à trois temps différents de la phase expérimentale. ....	115
Figure 26 : Correlation entre les paramètres de croissance ( $\mu_{max}$ et $\Delta X_{max}$ ) estimés lors des deux expériences : en microplaques et photobioréacteurs d'1 L. ....	116
Figure 27 : Représentation schématique et photographies du dispositif expérimental de culture.....	129
Figure 28 : Photographie au microscope photonique objectif x100 des cultures utilisées pour l'expérience.....	131
Figure 29 : Représentation schématique des analyses réalisées pour chaque culture et pour chaque prélèvement. ....	134
Figure 30 : Pourcentage de bactéries <i>Alteromonas sp.</i> SY007 retenues sur les filtres GF/F (0,7 $\mu$ m) et GF/D (2,7 $\mu$ m). ....	137
Figure 31 : Profils d'électrophorèse des analyses RAPD 1 et 4 (random amplified polymorphic DNA) réalisés sur 2 clones (C1 et C2) par échantillon correspondant aux cultures mixtes des photobioréacteurs 3 (P3) et 4 (P4).. ....	138
Figure 32 : Évolution de la concentration cellulaire de <i>Dunaliella sp.</i> et du débit des cultures continues en fonction du temps. ....	140
Figure 33 : Évolution de la concentration cellulaire d' <i>Alteromonas sp.</i> et du débit des cultures continues en fonction du temps.....	140
Figure 34 : Évolution du carbone organique particulaire (COP > 2,7 $\mu$ m) en fonction du temps.....	140
Figure 35 : Évolution des différents compartiments azotés et du taux de dilution appliqué au sein de chaque culture en fonction du temps.....	144
Figure 36 : Répartition de l'azote par compartiment exprimé en pourcentage d'azote par rapport à l'azote total pour les cultures témoins et mixtes. ....	145

## Liste des tableaux

---

Tableau 1: Les organismes photosynthétiques et le marché mondial .....	44
Tableau 2: Synthèse des différents types d'interactions interspécifiques et effets sur les protagonistes. (+) bénéfique, (o) ni bénéfique ni effet délétère, (-) effet délétère. ....	50
Tableau 3 : A- composition du milieu d'enrichissement de Walne modifié pour l'étude (Walne 1966) ; B- composition de l'eau de mer artificielle (ASW) d'après Lyman et Fleming (1940). ....	70
Tableau 4 : Composition du mélange concentré d'antibiotiques (100x).....	70
Tableau 5 : Synthèse des observations microscopiques réalisées à partir des cultures de <i>Dunaliella sp.</i> soumises au traitement antibiotique de différentes concentrations. ....	74
Tableau 6 : Liste des espèces microalgales utilisées pour les isollements bactériens. ....	79
Tableau 7 : Les 48 souches bactériennes de la collection testées en association avec <i>Dunaliella sp.</i> en microplaques, isolées à partir de culture de microalgues. ....	98
Tableau 8 : Morphologies, quotas et contribution des bactéries au carbone et à l'azote organique particulaire (COP et NOP) dosé sur les filtres GF/C en phase stationnaire. ....	114
Tableau 9 : Taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) de <i>Dunaliella sp.</i> , le gain en biomasse maximal ( $\Delta X_{max}$ ) de <i>Dunaliella sp.</i> en phase stationnaire exprimé en concentration cellulaire et en carbone, le quota cellulaire en carbone ( $Q_C$ ), le quota cellulaire en azote ( $Q_N$ ), le ratio carbone : azote (C :N), le biovolume de <i>Dunaliella sp.</i> , le rendement de l'azote ( $R_N$ ), le ratio bactéries : algues, la concentration cellulaire bactérienne. ....	118
Tableau 10 : Concentration cellulaire de <i>Dunaliella sp.</i> , carbone organique particulaire (COP), quotas en carbone ( $Q_C$ ) et en azote ( $Q_N$ ) des cellules de <i>Dunaliella sp.</i> , ratio carbone :azote (C :N), biovolume des cellules algales, rendement de l'azote ( $R_N$ ), ratio bactérie :algue, azote organique particulaire (NOP), COP et C :N correspondant au compartiment 0,7-2,7 $\mu\text{m}$ , azote organique dissous (NOD), azote inorganique dissous (NID). ....	142
Tableau 11 : Taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) de <i>Dunaliella sp.</i> , gain de biomasse en phase stationnaire ( $\Delta X_{max}$ ) exprimé en concentration cellulaire et en carbone, ratio carbone : azote (C :N), biovolume algal en phase stationnaire, ratio bactéries :algues en phase stationnaire, taux de croissance d' <i>Alteromonas sp.</i> SY007, azote organique dissous (NOD) et azote inorganique dissous (NID), calculés pour la phase de culture en batch. ....	146



## Liste des abréviations

---

<i>D. salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
CFB	<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>
C : N	Ratio carbone : azote mole à mole
N : C	Ratio azote : carbone mole à mole
N : P	Ratio azote : phosphore mole à mole
$\mu$	Taux de croissance
$\mu_{max}$	Taux de croissance maximal
$\Delta X_{max}$	Gain de biomasse maximale en phase stationnaire
Q <sub>C</sub>	Quota cellulaire en carbone
Q <sub>N</sub>	Quota cellulaire en azote
R <sub>N</sub>	Rendement de l'azote
COP	Carbone organique particulaire
NOP	Azote organique particulaire
NOD	Azote organique dissous
NID	Azote inorganique dissous
D	Taux de dilution
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
IQR	<i>Interquartile range</i> (écart interquartile)
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i> (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>



DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
ASW	<i>Artificial sea water</i> (eau de mer artificielle)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (acide éthylène diamine tétraacétique)
TRIS	Trihydroxyméthylaminométhane
CV	Coefficient de variation



# Glossaire

---

-*Allélopathie* : ensemble d'interactions positives ou négatives, directes ou indirectes, entre organismes (microorganismes inclus) par l'intermédiaire de métabolites secondaires.

-*Autotrophe* : un organisme capable de biosynthétiser tous les constituants cellulaires à partir de dioxyde de carbone source unique de carbone (Madigan & Martinko 2007).

-*Auxotrophe* : un organisme qui, par mutation, a perdu la capacité de synthétiser un nutriment essentiel et doit, en conséquence le trouver dans le milieu (Madigan & Martinko 2007).

-*Culture axénique* : une culture d'algue dépourvue de contaminants (1) excepté les virus ou (2) y compris les virus, et représente le contraire d'une culture xénique (Andersen 2005).

-*Cyanobactéries* : Procaryote phototrophe oxygénique contenant de la chlorophylle *a* et des phycobilines mais pas de chlorophylle *b* (Madigan & Martinko 2007).

-*Endosymbiose* : Processus ayant permis l'apparition des mitochondries et des chloroplastes dans les cellules eucaryotes à la suite de la colonisation de celles-ci par des procaryotes du domaine des *Bacteria* (Madigan & Martinko 2007).

-*Eucaryote* : Cellule dont le noyau est séparé du cytoplasme par une membrane et qui possède généralement des organelles. Les organismes eucaryotes appartiennent au domaine des Eukarya (Madigan & Martinko 2007).

-*Haploïdie / Diploïdie*: Les cellules haploïdes ne possèdent qu'un seul exemplaire du matériel génétique alors que les cellules diploïdes en possèdent deux (Andersen 2005).

-*Hétérothallie* : La reproduction sexuée nécessite le croisement de deux souches différentes (Andersen 2005).

-*Hétérotrophe* : organisme capable de biosynthétiser tous les constituants cellulaires à partir d'un ou plusieurs composés organiques comme source de carbone (Madigan & Martinko 2007).

-*Isogamie* : Les gamètes mâles et femelles ne peuvent être morphologiquement différenciés (Andersen 2005).

-*Procaryote* : Cellule dépourvue de structures internes délimitées par une membrane comme le noyau ou d'autres organelles. Les organismes procaryotes appartiennent au domaine des *Bacteria* ou des *Archaea* (Madigan & Martinko 2007).

-*Valence écologique* : représente la capacité d'une espèce à supporter des variations plus ou moins importantes d'un facteur écologique.



---

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---



## Introduction

Les microorganismes photosynthétiques occupent une fonction clé au sein des écosystèmes. A la base des réseaux trophiques aquatiques leur influence sur les cycles du carbone, de l'azote, du phosphore et du fer notamment est importante. Grâce à la photosynthèse, ces microorganismes autotrophes classés parmi les producteurs primaires ont un rôle majeur dans la mise à disposition du carbone sous forme organique ainsi que de dioxygène vers les organismes hétérotrophes des maillons trophiques supérieurs : 45% de la production primaire nette annuelle leur serait imputé à l'échelle du globe (Falkowski *et al.* 2004). Les microorganismes photosynthétiques comprennent, au sens large, tout organisme de taille microscopique, capable de pratiquer la photosynthèse et regroupent à ce titre à la fois des organismes eucaryotes et procaryotes. Les eucaryotes photosynthétiques sont communément appelés phytoplancton lorsqu'il s'agit d'organismes pélagiques ou microalgues, au sens large, comprenant à la fois les organismes pélagiques et benthiques. D'autre part, les cyanobactéries, organismes procaryotes pratiquant également la photosynthèse, ont souvent par le passé été associées aux microalgues. Cependant, outre de nombreuses fonctions communes au sein des écosystèmes, les microalgues et les cyanobactéries, constitutivement très différentes, sont aujourd'hui considérées comme deux groupes d'organismes distincts.

Les microalgues présentent une grande variété de modes de vies (mobiles, dérivant dans la colonne d'eau ou sessiles) et de morphologies cellulaires (sphériques, ovoïdes, fusiformes, cylindriques et même pyramidales). Ces organismes vivent principalement en cellules isolées de quelques microns à plusieurs centaines de microns pour les cellules les plus volumineuses, et parfois en colonies. Certains groupes ont développé des structures externes rigides aux motifs élaborés qui recouvrent la cellule et constituées principalement de silice pour les Diatomées (la frustule), de carbonate de calcium pour les Coccolithophoridés (le test) et de cellulose incrustée de silice pour les Dinoflagellées (la thèque). Cette forte diversité morphologique associée à une plasticité métabolique importante font l'ubiquité de ce groupe d'organismes. Outre leur présence dans les systèmes aquatiques marins, saumâtres et dulcicoles, certaines espèces ont fait preuve d'une forte adaptabilité et ont colonisé des écosystèmes peu favorables tels que les sols, les glaciers, les déserts et même les sources chaudes ou acides par exemple.

Du fait de ces caractéristiques uniques, les microalgues sont aujourd'hui valorisées dans de nombreux domaines et notamment les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques et aquacoles (Spolaore *et al.* 2006). D'autres voies d'application émergentes sont en cours d'étude et intéressent plus particulièrement nos sociétés actuelles telles que la production de bioénergies et la phycoremédiation (Molina Grima *et al.* 2003, Chisti 2007, Sialve *et al.* 2009, Fouilland 2012). Relativement aux plantes supérieures et aux macroalgues, ces organismes unicellulaires sont capables de convertir l'énergie solaire en biomasse avec un rendement plus élevé mais surtout une meilleure production de composés d'intérêt (Cadoret & Bernard 2008).

## Contexte de l'étude : le projet Symbiose

Le projet Symbiose est né en Janvier 2009 d'un financement de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) et s'est terminé en Mars 2012. Différentes compétences scientifiques (Ifremer, CNRS, Université de Montpellier, Inria et Inra) et industrielle (Naskéo) françaises étaient rassemblées autour d'une thématique de recherche appliquée : le couplage entre la production de microalgues et la digestion anaérobie pour la production d'énergie.

Le projet Symbiose s'inscrit dans la mouvance écologique actuelle qui privilégie l'écoresponsabilité dans la conception de nouveaux procédés industriels. Il propose, en effet, la valorisation de déchets industriels organiques et gazeux pour produire de l'énergie par voie biologique. La réduction des pollutions environnementales par le retraitement des effluents urbains, agricoles ou industriels est devenue un enjeu écologique mais aussi économique pour les industriels. De plus, avec la raréfaction des énergies fossiles ainsi que la croissance des demandes énergétiques, la production de bioénergie présente un intérêt significatif.

Le principe (Figure 1), breveté en 2009 (Bernard *et al.* 2009), repose sur la reproduction de mécanismes biologiques du milieu naturel en conditions contrôlées et optimisées (Figure 2). Tout d'abord, le carbone ( $\text{CO}_2$ ) contenu dans les effluents gazeux industriels est converti en biomasse organique au sein de la culture de microalgues par la photosynthèse. La première originalité du projet, est de cultiver les microalgues en présence de bactéries hétérotrophes sélectionnées. Il s'agit ici d'optimiser le recyclage de la matière organique, de stimuler la production primaire et de pérenniser l'écosystème. Ensuite, la matière organique produite à cette étape, est orientée vers des réacteurs de digestion anaérobie au sein desquels les populations bactériennes effectuent, en anaérobiose, la conversion en gaz méthane ( $\text{CH}_4$ ) principalement.

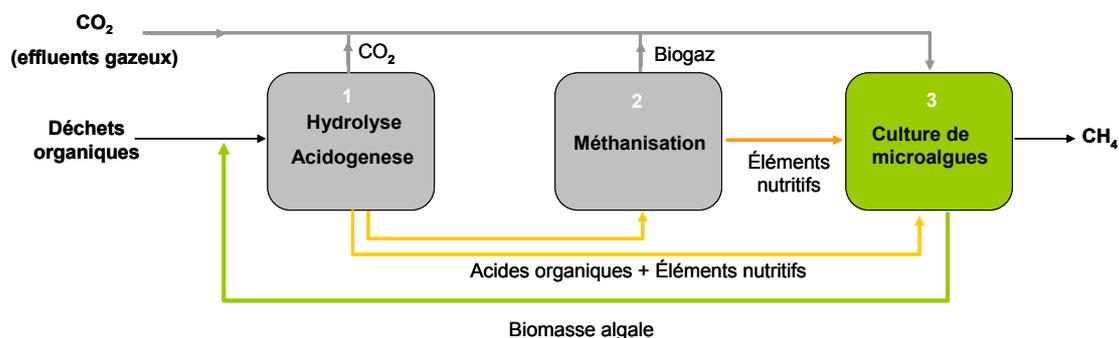


Figure 1 : Organisation des trois unités au sein du système couplé Symbiose.  $\text{CO}_2$ =dioxyde de carbone,  $\text{CH}_4$ =méthane. @Bruno Sialve Société NASKEO

La deuxième originalité du projet est le principe de la co-digestion de la biomasse algale avec un substrat organique de type effluent agricole afin d'obtenir des rapports carbone : azote : phosphore adéquats pour les rendements de méthanisation. Les résidus organiques et minéraux issus de la digestion sont ensuite transférés vers la culture mixte microalgues-bactéries où ils pourront être recyclés dans la biomasse, limitant de ce fait l'apport d'éléments nutritifs extérieurs et coûteux. Enfin, le biogaz produit constitué majoritairement de méthane mais aussi de dioxyde de carbone est purifié par injection au sein de la culture microalgale avant d'être utilisé comme énergie.

Au sein de ce contexte de recherche appliquée, un travail de thèse a été effectué au laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues de l'Ifremer qui propose d'étudier les interactions entre microalgues et bactéries hétérotrophes et aérobies en culture et plus spécifiquement celles permettant d'optimiser la production algale.

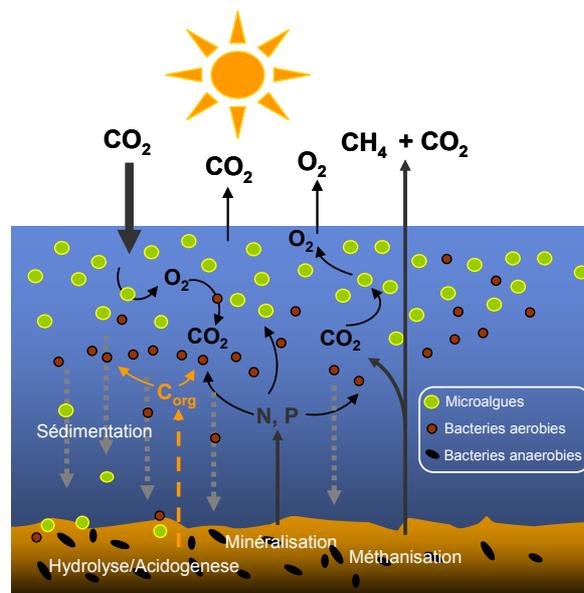


Figure 2 : Flux de matière entre les populations de microalgues et de bactéries dans les écosystèmes aquatiques naturels. N=azote, C=carbone, P=phosphore, O<sub>2</sub>=dioxygène, CO<sub>2</sub>=dioxyde de carbone, CH<sub>4</sub>=méthane. @Bruno Sialve société NASKEO

## Les microalgues et *Dunaliella salina*

### 1. Origine et classification

Les microalgues, groupe d'organismes polyphylétiques, présentent une diversité taxonomique importante. Au cours de l'évolution, différentes lignées sont apparues dont l'origine est expliquée par la théorie de l'endosymbiose basée sur l'étude des plastes (Figure 3). Tout d'abord, une première endosymbiose d'un procaryote photosynthétique (Cyanobactérie) par un eucaryote primitif expliquerait l'apparition des Plantae comprenant les chlorophytes (lignée verte) à l'origine des végétaux supérieurs, les glaucophytes et les rhodophytes (lignée rouge). D'autres endosymbioses sont apparues au cours de l'évolution et font encore aujourd'hui l'objet de discussions opposant principalement deux théories. Celles-ci s'opposent notamment concernant le nombre d'endosymbioses et la nature des cellules ancestrales impliquées. La première hypothèse et la plus controversée aujourd'hui dans la littérature est appelée « the Chromalveolate hypothesis » (Cavalier-Smith 1999). Une endosymbiose secondaire entre une algue rouge et un eucaryote aurait formé l'ancêtre de tous les Chromalvéolates à l'origine des cryptophytes, des haptophytes, des straménopiles, des ochrophytes (hétérokontophytes) et des dinoflagellées. Cependant, les différences observées au sein de ces groupes ne peuvent être complètement expliquées par cette hypothèse (Baurain *et al.* 2010). Une autre théorie, présentée par la Figure 3, et appelée « the independent acquisition hypothesis » explique l'origine des Chromalvéolates par une série d'endosymbioses (Baurain *et al.* 2010). Plusieurs dizaines de milliers à millions d'espèces de microalgues vivaient aujourd'hui sur la planète (Andersen 1992). Ces organismes présentent des physiologies variées et sont réparties dans les différents groupes taxonomiques des eucaryotes (Figure 4).

Les microalgues du genre *Dunaliella* sont des Chlorophycée (lignée verte) appartenant à l'ordre des Chlamydomonadales et à la famille des Dunaliellaceae (Polle *et al.* 2009). Ce genre a été décrit pour la première fois en 1905 par Teodoresco qui, comme de nombreux scientifiques, étudiait l'origine des colorations orangées de systèmes aquatiques hypersalés (Teodoresco 1905). Parmi les 28 espèces du genre *Dunaliella* décrites à ce jour, *D. salina* est une microalgue halotolérante répertoriée sur l'ensemble des continents à l'exception des continents arctiques et antarctiques (Oren 2005). Selon les souches et les conditions environnementales, cette espèce présente des cellules sphériques, ovoïdes ou pyriformes et des tailles variées autour de 5 à 25  $\mu\text{m}$  pour le grand axe et de 3 à 13  $\mu\text{m}$  pour le petit axe (Polle *et al.* 2009). Mobile, *D. salina* possède deux flagelles et dispose d'un unique chloroplaste cupuliforme pourvu d'un pyrénioïde central (Figure 5). La paroi cellulosique est absente, cependant les cellules sont recouvertes d'une enveloppe fine vraisemblablement de nature glycoprotéique. L'absence de paroi chez cette espèce facilite probablement son polymorphisme (Borowitzka & Siva 2007). *D. salina* est connue pour sa capacité de stockage de  $\beta$ -carotène (jusqu'à 8 % du poids sec) au sein de vésicules spécifiques ou granules (Figure 5). L'abondance de ces vésicules au sein de la cellule est responsable d'un changement

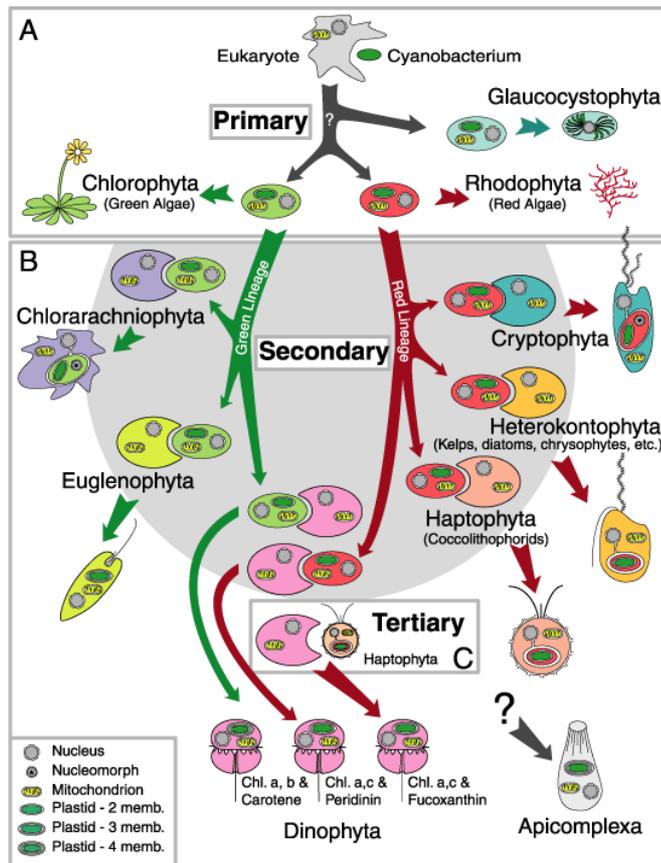


Figure 3: Représentation schématique de l'origine des Plantae et des Chromalvéolates expliquant l'apparition de différentes lignées d'algues au cours de l'évolution par endosymbioses ;A=Endosymbiose Primaire, B=Endosymbiose Secondaire, C= Endosymbiose Tertiaire (Delwiche 1999).

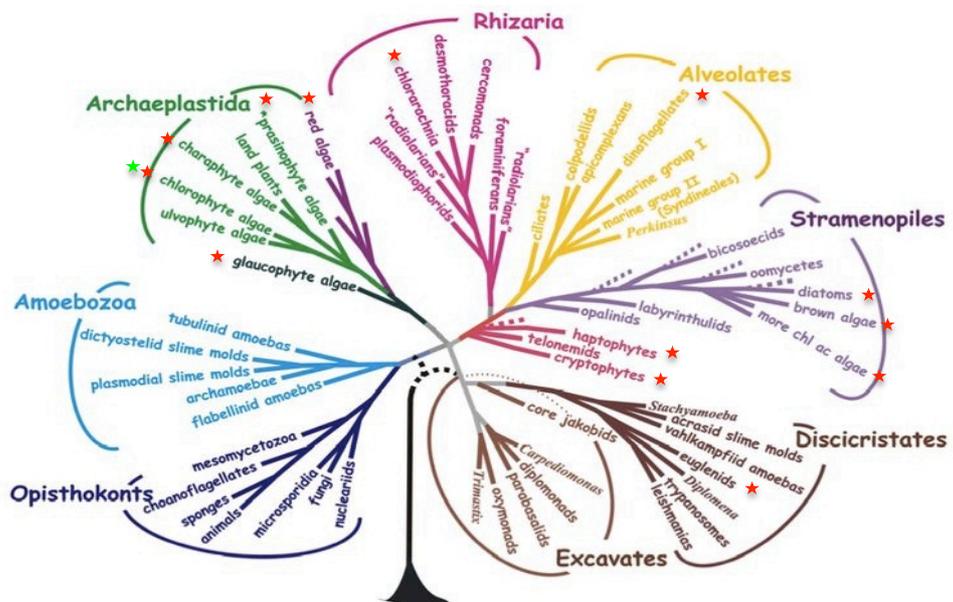
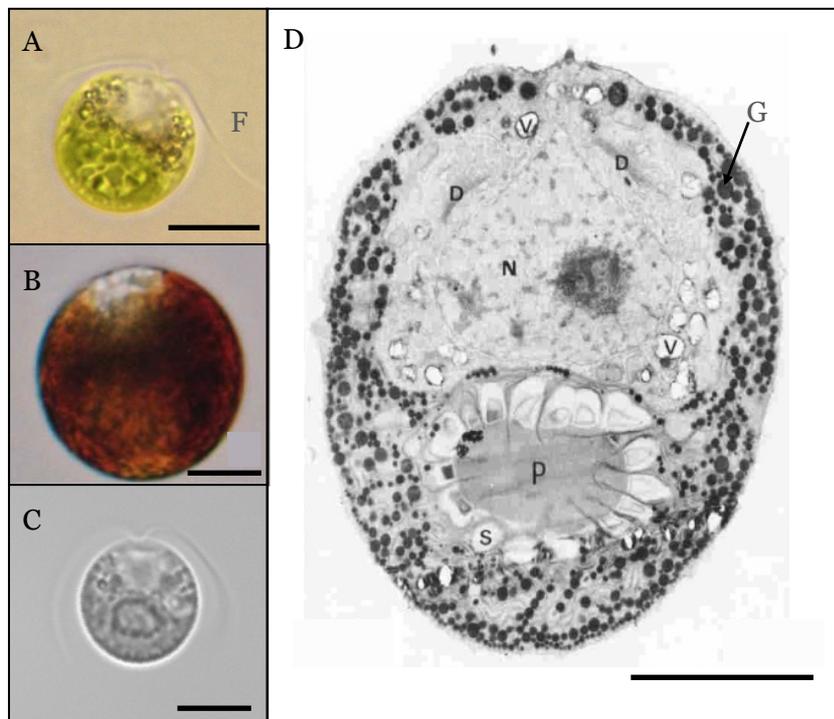


Figure 4: Arbre phylogénétique présentant les principaux groupes d'Eucaryotes et basé sur des techniques de Phylogénie moléculaire et des études ultrastructurales (Baldauf 2008) ; Positionnement taxonomiques : ★= microalgues, ★= *Dunaliella salina* .

de pigmentation de la cellule du vert à l'orange. Lors de blooms phytoplanctoniques, la concentration cellulaire importante entraîne alors une coloration orangée du milieu (Kleinegris *et al.* 2010).



**Figure 5 : Planche de photographies de l'espèce *Dunaliella salina*. A et C; Observation en microscopie photonique de la souche SAG 19.3, B ; Observation en microscopie photonique de la souche MUR23 cultivée à salinité importante (S‰=302,5) (Borowitzka & Siva 2007), D ; Coupe longitudinale en microscopie électronique à transmission (Leonardi & Cáceres 2004). Légende : D= Dictyosome, N=Noyau, F=Flagelle, P= Pyrénioïde, V=Vacuole, S= Amidon, G=Granule de  $\beta$ -carotène. Barre =5  $\mu$ m (A, C et D) ou 10  $\mu$ m (B).**

La souche SAG 19.3, provenant de la collection allemande de l'université de Göttingen, synonyme de UTEX200 et CCAP19/3, est sélectionnée pour l'étude. La position taxonomique précise de cette souche au sein du genre *Dunaliella*, n'est aujourd'hui pas encore élucidée clairement et est discutée dans la littérature. En effet, depuis les années 80 à nos jours, quelques auteurs émettent l'hypothèse d'une affiliation de cette souche à l'espèce *Dunaliella viridis*. Les arguments présentés reposent sur l'analyse de critères phénotypiques ou physiologiques tels que la pigmentation des cellules à salinité supérieure à 25 %, le taux de croissance en fonction de la salinité, la concentration en chlorophylle *a* ou la concentration en caroténoïdes (Loeblich 1982, Cifuentes *et al.* 2001, Borowitzka & Siva 2007). D'autres auteurs se basant sur des analyses comparatives de séquences ITS (espace intergénique de l'ADN ribosomal) trouvent des homologies de séquences fortes avec des souches appartenant aux espèces *D. pseudosalina* et *D. salina* (González *et al.* 2001, Mendoza *et al.* 2008). En l'absence de travaux

supplémentaires sur cette question, les contradictions entre les analyses comparatives d'ordre physiologique et d'ordre moléculaire ne permettent pas aujourd'hui de modifier la spéciation de la souche 19.3 (González *et al.* 2001). Cette souche est toujours désignée comme appartenant à l'espèce *Dunaliella salina* dans les publications et au sein des différentes collections d'organismes la référant : UTEX, CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) et SAG (Sammlung von Algenkulturen Göttingen).

## 2. Reproduction

La prolifération des microalgues s'effectue principalement par reproduction asexuée ou multiplication végétative : une cellule mère se divise alors en deux cellules filles génétiquement identiques. Cependant, comme la majorité des eucaryotes, les microalgues peuvent aussi se multiplier par reproduction sexuée. Cette phase du cycle de vie, est généralement déclenchée par des conditions environnementales particulières souvent multifactorielles. La nature de ce stimulus, peu ou pas connu, représente souvent un obstacle aux études du cycle cellulaire de certaines espèces (Coleman & Pröschold 2005).

*Dunaliella salina* présente une reproduction sexuée de type hétérothallique et isogamique avec différentes phases du cycle de vie identifiées et présentées sur la Figure 6 (Oren 2005, Borowitzka & Siva 2007). Stimulées par une dessalure du milieu ou par des conditions limitantes, deux cellules mobiles indifférenciées ou gamètes (haploïdes) fusionnent par l'apex grâce à l'émission d'un tube reproducteur pour former le planozygote. Cette cellule diploïde tétraflagellée produit une paroi résistante et perd ses flagelles pour donner le zygote. Par germination, généralement induite par une dessalure du milieu (précipitations), le zygote se divise en 4 à 8 cellules, plus rarement de 16 à 32, libérées par rupture de la paroi. La taille interviendrait dans la compétence des cellules à réaliser la reproduction sexuée. En effet, lorsque la taille des cellules végétatives est réduite, il existe un stade Palmellae intermédiaire avant la reproduction (Montoya & Olivera 1993, Borowitzka & Siva 2007). Les cellules se présentent alors dépourvues de flagelles et agglomérées au sein d'une matrice mucilagineuse.

En conditions salines non optimales ou de limitation par l'azote, les cellules végétatives peuvent évoluer en aplanospores, cellules à paroi rigide et dépourvues de flagelles, forme de résistance (cyste) de l'espèce (Borowitzka & Huisman 1993).

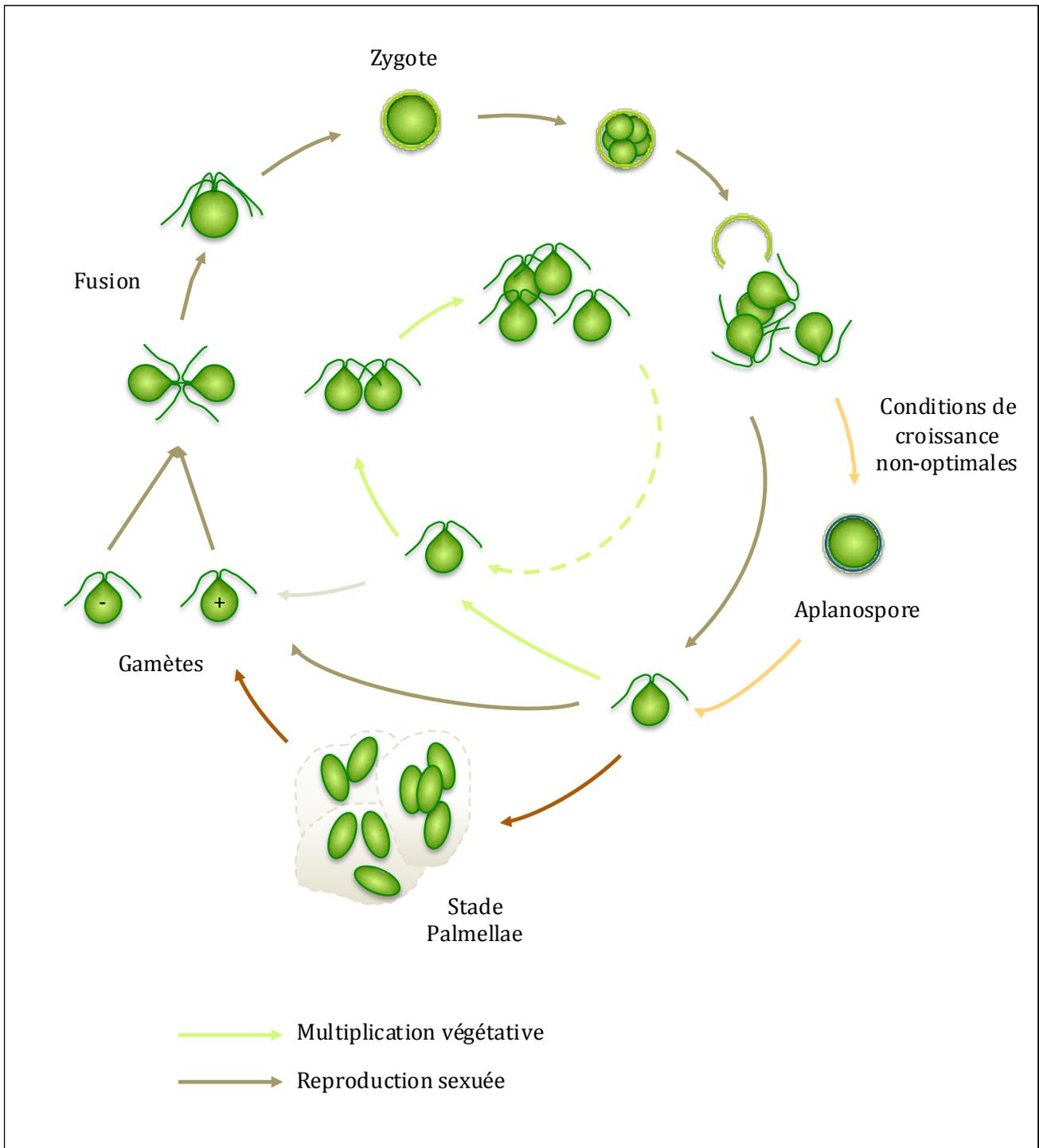


Figure 6 : Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce *Dunaliella salina*.

### 3. Besoins fondamentaux et physiologie

#### ○ Nutriments

L'activité autotrophe des microalgues requière l'acquisition d'éléments minéraux pour la croissance des cellules dont les besoins varient en fonction des espèces. D'une manière générale, les microalgues nécessitent un apport en carbone (C), azote (N), phosphore (P) et parfois en silice (Si) selon les espèces. D'après les travaux de Redfield, ces macroéléments sont présents dans la biomasse planctonique avec les ratios suivants 106 :16 :1 pour C:N:P et 106 :15 :16 :1 pour C:Si:N:P concernant les diatomées. Outre les macroéléments, des microéléments sont également nécessaires comprenant de nombreux métaux (Harrison & Berges 2005). La culture de nombreuses espèces impose l'ajout de vitamines, composés organiques, qui sont des co-facteurs d'enzymes clés du métabolisme (Croft *et al.* 2006). Croft *et al.* ont montré que sur 306 espèces de taxonomie différentes, 50% de l'échantillon avaient un besoin obligatoire en vitamines B12 (cyanocobalamine), 22% en B1 (thiamines) et 5% en B7 (biotine). A ce titre, ces microalgues sont des espèces auxotrophes dites vitamines-dépendantes. Les autres peuvent s'en affranchir par la mise en place de systèmes enzymatiques spécifiques vitamines-indépendants (Croft *et al.* 2005). L'hétérotrophie peut également être pratiquée chez certaines microalgues. A l'obscurité, l'énergie lumineuse est alors remplacée par le catabolisme de composés organiques carbonés tels que des sucres ou des acides organiques (Perez-Garcia *et al.* 2011). La culture des microalgues nécessite que l'ensemble des éléments nutritifs nécessaires soit apporté par les milieux d'enrichissement. La connaissance de ces besoins représente donc une information déterminant la cultivabilité d'une espèce.

La culture de *Dunaliella salina* ne présente pas d'exigence particulière. Cette microalgue est cultivable sur une grande variété de milieux de composition différente jusqu'au plus simple appelé ES et composé uniquement d'un mélange d'azote, de phosphore et de manganèse (Subba Rao 2009). En revanche, ce milieu ultra simplifié est utilisé en dilution dans une culture d'eau de mer naturelle, source potentielle de microéléments pour les cellules. La croissance en hétérotrophie de cette microalgue a déjà été répertoriée dans la littérature à partir de milieu complexe contenant notamment du glucose et du tryptone (Gladue & Maxey 1994). En revanche, la croissance notée dans ces conditions était faible.

#### ○ Conditions de croissance

Si l'ensemble des sels nutritifs est présent dans le milieu, les facteurs écophysologiques doivent être favorables pour permettre la croissance des microalgues. Il s'agit principalement des facteurs lumière, température, pH et salinité. Chaque espèce sélectionnée et adaptée à son environnement a développé au cours de l'évolution des préférences concernant ces paramètres. Considérant un facteur isolé, chaque espèce se développe de manière optimale pour une valeur donnée du paramètre. En s'écartant de ce préférence, les conditions sont moins favorables à la croissance. Celle-ci diminue plus ou moins rapidement en fonction de la valence écologique de l'espèce considérée. Les facteurs influençant la

physiologie des microalgues peuvent aussi agir en synergie : l'effet physiologique d'un facteur A est différent en fonction de l'intensité du facteur B. Marchetti *et al.* (2012) ont justement observé des interactions significatives de facteurs agissant sur la croissance de la microalgue fourrage *Isochrysis affinis galbana* : interactions pH-température et pH-éclairage.

La lumière représente la source d'énergie pour les organismes photosynthétiques et est, par conséquent, un facteur écophysio-logique très important pour leur survie dans un milieu. L'éclairage influence fortement la photosynthèse tel qu'illustré dans la Figure 7. La photosynthèse brute représente la somme de la photosynthèse nette et de la respiration. Pour des valeurs d'éclairage faibles et jusqu'au point de compensation, la photorespiration est plus importante que la photosynthèse brute. Il n'y a alors pas de photosynthèse nette et donc pas de croissance. Au delà du point de compensation, la photosynthèse augmente linéairement avec l'éclairage. Cependant, pour des valeurs d'éclairage plus importantes, on observe une perte de linéarité jusqu'au recrutement de la totalité des sites collecteurs se traduisant par une activité photosynthétique maximale  $P_{max}$ . En condition supra-optimale, un phénomène de stress lié au trop fort éclairage et appelée photoinhibition est observé entraînant une diminution de l'activité photosynthétique (Vonshak & Torzillo 2004).

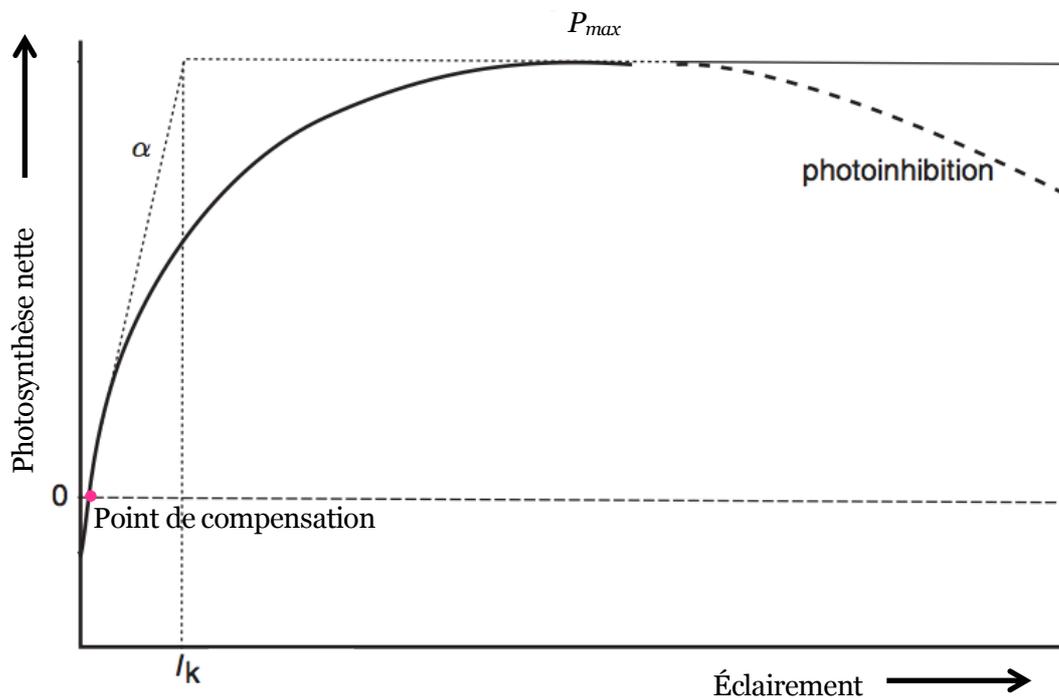


Figure 7 : Représentation schématique de l'influence de l'éclairage sur la photosynthèse chez les microalgues (Vonshak & Torzillo 2004) ;  $I_k$  représente l'intensité lumineuse de saturation,  $P_{max}$  la photosynthèse maximale et  $\alpha$  le taux de photosynthèse.

Outre la photosynthèse, les facteurs environnementaux et notamment la nature du facteur limitant affectent d'autres activités métaboliques et ainsi la composition biochimique des microalgues (Hu 2004). Une limitation par l'azote favorisera le stockage de carbone sous forme de triglycérides par exemple (Weldy & Huesemann 2007). Une étude de l'effet de ces facteurs représente donc une étape indispensable pour la valorisation des microalgues afin d'optimiser les rendements de production en biomasse et du ou des composé(s) d'intérêt.

*Dunaliella salina* est une espèce remarquable du point de vue de sa valence écologique puisque cette espèce est capable de supporter de larges gammes de variations de nombreux facteurs environnementaux. Tout d'abord, *D. salina* est connue pour vivre à des salinités très importantes jusqu'à saturation (environ 35 %) grâce à la mise en place de mécanismes osmotiques protecteurs (Hosseini Tafreshi & Shariati 2009). Cette espèce supporte de larges gammes de salinités jusqu'à des salinités pratiquement nulles, faisant d'elle l'espèce eucaryote la plus euryhaline. Selon les souches, il semblerait que la salinité optimale oscille entre 5 et 15 % (Cifuentes *et al.* 2001). Ensuite, *D. salina* est une espèce capable de croître à des éclairagements variés de 50 à 1500  $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec une croissance maximale atteinte à 800  $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Baroli & Melis 1996). L'optimum thermique se situe quant à lui entre 20 et 40°C selon les souches et les conditions environnementales (Subba Rao 2009). Sa capacité de croissance à température élevée augmente par exemple avec la salinité, mettant en évidence l'interaction entre ces deux facteurs chez cette espèce. Enfin, cette espèce supporte également une large gamme de pH entre 5,5 et 10 avec un optimum situé entre 7 et 8 (Subba Rao 2009).

Le métabolisme de *D. salina* est également fortement influencé par certains paramètres environnementaux. La particularité de cette espèce est d'accumuler en grande quantité du  $\beta$ -carotène (jusqu'à 10% du poids sec) au sein de granules intracellulaires (Figure 5) (Jin & Polle 2009). La synthèse de ce composé lui permettrait de résister aux forts éclairagements par absorption d'une partie du spectre lumineux. La caroténogénèse est favorisée en condition de stress intense pour les cellules et particulièrement en condition de fort éclairagement mais aussi de forte salinité, limitation nutritive (azote, phosphore, soufre et fer) et forte température (Oren 2005, Jin & Polle 2009, Subba Rao 2009, Hosseini Tafreshi & Shariati 2009). Dans ces conditions pour lesquelles la croissance est très faible, une synthèse d'acides gras accompagne la caroténogénèse (Lamers *et al.* 2010). Une autre particularité chez cette espèce est l'accumulation de glycérol particulièrement en condition de fortes salinités. Ce composé serait impliqué dans la capacité de *D. salina* à résister aux contraintes osmotiques en conditions de stress salin (Oren 2005).

## 4. Modes de culture

### ○ Culture en batch

La culture en batch représente un mode de culture très utilisé pour sa simplicité de mise en œuvre et son faible coût en matériel et en maintenance. Ce mode de culture repose sur un principe de production séquentiel des microalgues. Une partie de la biomasse produite en quelques jours est ensuite utilisée pour inoculer une nouvelle culture.

Les microalgues constituant l'inoculum sont transférées dans un milieu de culture frais et enrichi. Si les facteurs environnementaux le permettent, la croissance débute et connaît différentes phases caractéristiques (Figure 8) : tout d'abord, une phase de latence (1) est parfois observée dont la durée dépend du degré d'adaptation nécessaire des cellules aux nouvelles conditions de culture.

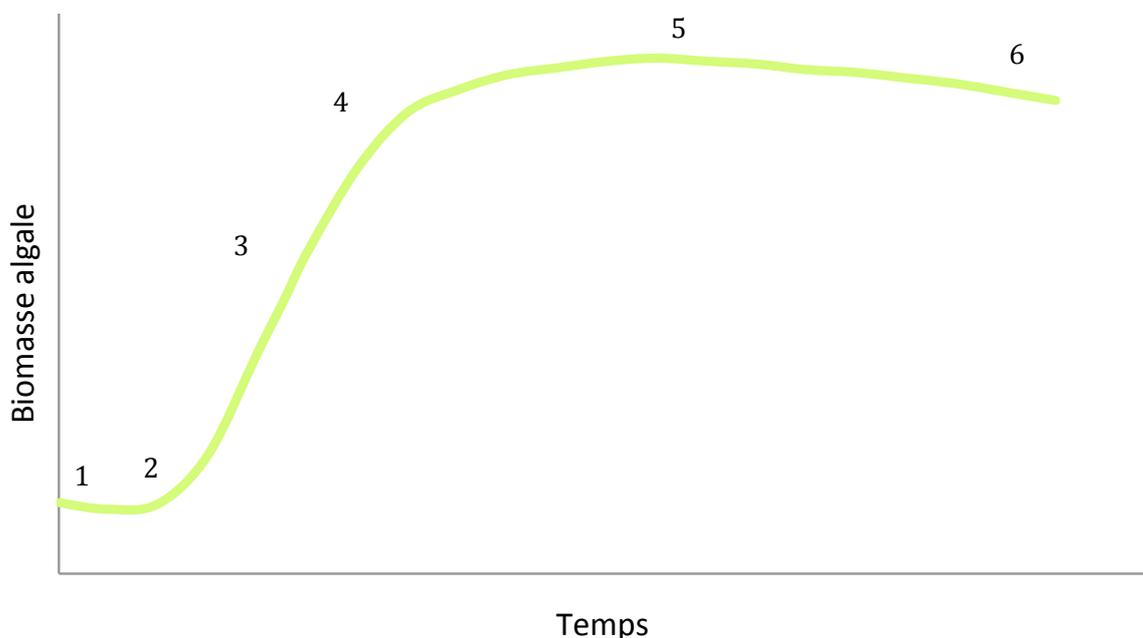


Figure 8 : Représentation schématique des différentes phases de croissance. Légende: 1=Phase de latence, 2=Phase de croissance maximale, 3= Phase de croissance linéaire, 4= Phase de ralentissement, 5= Phase stationnaire, 6= Phase de sénescence.

Au cours de cette phase qui dure de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, le taux de croissance est nul. Ensuite, au cours de la phase exponentielle (2), les cellules se multiplient jusqu'à atteindre leur taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$  en  $j^{-1}$ ), les facteurs de croissance n'étant pas limitant à ce stade. Cette phase est relativement éphémère et dure quelques heures. Pendant la phase linéaire (3), le taux de croissance ralentit progressivement en raison d'une limitation croissante d'un des éléments nécessaire à la croissance. Celle-ci peut durer plusieurs jours. Ensuite, la raréfaction du facteur limitant entraîne inévitablement une phase de ralentissement (4) importante de la croissance. Au moment de la phase

stationnaire (5), le taux de croissance est nul en raison d'une carence des cellules. Au cours de cette phase, le carbone fixé par la photosynthèse est orienté vers des pools de métabolites de réserves et également vers l'extérieur de la cellule. Enfin, lorsque la carence est prolongée, une mortalité des cellules est observée au cours de la phase de sénescence (6).

Dès lors qu'une production de microalgues en batch est nécessaire, il est préférable de récolter les cellules au stade 4 pour constituer l'inoculum du batch suivant. En effet, au moment de la phase de ralentissement, la biomasse algale tend vers la biomasse maximale tandis que les cellules ne sont pas encore carencées.

#### ○ Culture continue

Le second mode de culture dit continu, comme son nom l'indique, consiste à produire des microalgues de manière pérenne contrairement au mode de production séquentiel. Le principe repose sur l'application d'un flux entrant, contenant les éléments nutritifs, à un système de culture de volume constant contenant les microalgues. Par conséquent, le flux d'entrée impose au système un flux sortant de même débit correspondant à la production en biomasse algale et représenté par le bilan matière suivant (Équation 1) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX \quad \text{Équation 1}$$

Avec :

**X**, la biomasse algale en g.L<sup>-1</sup>

**t**, le temps en jours

**$\mu$** , le taux de croissance spécifique en j<sup>-1</sup>

**D**, le débit ou le taux de dilution du système en j<sup>-1</sup>

La production algale débute par l'ensemencement du système contenant un milieu enrichi soumis à un taux de dilution journalier (D). La concentration cellulaire au sein du système augmente jusqu'à atteindre un état stable appelé équilibre ( $dX=0$ ) qui peut en théorie s'étendre à l'infini. A ce stade, le taux de croissance égale le taux de dilution appliqué au système ( $\mu=D$ ).

Outre l'évolution de la biomasse algale, la cinétique des nutriments (S) dans le système peut être représenté par un autre bilan matière (Équation 2) :

$$\frac{dS}{dt} = -\rho X + D(S_i - S) \quad \text{Équation 2}$$

Avec :

**S**, la concentration en nutriments en  $\text{g.L}^{-1}$

**t**, le temps en jours

**S<sub>i</sub>**, la concentration en nutriments en entrée en  $\text{g.L}^{-1}$

**D**, le débit ou le taux de dilution du système en  $\text{j}^{-1}$

**X**, la biomasse algale en cellules.  $\text{L}^{-1}$

**$\rho$** , la vitesse d'absorption des nutriments par cellule en  $\text{g.cellule}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Ce mode de culture présente de nombreux intérêts. En effet, la culture en batch, simple d'utilisation et intéressante pour la production de biomasse, présente l'inconvénient d'évoluer de manière dynamique du début à la fin de la culture. La biomasse et les facteurs environnementaux (éclairage, quantité de nutriments) varient constamment au cours de la culture. La culture continue, quant à elle, propose l'analyse d'états stables au moment de l'équilibre du système et permet donc d'étudier plus finement les réponses physiologiques, en découplant les facteurs influents. De même, pour une application industrielle, la culture continue propose une production automatisée et une qualité constante de la culture et donc du ou des produit(s) d'intérêt.

## 5. Systèmes de culture

Avec la valorisation croissante des microalgues, une diversification des systèmes de culture est observée. Ceux-ci présentent des principes de fonctionnement variés mais surtout des géométries très différentes (Figure 9). Pour l'étude ou la valorisation d'une espèce, le choix du matériel de production représente un critère essentiel, la productivité mais aussi les coûts étant dépendants du système (Morita *et al.* 2000, Lee 2001, Shen *et al.* 2009). Outre cette grande diversité, les systèmes de production peuvent être regroupés sous deux familles.

La première catégorie rassemble les systèmes dits « fermés » qui ont la particularité de protéger physiquement la culture des contaminations procaryotes et eucaryotes et de plus ou moins contrôler les paramètres environnementaux selon les systèmes : éviter la dessalure, l'évaporation et appliquer des conditions de culture favorables à l'espèce en régulant la température, la lumière, le pH par exemple. Cette catégorie regroupe les photobioréacteurs cylindro-coniques et les sacs de culture de différents volumes, pour les moins sophistiqués, et les photobioréacteurs plus élaborés et dimensionnés pour les études en laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle. Ces systèmes représentent les matériels de culture généralement considérés comme les plus productifs (Hosseini Tafreshi & Shariati 2009). Le coût de production, lié aux prix des installations hautement technologiques et de leur maintenance, est en revanche conséquent et doit donc s'adresser à de la valorisation de produits à haute valeur ajoutée pour laquelle la qualité de la culture est primordiale.

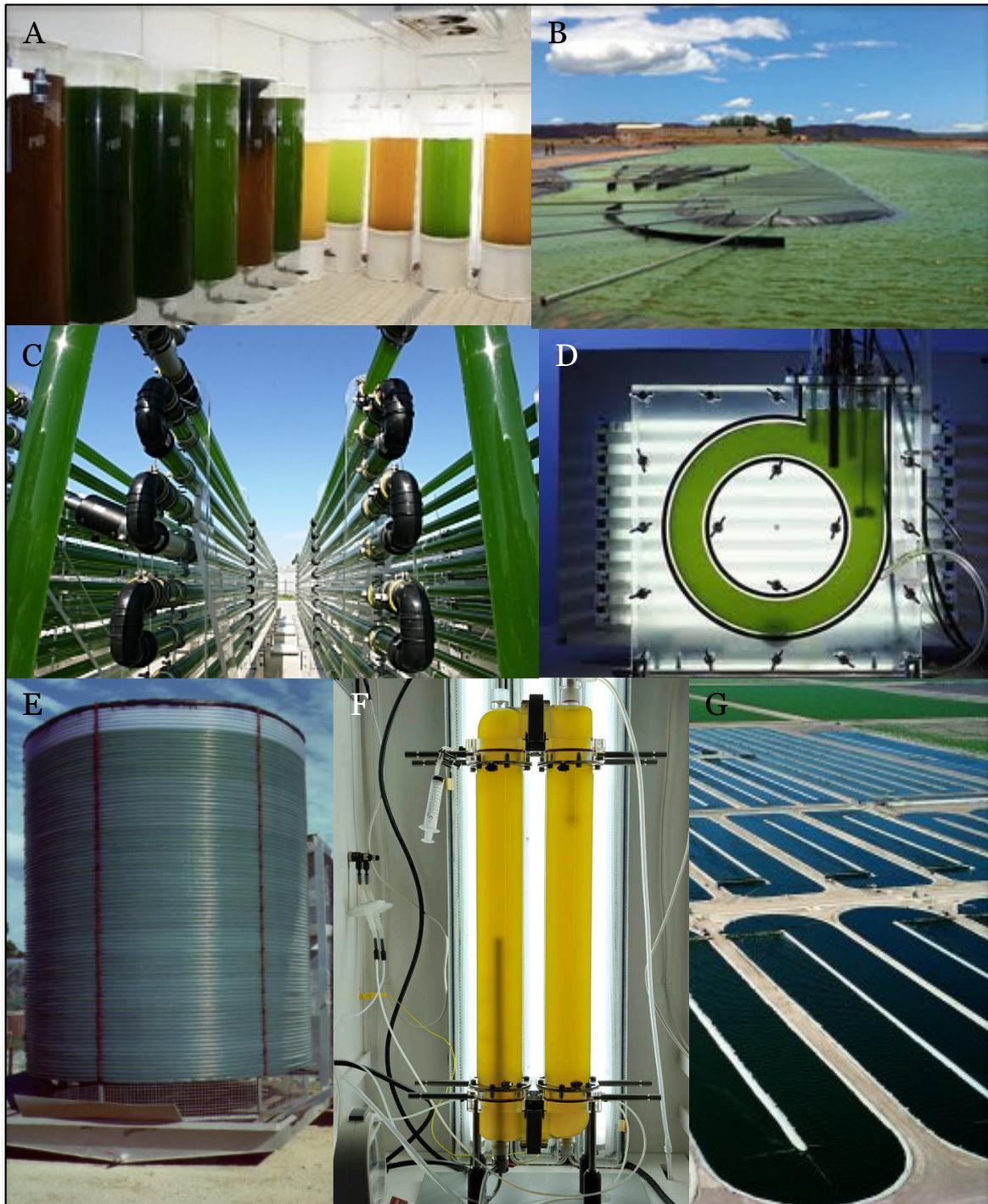


Figure 9: Photographies de systèmes de culture de microalgues ; A=Photobioréacteurs cylindro-coniques @Ifremer, Jean Prou, B=Open pond chez Aurora Algae en Australie, C=Photobioréacteurs de l'Algaeparc aux Pays Bas, D=Photobioréacteur torique du laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues de l'Ifremer, E=Photobioréacteur tubulaire d'un volume de 1000L en Australie, F= Photobioréacteur tubulaire du laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues de l'Ifremer, G=Raceway de la société Microbio Inc. en Californie culture de *Arthrospira platensis*.

Les microorganismes photosynthétiques cultivés avec succès en photobioréacteur d'échelle industrielle sont principalement des espèces du genre *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Chlorella* et *Tetraselmis* (Behrens 2005).

Une autre stratégie moins onéreuse consiste à cultiver les microalgues en milieu dit « ouvert », deuxième famille de système de production. Ces installations du type « lagune » ou « open pond » et « champ de course » ou « raceway », généralement considérées comme moins productives, peuvent toutefois permettre une monoculture avec un rendement intéressant (Blanco *et al.* 2007, Zeng *et al.* 2011) et notamment en se plaçant en conditions extrêmes du point de vue de la salinité ou du pH par exemple (Lee 2001). Au sein de ce groupe, différents niveaux technologiques peuvent être identifiés. En effet, ces systèmes seront plus ou moins élaborés selon les besoins : du système de lagunes sans contrôle des conditions de culture, jusqu'au raceway à la géométrie étudiée et équipé de technologies d'agitation ou d'injection de dioxyde de carbone par exemple. Les microorganismes photosynthétiques cultivés avec succès en systèmes ouverts pour l'industrie sont principalement les espèces *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis sp.*, *Porphyridium sp.*, *Monodus sp.*, *Scenedesmus sp.* et *Phaeodactylum tricorutum* pour les microalgues et *Arthrospira platensis* pour les cyanobactéries (Borowitzka 2005).

*Dunaliella salina* est majoritairement produite au sein de systèmes ouverts très simples et extensifs, généralement localisés dans des régions au climat chaud, sec, ensoleillé et proches d'une source d'eau de mer (Hosseini Tafreshi & Shariati 2009) (Figure 10). Les productivités rencontrées vont de 0,05 à 1 g.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup> pour les lagunes les plus simples jusqu'à 5 à 10 g.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup> pour les raceway plus élaborés (Hosseini Tafreshi & Shariati 2009).

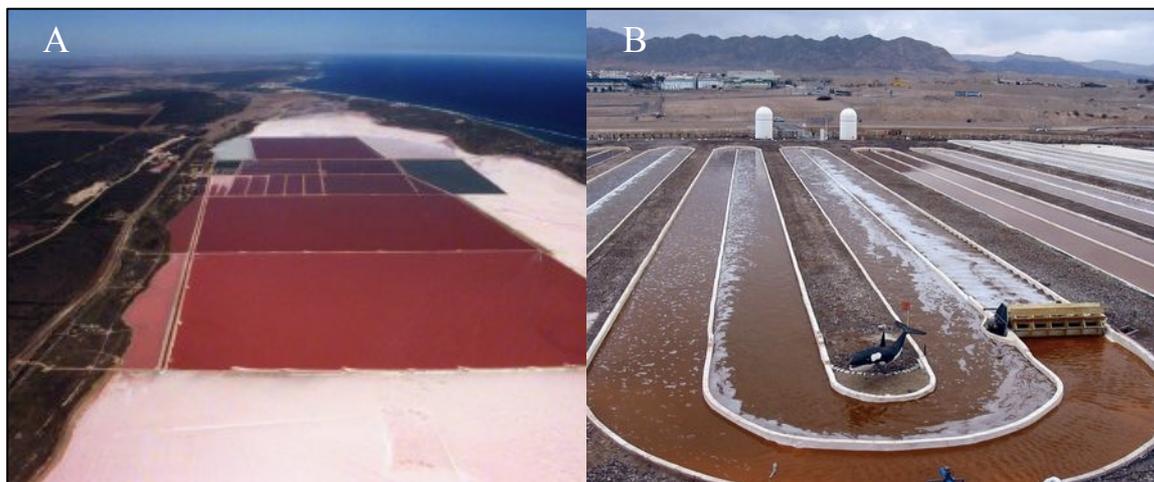


Figure 10: Photographies de deux modes de production industrielle de l'espèce *Dunaliella salina*; A=Open pond en Australie chez Western Technologies, B=Raceway en Israël chez Nature Beta Technologies.

Enfin, une étape critique dans la production de microalgues est représentée par la phase de récolte des cellules dont les rendements et les coûts variés sont dépendants des espèces et des systèmes proposés. Différentes techniques reposent sur les principes de centrifugation, sédimentation, filtration ou floculation (Molina Grima *et al.* 2003). Pour *D. salina*, la floculation des cellules est la technique la plus utilisée pour la production de  $\beta$ -carotène (Hosseini Tafreshi & Shariati 2009). Celle-ci repose sur l'utilisation d'un agent hydrophobe et de colonnes de rétention des cellules avant de réaliser une extraction des carotènes par lavages successifs à l'aide de solvants.

## 6. Production mondiale et domaines de valorisation

La diversité des microalgues et leur plasticité métabolique font de ce groupe d'organismes un réservoir de composés d'intérêt nouveaux et favorise la diversification des voies de valorisation. Le nombre de publications dans le domaine des applications industrielles des microalgues a fortement augmenté au cours de cette dernière décennie ainsi que les créations d'entreprises. A titre d'exemple, le marché mondial de la microalgue du genre *Chlorella* représentait en 2006 38 milliards de dollars (Spolaore *et al.* 2006). Certaines espèces sont déjà produites dans le monde et valorisées dans différents domaines (Tableau 1). Selon les applications, la biomasse peut être utilisée dans sa globalité ou faire l'objet d'extraction de composés à hautes valeurs ajoutées. Tout d'abord, la nutrition humaine représente un première voie de commercialisation des microalgues utilisées comme compléments alimentaires pour leur composition riche en protéines, acides gras polyinsaturés (DHA acide docosahexaénoïque et EPA acide eicosapentaénoïque), vitamines, sels minéraux ou comme colorant naturel (Spolaore *et al.* 2006). Ces propriétés nutritionnelles sont également intéressantes en nutrition animale et notamment en aquaculture. (Benemann 1992, Borowitzka 1997, Marchetti *et al.* 2012). Leur teneur en stérols est également importante pour le bon développement des stades larvaires de bivalves par exemple (Cardozo *et al.* 2007). Ensuite, en cosmétologie, des métabolites d'intérêts spécifiques issus de microalgues présentent des activités valorisables et notamment anti-âge, hydratante, de protection solaire ou encore pour le soin des cheveux par exemple (Spolaore *et al.* 2006). Ces organismes représentent également des sources de nouveaux médicaments en santé humaine. Certaines molécules possèdent des propriétés intéressantes comme par exemple des activités immunostimulantes, antitumorales, ou encore contre l'hypercholestérolémie (Skulberg 2000, Cardozo *et al.* 2007, Amaro *et al.* 2011). D'autres voies d'applications potentielles des microalgues sont aujourd'hui sérieusement considérées et intéressent particulièrement les industriels. L'exploitation des microalgues dans le domaine des bioénergies présente un fort potentiel avec la raréfaction des énergies fossiles. Celles-ci accumulent de manière importante des composés carbonés utilisables comme carburant après extraction (Cadoret & Bernard 2008). De plus, le rendement de production d'acides gras à l'hectare pour la production de bioénergie

peut être 30 fois supérieur chez les algues relativement aux plantes supérieures oléagineuses (Cadoret & Bernard 2008).

**Tableau 1: Les organismes photosynthétiques et le marché mondial d'après 1-Spoloore *et al.* 2006, 2-Larkum *et al.* 2012, 3-Marchetti *et al.* 2012 et 4-Borowitzka *et al.* 1997) (-)=non renseigné.**

Espèce produite	Production annuelle	Pays producteur	Applications ou produits	Ref
<i>Arthrospira</i>	3000 t (MS)	Chine, Inde, USA, Myanmar, Japon	Nutrition humaine et animale, cosmétiques, Phycobiliprotéines	1
<i>Chlorella</i>	2000 t (MS)	Taiwan, Allemagne, Japon	Nutrition humaine, aquaculture, cosmétiques	1
<i>Dunaliella salina</i>	1200 t (MS)	Australie, Israël, USA, Chine	Nutrition humaine, cosmétiques, $\beta$ -carotène	1
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 t (MS)	USA	Nutrition humaine	1
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 t (MS)	USA, Inde, Israël	Aquaculture, Astaxanthine	1
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 t DHA (huile)	USA	DHA	1
<i>Shizochytrium</i>	10 t DHA (huile)	USA	DHA	1
<i>Botryococcus braunii</i>	-	-	Huiles	2
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	-	Huiles, hydrogène, méthane	2
<i>Ostreococcus tauri</i>	-	-	Huiles	2
<i>Pavlova lutheri</i>	-	-	Aquaculture, acides gras	2,4
<i>Synechocystis sp.</i>	-	-	Huiles, isoprènes	2
<i>Isochrysis affinis galbana (T-iso)</i>	-	-	Aquaculture, acides gras	3,4
<i>Chaetoceros muelleri</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Skeletonema costatum</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Tetraselmis spp.</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Nannochloropsis spp.</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Nitzshia spp.</i>	-	-	Aquaculture	4
<i>Navicula spp.</i>	-	-	Aquaculture	4

D'autres études ont analysé la possibilité de produire de l'énergie sous forme de biogaz directement par les cellules (Hydrogène) ou par fermentation (méthane) de la biomasse algale (Sialve *et al.* 2009, Mussnug *et al.* 2010, Larkum *et al.* 2012). Malgré le fort potentiel de cette voie de valorisation en bioénergie, certains verrous technologiques et scientifiques évoqués dans la littérature restent à lever avant l'application à échelle industrielle (Cadoret & Bernard 2008, Scott *et al.* 2010, Collet *et al.* 2011). Enfin, la phycoremédiation représente une voie d'application de plus en plus étudiée et reflète la volonté de concevoir des procédés écologiquement responsables. L'utilisation des microalgues comme agent biologique dépolluant d'effluents liquides ou gazeux, urbains ou industriels permettrait en effet de réduire les pollutions environnementales (De Godos *et al.* 2010, Sydney *et al.* 2010, Park *et al.* 2010).

*Dunaliella salina* est la microalgue marine la plus produite au monde et exploitée pour sa richesse en pigments de la famille des caroténoïdes : le  $\beta$ -carotène. Ce pigment de nature lipidique est utilisé en cosmétologie et en agroalimentaire comme colorant naturel (Spolaore *et al.* 2006) mais également en santé humaine pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Cardozo *et al.* 2007). Outre l'intérêt de cette espèce sur le marché des caroténoïdes, *Dunaliella salina* pourrait demain être une candidate intéressante pour la production d'autres composés valorisables. De récentes études ont montré son potentiel pour la production de lipides exploitables comme biodiesel (Weldy & Huesemann 2007, Griffiths & Harrison 2009), de protéines recombinantes pour l'industrie pharmaceutique (Barzegari *et al.* 2010) ou encore d'EPS (Polysaccharides extracellulaires) valorisables en agroalimentaire comme gélifiant ou épaississant, ou en santé comme matrice hydrophile et agent immunostimulant (Mishra *et al.* 2011).



## Les bactéries

Les *Bacteria*, microorganismes procaryotes, communément appelés bactéries ont colonisé la quasi totalité des écosystèmes de la planète. Au cours de l'évolution, ce groupe d'organismes s'est fortement diversifié (Figure 11) et du fait de leur plasticité génomique importante, les bactéries présentent une capacité d'adaptation à des environnements très différents. La biomasse bactérienne est considérable puisqu'elle représenterait à l'échelle du globe  $5.10^{30}$  cellules soit une quantité de carbone équivalente à celle stockée par l'ensemble des végétaux (Madigan & Martinko 2007). Outre cette forte abondance, leur rôle dans l'évolution des cycles biogéochimiques est également fondamental au sein des écosystèmes (Azam *et al.* 1983, Ducklow 2008). En raison de leur petite taille (0,2 à 50  $\mu\text{m}$  en moyenne) ces organismes ancestraux n'ont été décrits par les scientifiques qu'en 1684, date de la première observation microscopique d'une bactérie par Antoine Van Leeuwenhoek. En raison du caractère pathogène de certaines espèces pour l'Homme ainsi que pour les végétaux et animaux d'élevage, la bactériologie est devenue par la suite une discipline très importante en recherche et a connu récemment un essor considérable avec l'émergence des outils moléculaires.

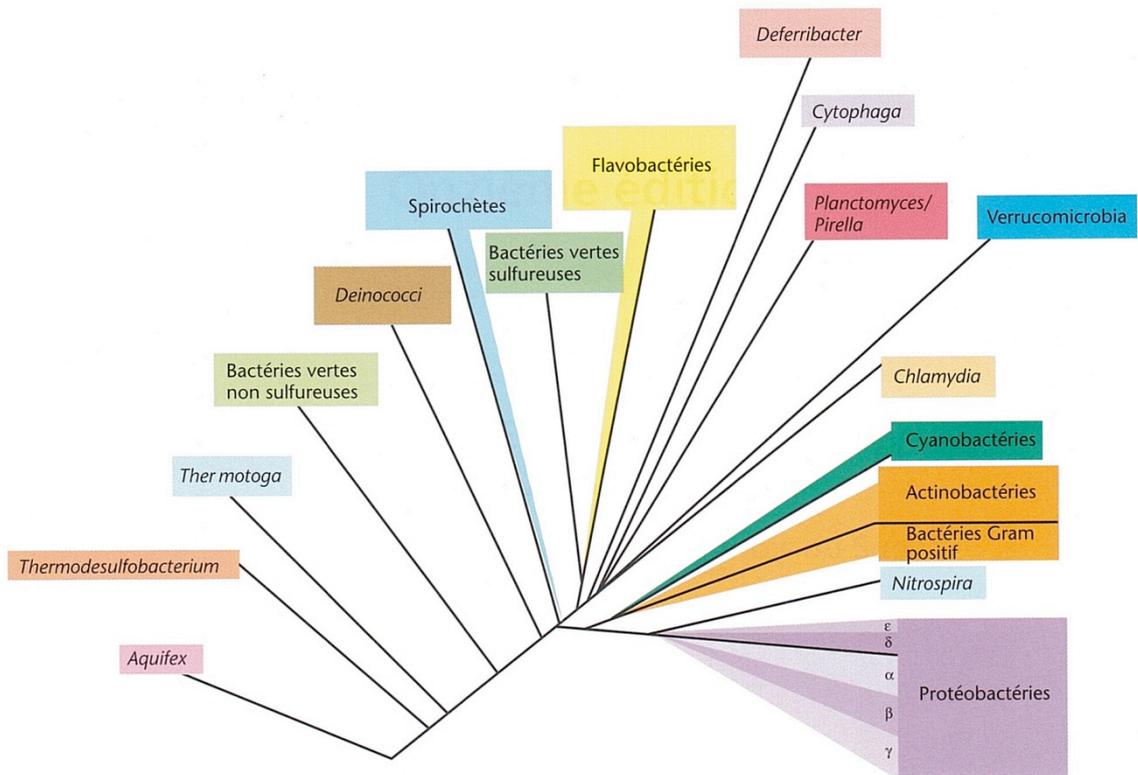


Figure 11: Arbre phylogénétique des *Bacteria* obtenu par comparaison des séquences d'ARN 16S (Madigan & Martinko 2007).

Les bactéries présentent une structure cellulaire dite simplifiée relativement à celle des eucaryotes. La cellule est dépourvue d'organites et contient un ou, dans quelques cas rares, plusieurs fragments d'ADN (acide desoxyribonucléique) libre appelé nucléoïde lorsqu'il est compacté et accompagné parfois d'un plasmide, fragment d'ADN plus petit et circulaire (Madigan & Martinko 2007). Au delà de la membrane plasmique, les cellules bactériennes possèdent une paroi rigide constituée principalement de polysaccharides, les peptidoglycanes, et de structure variée mise en évidence par la coloration de Gram. Les Gram positifs possèdent une paroi de structure simple constituée d'une couche de peptidoglycanes épaisse alors que la paroi des Gram négatifs, quant à elle, est caractérisée par une bicouche de peptidoglycanes recouverte par une membrane externe. Certaines espèces possèdent des fimbriae ou pili, structures supplémentaires fines et plus ou moins nombreuses au niveau de la paroi, de nature protéique et permettant notamment l'adhésion des cellules aux supports inertes ou vivants et la mobilité (Thanassi *et al.* 2012). Une majorité de bactéries présente également des structures cristallines de surface de nature protéique formant la couche S (Sleytr *et al.* 1999). Enfin, une couche mucoïde appelée capsule recouvre parfois les cellules bactériennes intervenant également dans l'adhésion des bactéries et la formation de biofilms. Selon les groupes taxonomiques, les cellules bactériennes présenteront des morphologies particulières telles que des cellules sphériques ou ovoïdes appelées coques, des cellules cylindriques appelées bacilles, des cellules cylindriques incurvées ou spiralées appelées spirilles, des cellules très allongées dites filamenteuses et des cellules possédant un appendice fixateur dites pédonculées. Les bactéries aquatiques vivent tout ou partie de leur cycle de vie en cellules libres dans la colonne d'eau ou fixées à un substrat biologique ou non (Grossart 2010), mobiles ou immobiles, ainsi que sous forme de colonies. Chez certaines espèces, la mobilité des cellules bactériennes est possible par la nage à l'aide d'un ou plusieurs flagelles ou par glissement sur une surface solide.

Lorsque les conditions environnementales le permettent, les bactéries prolifèrent par fission binaire : une cellule mère générant deux cellules filles génétiquement identiques. Ce groupe de microorganismes est justement connu pour la vélocité de leur prolifération puisque certaines espèces connaissent des temps de génération de quelques minutes seulement. Afin d'acquérir l'énergie sous forme d'ATP (adénosine tri-phosphate) nécessaire à leur développement, les bactéries ont mis en place différentes stratégies. En effet, outre la diversité taxonomique, il existe chez ces microorganismes une diversité métabolique importante expliquant leur répartition au sein de la majorité des écosystèmes de la planète (Madigan & Martinko 2007, Grossart 2010). Selon la nature du substrat métabolisé ou donneur d'électron, les bactéries sont qualifiées de 1) chimio-organotrophes lorsque l'énergie est puisée par oxydation de composés organiques tels que l'acétate ou le glucose par exemple. Les monomères et oligomères peuvent être assimilés directement tandis que des systèmes enzymatiques extracellulaires leur permettent d'accéder à la matière organique particulaire (Grossart 2010). Certaines espèces nécessitent la présence (bactéries aérobies) et d'autres l'absence (bactéries anaérobies) d'oxygène alors que d'autres seront indifférentes à ces conditions. 2) Les chimio-lithotrophes oxydent quant à elles des

composés inorganiques tel que le sulfure d'hydrogène par exemple et seront à ce titre complémentaires des chimio-organotrophes d'un point de vue écologique. 3) Les phototrophes utilisent l'énergie lumineuse pour produire de l'ATP par photosynthèse grâce à la présence de pigment. Les cyanobactéries réalisent la photosynthèse oxygénique, qui produit du dioxygène, alors que les bactéries vertes et pourpres pratiquent la photosynthèse anoxygénique.

Les bactéries ont, comme tout être vivant, des besoins nutritionnels propres reflétant leur composition chimique (Madigan & Martinko 2007). Le carbone est l'élément majeur puisqu'il peut représenter 50 % du poids sec d'une cellule bactérienne. Les bactéries dites hétérotrophes captent le carbone à partir d'éléments organiques contrairement aux bactéries autotrophes. L'azote, deuxième élément par ordre d'importance, constitue environ 12 % du poids sec bactérien. Selon les espèces, les besoins nutritionnels nécessitent l'apport d'autres macroéléments tels que le phosphore, le soufre, le potassium, le magnésium, le calcium par exemple, et de microéléments tels que le fer, le bore, le cuivre par exemple. Des milieux spécifiques liquides ou solides prêts à l'emploi sont aujourd'hui disponibles pour la culture des bactéries en laboratoire ainsi qu'à plus grande échelle dans le domaine industriel. Cependant, aujourd'hui encore peu d'espèces bactériennes sont cultivables, ce qui les rend difficiles à étudier. Parmi les bactéries marines, seules 20 % des espèces seraient aujourd'hui cultivables (Selje *et al.* 2005).

## Interactions microalgues-bactéries

### 1. Approche théorique

Au sein d'un écosystème, les espèces ne peuvent vivre totalement isolées et subissent des contraintes abiotiques (physiques et chimiques) et biotiques conditionnant leur survie et leur développement. Chaque organisme interagit directement et indirectement avec son environnement : son milieu à proprement parlé ainsi que les autres organismes qui y vivent. Comprendre la nature des interactions entre les organismes représente une étape clé dans l'étude des écosystèmes et des cycles biogéochimiques (Grossart 2010). Les interactions sont qualifiées d'intra ou d'interspécifiques selon la nature des protagonistes. Les relations de type prédateurs-proies représentent des interactions éphémères pour lesquels l'échange constitue un transfert d'énergie ponctuel et fugace, contrairement aux interactions dites durables (Combes 2002).

Les interactions interspécifiques sont nombreuses et complexes, cependant, en simplifiant plusieurs types d'interactions peuvent être définies (Tableau 2) selon l'influence négative, nulle ou positive d'un organisme A sur un organisme B (Breuil 1997, Combes 2001).

**Tableau 2: Synthèse des différents types d'interactions interspécifiques et effets sur les protagonistes. (+) bénéfique, (0) ni bénéfique ni effet délétère, (-) effet délétère.**

Interactions	Organisme A	Organisme B
Compétition	-	-
Parasitisme	-	+
Amensalisme	-	0/+
Neutralisme	0	0
Commensalisme	+	0
Mutualisme	+	+
Symbiose	+	+

- **Interactions négatives**

La compétition existe entre un organisme A et B vivants au sein d'une même niche écologique, lorsque ceux-ci luttent pour l'espace et/ou les ressources. La compétition est d'autant plus forte que les besoins des organismes sont proches.

L'interaction est qualifiée de parasitisme lorsque l'organisme A (le parasite) se développe au détriment de l'organisme B (l'hôte) causant suffisamment de dommages pour nuire à l'épanouissement de ce dernier et pouvant entraîner sa mort. Le bénéfice d'une telle association est donc unilatéral et au profit du parasite. Ce dernier y trouve une source de nutriments, une protection ou un transport et réalise tout ou partie de son cycle de développement associé à l'hôte.

L'amensalisme repose sur le principe de nuisance d'un organisme A sur un organisme B sans réciprocité. Lorsqu'il s'agit d'une lutte chimique, l'amensalisme est appelé antibiose et est relativement répandue chez les organismes sessiles.

- **Interactions neutres**

Les organismes A et B peuvent dans certains cas cohabiter sans bénéfice ni dommage évidents au premier abord. Il s'agit de neutralisme.

- **Interactions positives**

Les organismes A et B peuvent cohabiter sans effet délétère pour aucun des protagonistes. Il s'agit alors de coopération si l'interaction est favorable pour au moins l'un d'entre eux. Deux types de coopération existent : le commensalisme lorsque le bénéfice est unilatéral et le mutualisme s'il est réciproque. La symbiose, quant à elle, est un cas particulier de mutualisme entre deux organismes interagissant de manière spécifique, intime et obligatoire (Munn 2004). Dans ce dernier cas, un rapprochement physique est généralement observé et dans certains cas, jusqu'à l'internalisation d'un des deux protagonistes appelé endosymbionte.

Comme l'ensemble des organismes, les microalgues interagissent avec leur milieu et les organismes qui y vivent. Des études se sont intéressées aux relations microalgues-animaux, microalgues-plantes et notamment microalgues-bactéries. En effet, les bactéries ont colonisé la quasi totalité des écosystèmes de la planète et cohabitent par conséquent avec les microalgues. Compte tenu de leur importance au sein des systèmes aquatiques mais aussi du potentiel valorisable des microalgues, l'étude des interactions microalgues-bactéries présente un intérêt grandissant.

## 2. Approche expérimentale

Entre les microalgues et les bactéries, cohabitant au sein des mêmes écosystèmes naturels, les différents types d'interactions interspécifiques évoqués précédemment peuvent potentiellement exister. Par

conséquent, la relation pourra être nuisible, neutre ou favorable à l'un ou les deux organismes. Les microalgues et les bactéries vivent au cœur d'un réseau d'interactions tissé par l'ensemble des organismes de l'écosystème sans compter l'influence des conditions environnementales. Pour cette raison, différentes approches sont utilisées pour améliorer la compréhension des systèmes en les simplifiant, telles que les études en mésocosmes jusqu'au système bispécifique en laboratoire. Ce dernier représente le système s'éloignant le plus des conditions réelles mais aussi le plus simple à analyser. Les premières études des interactions microalgues bactéries publiées sont relativement anciennes (Berland *et al.* 1969, Bell *et al.* 1974, Haines & Guillard 1974, Cole 1982), cependant devant la complexité de la question, de nombreuses interrogations demeurent d'actualité (Fouilland & Mostajir 2010).

### ○ Effets constatés chez les bactéries

Dans les systèmes aquatiques, les blooms phytoplanctoniques représentent pour la communauté bactérienne une source de matière organique pour leur propre prolifération. Ce pool éphémère de matière organique est alimenté par la mortalité des cellules algales mais aussi par l'exsudation de substances organiques par celles-ci. En effet, selon les espèces et les conditions du milieu, les microalgues peuvent exsuder en moyenne 10%, et dans certains cas jusqu'à 70%, du carbone fixé par la photosynthèse généralement sous forme de polysaccharides (Grossart & Simon 2007). Cette stimulation de la croissance bactérienne est importante et dépendra de leur capacité à dégrader ces composés organiques (Rooney-Varga *et al.* 2005).

A l'inverse, certains composés sécrétés par les microalgues possèdent des propriétés antibiotiques contre le développement bactérien (Bruhn *et al.* 2007). Selon le spectre d'activité et les concentrations, les espèces bactériennes affectées seront inhibées tandis que d'autres, résistantes, profiteront de l'élimination de leurs compétiteurs.

### ○ Effets constatés chez les microalgues

L'influence des bactéries sur le développement des microalgues a souvent été étudiée au sein des écosystèmes naturels. De nombreuses études analysent particulièrement l'importance des interactions microalgues-bactéries sur les cycles de développement des blooms d'algues toxiques, responsables de mortalités animales et d'intoxications humaines. Les bactéries peuvent en effet inhiber, stimuler ou prolonger la durée de blooms phytoplanctoniques (Dakhama *et al.* 1993, Smith *et al.* 1995, Rooney-Varga *et al.* 2005, Danger, Oumarou, *et al.* 2007). La présence d'une ou plusieurs espèces bactériennes peut affecter fortement le taux de croissance des populations microalgales. Meseck *et al.* (2007) ont observé une diminution de 13% du taux de croissance de la microalgue *Tetraselmis chui* en présence d'une communauté bactérienne alors que d'autres auteurs ont pu constater l'inhibition totale de la croissance (Dakhama *et al.* 1993) et parfois jusqu'à la lyse cellulaire algale (Bowman 2007). Ces bactéries dites algicides appartiennent à différents groupes taxonomiques dont les plus fréquemment cités sont les

genres *Cytophaga*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus* par exemple (Mayali & Azam 2004, Imai *et al.* 2006). D'autres études ont montré un effet négatif de bactéries sur la biomasse atteinte en phase stationnaire de culture de microalgues. Par exemple, après ajout d'une souche bactérienne non identifiée, Fukami *et al.* ont pu constater une diminution de 21% de la densité cellulaire de *Chaetoceros cerastosporum* (Fukami *et al.* 1997) alors que Guerrini *et al.* ont noté une diminution drastique de 80% chez *Cylindrotheca fusiformis* (Guerrini *et al.* 1998).

A l'inverse, de nombreuses études ont présenté l'effet bénéfique de bactéries sur la croissance de microalgues tant au niveau du taux de croissance qu'au niveau de la densité cellulaire en phase stationnaire. Ainsi, le taux de croissance de *Nitzschia sp.* a pu être augmenté de 93% lors des travaux de Liu *et al.* (2008) et un gain de 50% de biomasse a été noté chez *Scenedesmus bicellularis* en présence de *Brevundimonas vesicularis* au cours des travaux de Mouget *et al.* (1995). Des relations de type symbiotique peuvent exister (Geng & Belas 2010) comme il a pu être observé au cours d'une étude de Park *et al.* (2008) entre *Chlorella ellipsoidea* et une bactérie appartenant au genre *Brevundimonas*, l'un ne survivant pas sans l'autre.

Outre les effets sur la croissance microalgale, certains auteurs ont constaté d'autres modifications d'ordre physiologique dont l'origine ou les mécanismes mis en place demeurent complexes et encore souvent inconnus. Tout d'abord, de manière surprenante, certaines bactéries ont la capacité de réduire directement ou indirectement la sensibilité de microalgues à la présence de composés toxiques. Par exemple, Levy *et al.* (2009) ont pu observer une augmentation de plus de 300% de la concentration de cuivre nécessaire pour réduire de moitié le taux de croissance de *Chlorella sp.* dès lors qu'elle était en présence de bactéries non identifiées. Ensuite, une étude de De-Bashan, Bashan *et al.* (2002) a recensé un ensemble de modifications affectant *Chlorella vulgaris* sous l'influence de la bactérie *Azospirillum brasilense*. Ces auteurs ont pu observer une augmentation significative du volume cellulaire, de la concentration en pigments, de la quantité et du type d'acides gras présents chez cette microalgue. Enfin, plusieurs travaux se sont focalisés sur le rôle des interactions microalgues-bactéries au sein d'écosystèmes benthiques dans lesquels des microorganismes sessiles se développent sous forme de biofilms. Certaines bactéries pourraient non seulement favoriser la croissance de microalgues mais également provoquer la sécrétion de matière organique de nature polysaccharidique et par conséquent favoriser la formation de biofilms par certaines microalgues (Guerrini *et al.* 1998, Bruckner *et al.* 2011, Gardes *et al.* 2011). Enfin, compte tenu des enjeux sanitaires, de nombreuses études ont tenté de comprendre l'influence des bactéries sur la production de toxines par certaines espèces microalgales (Doucette 1995, Uribe & Espejo 2003, Bates *et al.* 2004). La complexité de telles études explique peut être la présence de contradictions dans la littérature quant au rôle de chaque protagoniste. Les bactéries interviennent-elles directement au niveau de la synthèse toxinique ou stimulent-elles d'une manière ou d'une autre la synthèse de la toxine ou d'un précurseur de la molécule chez la microalgue? Le rôle des

interactions microalgue-bactéries semble en tout cas important dans la compréhension de ce phénomène (Hold *et al.* 2001).

### 3. Mécanismes d'interactions

De manière générale, les travaux réalisés sur les interactions microalgues-bactéries décrivent les influences fortes existant entre ces deux types d'organismes. En revanche, devant la complexité des phénomènes biologiques impliqués, les études traitant des mécanismes sous-jacents sont plus rares.

#### ○ **Phycosphère**

La phycosphère représente l'environnement immédiat des cellules algales au sein duquel les flux de composés chimiques ont lieu avec le milieu et les autres organismes, et donc précisément avec les bactéries (Sapp, Schwaderer, *et al.* 2007). Les bactéries peuvent coloniser la phycosphère de trois façons différentes et ainsi améliorer leur capacité d'interactions mutuelles. Tout d'abord celles-ci peuvent évoluer librement (1) au sein du système et interagir avec les microalgues par l'intermédiaire du milieu, lieu de flux d'éléments entre les deux organismes (Figure 12).

Un rapprochement physique est également observé dans certains cas (2) (Figure 12) : les bactéries épiphytes se développent alors en adhérant à la surface des cellules algales. Certaines espèces présentent des comportements de mobilité orientée vers les cellules algales par chimiotaxisme (Miller *et al.* 2004, Geng & Belas 2010). Certaines substances telles que le diméthylsulfonopropionate (DMSP), la méthionine ou des glucides peuvent être détectés par les bactéries déclenchant un processus de rapprochement physique puis d'adhésion aux cellules via l'utilisation d'appendices extracellulaires de type Fimbriae ou pili. Certaines *Roseobacter* épiphytes seraient ensuite capables de sécréter des métabolites directement dans la cellule algale à l'aide de systèmes de sécrétion spécifiques (Geng & Belas 2010). D'autres auteurs tels que Kaczmarska *et al.* ont montré que les bactéries épiphytes s'installeraient préférentiellement au niveau de régions spécifiques de la surface cellulaire chez les Diatomées comme la zone du raphé, fente présente chez les Diatomées pennées et lieu de sécrétion de mucilage qui constitue très probablement une source de matière organique pour les communautés bactériennes (Kaczmarska *et al.* 2005). L'adhésion des cellules bactériennes est parfois indispensable à la mise en place de mécanismes biologiques agissant comme stimulus et influençant les interactions : l'inhibition de la croissance de microalgues toxiques peut être déclenchée par l'adhésion de bactéries algicides (Salomon & Imai 2006).

Enfin, certains travaux ont montré la présence de bactéries endophytes (3) se développant au sein de cellules microalgales (Figure 12) et principalement chez les Dinoflagellées (Escalera *et al.* 2010, Geng & Belas 2010). En revanche, peu de données existent dans la littérature sur les relations entre les deux organismes.

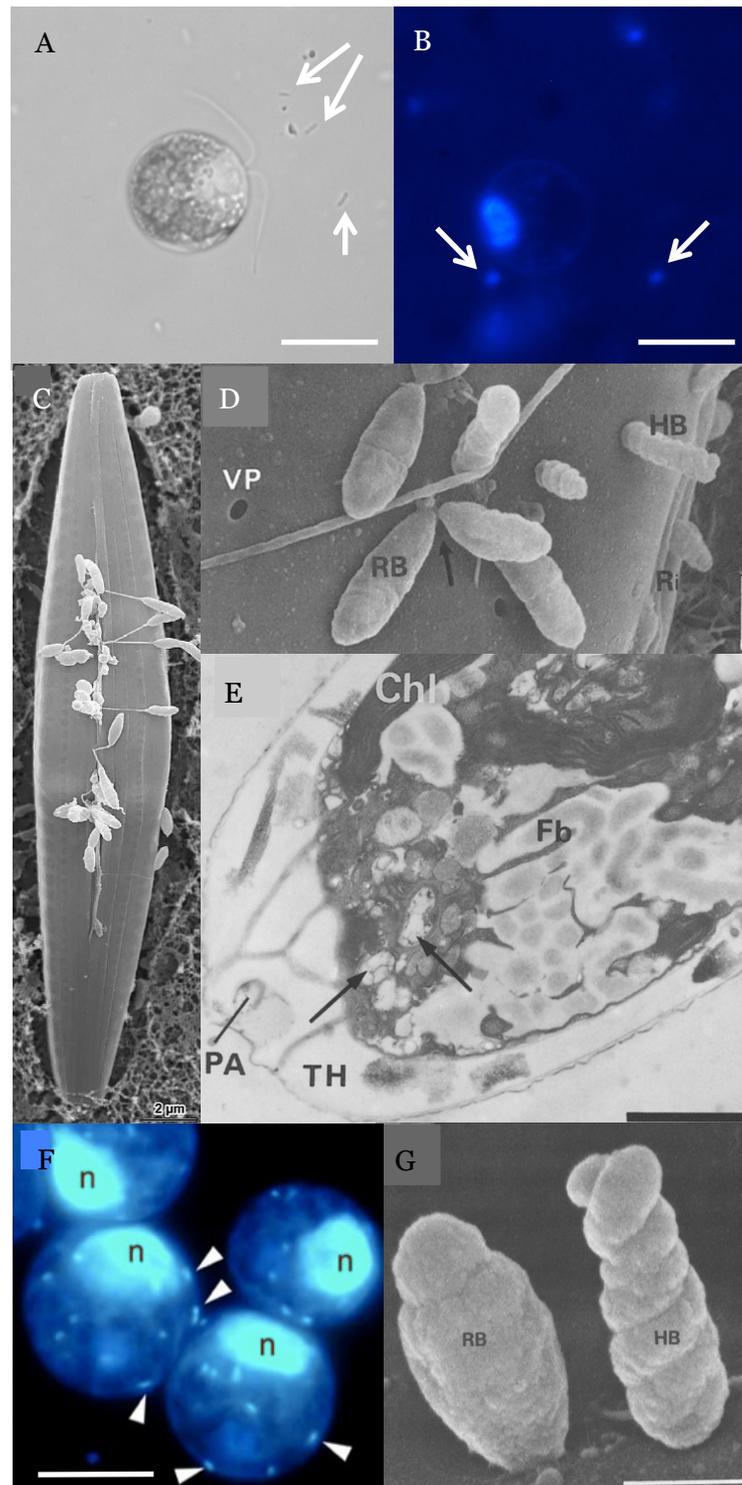


Figure 12 : Observations des différentes formes d'interactions physiques microalgues-bactéries. Bactéries libres (A) et (B) (flèches blanches) au sein d'une culture de *Dunaliella salina*, barre = 10  $\mu\text{m}$ , (A) observation en microscopie photonique et (B) en microscopie à épifluorescence après marquage au DAPI. Bactéries épiphytes en microscopie électronique (C), (D) et (G) d'une cellule de *Pseudo-nitzschia multiseriata* (C) (Bates *et al.* 2004) et d'une cellule de *Prorocentrum lima* (D) barre = 1  $\mu\text{m}$  (G) barre = 0,5  $\mu\text{m}$  (Rausch de Traubenberg *et al.* 1995). Bactéries endophytes (E) (F) observées en microscopie électronique au sein d'une cellule de *Prorocentrum lima* indiquées par les flèches noires (E) barre = 2  $\mu\text{m}$  (Rausch de Traubenberg *et al.* 1995) et observées en microscopie à épifluorescence après marquage par une sonde spécifique (technique FISH, sonde Volv-835) au sein de cellules de *Ceratia cerasiformis*, barre = 10  $\mu\text{m}$  (Kawafune *et al.* 2012).

### ○ Métabolites primaires et nutriments

Les flux d'éléments nutritifs minéraux ou organiques entre microalgues et bactéries sont relativement bien connus. Ces composés étant indispensables à leur développement, ces flux peuvent par conséquent influencer positivement ou négativement, les dynamiques de populations.

Tout d'abord, les bactéries peuvent capter le dioxygène produit par la photosynthèse et surtout la matière organique algale produite par mortalité des cellules ainsi que par exsudation. Le dioxyde de carbone produit par la respiration bactérienne ainsi que des éléments minéraux, comme l'ammonium par exemple, issu du catabolisme de la matière organique (reminéralisation), peuvent profiter en retour aux cellules algales. En effet, certaines bactéries hétérotrophes sont capables de reminéraliser la matière organique et de libérer dans le milieu de l'azote et/ou du phosphore sous forme minérale (Tezuka 1990). Ces éléments inorganiques peuvent ensuite profiter aux cellules algales pour poursuivre leur croissance.

La production de vitamines par les bactéries est un phénomène biologique régulièrement cité dans la littérature comme pouvant stimuler la croissance algale. Certaines microalgues dites vitamines-dépendantes ont des besoins vitaminiques obligatoires et ne peuvent subsister en milieu carencé. En revanche, les microalgues dites vitamines-indépendantes peuvent mettre en place un système enzymatique spécifique assurant leur survie mais plus coûteux en énergie (Croft *et al.* 2005). L'absence de vitamines dans le milieu de culture peut donc potentiellement affecter les performances de croissance chez les microalgues vitamines-indépendantes. En condition de carence, les bactéries capables d'en sécréter, peuvent donc stimuler significativement la croissance de ces microalgues. Quelques auteurs ont précisément démontré cette influence positive sur la croissance microalgale (Haines & Guillard 1974, Croft *et al.* 2005). Enfin, l'acquisition de certains oligoéléments chez les microalgues peut être facilité par l'exsudation de chélateurs par les bactéries. Le fer en est un exemple régulièrement cité dans la littérature. Cet élément essentiel de la physiologie des microalgues entrant dans la composition des chlorophylles est pourtant souvent limitant au sein des océans, car présent majoritairement sous forme insoluble (Fer III). Beaucoup d'espèces bactériennes sécrètent dans le milieu extracellulaire des sidérophores, peptides à forte affinité pour le fer III ( $Fe^{3+}$ ). Le complexe dissous ainsi formé libère le fer III par photolyse au voisinage de la surface de diffusion des cellules algales qui peuvent ainsi plus aisément le capter (Keshtacher-Liebson *et al.* 1995, Amin *et al.* 2009).

Au contraire, des phénomènes de compétition directe entre microalgues et bactéries peuvent aussi exister vis-à-vis des éléments nutritifs minéraux (Joint *et al.* 2002). En effet, les bactéries hétérotrophes peuvent aussi avoir des besoins en minéraux et modifient ainsi la disponibilité en nutriments indispensables au développement des microalgues (Rhee 1972, Klug 2005, Meseck *et al.* 2007). Cette compétition est particulièrement forte concernant le phosphore puisque Mindl *et al.* ont pu constater que la part de phosphore particulaire bactérien au sein d'une culture mixte pouvait atteindre jusqu'à 45 % du phosphore total (Mindl *et al.* 2005). De même, la composition biochimique, et notamment le ratio azote : phosphore constitutif des bactéries, diffère de celui des microalgues et peut donc entraîner

lors de développement bactérien important, un changement dans la nature de l'élément limitant la croissance algale (Danger, Oumarou, *et al.* 2007).

- **Allelopathie**

Outre les flux d'éléments nutritifs, la nature des interactions microalgues-bactéries est parfois liée à la production par l'un ou les deux, de métabolites secondaires influençant la croissance de l'autre organisme et sa physiologie d'une manière générale. Park *et al.* (2008) ont montré la stimulation ou la diminution du taux de croissance de *Chlorella vulgaris* selon l'ajout d'un filtrat de culture d'espèces bactériennes différentes. Ainsi, en fonction des espèces considérées, certaines bactéries peuvent sécréter des composés stimulant la division cellulaire algale. Par exemple, De-bashan *et al.* (2008) ont démontré que l'auxine, une phytohormone, produite par la bactérie *Azospirillum brasilense* pouvait stimuler le taux de croissance de *Chlorella vulgaris*. Riquelm *et al.* (1988) ont, quant à eux, décrit une glycoprotéine produite par une bactérie du genre *Pseudomonas* et stimulant la croissance d'*Asterionella glacialis*. Outre les effets bénéfiques de certains métabolites secondaires, d'autres composés sécrétés induisent des inhibitions totales ou partielles de la croissance des bactéries. En effet, certaines microalgues sont capables d'émettre des molécules à activité antibiotique de spectre varié c'est à dire qui affecteront plus ou moins les espèces bactériennes selon la nature du composé et sa concentration dans le milieu (Cole 1982, Rooney-Varga *et al.* 2005). De même, la croissance et la survie de certaines microalgues peuvent être affectées par l'émission de composés bactériens toxiques qui pourront entraîner jusqu'à la mort cellulaire (Mulderij *et al.* 2003, Bowman 2007). Dakhama *et al.* (1993) ont montré l'inhibition de la croissance de *Scenedesmus bicellularis* par des composés algicides (hydroxyphenazine et oxychloraphine) sécrétés par une bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Des lyses cellulaires ont également été observées par Bowman *et al.* (2007) dans une culture de *Gymnodinium catenatum*, provoquées par l'émission de substances extracellulaires par la bactérie *Pseudoalteromonas sp.*

- **Facteurs principaux influençant la nature des interactions**

De nombreux facteurs peuvent potentiellement influencer la nature des interactions microalgues-bactéries. Tout d'abord, les interactions sont dites espèces dépendantes (1) puisque les effets constatés peuvent varier drastiquement d'une espèce à l'autre (Imam *et al.* 1984, Park *et al.* 2008). Une espèce bactérienne peut inhiber ou stimuler la croissance microalgale selon l'espèce algale considérée (Cole 1982, Fukami *et al.* 1997, Mulderij *et al.* 2003). La nature des interactions ou l'intensité des effets peut également être fortement influencée par l'abondance des populations (2). En effet, plusieurs mécanismes décrits précédemment tels que la compétition pour les ressources en éléments nutritifs sont plus ou moins intenses en fonction des tailles respectives des populations algales et bactériennes. L'exsudation de métabolites par les bactéries est, pour certaines espèces, dépendante de la taille de la population. Ce processus biologique, appelé le « quorum sensing », est une forme de communication

chimique bactérienne impliquée dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires par la régulation coordonnée de certains gènes bactériens (Piel 2004). Les N-homosérines lactones sont un exemple de molécules médiatrices impliquées dans le quorum sensing chez certaines espèces (Loh *et al.* 2002). L'exsudation de métabolites peut être contrôlée par ce processus qui pourrait donc intervenir dans la nature des interactions microalgues-bactéries (Geng & Belas 2010), même si cette hypothèse n'a pas encore été validée expérimentalement. En revanche, l'importance de ce type de communication dans la symbiose ou la pathogénicité de bactéries a déjà été montrée dans le cadre d'interactions entre plantes et bactéries (Loh *et al.* 2002). Enfin, les facteurs environnementaux (3) tels que par exemple la nature et l'intensité de la limitation peuvent représenter des facteurs majeurs influençant la nature des interactions. Danger, Leflaive *et al.* (2007) ont, à ce titre, montré que les interactions pouvaient évoluer du mutualisme à la compétition entre *Scenedesmus obliquus* et une communauté de bactéries non identifiées, lorsque les conditions devenaient phosphore-limitantes. Dans le même ordre d'idées, Amaro *et al.* (2005) ont observé que le pouvoir lytique de trois bactéries envers l'espèce *Alexandrium catenella* n'était exprimé qu'en présence d'un milieu de culture riche en éléments nutritifs.

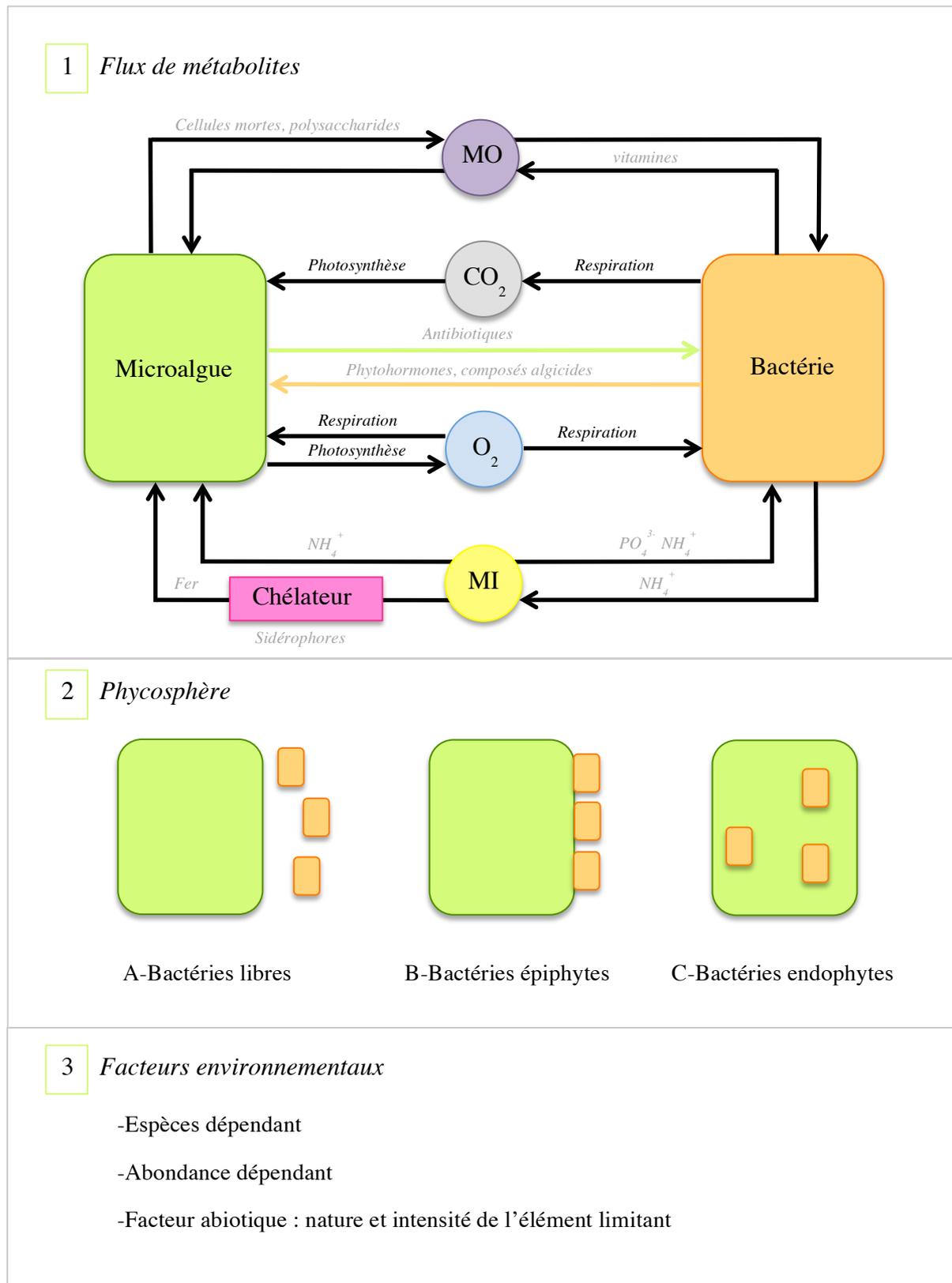


Figure 13 : Interactions microalgues-bactéries (synthèse) ; MO= matière organique, MI=matière inorganique

#### 4. Applications potentielles de cultures mixtes microalgues-bactéries

Dès lors qu'une production en masse de microalgues est envisagée, différents systèmes de production existent de type ouvert ou fermé avec leurs caractéristiques propres. Hormis le cas rare de culture en axénie, la production grande échelle est soumise à l'installation de communautés bactériennes qui peuvent avoir des effets délétères sur la physiologie des algues et donc sur les rendements de production en biomasse ou en métabolites d'intérêts (Bínová & Zahradník 1998). La production de microalgues en axénie, c'est à dire la culture d'une microalgue dépourvue de bactéries et en condition stérile représente un coût important à échelle industrielle (Subba Rao 2009). Étudier les interactions microalgues-bactéries et particulièrement l'ensemencement de bactéries favorables à la culture devient alors un sujet à fort intérêt compte tenu de la hausse considérable des voies de valorisation des microalgues ces dernières années. Il est notable que le nombre de publications traitant des interactions microalgues-bactéries dans un contexte appliqué a significativement augmenté ces dernières années (Lakaniemi *et al.* 2011, Subashchandrabose *et al.* 2011, Trejo *et al.* 2012, Fouilland 2012, Vasseur *et al.* 2012, Kazamia *et al.* 2012).

L'ensemencement d'une culture de microalgue par une population bactérienne choisie peut offrir de nombreux avantages. Tout d'abord, l'occupation de la niche écologique peut permettre de lutter contre l'installation d'autres communautés bactériennes néfastes par des phénomènes d'exclusion compétitive. De même, certaines espèces bactériennes, produisant des substances antibiotiques, peuvent empêcher l'installation d'autres communautés bactériennes par antibiose (Long & Azam 2001, Geng & Belas 2010). Cette lutte contre l'installation de contaminants dans les cultures de microalgues est explorée dans le domaine de l'aquaculture afin d'éviter l'utilisation massive de composés chimiques antibiotiques représentant un coût mais aussi un risque de sélection de souches bactériennes résistantes (Rico-Mora *et al.* 1998, Verschueren *et al.* 2000, Avendaño & Riquelme 2001, Nicolas *et al.* 2004, Kesarcodi-Watson *et al.* 2008). Outre cette activité protectrice contre l'installation de pathogènes, l'ensemencement par des bactéries sélectionnées peut également permettre d'augmenter les rendements de production de la culture algale à travers l'augmentation du taux de croissance et/ou de la biomasse maximale en fin de croissance (chapitre interactions microalgues-bactéries).

Un certain nombre d'études se sont particulièrement intéressées à l'application de ces cultures mixtes dans le domaine de la phycoremédiation afin d'améliorer la biodépollution d'effluents gazeux (CO<sub>2</sub>) ou liquides (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) de rejets urbains, industriels ou agricoles (De-Bashan, Moreno, *et al.* 2002, Muñoz *et al.* 2005, Essam *et al.* 2006, De Godos *et al.* 2010, Fouilland 2012). Certains auteurs ont montré des rendements de dépollution améliorés en culture mixte concernant l'élimination de certains composés toxiques tels que les herbicides (Wolfaardt *et al.* 1994), les métaux lourds (Safonova *et al.* 2004, Naik *et al.* 2012), ou encore des polluants organiques tels que les hydrocarbures (Borde *et al.* 2003, Muñoz *et al.* 2003).

A notre connaissance aucune étude n'a à ce jour cherché à améliorer les rendements de culture de *Dunaliella salina* par l'ajout de bactéries sélectionnées. Cela peut s'expliquer par le fait que la plupart des études présentant le fort potentiel appliqué des cultures mixtes concernent principalement à ce jour le domaine de la phycoremédiation. La matrice des effluents de types agricoles, urbains ou industriels est généralement non salée et constitue donc un substrat plus adapté pour des espèces microalgales d'eau douce. De plus, la culture de *Dunaliella salina* à échelle industrielle s'effectue généralement en condition de forte salinité. Ces conditions extrêmes pour la plupart des organismes vivants réduit le risque de contamination bactérienne mais aussi la possibilité d'encencement par des bactéries promotrices choisies. L'intérêt majeur de cette espèce de microalgue réside en sa valence écologique concernant les principaux facteurs influençant la croissance tels que la température, le pH, l'éclairement et la salinité (Subba Rao 2009, Hosseini Tafreshi & Shariati 2009). Du fait de sa grande valence écologique, cette espèce peut donc présenter une forte résilience aux variations des conditions de culture à grande échelle, soumises aux variations climatiques et aux aléas du procédé de production. La culture de cette microalgue à salinité normale est possible et présente de nombreux avantages par rapport aux systèmes dulcicoles tels que l'absence de concurrence avec les ressources en eau douce et une réduction des contaminations possibles. Relativement aux systèmes de production en condition hyperhaline, la réduction de la salinité ouvre de nouvelles voies de valorisation pour cette espèce. La présence de sels peut affecter certains procédés tels que la production de biogaz par digestion anaérobie où le sodium représente un composé inhibiteur des organismes méthanogènes (Sialve *et al.* 2009).



## Objectifs de l'étude

Le présent travail concerne l'étude des interactions microalgues-bactéries en cultures mixtes et notamment l'analyse de l'effet de bactéries sur la croissance et le métabolisme de la microalgue SAG 19.3 appartenant au genre *Dunaliella*. Etant donné le débat toujours actuel sur l'appartenance de cette souche à l'espèce *D. salina* (cf. Introduction générale, chapitre 1 origine et classification) nous prenons la précaution de la dénommer *Dunaliella sp.* dans la suite de ce document présentant les résultats de notre étude. Bien que cette microalgue soit produite à échelle industrielle et présente un fort potentiel de valorisation pour l'avenir, à notre connaissance aucune étude n'a été communiquée sur les interactions *Dunaliella*-bactéries et leur potentiel appliqué.

Ce travail a donc pour objectif, outre l'étude des interactions d'une manière globale, d'analyser le potentiel de culture mixte *Dunaliella*-bactéries en système simplifié. Nous essaierons de répondre à plusieurs questions : Peut-on, et si oui dans quelle mesure, augmenter la productivité d'une culture de *Dunaliella sp.* par l'ajout d'espèces bactériennes choisies? Quels sont les impacts sur le métabolisme de cette microalgue? De quel type d'interactions s'agit-il ? Peut-on identifier et quantifier les flux de matière entre les différents compartiments : microalgues, bactéries et milieu de culture ?

Ce travail a été réalisé à travers différentes étapes séquentielles illustrées par trois parties distinctes dans le manuscrit :

-La première partie concerne l'obtention des modèles biologiques pour cette étude. Tout d'abord, une étape indispensable consiste en la purification d'une culture de *Dunaliella sp.* afin de disposer d'une souche axénique. Ensuite, il s'agit d'acquérir et d'identifier des souches bactériennes présentant un potentiel pour ce travail.

-La deuxième partie représente l'étape de comparaison en petits volumes du potentiel des différentes cultures mixtes afin de sélectionner une souche bactérienne influençant positivement la productivité de *Dunaliella sp.*

-La troisième partie expose l'étude et la caractérisation des interactions entre *Dunaliella sp.* et la bactérie sélectionnée à l'étape précédente.



---

PARTIE 1- ORGANISMES MODÈLES POUR L'ÉTUDE ET  
PRÉAMBULE

---



## Obtention d'une souche microalgale axénique

### 1. Introduction

L'étude fine de l'influence de bactéries choisies sur la croissance de *Dunaliella sp.* implique l'obtention d'une culture pure, dite axénique, dépourvue de contaminants biologiques. Les cultures de microalgues peuvent être colonisées par des organismes eucaryotes (mycètes, ciliés), procaryotes (bactéries) ou viraux. Les organismes dits contaminants peuvent influencer fortement les réponses physiologiques de l'espèce algale étudiée comme nous l'avons développé précédemment pour les bactéries. Leur présence peut donc devenir indésirable. De même, la décontamination devient également nécessaire pour certaines analyses pour lesquelles la présence d'autres organismes peut fausser ou polluer les résultats des travaux obtenus. Leur origine peut être double. Ces organismes peuvent, tout d'abord, avoir été isolés de leur écosystème naturel avec la microalgue et maintenus depuis en co-culture en laboratoire. Cependant, des contaminations peuvent également avoir lieu pendant la manipulation des souches en laboratoire. Au cours d'un processus de décontamination d'une culture de microalgues, la première étape indispensable consiste à identifier le ou les contaminants, et ensuite, à observer les interactions physiques entre les organismes (organismes épiphytes, biofilms par exemple). Cette phase d'observation permet ensuite d'établir une stratégie de traitement adaptée à la situation. Le traitement appliqué à la culture dépendra d'une part de la nature de la contamination mais aussi de la sensibilité des cellules algales à la technique proposée d'autre part. Dans notre cas, des contaminants de type bactérien ont été constatés au sein de la souche xénique de *Dunaliella sp.*

L'élimination des bactéries dans une culture algale est possible selon différentes techniques répertoriées dans la littérature et reposant sur l'usage de substances chimiques et de techniques de séparation physique des organismes les uns des autres (Droop 1967, Guillard 2005). Les traitements antibiotiques reposent sur l'utilisation d'une ou plusieurs molécules chimiques naturelles ou synthétiques qui visent à nuire à l'organisme bactérien en inhibant sa croissance (agent bactériostatique) ou en détruisant les cellules (agent bactéricide) (Madigan & Martinko 2007). Les agents antibiotiques affectent différemment les populations bactériennes selon leur mode d'action résultant de leur famille chimique, leur concentration et également selon la résistance de l'espèce bactérienne présente. La famille la plus connue est celle des  $\beta$ -lactames qui regroupe la célèbre pénicilline synthétisée par un organisme eucaryote *Penicillium chrysogenum* et caractérisée par Alexander Fleming au début du 20<sup>ème</sup> siècle (Bennett & Chung 2001). Ces molécules cycliques sont des inhibiteurs efficaces de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne par fixation sur les transpeptidases, et sont actives contre les bactéries Gram +. D'autres familles d'antibiotiques telles que les aminoglycosides, les macrolides, les tétracyclines et les daptomycines regroupent, quant à elles, des molécules produites par des organismes procaryotes appartenant aux *Bacteria*. Les aminoglycosides, macrolides et tétracyclines agissent par inhibition de la

synthèse protéique en se fixant aux sous unités ribosomales 30S ou 50S tandis que les daptomycines inhibent la synthèse macromoléculaire (acide nucléique et protéine) par dépolarisation membranaire (Madigan & Martinko 2007).

Des techniques de séparation physique des organismes sont également utilisées en combinaison ou non avec un traitement chimique (Guillard 2005, Bruckner & Kroth 2009). Il s'agit ici d'isoler une ou plusieurs cellules microalgales du reste de la culture contaminée. Différentes méthodes sont utilisées telles que la séparation par filtration ou par centrifugation classique ou différentielle (Connell & Cattolico 1996, Cho *et al.* 2002, Su *et al.* 2007). L'isolement peut aussi être pratiqué sur milieu solide, ou liquide avec l'aide d'un micromanipulateur ou d'un cytomètre en flux (Cho *et al.* 2002, Guillard 2005). La phase d'axénisation est plus délicate lorsque les bactéries installées dans la culture se développent en épiphytes sur les cellules algales. La disjonction des bactéries est alors nécessaire grâce à l'utilisation de tensio-actifs combinée à l'agitation des cellules (vortex) ou l'utilisation d'ultrasons (Guillard 2005, Su *et al.* 2007). Les bactéries sont libérées dans le milieu et peuvent ensuite être éliminées par séparation physique. D'autres techniques existent, telles que l'usage de traitements aux rayons ultra-violets (UV) de type C ou B (Guillard 2005). Il faut cependant s'assurer que la souche algale n'ait pas subi de dommages. Les rayons UV peuvent en effet conduire à des mutations au sein du génome algal et modifier ainsi la souche initiale.

L'observation de la culture de *Dunaliella sp.* choisie pour l'étude révélait la présence de populations bactériennes libres dans le milieu de culture faisant obstacle à notre étude des interactions *Dunaliella sp.*-bactéries. L'objectif de cette étape de purification est, par conséquent, l'élimination des contaminants bactériens et obtenir ainsi une culture de *Dunaliella sp.* axénique.

## 2. Matériels et méthodes

### ○ Culture de *Dunaliella sp.* et maintien

*Dunaliella sp.* SAG 19.3 (synonyme de UTEX 200 et CCAP 19/3) a été obtenue de la collection allemande Sammlung von Algenkulturen Göttingen en 2008 pour cette étude et maintenue en culture au laboratoire à 20 °C sous éclairage continu d'environ 100  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Les repiquages, toutes les trois semaines, sont réalisés en erlenmeyers stériles sur eau de mer artificielle ASW enrichie du milieu de Walne modifié (Tableau 3, A) :

1. L'eau de mer artificielle (ASW) est préférée à une eau de mer naturelle afin de disposer d'une composition minérale stable et contrôlée du milieu de culture. La synthèse de l'ASW est effectuée selon les travaux de Lyman et Fleming en 1940 (Tableau 3, A). Celle-ci est ensuite filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ . L'utilisation de l'ASW impose une salinité autour de 35, possible pour la culture de *Dunaliella sp.* du fait de sa valence écologique. Relativement à un milieu hyperhalin, cette salinité est intéressante d'un point de vue industriel. Pour certaines applications, la quantité de sels peut affecter directement les rendements de production. Particulièrement dans le cadre présent du projet Symbiose et d'une conversion de la biomasse algale en biogaz par digestion anaérobie, le sodium représente un élément toxique pour les microorganismes méthanogènes (Sialve *et al.* 2009). Une faible salinité représente ainsi les conditions opératoires de choix.

2. L'ASW est ensuite enrichie par un milieu de Walne modifié pour la source d'azote et l'apport en vitamines (Walne 1966) (Tableau 3, B): les nitrates sont remplacés par l'ammonium qui représente la forme minérale azotée la plus commune dans les effluents et particulièrement ceux issus de la méthanisation dans le cadre du projet Symbiose (Sialve *et al.* 2009, Vasseur *et al.* 2012). Ensuite, les vitamines B12 (cyanocobalamine) et B1 (thiamine) sont éliminées du milieu d'enrichissement. *Dunaliella sp.* SAG 19.3 est connue pour son indépendance vitaminique (Cifuentes *et al.* 2001, Giordano 2001) alors que l'apport de vitamines à l'échelle de cultures microalgales industrielles représente un coût. En se plaçant en condition d'absence de vitamine, nous pourrions aussi potentiellement mettre en évidence une amélioration du taux de croissance algal par la synthèse bactérienne de vitamines dans le milieu de culture.

### ○ Purification de la culture

Le principe consiste en un traitement antibiotique combiné à une série de rinçages par centrifugation douce (Figure 14). Le mélange d'antibiotiques proposé ici s'inspire de travaux réalisés par Cho *et al.* (2002) et regroupe des molécules bactéricides à spectres larges appartenant à deux grandes familles d'antibiotiques : l'ampicilline de la famille des  $\beta$ -lactames ciblant les bactéries Gram +, et la gentamycine, kanamycine et néomycine, de la famille des aminoglycosides ciblant les bactéries Gram - (Tableau 4). Différentes concentrations sont appliquées en s'inspirant des travaux de Droop, afin

**Tableau 3 : A- composition du milieu d'enrichissement de Walne modifié pour l'étude (Walne 1966) ; B- composition de l'eau de mer artificielle (ASW) d'après Lyman et Fleming (1940).**

A	Milieu de Walne	Original	Modifié	B	Eau de mer artificielle	g.L <sup>-1</sup> d'eau osmosée
		g.L <sup>-1</sup> d'eau osmosée	g.L <sup>-1</sup> d'eau osmosée			
Solution principale (SEP)				NaCl	24,09	
	FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1,3	1,3	MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	10,92	
	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,36	0,36	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,02	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6	33,6	CaCl <sub>2</sub>	1,13	
	Na <sub>2</sub> -EDTA, 2H <sub>2</sub> O	49,8	49,8	KCl	0,68	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	26	26	NaHCO <sub>3</sub>	0,197	
	NaNO <sub>3</sub>	100	-	KBr	0,098	
	NH <sub>4</sub> Cl	-	62,5	SrCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,041	
Solution de métaux (SEM)				H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,027	
	ZnCl <sub>2</sub>	0,21	0,21	FNa	0,003	
	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,2	0,2			
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,09	0,09			
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,2	0,2			
Solution de vitamines (SEV)						
	B1 (thiamine)	0,2	-			
	B12 (cyanocobalamine)	0,01	-			

**Tableau 4 : Composition du mélange concentré d'antibiotiques (100x).**

Pour 100 mL de cocktail antibiotique 100x	gramme	Concentration finale
Ampicilline	5	50 mg.mL <sup>-1</sup>
Gentamycine	1	10 mg.mL <sup>-1</sup>
Kanamycine	2	20 mg.mL <sup>-1</sup>
Néomycine	10	100 mg.mL <sup>-1</sup>

de déterminer la concentration idéale pour laquelle les bactéries sont affectées sans altérations des cellules de *Dunaliella sp.* (Droop 1967). Les étapes de rinçage par centrifugation permettent, quant à elles, de réaliser des abattements importants de populations bactériennes éliminées avec le surnageant. Le mélange d'antibiotiques concentré (100x) (Tableau 4) est préparé à l'aide d'eau osmosée, filtré à 0,22  $\mu\text{m}$ , aliquoté et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les cellules de *Dunaliella sp.*, prélevées en fin de phase de croissance linéaire, subissent une centrifugation douce (500 g pendant 3 min à  $20^{\circ}\text{C}$ ) et sont transférées dans 5 erlenmeyers stériles contenant 25 mL d'ASW enrichie (voir ci-dessus) auquel on ajoute différents volumes du mélange d'antibiotiques afin d'obtenir la gamme de concentrations désirée (Figure 14). Pendant la phase de traitement chimique, les erlenmeyers sont placés à  $20^{\circ}\text{C}$  sous éclairage continu d'environ 100  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  pendant 7 jours. Au bout de 7 jours, les cultures sont diluées dans un nouvel erlenmeyer de 75 mL d'ASW enrichie et maintenues pendant 3 semaines. Cette étape a donc pour effet de diluer le mélange d'antibiotiques afin de favoriser la croissance des microalgues. Au bout de 3 semaines, si l'axénie n'est pas avérée, un nouveau cycle de traitement débute par le lavage des cellules algales par centrifugation. Le cycle de traitement est répété jusqu'à élimination totale des bactéries.

- **Contrôle des populations bactériennes**

Une observation des populations bactériennes au sein des cultures de *Dunaliella sp.* est réalisée au début et à la fin de chaque cycle du traitement grâce à différentes techniques : tout d'abord, des isollements bactériens sur milieu hétérotrophe (Marine Agar, Difco 212185, Becton Dickinson) sont réalisés. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées en incubation à  $20^{\circ}\text{C}$  pendant 10 jours avant contrôle du développement de colonies bactériennes. La seconde technique utilisée consiste en l'observation directe des cellules bactériennes en microscopie à épifluorescence (objectif 100) après marquage de l'ADN au SYBRgreen® 1 (Lonza USA, concentration finale 1x) et après 10 minutes à l'obscurité. Enfin, la présence de cellules bactériennes est également déterminée par cytométrie en flux (ACCURI, Becton Dickinson, 1 min, fast, threshold (FSC) =10000) après dilution des échantillons, ajout de formaldéhyde à 2%, marquage de l'ADN au SYBRgreen® 1 (Lonza USA, concentration finale 1x) et 10 minutes à l'obscurité.

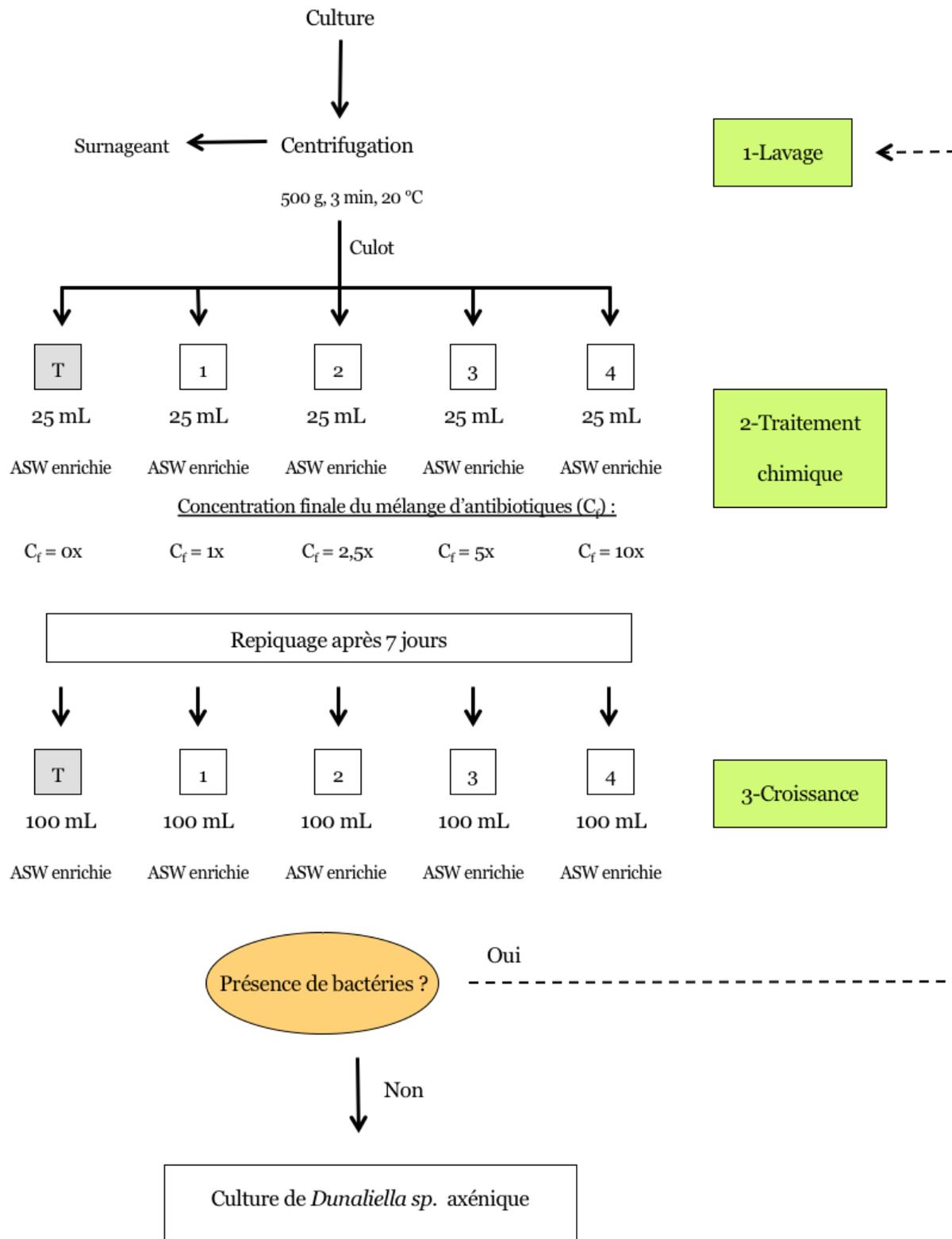


Figure 14 : Représentation schématique du protocole appliqué pour l'axénisation de *Dunaliella sp.*

### 3. Résultats et discussion

L'étude de l'influence de bactéries sélectionnées sur la croissance de *Dunaliella sp.* implique de disposer d'une culture axénique et d'éliminer les populations bactériennes observées à l'aide de différentes techniques : l'épifluorescence, la cytométrie en flux et l'étalement sur milieu hétérotrophe (Figure 15). La phase d'observation a montré la présence de bactéries libres dans le milieu de culture, sans comportement épiphytique. La stratégie de traitement adoptée pour l'axénisation de la culture repose principalement sur la mise en place d'un traitement antibiotique associé à des phases de lavages doux des cellules algales. Un cocktail d'antibiotiques à spectre large agissant contre les bactéries Gram - et Gram + est élaboré et plus ou moins dilué dans le milieu de culture afin d'établir une gamme de concentration. Dès le premier cycle de traitement et pour toutes les concentrations, une réduction importante du nombre de bactéries est observée, associée à une survie des cellules microalgales. *Dunaliella salina* a déjà montré une capacité de résistance aux molécules antibiotiques dans d'autres études mais pour des concentrations inférieures (Mishra *et al.* 2008) ou du même ordre de grandeur (Geng *et al.* 2003). En revanche, après observation microscopique, les cellules semblent plus affectées par la dose d'antibiotique 10x (Tableau 5) puisqu'elles perdent leur mobilité et présentent un volume cellulaire supérieur. Il pourrait s'agir d'aplanospores, forme de résistance observée chez cette espèce en conditions de croissance non-optimales (cf introduction générale). Néanmoins, après seulement deux cycles de traitements s'étalant sur une période totale de deux mois, toutes les cultures sont capables de croissance et surtout apparaissent dépourvues de cellules bactériennes (Figure 15, Tableau 5). Ce succès s'explique probablement par la convergence de multiples facteurs favorables. Tout d'abord, les observations microscopiques révèlent que les bactéries ne présentent pas de comportement épiphytique. Il n'est donc pas nécessaire d'employer une étape de prétraitement, combinant généralement des lavages à l'aide d'une solution tensioactive avec l'emploi d'ultrasons ou de vortex, pouvant fragiliser les cellules algales. Un abattement important des bactéries libres peut donc être réalisé par l'utilisation de techniques de lavages simple à mettre en œuvre et peu destructrices pour les microalgues. Ensuite, un traitement de forte concentration sur un temps court représente une meilleure stratégie qu'un traitement doux et long (Bruckner & Kroth 2009) à condition que les cellules algales le supportent. L'utilisation d'un cocktail de molécules antibiotiques à spectres larges multiplie également les chances de succès.

Le traitement choisi pour cette étude a également pour objectif de conserver au mieux la diversité de la population algale d'origine. En effet, l'usage de certaines techniques d'isolement telles que la cytométrie en flux ou la micromanipulation aboutit à l'obtention de cultures clonales. La réduction des étapes de traitement et la conservation de la totalité des cellules à chaque étape sont toutes deux favorables au maintien de la diversité présente initialement. En revanche, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse d'une sélection phénotypique par pression chimique. De manière à éviter toutes erreurs

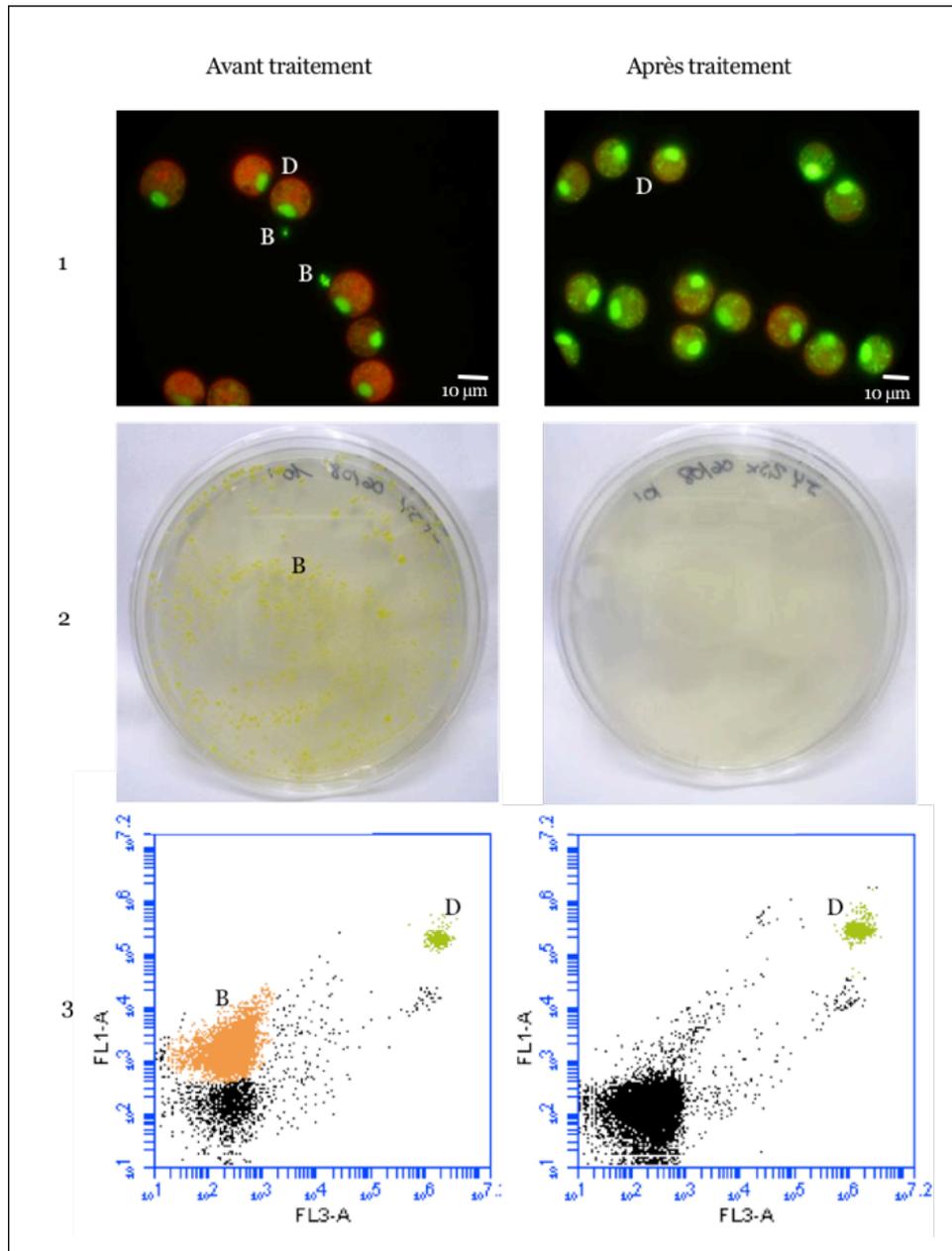


Figure 15 : Observation d'une culture de *Dunaliella sp.* avant et après traitement antibiotique à la concentration de 2,5x en épifluorescence (1), sur milieu hétérotrophe (2) et en cytométrie en flux (3) ; D= *Dunaliella sp.*, B= bactéries.

Tableau 5 : Synthèse des observations microscopiques réalisées à partir des cultures de *Dunaliella sp.* soumises au traitement antibiotique de différentes concentrations.

Concentration du cocktail antibiotique	Présence de bactéries	Intégrité des cellules algales
1X	-	+
2,5X	-	+
5X	-	-
10X	-	--

d'interprétations de résultats, cette souche axénique constitue désormais notre nouvelle culture de référence et servira de témoin pour la suite de l'étude.

Après observation microscopique des cultures traitées avec différentes concentrations d'antibiotiques, l'axénie est observée pour toutes les conditions. Malgré la résistance apparente des cellules algales qui sont capables de croissance après l'arrêt du traitement, les observations microscopiques ont montré que les fortes concentrations affectaient *Dunaliella sp.* De manière à garantir l'axénie de la culture choisie sur le long terme pour la suite de l'étude, il est judicieux de sélectionner la souche traitée avec la plus forte concentration antibiotique mais sans effet délétère observé sur les cellules algales. Par conséquent, la culture traitée avec une concentration de 2,5x est retenue pour la suite de l'étude.



## Souches bactériennes : Mise en place d'une collection

### 1. Introduction

Une souche axénique de *Dunaliella sp.* est désormais disponible grâce au traitement appliqué reposant sur l'utilisation d'un mélange de différentes molécules antibiotiques. Nous pouvons maintenant nous focaliser sur la recherche de souches bactériennes à fort potentiel d'interaction avec cette microalgue.

Dans la littérature traitant de l'étude des interactions microalgues-bactéries, deux stratégies différentes sont utilisées par les auteurs. Pour une part, les travaux se focalisent sur l'étude d'organismes vivant au sein du même écosystème. Il s'agit là, pour la majorité des travaux d'étudier l'écologie des espèces. Certaines études choisissent d'analyser des systèmes plurispécifiques tels que Liu *et al.* (2008) qui ont étudié en laboratoire les interactions entre *Heterosigma akashiwo* et des communautés bactériennes prélevées au moment du bloom de ce dinoflagellé. Amaro *et al.* (2005) ont analysé quant à eux, les interactions entre *Alexandrium catenella* et trois bactéries algicides, une à une, isolées à partir de la culture après plusieurs années de maintien au laboratoire. D'autres travaux, généralement dans un contexte plus applicatif, sont basés sur l'utilisation d'associations dites non naturelles. De-bashan, Moreno *et al.* (2002) ont par exemple associé à plusieurs microalgues d'eau douce dont *Chlorella vulgaris*, la bactérie *Azospirillum brasilense*, favorisant la croissance des végétaux supérieurs et utilisée comme probiotique en agriculture.

Le laboratoire PBA possède une collection de microalgues marines diversifiées d'un point de vue taxonomique. Au sein de ces cultures, des souches bactériennes vivent associées aux microalgues. En absence de tout apport de carbone organique dans les cultures, ces communautés bactériennes sont considérées comme capables de se développer à partir de la seule matière organique algale sans effets délétères évidents pour les algues. La stratégie adoptée pour cette étude repose sur l'isolement de ces souches bactériennes afin de constituer ainsi une collection bactérienne spécifique pour l'étude.

## 2. Matériel et méthode

### ○ **Isolement des souches bactériennes**

Les souches bactériennes sont isolées à partir de cultures de microalgues marines du laboratoire appartenant à 19 espèces différentes (Tableau 6). Ces microalgues étaient maintenues en culture à 20°C sous éclairage continu de faible intensité (50  $\mu\text{molphotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Un étalement bactérien est réalisé au moment de la phase stationnaire sur Marine Agar (Difco 212185, Becton Dickinson EU), milieu solide à spectre large pour bactéries marines. Les prélèvements sont ensuite incubés à 20°C à l'obscurité pendant 10 jours avant observation. Les différentes colonies formées sont isolées à l'aide d'une pipette Pasteur bouturée sur le même milieu afin de disposer d'une culture pure. Chaque type de colonie est décrit (couleur, forme), référencé et transféré sur le milieu liquide Marine Broth (Difco 279110, Becton Dickinson, EU) avant d'être conservé à -80°C. La conservation des bactéries à cette température est possible par l'ajout du cryoprotectant le diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 5 %.

### ○ **Extraction de l'ADN bactérien**

La méthode d'extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique) utilisée pour cette étude est celle développée par Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* 1989). Les bactéries sont cultivées pendant 48 h sur Marine Broth à 20 °C et sous agitation à 350 rtm. Les cellules (environ  $10^9.\text{mL}^{-1}$ ) sont ensuite récupérées par centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) de la culture et transférées dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon Tris-EDTA préparé de la manière suivante : 606 mg de trihydroxyméthylaminométhane (TRIS) et 190 mg d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) sont dilués dans de l'eau osmozée afin de disposer d'un volume final de 10 mL de solution tampon. Son pH est neutralisé à 7,5 par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M. Ensuite, 25  $\mu\text{L}$  de lysosyme à 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  sont ajoutés avant incubation à 37 °C pendant 45 min. Une seconde incubation est nécessaire à 55 °C pendant 1 heure après l'ajout de 60  $\mu\text{L}$  de SDS à 10 % (p/v) et 6  $\mu\text{L}$  de protéinase k à 10  $\text{mg.mL}^{-1}$ . L'échantillon subit alors une série de deux extractions qui débutent par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de chlorure de sodium 5 M et 700  $\mu\text{L}$  de phénolchloroforme isoamylé (25 /24 /1). Après émulsion et centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) la phase aqueuse est récupérée et subit une deuxième extraction avec 700  $\mu\text{L}$  de chloroforme. La troisième étape consiste à précipiter l'ADN avec 700  $\mu\text{L}$  d'isopropanol à -20 °C pendant 10 min. L'ADN est ensuite récupéré après centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) et élimination du surnageant. Le culot est lavé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 70 % avant de subir une dernière centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C). Après élimination du surnageant, l'ADN est séché à température ambiante puis repris dans 30  $\mu\text{L}$  de tampon Tris-EDTA dans lequel il est conservé à 4 °C.

Tableau 6 : Liste des espèces microalgales utilisées pour les isolements bactériens.

Embranchement	Espèce
Ochrophyte	<i>Chaetoceros calcitrans</i>
	<i>Chaetoceros gracilis</i>
	<i>Chaetoceros minus</i>
	<i>Chaetoceros pumilum</i>
	<i>Chaetoceros sp. tenuissimus like</i>
	<i>Odontella aurita</i>
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
	<i>Skeletonema costatum</i>
	<i>Skeletonema marinoi</i>
	<i>Thalassiosira sp.</i>
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>
Haptophyte	<i>Emiliana huxleyi</i>
	<i>Isochrysis affinis galbana</i>
	<i>Isochrysis galbana</i>
Chlorophyte	<i>Tetraselmis suecica</i>
	<i>Dunaliella sp.</i>
Chlorarachniophyte	<i>Chlorarachnion reptans</i>
Cryptophyte	<i>Rhodomonas salina</i>
Rhodophyte	<i>Rhodella violacea</i>

○ **Amplification de l'ADN r16S**

Un fragment d'environ 1500 pb du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome bactérien est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) grâce à l'utilisation des amorces Sadir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') et S17-rev (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). Le mélange pour PCR (25 µL) est constitué de : 100 ng d'ADN, 50 µM de chaque amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1x de tampon Go taq (Go taq kit, Promega) et 1, 25 unité d'enzyme taq polymérase (Go taq kit, Promega). L'amplification se déroule dans un thermocycleur (MyCycler, BIO-RAD) selon les cycles de température suivants : 5 min à 94 °C, puis 35 cycles de 0,58 min à 94 °C, 1min à 54 °C et 1,5 min à 72 °C, et enfin 7 min à 72 °C. Les produits d'amplification sont observés après électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et coloration des acides nucléiques au bromure d'éthidium.

○ **Séquençage et analyse phylogénétique**

Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite séquencés à partir de l'amorce Sadir par la plateforme génomique Biogenouest de Roscoff (<http://www.sb-roscoff.fr/plateformes-techniques/genomique-sbr.html>). Les séquences obtenues sont comparées aux bases de données Genbank bacteria par BlastN. Les logiciels Bioedit (Ibis Bioscience) et ClustalW sont utilisés pour l'édition et l'alignement des séquences respectivement. Les arbres phylogénétiques (500 réplicats) sont construits à l'aide du logiciel Phylo-Win en utilisant l'algorithme du neighbor-joining et le modèle de substitution de Jukes and Cantor (Jukes & Cantor 1969, Saitou & Nei 1987).

### **3. Résultats et discussion**

Le présent travail avait pour objectif d'acquérir des souches bactériennes potentiellement intéressantes pour l'étude des interactions *Dunaliella sp.* - bactéries en système bispécifique. La stratégie adoptée reposait sur l'isolement de bactéries naturellement associées à des monocultures de microalgues maintenues en laboratoire. Cette phase exploratoire nous a permis d'isoler 97 souches bactériennes et de mettre en place une collection de bactéries spécifique. La majorité (70%) des souches a été isolée à partir de cultures de diatomées (Ochrophytes) qui constituaient la majorité (58%) des espèces algales échantillonnées (Figure 16). En moyenne, 5 souches bactériennes sont isolées par espèce microalgale. Le plus grand nombre de souches isolées est obtenu chez la microalgue *Odontella aurita* avec 22 souches bactériennes isolées.

L'entretien des cultures de microalgues au laboratoire s'effectue sans apport de milieu hétérotrophe. Par conséquent, les populations bactériennes qui s'y développent, métabolisent le carbone organique produit par les cellules de microalgues. La croissance des bactéries à partir de la matière organique directement disponible dans la culture est un premier critère de sélection important dans un contexte

appliqué tel que le projet Symbiose, puisqu'il n'est pas nécessaire de réaliser des apports organiques à la culture représentant un coût supplémentaire.

L'analyse phylogénétique de la collection a permis d'observer une diversité intéressante au sein de cet échantillon de souches, avec peu de souches communes à plusieurs cultures de microalgues (Figure 18). L'analyse comparative des séquences d'ADN r16S permet d'identifier le genre et parfois l'espèce de 87% des souches isolées. La majorité des souches (79) sont des bactéries de type gram négatif (gram-) et appartiennent à différents groupes taxonomiques : *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) pour 23% d'entre elles, et deux sous groupes des Proteobacteria,  $\alpha$ - pour 28% et  $\gamma$ - pour 31% (Figure 17). Le reste de la collection est constitué de bactéries de type gram positif (gram +).

La diversité obtenue au sein de la collection pourrait suggérer une certaine spécificité dans les associations microalgues-bactéries. En effet, une faible redondance de souches bactériennes est observée entre les cultures de microalgues. Sapp, Schwaderer *et al.* (2007) ont fait le même constat aux cours de leur travaux sur ce sujet. Ils ont conclu cependant que la question d'association spécifique demeure complexe compte tenu de la diversité de facteurs intervenant dans la sélection des espèces.

Les bactéries sont réparties au sein de 4 groupes taxonomiques :  $\alpha$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) et Gram +. Ces groupes bactériens sont régulièrement cités dans la littérature dès lors que les études analysent la diversité bactérienne associée aux microalgues dans le milieu naturel ou en culture (Crump *et al.* 1999, Green *et al.* 2004, Sapp, Wichels, *et al.* 2007). Nicolas *et al.* (2004) ont observé des bactéries des groupes taxonomiques  $\alpha$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria*, CFB et gram + isolées à partir de cultures de microalgues utilisées en éclosérie de bivalves.

En revanche, l'étude de Nicolas *et al.* (2004) comme d'autres travaux, a montré également la présence  $\beta$ -*Proteobacteria* (Pinhassi *et al.* 1997, Bano & Hollibaugh 2000) alors que ce type de bactéries n'est pas observé au sein de notre collection de bactéries. Ce groupe de  $\beta$ -*Proteobacteria* est plutôt abondant en systèmes aquatiques terrestres et reste minoritaire en milieu marin, par conséquent leur origine marine est parfois discutée (Schäfer *et al.* 2002, Kirchman 2002). La méthode d'isolement bactérien utilisée ici nous permet d'accéder aux bactéries dominantes et cultivables au sein des cultures de microalgues. La part de bactéries cultivables dans le milieu naturel est assez faible et représenterait au sein de cultures de microalgues entre 10 à 60% de la population bactérienne totale (Nicolas *et al.* 2004). D'après Selje *et al.* (2005), 20% des bactéries marines seraient cultivables. Une analyse culture-indépendante par approche moléculaire permettrait d'étudier de manière plus exhaustive la diversité bactérienne au sein de ces cultures algales. Dans le cadre de notre étude, la cultivabilité des souches bactériennes et leur croissance à partir de la matière organique algale sont indispensables.

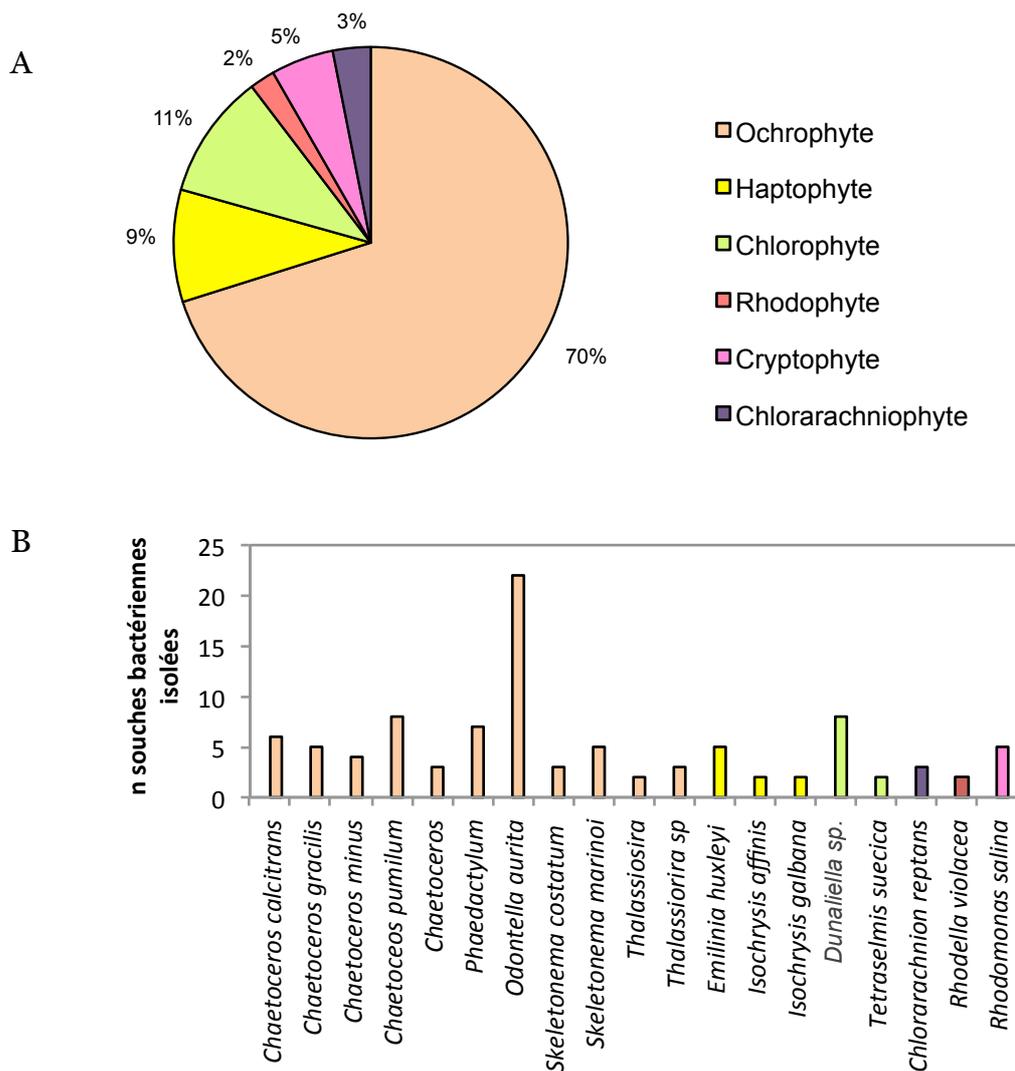


Figure 16 : Nombre de souches bactériennes isolées, exprimé (A) en pourcentage par embranchement algal, (B) en nombre de souches par espèce algale

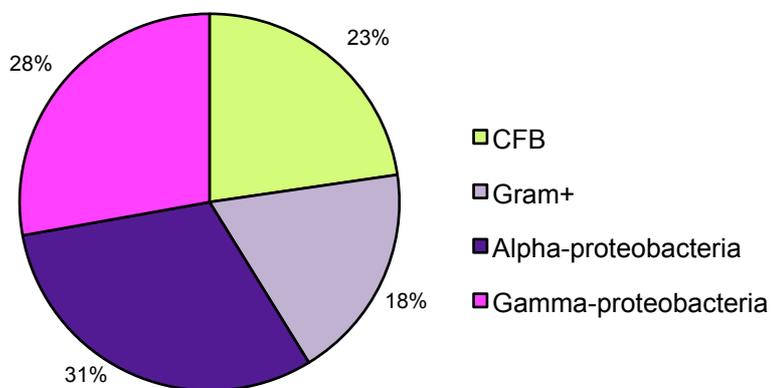


Figure 17: Répartition des souches bactériennes isolées, exprimée en pourcentage et par groupe taxonomique.

Les bactéries appartenant au groupe des CFB sont, avec les  *$\alpha$ -Proteobacteria*, des bactéries dominantes du picoplancton (Schäfer *et al.* 2002). Ce groupe de bactéries est souvent abondant dans de nombreux systèmes marins et dulcicoles et présente des taux de croissance importants comparés aux autres groupes bactériens (Kirchman 2002). Les genres *Muricauda* et *Cytophaga* observés ici, ont également été répertoriés au sein de cultures de diatomées par Nicolas *et al.* (2004). Les CFB regroupent des bactéries capables de dégrader des macromolécules organiques, particulièrement adaptées aux milieux riches en polysaccharides (Cottrell & Kirchman 2000, Kirchman 2002) tels qu'au sein d'une culture de microalgues par exemple.

La présence de bactéries gram+ au sein de cultures de microalgues a déjà été constatée par d'autres auteurs. Nicolas *et al.* (2004) ont suggéré que les bactéries gram+ observées ne sont probablement pas natives d'environnements marins mais certainement importées pendant la manipulation des cultures. Les souches bactériennes isolées à partir de la culture de *Dunaliella sp.*, avant l'étape d'axénisation, sont toutes de type gram+. Cinq souches sont affiliées à l'espèce *Rhodococcus fascians*. Il est intéressant de noter que l'espèce *R. fascians* est connue pour sa pathogénicité envers les végétaux supérieurs (Simón-Mateo *et al.* 2006). Cette bactérie est en effet responsable de la formation d'excroissances appelées galles chez les végétaux. Une autre bactérie de même genre, *R. luteus* a également été observée dans des cultures de *Dunaliella sp.* par d'autres auteurs (Borisova & Nogina 2000). Les séquences 16S de ces cinq souches présentent 100 % d'homologie ce qui démontre leur grande proximité taxonomique.

Les *Proteobacteria* forment un groupe de bactéries gram- présentant une grande diversité métabolique (Madigan & Martinko 2007). Les sous-groupes alpha et gamma sont capables de métaboliser certains composés organiques tels que des acides aminés ou des protéines (Cottrell & Kirchman 2000).

Les  *$\alpha$ -Proteobacteria* sont fréquemment rencontrés en milieu marin et représentent un groupe dominant des communautés bactériennes de surface (Morris *et al.* 2002). Les *Roseobacter* sont les  *$\alpha$ -Proteobacteria* les plus souvent rencontrées en association avec les microalgues dans le milieu naturel et connues pour produire des composés antibiotiques (Bruhn *et al.* 2007, Geng & Belas 2010). Au sein de la collection bactérienne, seule une souche (SY133) appartenant à ce genre a été isolée dans une culture de *Skeletonema marinoi*. Le genre *Sulfitobacter*, présent dans la collection, est assez répandu en milieu océanique et a déjà été observée en association avec des diatomées d'espèces différentes (Schäfer *et al.* 2002).

Les  *$\gamma$ -Proteobacteria*, contrairement au sous groupe  $\alpha$ , vivent souvent en épiphyte sur des particules organiques détritiques (DeLong *et al.* 1993). Le genre *Marinobacter* est majoritaire au sein du groupe des  *$\gamma$ -Proteobacteria* répertoriés dans la collection bactérienne. En effet, 14 souches appartenant à ce genre ont été isolées à partir de cultures de diatomées essentiellement : *Odontella aurita*, *Chaetoceros minus*, *Skeletonema marinoi*, *Chaetoceros pumilum* et *Thalassiosira sp.*. Des homologies de séquences sont à noter au sein de ce groupe de souches.

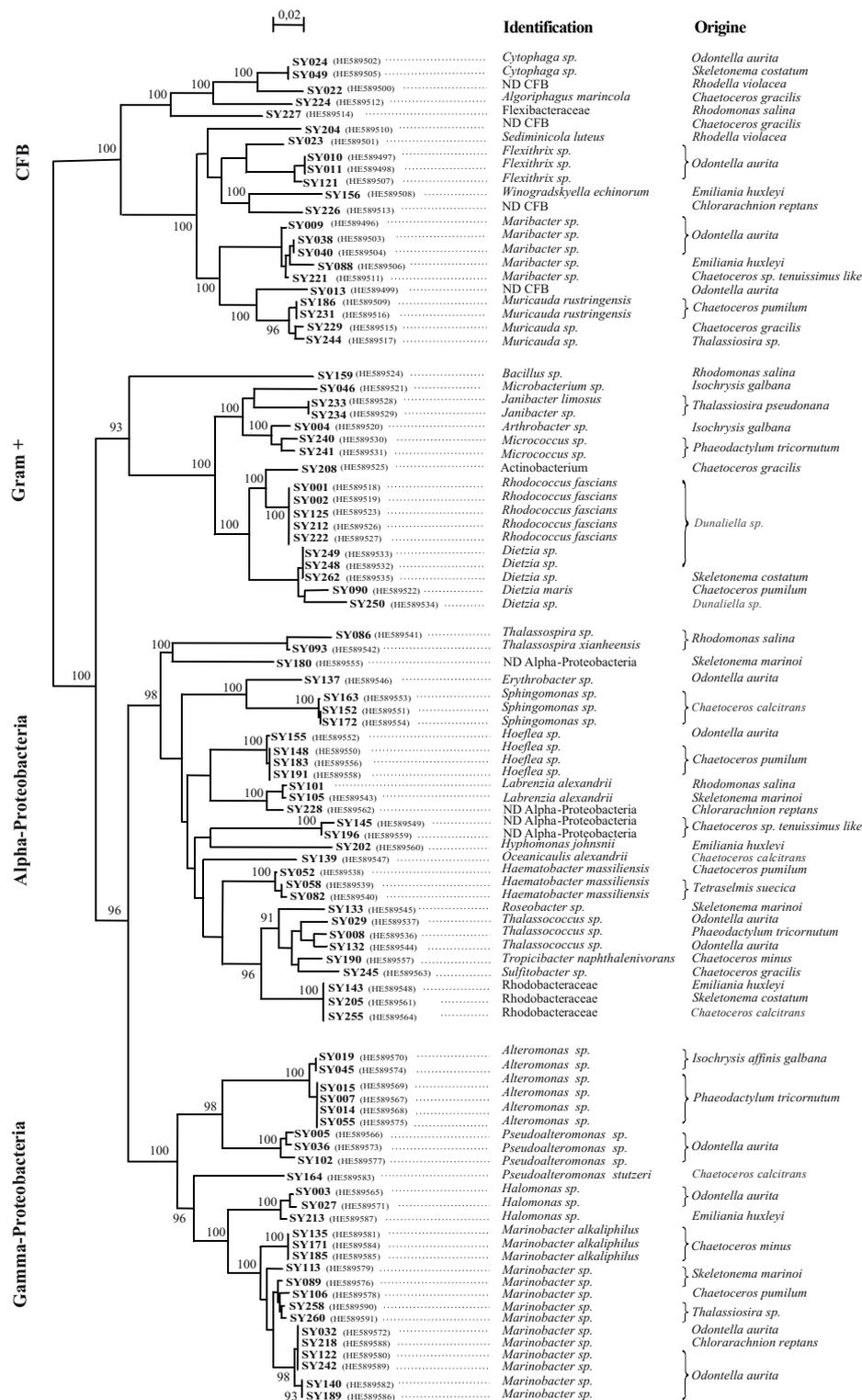


Figure 18 : Arbre phylogénétique (selon la méthode neighbor-joining) basé sur l'analyse comparée de séquences de l'ADN r16S de bactéries isolées à partir de cultures de microalgues. Les souches bactériennes sont identifiées par un code de collection du laboratoire du type SYxxx puis une référence de la banque de séquences European Nucleotide Archive du type HExxxxx.

En revanche, sans analyse complémentaire nous ne pouvons conclure quand à la présence de dupliques de souches au sein de la collection bactérienne. Le genre *Marinobacter* est relativement commun dans les océans et fréquemment associé au phytoplancton (Amin *et al.* 2009, Sonnenschein *et al.* 2011). Certaines espèces sécrètent dans le milieu des sidérophores facilitant l'acquisition du fer par les microalgues (Amin *et al.* 2009). Le genre *Pseudoalteromonas* est également représenté par 4 souches au sein de la collection. Ce genre regroupe des bactéries généralement cultivables, communes des environnements marins et capables de survivre en milieu oligotrophe grâce à leur plasticité métabolique (Ivanova *et al.* 2002). Les *Pseudoalteromonas* sont considérées comme des organismes saprophytes impliqués dans la dégradation des thalles de macroalgues et donc capables de dégrader des composés organiques complexes (Ivanova *et al.* 2002). Trois souches du genre *Halomonas* ont également été isolées au cours de cette étude à partir de cultures d'*Odontella aurita* et *Emiliana huxleyi*. Ce genre regroupe des bactéries halophiles modérées capables de se développer dans des environnements de salinité variée (Dobson & Franzmann 1996). Ces bactéries utiliseraient comme substrat organique les produits de dégradation de composés organiques complexes qu'elles ne peuvent métaboliser directement (Ivanova *et al.* 2002). Une bactérie du genre *Halomonas* a montré, au cours des travaux de Croft *et al.* (2005), un effet promoteur de la croissance d'une microalgue marine *Porphyridium purpureum*.

Enfin, au sein de la collection, nous pouvons remarquer la présence de certains genres bactériens régulièrement cités dans la littérature et dont certaines souches sont connues pour leur activité algicide. Il s'agit des genres *Cytophaga sp.*, *Alteromonas sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Bacillus sp.* ou *Dietzia sp.* (Mayali & Azam 2004, Imai *et al.* 2006, Kim *et al.* 2008). Cependant, deux espèces du même genre et même deux souches de la même espèce peuvent avoir des activités biologiques différentes.

## Conclusion

La méthode proposée pour la purification de *Dunaliella sp.* SAG 19.3 combine une phase de traitement antibiotique à des lavages de la culture. Deux cycles de traitement, correspondant à une durée totale de deux mois, ont permis d'éliminer les communautés bactériennes initialement présentes au sein de la culture. Une culture de *Dunaliella sp.* axénique est désormais disponible pour l'étude. Le protocole mis en œuvre pour le maintien des cultures axéniques se révèle particulièrement efficace puisqu'il a permis de conserver cette axénie pendant les trois ans de l'étude.

Dans un second temps, l'étape d'isolement de bactéries associées aux microalgues en culture, a permis d'obtenir une collection bactérienne riche de 97 souches d'une diversité intéressante. Ces bactéries obtenues sont majoritairement de type gram négatif (82 %) et appartiennent à 3 groupes taxonomiques parmi les plus abondants en milieu marin et également observés au sein de cultures de microalgues : les *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*,  $\alpha$ - et  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Un autre groupe de bactéries minoritaires (18 %) de type gram+ est également présent au sein de la collection. Ce groupe de bactéries est plus fréquemment rencontré en système aquatique terrestre.

Cette collection de bactéries associées aux microalgues marines en culture représente un pool de bactéries potentiellement intéressant dans le cadre de notre étude. Nous pouvons désormais tester leur potentiel en culture mixte avec *Dunaliella sp.* et étudier l'effet de ces souches bactériennes sur la croissance cette microalgue.

---

PARTIE 2- INFLUENCE DE BACTÉRIES SUR LA CROISSANCE  
ET LE MÉTABOLISME DE *DUNALIELLA SP.*

---



## Sélection de bactéries stimulant la croissance de *Dunaliella sp.* en microplaques

### 1. Introduction

De nombreux facteurs peuvent influencer la nature des interactions interspécifiques entre les organismes résultant en des interactions neutres, positives ou négatives avec ou sans réciprocité (Breuil 1997, Combes 2001). C'est également le cas des interactions microalgues-bactéries même si celles-ci ont été encore peu étudiées, rendant leur analyse particulièrement complexe. Quelques auteurs ont montrés par exemple qu'une espèce bactérienne peut inhiber ou stimuler la croissance microalgale selon l'espèce algale considérée (Imam *et al.* 1984, Park *et al.* 2008). Ce caractère espèce dépendant des interactions microalgues-bactéries tient toute son importance pour notre étude qui a pour objectif de sélectionner une souche bactérienne permettant d'améliorer les rendements de production de la microalgue *Dunaliella sp.* souche SAG19.3.

L'étape d'isolement de bactéries associées aux microalgues du laboratoire nous a permis de créer une collection de bactéries marines intéressante. La taille de la collection et la diversité des souches bactériennes disponibles augmentent donc la probabilité de sélectionner un couple *Dunaliella sp.* - bactérie aux rendements de production augmentés.

Afin d'observer l'effet de chaque bactérie isolée à l'étape expérimentale précédente sur la croissance de la microalgue, la sélection peut être réalisée en comparant les performances des cultures mixtes une à une par rapport à la culture axénique dépourvue de bactéries. Il est également intéressant de comparer ces performances à la culture d'origine appelée culture xénique et contenant une communauté de bactéries différentes. Cependant, devant la diversité de la collection bactérienne à tester, la comparaison de 97 cultures mixtes dans des systèmes de cultures classiques (Erlenmeyers ou photobioréacteurs) représenterait un travail de plus d'une année. Ce type de dispositif obligerait en outre, à effectuer l'expérience de manière séquentielle avec les biais liés à ce type d'approche. Par conséquent, il est apparu nécessaire de développer un outil de culture adapté pour l'étude et qui propose de comparer en une seule et même expérience, jusqu'à 96 cultures différentes et en triplicats. Le système repose sur l'utilisation de microplaques 96 puits placées en conditions de température et d'éclairement homogènes. De tels systèmes ont pu être utilisés par le passé pour accéder à la croissance de microalgues, à leur capacité photosynthétique ou encore pour des études toxicologiques (Eisentraeger *et al.* 2003, Mertiri *et al.* 2011, Skjelbred *et al.* 2012). En revanche, aucune étude à notre connaissance n'a utilisé le potentiel d'outils de criblages en microplaques pour étudier les interactions microalgues-bactéries.

Néanmoins, la miniaturisation des cultures de microalgues impose de faire face à quelques contraintes.

Tout d'abord, le faible volume de culture (300  $\mu\text{L}$ ) impose l'utilisation de méthodes de suivi indirectes de la croissance algale telles que l'estimation de la quantité de chlorophylle *a* par absorbance ou par fluorescence. Il faut en revanche, au préalable, analyser la sensibilité de ces proxys (absorbance et fluorescence) au développement de populations bactériennes. Il faut ensuite limiter ou interdire toute évaporation de ce faible volume de culture afin de mesurer la croissance algale de façon rigoureuse. Pour ce faire, le choix du film de scellage des micropuits représente un point essentiel. Enfin, la comparaison des résultats de croissance obtenus interpuits et interplaques recommande une homogénéisation soignée des principaux paramètres influençant la réponse mesurée : l'intensité lumineuse, la température, les contaminations bactériennes.

L'objectif de cette étude est de réaliser un premier criblage des différentes associations *Dunaliella sp.* - bactéries et de sélectionner des bactéries améliorant la productivité de cette microalgue. L'effet des souches bactériennes est estimé à travers le calcul de deux paramètres contribuant à la productivité d'une culture en batch : le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) et le gain en biomasse maximale ( $\Delta X_{max}$ ) mesuré en phase stationnaire.

## 2. Matériel et méthode

### A. Mise au point des méthodes : étude par plan factoriel de l'influence des bactéries sur l'estimation de la croissance algale

La méthode des plans d'expérience est choisie pour cette étude car elle permet d'analyser l'influence de facteurs à travers leurs effets principaux mais aussi en interactions. L'effet de la population bactérienne (facteur B), et notamment sa taille, est testé sur les deux méthodes de suivi indirecte de la croissance algale : l'absorbance et la fluorescence de la chlorophylle *a*. Cette influence peut potentiellement varier selon la taille de la population algale (facteur A). Le plan d'expérience complet composite  $2^{2*}$  est créé à l'aide du logiciel Statgraphics et impose la réalisation de 11 cultures mixtes *Dunaliella sp.* -bactéries différentes pour le résoudre (Figure 19). Pour chaque facteur, deux modalités (-1 et +1) sont déterminées (Figure 19, B). Ces valeurs sont choisies de façon à encadrer les conditions expérimentales de la suite de l'étude. Elles représentent les bornes du domaine expérimental formant ici un carré (4 points) (Figure 19, B). Les points centraux (o) au nombre de 3 servent à estimer la variance de la réponse pour l'ensemble de l'expérience. Les 4 points étoiles (- $\alpha$  et + $\alpha$ ) permettent d'accéder aux effets quadratiques des facteurs dans le cas de réponses non linéaires. Leur distance par rapport aux points centraux est déterminée à partir de la valeur  $\alpha$  de 1,414. La modélisation de la réponse peut s'écrire selon l'équation suivante :

$$y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_j X_j + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{jj} X_j^2 + \varepsilon$$

Équation 3

Avec :

**y**, réponse du système

**$\beta$** , coefficient du modèle

**$X_i$** , effet principal du facteur i

**$X_i X_j$** , interaction entre les facteurs i et j

**$X_i^2$** , effet quadratique du facteur i

**$\varepsilon$** , terme d'erreur

Une souche bactérienne *Sphingomonas sp.* SY163 isolée d'une culture de *Chaetoceros calcitrans* sélectionnée de manière aléatoire au sein de la collection, mise en culture sur Marine Broth depuis 48 h, à 20 °C sous agitation, est centrifugée à 3000 g pendant 5 min à 20 °C. Le milieu de culture turbide pouvant perturber les mesures d'absorbance et de fluorescence, est ainsi éliminé avec le surnageant. Les cellules bactériennes sont ensuite récupérées et transférées dans un volume d'eau de mer artificielle filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ . La concentration cellulaire bactérienne à introduire pour chaque condition est estimée par l'utilisation de la relation approximative, préalablement établie à l'aide d'un spectrophotomètre à cuve de 1 cm de trajet optique : 1 unité d'absorbance à 540 nm correspond à environ  $10^9$  cellules bactériennes. Les différents volumes de culture bactérienne correspondants sont alors ajoutés aux 11 tubes de manière à obtenir la concentration imposée par le plan d'expérience (Figure 19). Ensuite, différents volumes d'une culture de *Dunaliella sp.* axénique sont également répartis dans les 11 tubes (Eppendorf, 15 mL) décrits précédemment et ajoutés aux volumes de culture bactérienne (Figure 19).

Enfin, les volumes finaux sont ajustés par l'ajout d'un complément d'eau de mer stérile afin de réaliser les 11 mélanges *Dunaliella sp.* -bactéries. L'absorbance à 680 nm et la fluorescence (excitation 450nm, émission 685nm) sont choisis pour le suivi de la croissance algale puisque ces deux mesures sont fortement corrélées à la concentration de chl *a*, spécifique des microalgues. Ces deux mesures sont réalisées à partir des 11 mélanges différents répartis dans une microplaque 96 puits, à l'aide d'un spectrofluorimètre à microplaques (TECAN). Les valeurs obtenues pour les deux réponses et pour chaque condition servent ensuite à résoudre le plan d'expérience à l'aide du logiciel Statgraphics.

## B. Dispositif de culture en microplaques et analyses

### ○ Préparation des cultures mixtes *Dunaliella sp.* -bactéries

Les 97 souches bactériennes de la collection (Figure 11), conservées à -80 °C, sont reprises et isolées sur milieu solide (Marine Agar) avant d'être transférées sur milieu liquide (Marine Broth). Après 48 h à 20 °C sous agitation, la culture est centrifugée à 3000 g pendant 5 min et à 20 °C afin d'éliminer le milieu hétérotrophe de la culture. Le culot de cellules bactériennes est repris dans de l'eau de mer artificielle stérile (ASW). Parallèlement à ce travail, un inoculum de *Dunaliella sp.* SAG 19.3 axénique est préparé 10 jours avant l'expérience à 20 °C et sous éclairage continu d'environ 100  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Cette culture est diluée dans un milieu fraîchement préparé à base d'ASW et de milieu de Walne modifié : sans vitamine. L'azote est apporté à 547,8  $\mu\text{M}$  sous forme de chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) de manière à favoriser la limitation par l'azote pendant l'expérience. Le ratio azote : phosphore est dans ce cas de 3,3 :1. Afin d'éviter la limitation en carbone des cultures du fait de l'absence d'échanges gazeux, une solution d'hydrogénocarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 10 mM. La concentration algale est fixée à  $2.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> afin de disposer en fin d'expérience de cultures peu concentrées et d'éviter la limitation des cellules par la lumière. Cette culture est répartie dans différentes flasques de culture (BD Falcon). A chaque flasque, un volume de culture bactérienne est ajouté de manière à obtenir un rapport algues : bactéries d'environ 1 :10. Le volume à ajouter est estimé par la mesure de l'absorbance à 540 nm et l'utilisation de la relation approximative précédemment expliquée.

### ○ Criblage en microplaques

Un dispositif expérimental basé sur la culture en microplaque 96 puits et en triplicat a été spécialement développé pour cette étude (Figure 20). Une phase de tests préliminaires a permis dans un premier temps de sélectionner les matériels les plus appropriés pour l'expérience. Tout d'abord, plusieurs références de microplaques ont été comparées et des microplaques noires à fond transparent de la marque Corning (Costar 3615, Corning) ont été choisies pour leur plus faible bruit généré sur les mesures de fluorescence de la chlorophylle *a*. Cette référence propose, en effet, un fond en polystyrène

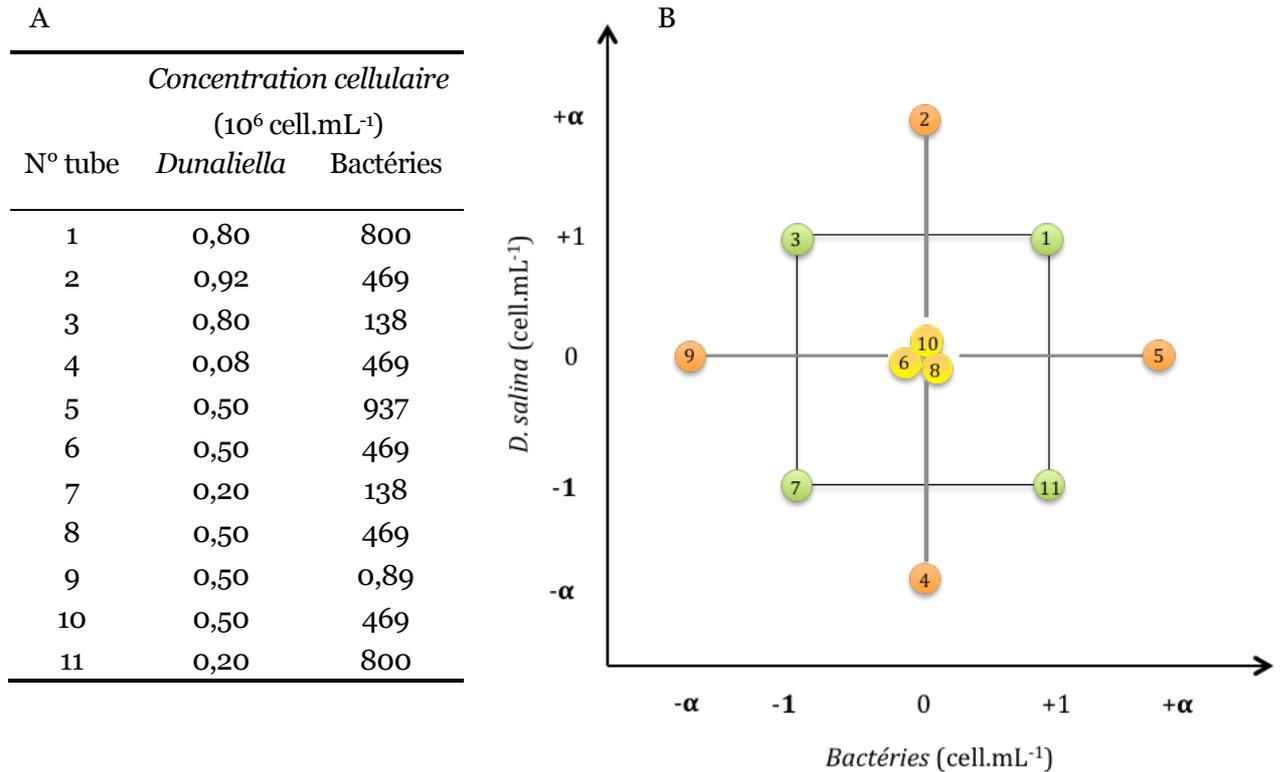


Figure 19: Méthodologie du plan factoriel utilisé pour évaluer la sensibilité des proxys d'absorbance et de fluorescence de la chl *a* à la population bactérienne. A : tableau présentant les différentes conditions expérimentales (tubes) prévues par le plan d'expérience avec les modalités correspondantes pour chaque facteur. B : les différentes modalités représentées dans le domaine expérimental ; chaque sphère représente une expérience numérotée (N° tube), en vert les points du domaine expérimental, en jaune les répliques au centre du domaine, en orange les points étoiles.

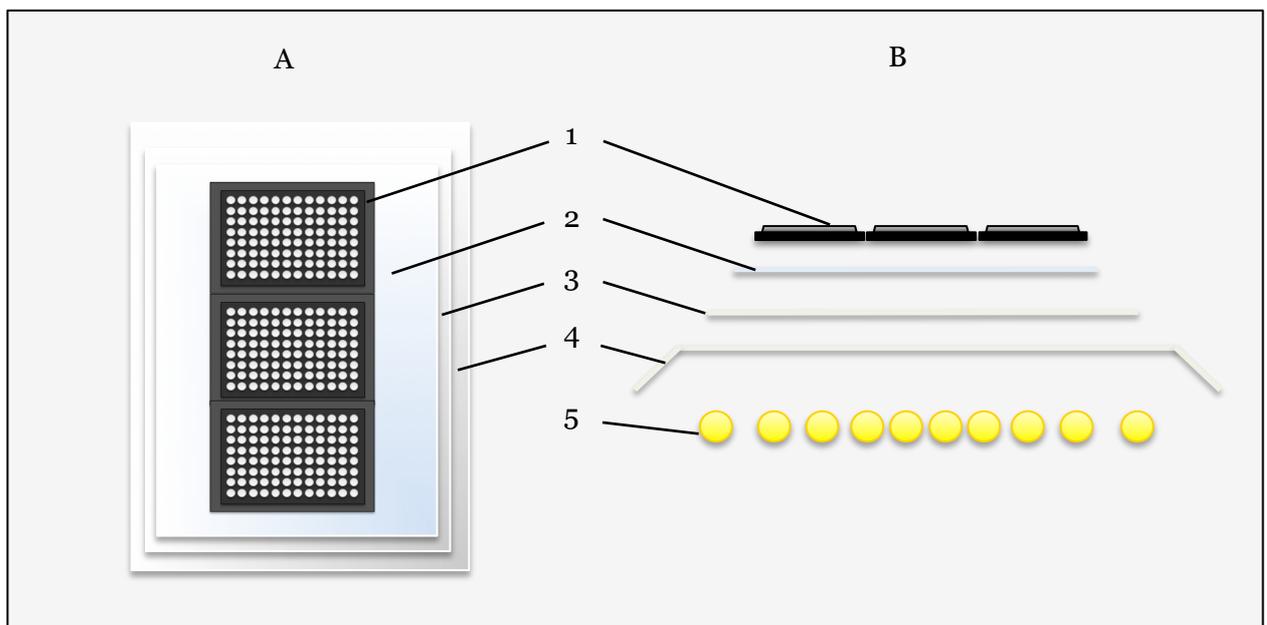


Figure 20 : Système de culture développé pour le criblage d'associations microalgue-bactérie. Représentation schématique du système de culture vue du dessus (A) et en coupe verticale éclatée (B). Le montage est constitué de 3 microplaques 96 puits (1), d'une plaque de PMMA transparente (2), de 2 plaques de PMMA blanches diffusantes (3 et 4) et de 10 tubes fluorescents (5).

transparent dont l'épaisseur est réduit de 60 % par rapport aux plaques classiques, permettant d'obtenir une qualité optique supérieure. La réduction du bruit de mesure a été effectivement constatée au laboratoire. Ensuite, différentes références de films de scellage des micropuits ont été également testées. Ces films ont pour objet de protéger les cultures des contaminations et de l'évaporation durant l'expérience. Les films classiquement utilisés pour les cultures cellulaires autorisant les échanges gazeux n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude. En effet, ces films permettent une évaporation d'eau trop importante qui peut atteindre jusqu'à 85 % du volume (300  $\mu$ L) après une période de 11 jours d'expérience. Par conséquent, un film imperméable aux échanges gazeux (Optical adhesive film, MicroAmp, Applied Biosystems) est sélectionné pour l'expérience permettant d'éviter l'évaporation de l'eau des cultures. En revanche, avec ce film, les cellules algales ne peuvent plus capter le dioxyde de carbone atmosphérique. Par conséquent, de manière à proscrire une limitation des cultures en carbone, une source de carbone minéral dissous est ajoutée au milieu de culture (voir ci-après).

L'homogénéité des facteurs environnementaux (éclairage et température) est un point crucial pour la réussite de cette expérience. Pour observer uniquement l'effet des bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.*, il faut disposer de conditions de culture identiques intra et inter plaques. Pour cela, les microplaques sont éclairées par le fond grâce à 10 tubes fluorescents (Osram, 13W954) recouverts de deux plaques de diffusion en polyméthacrylate de méthyl (PMMA) assurant l'homogénéité (Figure 20). Un éclairage moyen de 50  $\mu$ molphotons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> est ainsi apporté aux cultures avec un faible coefficient de variation de 5,3 % (n=117 mesures réparties sur les 3 microplaques) constaté au sein des micropuits. Une température moyenne de 19,4 °C, associée à un faible coefficient de variation estimé à 2,3 % (n=38 mesures réparties sur les 3 microplaques) est assurée par un flux d'air thermorégulé au voisinage des microplaques.

Un volume de 300  $\mu$ L de chaque culture préparée (cultures axéniques de *Dunaliella sp.* (témoin) et les co-cultures *Dunaliella sp.* -bactéries) est transféré dans un puits pour chaque microplaque avant le scellage des puits pour la totalité de l'expérience. L'utilisation de 3 microplaques permet ainsi de répéter l'ensemble de l'expérience 3 fois, pour une plus grande robustesse des résultats.

- **Suivi de la croissance algale**

La croissance de *Dunaliella sp.* est suivie par mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* (excitation : 450nm ; émission : 685 nm) à l'aide d'un spectrofluorimètre (TECAN). Les mesures sont effectuées, après agitation linéaire à l'aide de l'appareil, afin d'homogénéiser les cultures, 3 fois par jour pendant 17 jours puis 2 ou 1 mesure par jour par la suite.

- **Contrôle des contaminations bactériennes**

La présence de contaminants bactériens cultivables est vérifiée au début et à la fin de l'expérience par isolement sur milieu solide (Marine Agar) après 10 jours d'incubation à 20°C.

○ **Calcul des paramètres de croissance et statistiques**

Le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$  en  $j^{-1}$ ) de *Dunaliella sp.* est calculé selon l'équation suivante :

$$\mu_{max} = \frac{\Delta \ln X}{\Delta t} \quad \text{Équation 4}$$

Avec :

**$X$ , la fluorescence de la chlorophylle  $a$**   
 **$t$ , le temps en jour**

Le gain en biomasse algale ( $\Delta X_{max}$ ) est calculé au moment de la phase stationnaire à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta X_{max} = X_f - X_i \quad \text{Équation 5}$$

Avec :

**$X_i$ , la fluorescence de la chlorophylle  $a$  au début de l'expérience**  
 **$X_f$  la fluorescence de la chlorophylle  $a$  au moment de la phase stationnaire**

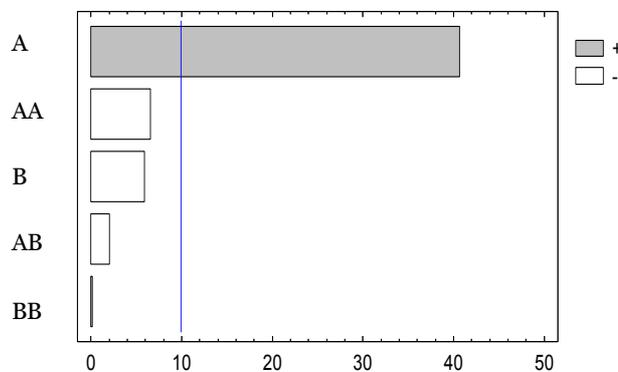
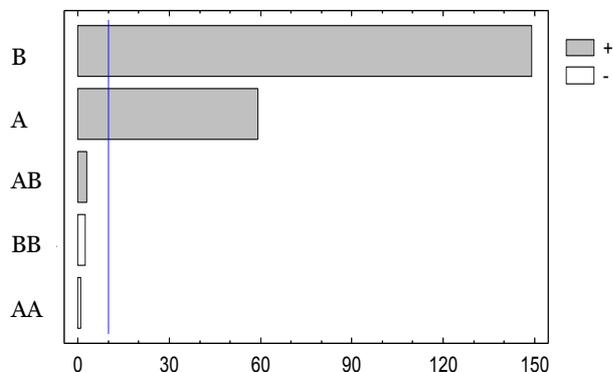
Les résultats de  $\mu_{max}$  et de  $\Delta X_{max}$  sont présentés en graphiques de type boîtes à moustaches ou cités dans le texte sous forme de médiane associée à l'écart interquartile (IQR) présenté entre parenthèses. Les graphiques et calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel R (GNU project).

Les résultats du plan d'expérience, étudiant l'influence de populations bactériennes sur l'utilisation de proxy pour estimer la croissance algale, ont été analysés à l'aide du logiciel Statgraphics (Sigmaplus).

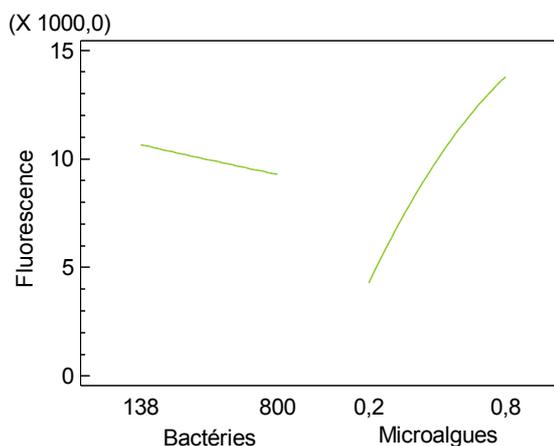
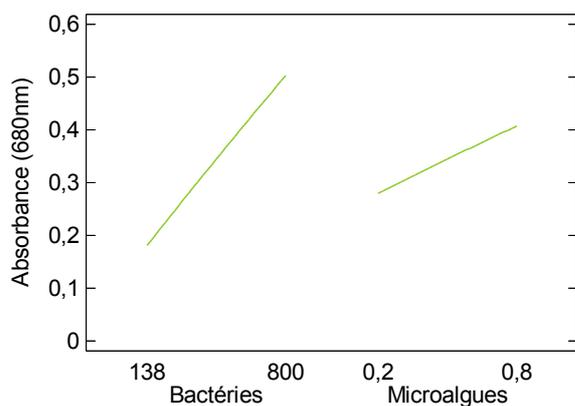
Absorbance (680nm)

Fluorescence (450nm, 685nm)

1-Graphiques de Paréto



2-Graphiques des effets principaux



3-Statistiques

ANOVA (Absorbance)	
R <sup>2</sup> =99,88%	P-value
A	0,0003
B	0,0000
AA	0,4271
BB	0,1432
AB	0,0985

ANOVA (Fluorescence)	
R <sup>2</sup> =99,62%	P-value
A	0,0006
B	0,0277
AA	0,0223
BB	0,9183
AB	0,1790

Figure 21 : Effets des populations bactériennes et algales sur les mesures d'absorbance (680 nm) et de fluorescence (450nm ; 685nm). Graphiques de Paréto : la ligne bleue représente la limite de significativité de l'effet ( $\alpha=1\%$ ). Facteur A= concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* ( $10^6.mL^{-1}$ ), Facteur B=concentration bactérienne ( $10^6.mL^{-1}$ ), AA=effet quadratique du facteur A, BB= effet quadratique du facteur B, AB=interaction des facteur A et B.

### 3. Résultats

#### ○ Suivi de la croissance algale en culture mixte : influence des populations bactériennes par plan factoriel

Tout d'abord, la résolution du plan d'expérience à partir des données d'absorbance à 680 nm de la chlorophylle *a* confirme que, dans la gamme de concentration algale appliquée, cette mesure représente un bon proxy de la croissance algale. Un effet positif et linéaire de la concentration cellulaire algale (A) est, en effet, observé sur la mesure d'absorbance (Figure 21 ; 1). En revanche, un effet fort de la population bactérienne (B) est également constaté sur la mesure. Cet effet est positif (B) tel qu'indiqué sur le graphique de Paréto (Figure 21 ;1) : plus la population bactérienne augmente plus l'absorbance à 680 nm augmente également et, par conséquent, plus la mesure d'absorbance devient un mauvais estimateur de la biomasse algale. L'effet quadratique (BB) de ce facteur n'est pas significatif traduisant l'influence linéaire de la taille de la population bactérienne sur la mesure, nettement visible sur le graphique des effets principaux (Figure 21 ; 2). Enfin, il n'a pas été constaté d'interaction entre les deux facteurs sur la mesure (AB).

L'analyse des données obtenues par mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* confirme la possibilité d'utiliser cette mesure comme estimateur indirect de la biomasse algale. En effet, une influence positive et importante de la concentration algale (A) est notée sur la mesure de fluorescence (Figure 21; 1). L'effet quadratique (AA) de ce facteur n'est pas significatif, traduisant que la fluorescence mesurée et la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* augmentent de manière strictement linéaire dans les conditions de l'expérience. En revanche, l'effet des bactéries (B) sur la mesure ici n'est pas significatif. La taille de la population bactérienne n'influence pas la mesure comme indiqué sur le graphique de Paréto. Enfin, comme dans le cas de l'absorbance, il n'a pas été constaté d'interactions entre les deux facteurs sur la mesure de fluorescence (AB).

#### ○ Effets des bactéries sur le taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) et le gain en biomasse ( $\Delta X_{max}$ ) de *Dunaliella sp.*

Parmi les 97 souches bactériennes de la collection, 19 souches n'ont pas pu être testées en raison soit d'une absence de croissance après cryoconservation ou de la présence de contaminants bactériens au sein des cultures. Les 78 souches bactériennes restantes ont été ajoutées individuellement avec succès à un aliquot de culture de *Dunaliella sp.* axénique. La croissance de ces 78 cultures mixtes a pu être comparée à la culture de *Dunaliella sp.* axénique, en microplaques 96 puits. En revanche, après observation des isollements bactériens à la fin de l'expérience, 30 des 78 souches de départ étaient contaminées par une ou plusieurs souches bactériennes. Par conséquent, sont exploités par la suite, les résultats obtenus pour les 48 cultures mixtes non contaminées (Tableau 7).

**Tableau 7 : Les 48 souches bactériennes de la collection testées en association avec *Dunaliella* sp. en microplaques, isolées à partir de culture de microalgues. Chaque souche bactérienne est présentée par son code de la collection (Ref), la culture microalgale d'origine (Origine), sa référence au sein de la banque de séquences European Nucleotide Archive (Code ENA) et les indications obtenues sur son identification (Classe, Famille, Résultat blast) grâce aux analyses de séquences de l'ADN r16S.**

Ref	Origine	Code ENA	Classe	Famille	Résultat blast	
SY022	<i>Sketetonema costatum</i>	HE589500	Sphingobacteria	Cyclobacteriaceae	<i>Cytophaga</i> sp.	
SY049	<i>Rhodella violacea</i>	HE589505		Cyclobacteriaceae	<i>Cytophaga</i> sp.	
SY010	<i>Odontella aurita</i>	HE589497	Flavobacteria	Flavobacteriaceae	<i>Flexithrix</i> sp.	
SY121	<i>Odontella aurita</i>	HE589507		Flavobacteriaceae	<i>Flexithrix</i> sp.	
SY088	<i>Emiliania huxleyi</i>	HE589506		Flavobacteriaceae	<i>Maribacter</i> sp.	
SY221	<i>Chaetoceros</i> sp	HE589511		Flavobacteriaceae	<i>Maribacter</i> sp.	
SY186	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589509		Flavobacteriaceae	<i>Muricauda</i> sp.	
SY244	<i>Thalassiosira</i> sp	HE589517		Flavobacteriaceae	<i>Muricauda</i> sp.	
SY097	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	HE995401		Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus foraminis</i>
SY233	<i>Thalassiosira pseudomona</i>	HE589528	Actinobacteria	Intrasporangiaceae	<i>Janibacter limosus</i>	
SY234	<i>Thalassiosira pseudomona</i>	HE589529		Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i> sp.	
SY004	<i>IsochrYSIS galbana</i>	HE589520		Micrococccineae	<i>Arthrobacter</i> sp	
SY240	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	HE589530		Micrococccineae	<i>Micrococcus</i> sp	
SY241	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	HE589531		Micrococccineae	<i>Micrococcus</i> sp	
SY208	<i>Chaetoceros gracilis</i>	HE589525		Nocardiaceae	<i>Actinobacter</i> sp	
SY001	<i>Dunaliella</i> sp	HE589518		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus fascians</i>	
SY002	<i>Dunaliella</i> sp	HE589519		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus fascians</i>	
SY090	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589522		Dietziaceae	<i>Dietzia mari</i>	
SY250	<i>Dunaliella</i> sp	HE589534		Dietziaceae	<i>Dietzia</i> sp.	
SY086	<i>Rhodomonas salina</i>	HE589541	Alphaproteobacteria	Rhodospirillaceae	<i>Thalassospira</i> sp	
SY093	<i>Rhodomonas salina</i>	HE589542		Rhodospirillaceae	<i>Thalassospira xianheensis</i>	
SY180	<i>Skeletonema marinoi</i>	HE589555		Rhodospirillaceae	<i>Nisaea</i> sp.	
SY127	<i>Nannochloris</i> sp	HE995403		Erythrobacteraceae	<i>Citromicrobium</i> sp	
SY183	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589556		Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i> sp	
SY148	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589550		Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i> sp	
SY191	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589558		Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i> sp	
SY228	<i>Chaetoceros reptans</i>	HE589562		Rhodobacteraceae	<i>Stappia</i> sp.	
SY052	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589538		Rhodobacteraceae	<i>Haematobacter massiliensis</i>	
SY133	<i>Skeletonema marinoi</i>	HE589545		Rhodobacteraceae	<i>Roseobacter</i> sp.	
SY029	<i>Odontella aurita</i>	HE589537		Rhodobacteraceae	<i>Thalassococcus</i> sp.	
SY245	<i>Chaetoceros gracilis</i>	HE589563		Rhodobacteraceae	<i>Sulfobacter</i> sp.	
SY143	<i>Emiliania huxleyi</i>	HE589548		Rhodobacteraceae	<i>Roseobacteraceae</i>	
SY255	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	HE589564		Rhodobacteraceae	<i>Roseobacteraceae</i>	
SY118	<i>Nannochloris</i> sp	HE995402		Hyphomonadaceae	<i>Hyphomonas</i> sp	
SY145	<i>Chaetoceros</i> sp	HE589549		Hyphomonadaceae	<i>Algimonas</i> sp.	
SY196	<i>Chaetoceros</i> sp	HE589559		Hyphomonadaceae	<i>Algimonas</i> sp.	
SY007	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	HE589567		Gammaproteobacteria	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i> sp.
SY102	<i>Odontella aurita</i>	HE589577			Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
SY182	<i>Nannochloris</i> sp	HE995404	Pseudomonadaceae		<i>Pseudomonas</i> sp	
SY003	<i>Odontella aurita</i>	HE589565	Halomonadaceae		<i>Halomonas</i> sp.	
SY213	<i>Emiliania huxleyi</i>	HE589587	Halomonadaceae		<i>Halomonas</i> sp.	
SY135	<i>Chaetoceros minus</i>	HE589581	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	
SY171	<i>Chaetoceros minus</i>	HE589584	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	
SY185	<i>Chaetoceros minus</i>	HE589585	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	
SY032	<i>Odontella aurita</i>	HE589572	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter</i> sp.	
SY089	<i>Skeletonema marinoi</i>	HE589576	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter</i> sp.	
SY106	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589578	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter</i> sp.	
SY260	<i>Thalassiosira</i> sp	HE589591	Alteromonadaceae		<i>Marinobacter</i> sp.	

Les taux de croissance obtenus pour *Dunaliella sp.*, après analyse des données de fluorescence, varient faiblement de 0,23 à 0,36 j<sup>-1</sup> selon les associations considérées, avec la valeur la plus forte de 0,36(0,01)j<sup>-1</sup> obtenue pour le témoin axénique (Figure 22 ; A). Le coefficient de variation moyen (CV) de 6 % montre une faible variabilité entre les réplicas de cultures situés sur des microplaques différentes. L'analyse des graphiques de boîtes à moustaches montre que les bactéries testées ont tendance à diminuer le taux de croissance pour la majorité d'entre elles (Figure 22). Ces bactéries diminuant le  $\mu_{max}$  sont dispersées au sein de l'arbre phylogénétique. Le plus faible  $\mu_{max}$  est obtenu avec la souche xénique de *Dunaliella sp.* De manière intéressante, les souches bactériennes isolées à partir de cette culture (*Rhodococcus fascians* SY001 et SY002 et *Dietzia sp.* SY250) et testées individuellement montrent également un effet négatif. *Muricauda sp.* SY244 isolée d'une culture de *Thalassiosira sp.*, quant à elle entraîne une diminution de 22 % du  $\mu_{max}$ . Une autre souche affiliée au même genre *Muricauda* (SY186) induit également un effet négatif sur  $\mu_{max}$ . A l'inverse, aucune souche bactérienne ne permet d'augmenter sensiblement  $\mu_{max}$  puisque les valeurs médianes calculées sont toujours inférieures à celles obtenues pour la culture axénique. Les souches SY004 et SY097, affiliées respectivement aux genres *Arthrobacter* et *Bacillus*, ont quant à elle un effet neutre sur le  $\mu_{max}$ .

Le gain de biomasse en phase stationnaire ( $\Delta X_{max}$ ) est plus fortement influencé par la présence de certaines souches bactériennes (Figure 22 ; B) malgré une plus forte variabilité au sein des réplicas de culture (CV=11 %). Les effets calculés à l'aide des valeurs médianes vont de -57 % à +26 %. Comme pour le taux de croissance, la majorité des effets constatés sont négatifs et observés pour les 4 groupes taxonomiques bactériens de la collection. De même qu'observé précédemment pour le  $\mu_{max}$ , le plus faible  $\Delta X_{max}$  est calculé pour la culture xénique (-57 %). De plus, les souches SY001 et SY002, isolées de cette même culture et affiliées à l'espèce *Rhodococcus fascians* ont également tendance à fortement diminuer  $\Delta X_{max}$  (-42 et -44 %, respectivement) lorsqu'elles sont testées individuellement.

De manière intéressante, deux souches bactériennes ont tendance à augmenter  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* Celui-ci est amélioré de 22 et 26 % lorsque les souches *Alteromonas sp.* SY007 et *Muricauda sp.* SY244, isolées respectivement à partir de cultures de *Phaeodactylum tricorutum* et de *Thalassiosira sp.*, sont ajoutées à la culture de *Dunaliella sp.*

Au cours de l'expérience, aucune bactérie ne parvient à stimuler conjointement  $\mu_{max}$  et  $\Delta X_{max}$  chez *Dunaliella sp.* En revanche, 18 souches bactériennes inhibent à la fois l'un et l'autre des deux paramètres de croissance

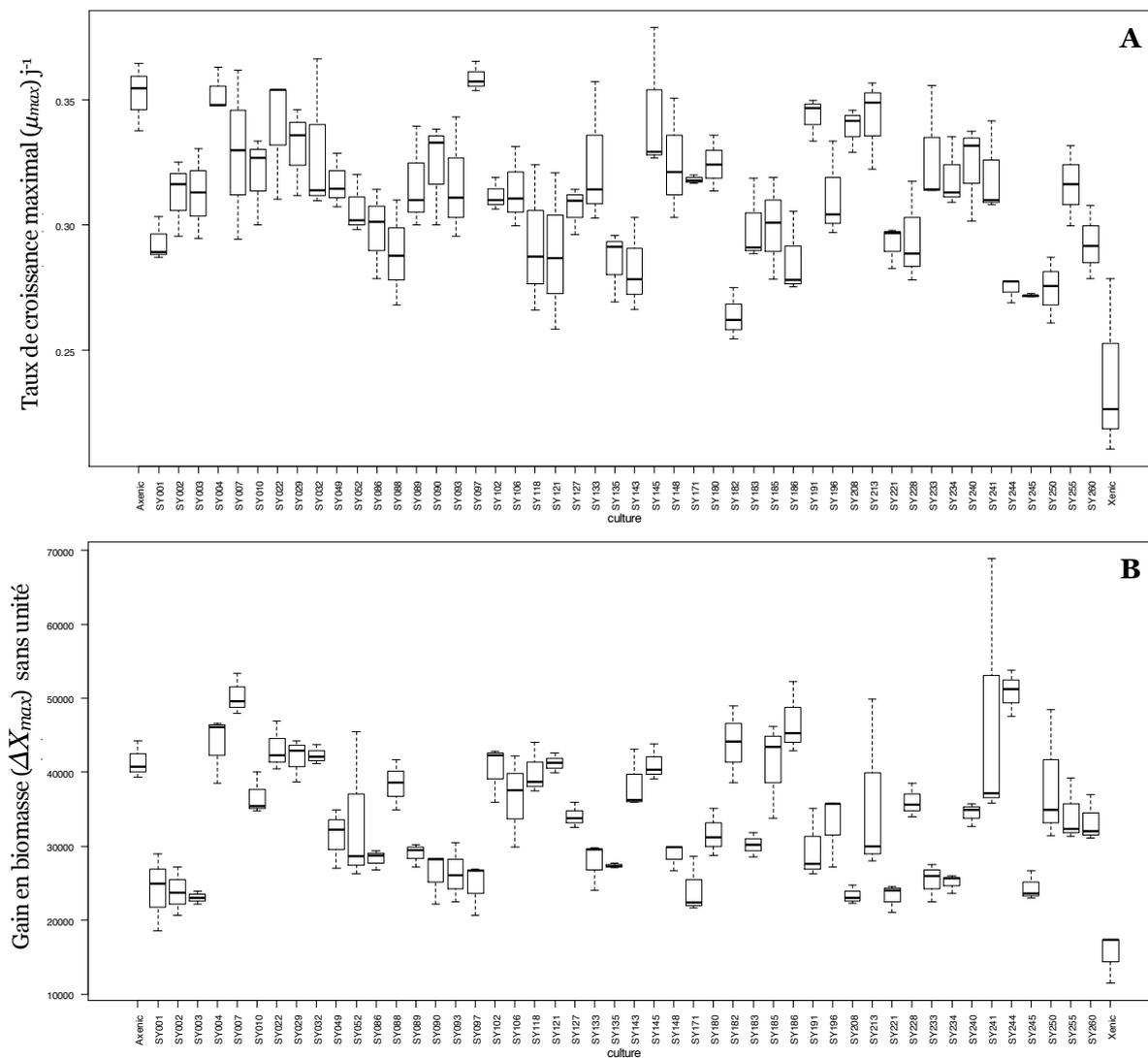


Figure 22: Graphiques en boîtes à moustaches présentant le taux de croissance maximal ou  $\mu_{max}$  (A) et gain en biomasse ou  $\Delta X_{max}$  (B) de *Dunaliella sp.* en culture mixte avec différentes souches bactériennes identifiées par leur référence au sein de la collection. Pour chaque condition la ligne en gras représente la médiane (n=3), la longueur de la boîte donne l'écart interquartile (IQR).

## 4. Discussion

### ○ Suivi de la croissance algale en culture mixte

Le faible volume de culture (300  $\mu$ L) imposé par l'utilisation des microplaques 96 puits interdit le suivi de la croissance microalgale par des méthodes directes classiquement utilisées telles que l'estimation de la concentration cellulaire ou le dosage du carbone particulaire. La biomasse algale peut être estimée à travers l'utilisation de méthodes indirectes tels que l'absorbance ou la fluorescence de la chlorophylle *a* (chl *a*). Cependant nous avons pu constater que ces deux techniques ne sont pas équivalentes dans le cadre de notre étude puisque la présence de la population bactérienne a un effet fort sur la mesure d'absorbance. Le signal est fortement augmenté en présence de bactéries ne permettant pas d'obtenir une mesure fiable de l'évolution de la biomasse algale. A l'inverse, il n'y a pas d'influence des populations bactériennes sur la mesure de fluorescence. De plus, une relation linéaire est observée entre la mesure de fluorescence et la concentration cellulaire algale signifiant que cette mesure est un bon estimateur de la biomasse algale dans les conditions de l'expérience. Par conséquent, l'utilisation de la mesure de fluorescence de la chl *a* semble adaptée pour suivre la croissance algale dans le cadre de cultures mixtes *Dunaliella sp.* -bactéries.

### ○ Outil de sélection d'associations à haut débit

La majorité des études d'interactions microalgues-bactéries sont conduites dans des systèmes de culture de volumes variés : du millilitre au litre (Watanabe *et al.* 2005, Park *et al.* 2008). Cependant, ces volumes de culture ne permettent pas la réalisation d'un criblage rapide d'un grand nombre de cultures différentes. Nous avons par conséquent développé un outil basé sur la culture en microplaque permettant de comparer jusqu'à 96 cultures différentes avec réplicats et en une seule et même expérience. Un effort particulier a été fourni pour la sélection des matériels pour l'étude. La mesure de la fluorescence est d'une telle sensibilité que le choix de la référence de microplaque constitue un premier obstacle à contourner afin de diminuer les bruits de mesure qui peuvent être importants. Ensuite, les puits des microplaques sont habituellement scellés par un film pour culture cellulaire protégeant les cultures des contaminations et autorisant les échanges gazeux avec l'atmosphère. Ces films sont en revanche inadaptés pour des cultures algales durant plusieurs jours compte tenu de la forte évaporation observée pendant la phase de test. Nous avons pu constater par la suite que l'utilisation des films adhésifs et occlusifs aux gaz, conçus pour la PCR et combinée à l'ajout de carbone dissous, permettait la réalisation des cultures sans évaporation. Enfin, l'homogénéisation des conditions de culture intra et inter microplaques représentait une deuxième étape de mise au point crucial pour la réussite de l'expérience. La mise en oeuvre de comparaisons d'autant de cultures différentes en une seule expérience implique en effet d'obtenir des conditions de cultures les plus proches d'un puit à l'autre et d'une microplaque à l'autre. Pour ce faire, un travail minutieux d'homogénéisation de l'éclairement et de la température a été réalisé. Cet effort nous a permis d'obtenir une faible variabilité au sein des réplicats

particulièrement visible pour le taux de croissance maximal pour lequel le coefficient de variation moyen par réplicat n'est que de 6 %. En revanche, par rapport à des systèmes classiques, le faible volume, imposant un suivi indirect de la croissance algale, et l'absence d'agitation continue, représentent des contraintes propres au dispositif conçu qui soulèvent la question de la représentativité des résultats obtenus. Cette question est justement traitée dans la partie suivante (cf « Effet de bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.* en photobioréacteurs »).

- **Effets des bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.***

Le criblage d'association en microplaques a permis d'observer un effet sensible d'une partie des souches bactériennes de la collection sur la croissance de *Dunaliella sp.* lorsque celle-ci est soumise à des conditions limitantes pour l'azote. Les effets constatés sont principalement négatifs, d'intensité variée et affectent plus particulièrement  $\Delta X_{max}$ . Une relation entre le type d'effet induit sur *Dunaliella sp.* et le groupe taxonomique des souches bactériennes n'a pas pu être établi au cours de l'étude. Des bactéries phylogénétiquement très proches, par exemple de même genre voir de même espèce, peuvent en effet être phénotypiquement différentes.

Parmi les 48 souches bactériennes testées, aucune souche ne stimule le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) de *Dunaliella sp.* et la majorité d'entre elles l'a affecté négativement. Le plus faible  $\mu_{max}$ , inférieur de 36 % par rapport au témoin axénique, est observé au sein de la culture xénique vivant avec une communauté de bactéries. D'autres auteurs ont également observé de tels effets sur le taux de croissance de microalgues. Par exemple, Meseck *et al.* (2007) ont noté une diminution de 12 % du taux de croissance de *Tetraselmis chuii* après addition d'une communauté bactérienne isolée d'une culture de *T. striata*. Les processus biologiques impliqués dans ces phénomènes seraient liés à l'exsudation de composés bactériens dans le milieu affectant la division cellulaire algale. Des métabolites bactériens sécrétés dans le milieu de culture peuvent avoir un effet phytotoxique entraînant une diminution du taux de croissance tel qu'évoqué par Amaro *et al.* (2005). Cinq souches de la collection (SY049, SY102, SY234, SY241 et SY250), ayant diminué le taux de croissance de *Dunaliella sp.*, appartiennent précisément aux genres *Cytophaga*, *Janibacter*, *Micrococcus*, *Pseudoalteromonas* et *Dietzia* parmi lesquels certaines souches sont connues pour leur potentiel algicide (Mayali & Azam 2004, Imai *et al.* 2006, Kim *et al.* 2008). Quelques auteurs ont également montrés que des souches du genre *Halomonas* pouvaient aussi exercer un pouvoir algicide à travers l'exsudation de substances toxiques dans le milieu de culture (Su *et al.* 2011). Les résultats obtenus au cours de notre étude montrant un effet inhibiteur de la croissance de *Dunaliella sp.* par la souche SY003 du genre *Halomonas sp.* sont en accord avec ces observations antérieures.

En présence de certaines bactéries, le  $\mu_{max}$  de microalgues peut également être stimulé par l'exsudation de substances promotrices telles que des vitamines par exemple (Cole 1982, Croft *et al.* 2005, Park *et al.* 2008). Malgré l'absence de vitamines au sein du milieu de culture au cours de notre étude, nous n'avons

pas observé d'effet promoteur des bactéries testées à ce stade de la croissance algale, démontrant l'absence de sécrétion de substances stimulantes ou leur inefficacité.

Ensuite, le gain en biomasse en phase stationnaire a également été différenciellement affecté par la présence de bactéries, selon les souches considérées. Une majorité d'effets négatifs a été observé avec des diminutions maximales obtenues pour la culture xénique (-57 %) et en présence de la souche *Marinobacter alkaliphilus* SY171 (-45 %). Guerrini *et al.* (1998) avaient aussi noté une diminution drastique de 80 % de la biomasse maximale de *Cylindrotheca fusiformis* en co-culture avec une bactérie non identifiée. Comme précédemment mentionné par Meseck *et al.* (2007), des phénomènes de compétition au profit des bactéries et vis à vis de l'azote limitant, pourraient expliquer les effets inhibiteurs des bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.* De telles compétition envers le phosphore ont été également observé au sein de cultures de *Scenedesmus* (Rhee 1972, Danger, Oumarou, *et al.* 2007). De plus, la phycotoxicité de substances bactériennes impliquées dans la réduction du  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire peut également intervenir, cette hypothèse ayant déjà été proposée dans la littérature par le passé (Fukami *et al.* 1997, Mitsutani *et al.* 2001).

Au contraire, Mouget *et al.* (1995) ont observé un gain de 50% sur la biomasse maximale de *Scenedesmus bicellularis* lorsqu'elle était associée à la bactérie *Brevundimonas diminuta*. Au cours de cette étude, nous avons également obtenu un gain de biomasse sensible lorsque *Dunaliella sp.* était en présence des bactéries *Alteromonas sp.* SY007 (+22 %) et *Muricauda sp.* SY244 (+26 %). Sous les conditions de limitation azotée imposées au cours de l'expérience, nous supposons qu'une reminéralisation bactérienne de composés organiques émis par les microalgues pourrait retarder l'apparition de la phase stationnaire. Les observations de Tai *et al.* (2009) sont intéressantes à ce titre puisque ces auteurs ont pu montrer qu'un flux d'azote sous forme d'ammonium produit par un *Vibrio sp.* pouvait supporter la croissance d'une cyanobactérie du genre *Synechococcus*.

Enfin, il est important de rappeler que le film de scellage des micropuits est totalement imperméable aux gaz et empêche donc tout échange avec l'atmosphère. Les conditions d'éclairement constant favorisent alors l'accumulation d'oxygène dans la culture, inhibiteur de la photosynthèse. Une hypothèse alternative, évoquée par Mouget *et al.* (1995), pourrait être que la diminution de la pression partielle en oxygène au sein des cultures par la respiration bactérienne pourrait favoriser la croissance de microalgues.

- **Souches axénique et xénique de *Dunaliella sp.***

Au cours de cette étude, nous avons pu constater que les performances de croissance de la souche xénique étaient sensiblement plus faibles que celles de la souche axénique. De manière intéressante, les effets des bactéries isolées de cette culture, avaient justement tendance à diminuer l'un ou les deux paramètres de croissance lorsque celles-ci étaient réintroduites individuellement au sein de la culture de *Dunaliella sp.* Certaines souches des mêmes genres sont connues pour leur potentiel pathogène envers certaines microalgues (*Dietzia*) ou des plantes supérieures (*Rhodococcus fascians*) (Simón-Mateo *et al.* 2006, Kim *et al.* 2008). Nous pouvons donc supposer que les bactéries initialement associées à cette microalgue en culture exerçaient une activité inhibitrice sur *Dunaliella sp.* et que leur élimination a permis de restaurer son potentiel de croissance. Ces résultats démontrent également l'intérêt d'étudier l'influence des communautés bactériennes associées aux cultures de microalgues dès lors qu'une valorisation est envisagée.

## 5. Conclusion

L'effort particulier fourni pour le développement d'un outil de criblage, tant au niveau de la sélection du matériel que de l'homogénéisation des conditions de culture, a permis de réaliser un criblage de 48 associations microalgues-bactéries en une seule expérience et avec succès. Cette approche originale de l'étude des interactions microalgues-bactéries, nous a permis de constater des effets sensibles des souches bactériennes de la collection sur la croissance de *Dunaliella sp.* tant au niveau du taux de croissance qu'en gain de biomasse maximale. Les effets observés sont, pour la majorité des souches, négatifs pour les deux paramètres calculés. Cependant, deux souches exercent des effets promoteurs intéressants sur la biomasse accumulée en phase stationnaire. En début de culture, l'exsudation de composés bactériens inhibiteurs pourrait expliquer les effets constatés sur le taux de croissance. En revanche, au moment de la phase stationnaire, nous suggérons que les effets mesurés sur l'accumulation de biomasse, peuvent être reliés à des phénomènes de compétition pour l'azote minéral ou de production de composés toxiques d'origine bactériennes pour les effets inhibiteurs observés, ou de reminéralisation de l'azote organique relargué par les microalgues, pour les effets promoteurs.

Nous pouvons conclure que les performances de culture de l'espèce *Dunaliella sp.* peuvent être modifiées sensiblement par l'ajout de bactéries choisies. Les souches *Alteromonas sp.* SY007 et *Muricauda sp.* SY244 favorisant l'accumulation de biomasse en phase stationnaire nécessitent d'être étudiées en culture de volume supérieur afin de valider leur potentiel et de caractériser plus finement leurs effets sur la croissance de *Dunaliella sp.*

## Effet de bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.* en photobioréacteur

### 1. Introduction

L'étape de sélection (expérience 1) effectuée à l'aide de l'outil de criblage d'association a permis de montrer l'influence des bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.* et particulièrement sur l'accumulation de biomasse mesurée en phase stationnaire. Les souches *Alteromonas sp.* SY007 et *Muricauda sp.* SY244 ont été sélectionnées à l'issue de la phase expérimentale de criblage pour leur potentiel stimulant de la biomasse algale. Nous avons émis l'hypothèse qu'en présence de ces deux souches bactériennes et en conditions de limitation azotée, une plus forte accumulation de biomasse microalgale, repose sur la remise à disposition d'azote par les bactéries sous forme assimilable par *Dunaliella sp.* et retardant de ce fait l'apparition de la phase stationnaire.

Une deuxième phase expérimentale (expérience 2) s'avère néanmoins nécessaire afin de valider, dans un premier temps, les résultats obtenus en microplaques 96 puits. En effet, par rapport à des systèmes de culture dits classiques, le faible volume de culture (300  $\mu$ L), l'absence d'agitation continue et d'échanges gazeux avec l'atmosphère ainsi que la mise en place d'un suivi indirect de la croissance algale représentent des contraintes propres au dispositif conçu qui soulèvent la question de la représentativité des résultats obtenus. Pour atteindre ce premier objectif de validation du dispositif de criblage en microplaques, la démarche consiste à comparer pour des cultures mixtes choisies, les performances enregistrées en microplaques à celles obtenues sur un système de culture plus éprouvé. Pour cela un dispositif de cultures en batch possédant un volume de 1 litre est mis au point. En outre, la pertinence de l'approche de validation nécessite de disposer de cultures mixtes aux performances aussi différentes que possible. Au delà des deux bactéries sélectionnées (SY007 et SY244), la souche bactérienne SY003 ayant montré une influence négative sur le taux de croissance et l'accumulation de biomasse des cultures de *Dunaliella sp.*, est également retenue pour cette seconde phase expérimentale. Ensuite, au sein de la collection bactérienne la bactérie *Alteromonas sp.* SY015, est également sélectionnée pour son appartenance au même genre que la souche SY007, améliorant l'accumulation de biomasse finale. Enfin, l'adoption de volumes de cultures supérieurs pour cette deuxième phase expérimentale autorise la réalisation de prélèvements permettant la mesure directe de la croissance algale à travers la mesure de la concentration cellulaire mais aussi par la cinétique de fixation du carbone dans la biomasse, indice robuste intégrant les variations de volumes cellulaires possible d'une condition de culture à une autre. Ces analyses supplémentaires ont pour objectifs de caractériser les interactions au sein des cultures et de tester l'hypothèse de reminéralisation de l'azote par les bactéries SY007 et SY244.

## 2. Matériel et méthode

### ○ Dispositif expérimental et conditions de culture

Le dispositif expérimental développé pour l'étude est constitué de 18 photobioréacteurs en verre borrosilicaté d'un volume de 1L (Duran Schott) hermétiquement clos et protégés des contaminations biologiques extérieures (Figure 23). Excepté la seringue de prélèvement, l'ensemble du photobioréacteur est stérilisable à 120 °C pendant 20 min avant le lancement de la phase expérimentale. Chaque photobioréacteur peut être déconnecté du poste de culture de manière stérile afin de réaliser les prélèvements sous hotte à flux laminaires.

Chaque bouteille d'1L est fermée par un système de bouchon percé et équipé d'un septum à 3 ports étanches façonnés pour l'étude (Figure 23). Les différentes ouvertures permettent, (1) l'insertion d'une canule de 25 cm en verre reliée à un filtre à air 0,22 µm (Midisart, Sartorius) lui-même connecté à un système d'air comprimé filtré, assurant l'homogénéisation stérile de la culture par bullage. Une deuxième canule (2) fait office d'évent stérile. Enfin, le troisième port (3) correspond au système de prélèvement et permet l'insertion d'un tuyau téflon connecté à un raccord « luer ». Une seringue de 2 mL stérile et jetable y est positionnée pour le prélèvement sous hotte à flux laminaires.

Les 18 photobioréacteurs, correspondant à 6 cultures différentes et en triplicat, sont placés dans une enceinte thermostatée à une température de culture de 20 °C. L'éclairement moyen des cultures de 250 µmolphotons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> est dispensé par un ensemble de 6 tubes fluorescents répartis sur les trois étages de l'enceinte (OSRAM, L36W865).

### ○ Matériels biologiques et préparation des *inocula*

Les cultures de *Dunaliella sp.* axénique (témoin), *Dunaliella sp.* xénique, *Dunaliella sp.* -*Halomonas sp.* SY003, *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY007, *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY015 et *Dunaliella sp.* -*Muricauda sp.* SY244 sont préparées 10 jours avant l'expérience afin de disposer de biomasse algale suffisante pour ensemercer les photobioréacteurs. Pour cela, les 6 cultures mères sont préparées dans des ballons de 2 L d'eau de mer artificielle (ASW) stérile filtrée sur 0,22 µm avec un enrichissement identique à celui de l'expérience en microplaques 96 puits : milieu de Walne sans vitamine et dont l'apport d'azote sous forme d'ammonium correspond à 547,8 µM (N :P=3,3 :1) et un apport de NaHCO<sub>3</sub> à 10 mM final. Les cultures sont préparées de manière à obtenir une concentration algale initiale de 0,1 .10<sup>6</sup> cell.mL<sup>-1</sup> et sont placées ensuite dans le dispositif de culture décrit ci-dessus à 20 °C sous un éclairement de 250 µmolphotons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> sous agitation par bullage d'air et pendant 10 jours. Au terme de cette période, les inocula des cultures expérimentales sont préparés en triplicat par centrifugation (500 g, 20 °C, 3 min) afin d'éliminer les éléments nutritifs résiduels. Après élimination du surnageant, les culots sont repris pour ensemercer les photobioréacteurs avec une concentration algale initiale de 0,2 .10<sup>6</sup> cell.mL<sup>-1</sup>. Les photobioréacteurs sont complétés à un volume de 1 L à l'aide d'ASW filtrée à 0,22 µm et

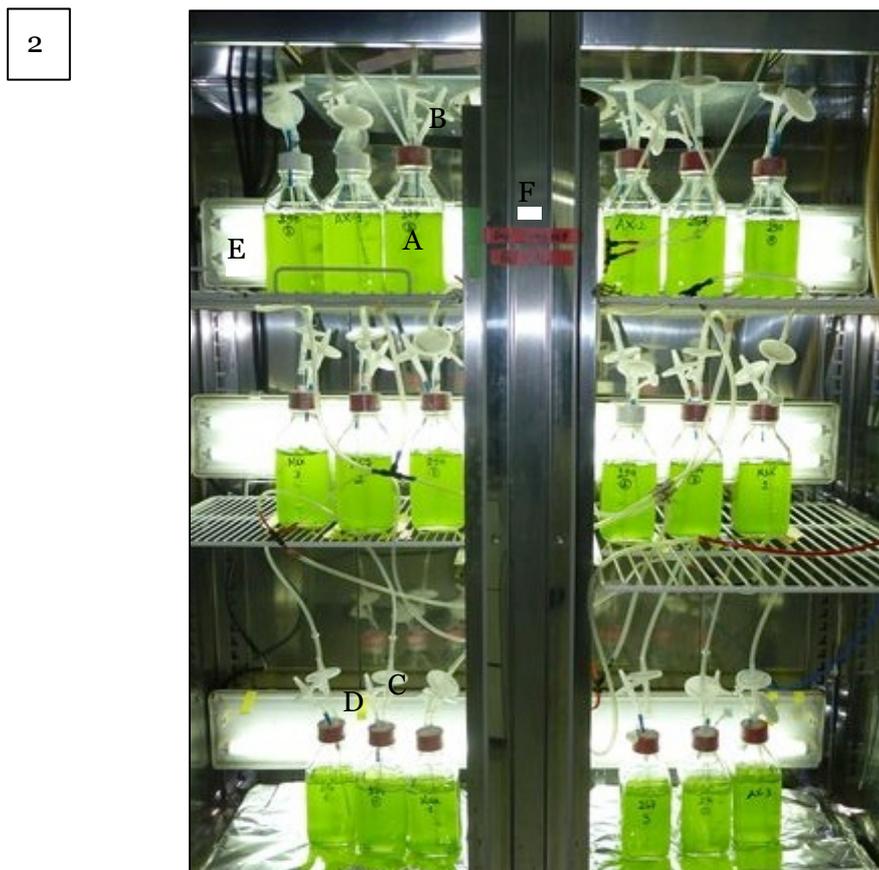
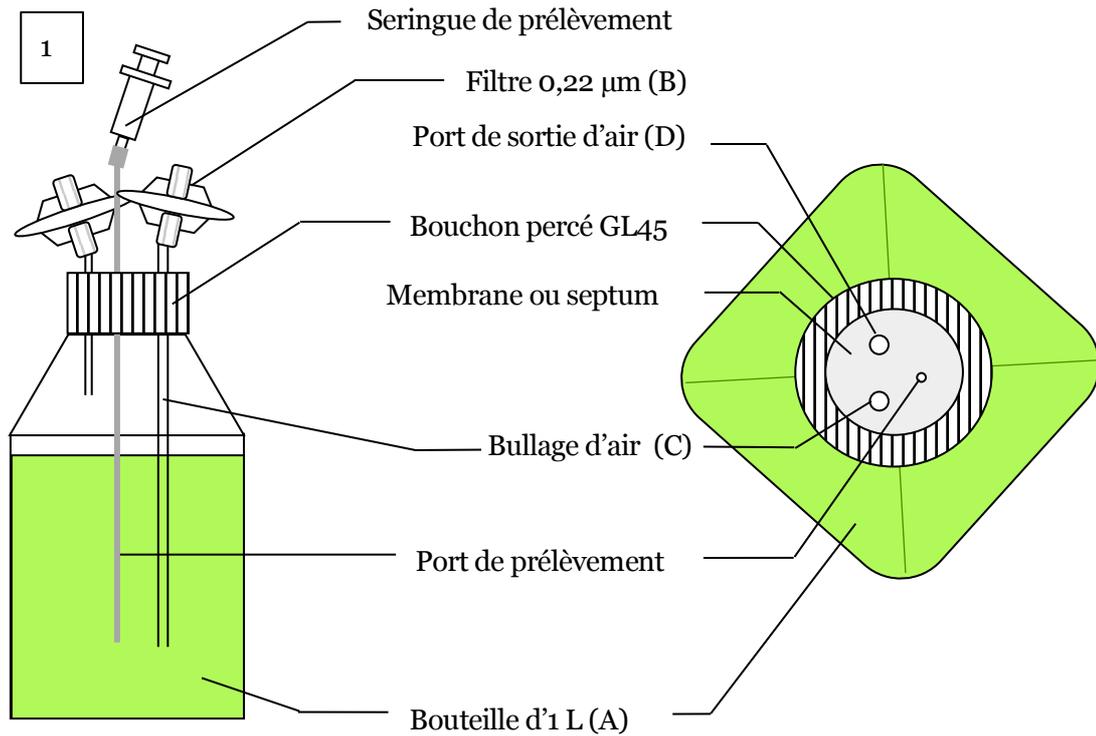


Figure 23 : Représentation schématique (1) et photographies (2) du dispositif expérimental de culture constitué des éléments suivants : (A) bouteille en verre d'1L, (B) filtre 0,22 µm, (C) système de bullage d'air, (D) sortie d'air, (E) système d'éclairage, (F) enceinte thermostatée.

enrichie tel que décrit ci-dessus. Les 18 photobioréacteurs sont ensuite connectés au système de bullage d'air et placés dans l'enceinte de culture pour les 13 jours d'expérience. Lorsque les populations algales atteignent la phase stationnaire, un pulse d'azote est réalisé afin de vérifier la limitation de la croissance par l'azote. Pour ce faire, une injection stérile de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est pratiquée au niveau du port de prélèvement à l'aide d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  correspondant à un apport de 547,8  $\mu\text{mol}$  d'azote.

- **Suivi des populations microalgales et bactériennes**

Les prélèvements sont réalisés après déconnection des photobioréacteurs et placement sous hotte à flux laminaire. Après homogénéisation du volume de culture, ceux-ci sont réalisés à l'aide de seringues stériles et jetables. La croissance algale est suivie deux fois par jour pendant 6 jours puis une fois par jour jusqu'à la fin de l'expérience. Le suivi est effectué par des mesures directes de la croissance par dénombrement cellulaire grâce à un compteur de particules HIAC (Hach Ultra) et par dosage du carbone particulaire (voir analyses biochimiques élémentaires).

Un dénombrement bactérien est également réalisé en début d'expérience, à 5 jours et à 10 jours. Les prélèvements sont conservés à 4 °C après ajout de formaldéhyde à 2% jusqu'à analyse. Chaque échantillon est ensuite analysé en cytométrie en flux (ACCURI, Becton Dickinson) après marquage de l'ADN au SYBRgreen (Lonza).

- **Contrôle des contaminations bactériennes (isolements et RAPD)**

Des isolements bactériens sont réalisés en début d'expérience, à 5 jours et à 10 jours sur Marine Agar et incubés à 20 °C, à l'obscurité pendant 10 jours. Les colonies bactériennes formées sont ensuite observées et comparées sur leur phénotype aux cultures mères de référence issues de la collection bactérienne.

Parallèlement à ce travail, les colonies bactériennes obtenues sur Marine Agar à la fin de l'expérience, sont isolées pour analyse ultérieure en RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe). Les colonies sont transférées sur milieu liquide (Marine Broth) et mises en culture pendant 1 à 3 jours selon la croissance bactérienne et à 25 °C. Une extraction d'ADN est ensuite réalisée selon la méthode de Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* 1989). Les cellules sont récupérées par centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) de la culture et transférées dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon Tris-EDTA (préparé tel que décrit précédemment). Ensuite, 25  $\mu\text{L}$  de lysosyme à 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sont ajoutés avant incubation à 37 °C pendant 45 min. Une seconde incubation est nécessaire à 55 °C pendant 1 heure après l'ajout de 60  $\mu\text{L}$  de SDS à 10 % (p/v) et 6  $\mu\text{L}$  de protéinase k à 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . 100  $\mu\text{L}$  de chlorure de sodium à 5 M et 700  $\mu\text{L}$  de phénolchloroforme isoamyle (25 /24 /1) sont ajoutés à l'échantillon. Après émulsion et centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) la phase aqueuse est récupérée et subit un deuxième lavage avec 700  $\mu\text{L}$  chloroforme. La phase aqueuse est à nouveau récupérée après émulsion et centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C). Enfin, L'ADN est précipité avec 700  $\mu\text{L}$  d'isopropanol à -20 °C pendant 10 min et récupéré après centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) et élimination du surnageant. Le culot est lavé avec 500  $\mu\text{L}$

d'éthanol à 70 % (10 000 g, 10 min, 4 °C). Après élimination du surnageant, l'ADN est séché à température ambiante et repris dans 30 µL de tampon Tris-EDTA dans lequel il est conservé à 4 °C.

Les brins d'ADN extraits subissent ensuite deux amplifications parallèles par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les deux amorces, RAPD1 (5'-AAGAGCCCGT-3') et RAPD4 (5'-GGTGCGGGAA-3') (Amersham) choisies s'hybrident selon la présence du motif correspondant sur la séquence d'ADN et permettent ainsi l'amplification de séquences de différentes longueurs. Le mélange pour PCR (25 µL) ajouté à l'échantillon contenant environ 15 ng d'ADN est constitué de : 0,6 µM d'amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1x de tampon Go taq (Go taq kit, Promega) et 0,75 unité d'enzyme taq polymérase (Go taq kit, Promega). L'amplification (MyCycler, BIO-RAD) se déroule ensuite selon la procédure suivante : 5 min à 95 °C, puis 45 cycles de 1 min à 95 °C, 1 min à 36 °C et 2 min à 72 °C, et enfin 5 min à 72 °C. Enfin, une migration des 15 µL de produits de PCR est effectuée sur gel d'agarose à 1,5 %, contenant du bromure d'éthidium (BET) à 30 ‰. Un profil de bandes est observé après révélation du BET aux rayonnements ultraviolets.

- **Dosage du carbone (COP) et de l'azote (NOP) organique particulaire par analyseur élémentaire**

Une fois par jour, un échantillon de chaque culture correspondant à une population de  $3 \cdot 10^6$  de cellules algales est récolté pour réaliser un dosage du carbone (COP) et de l'azote (NOP) organiques particuliers. Pour cela, l'échantillon est filtré sur filtre en fibre de verre GF/C (1,2 µm, Whatman) préalablement brûlé à 450°C pendant 4 heures. Après filtration, le prélèvement est déshydraté à 70°C pendant 24 heures avant analyse du carbone et de l'azote élémentaire à l'aide d'un analyseur CN (Thermoscientific, Flash 2000).

Les observations microscopiques des cultures mixtes ont permis de constater que la taille des bactéries SY003, SY007 et SY244 était suffisante pour être retenues avec les cellules de *Dunaliella sp.* sur les filtres GF/C utilisés pour estimer le COP et NOP. Les tests de rétention cellulaire pratiqués ont en effet montré une rétention importante des bactéries sur les filtres GF/C de 99,8 (2,4) % pour la souche SY003, de 94,2 (1,2) % pour la souche SY007 et de 98,1 (0,4) % pour la souche SY244. Afin d'évaluer la part de carbone et d'azote bactérien dans le COP et NOP mesuré au cours de l'expérience, des cultures pures de ces trois souches sont réalisées sur Marine Broth pendant 48 h à 20 °C et sous agitation de 300 rpm. Après centrifugation (10000 g, 5 min, 20 °C), les cellules bactériennes sont resuspendues dans de l'ASW. Les concentrations cellulaires sont alors estimées par cytométrie en flux (cf suivi des populations algales et bactériennes). Chaque culture est alors filtrée sur GF/C en triplicat pour analyse du carbone et de l'azote à l'aide de l'analyseur CN. Les quotas cellulaires bactériens en carbone et en azote ainsi estimés permettent ensuite grâce aux concentrations bactériennes, mesurées par cytométrie en flux au cours de l'expérience, d'estimer le COP et le NOP bactérien. Le COP et le NOP algal sont ensuite calculés par différence entre les valeurs de COP et NOP total et COP et NOP bactériens. Cette démarche

expérimentale d'estimation des quotas bactériens ne peut être réalisée au sein de la culture xénique contenant une communauté de différentes souches bactériennes. Les observations microscopiques de cette culture ont permis d'observer une forme et une taille, des cellules bactériennes présentes, proche de la souche SY003. De ce fait, le COP et le NOP bactériens au sein de la culture xénique sont estimés à partir des quotas bactériens obtenus pour la souche SY003.

○ **Calculs et statistiques**

Le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$  en  $j^{-1}$ ) de *Dunaliella sp.* est calculé selon l'équation suivante :

$$\mu_{max} = \frac{\Delta \ln X}{\Delta t} \quad \text{Équation 6}$$

Avec :

**X, la concentration en carbone particulaire (mM)**

**t, le temps (jour)**

Le gain en biomasse algale ( $\Delta X_{max}$ ) est calculé au moment de la phase stationnaire à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta X_{max} = X_f - X_i \quad \text{Équation 7}$$

Avec :

**$X_i$ , la concentration cellulaire algale ( $cell.mL^{-1}$ ) ou COP algal (mM) au début de l'expérience**

**$X_f$ , la concentration cellulaire algale ( $cell.mL^{-1}$ ) ou COP algal (mM) au moment de la phase stationnaire**

Les corrélations entre les résultats des expériences de culture en microplaque (expérience 1) et en photobioréacteurs (expérience 2) pour  $\mu_{max}$   $\Delta X_{max}$  sont estimées à l'aide du test de Spearman ( $\alpha = 5\%$ ). Les données de  $\Delta X_{max}$  estimées en fluorescence pour l'expérience 1 et par le carbone organique particulaire pour l'expérience 2 sont normalisées avant d'être comparées :

$$\Delta X_{max}^{norm} = \frac{\Delta X_{max} - \overline{\Delta X_{max}}}{\sigma} \quad \text{Équation 8}$$

Avec :

**$\Delta X_{max}^{norm}$  le gain en biomasse algale normalisé**

**$\Delta X_{max}$  le gain en biomasse algale (fluorescence ou mM de carbone)**

**$\overline{\Delta X_{max}}$  le gain moyen en biomasse algale (fluorescence ou mM de carbone)**

**$\sigma$  l'écart type**

Les quotas cellulaires en carbone ( $Q_C$ ) et en azote ( $Q_N$ ) des microalgues calculés en phase stationnaire, représentent la quantité totale de l'élément considéré sous toutes ses formes dans la cellule. Les  $Q_C$  et  $Q_N$  sont calculés en divisant le COP et le NOP algal respectivement, par la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* Le ratio C:N correspond au rapport entre le COP algal et le NOP algal en phase stationnaire.

Le biovolume de *Dunaliella sp.* est estimé à l'aide des données de diamètre cellulaire obtenues avec le compteur de particule HIAC (Hach Ultra) et en considérant le volume d'une sphère ( $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ ).

Le rendement de l'azote ( $R_N$ ) pour les cellules de *Dunaliella sp.*, exprimé en pourcentage, est calculé par le ratio de l'azote organique particulaire (NOP) algal en phase stationnaire et de l'azote apporté (547,8  $\mu\text{M}$ ) par le milieu de culture.

Les résultats sont présentés sous la forme des valeurs médianes associées à la valeur de l'écart interquartile (IQR) correspondante présentée dans le texte entre parenthèse. Ces valeurs ainsi que les tests statistiques non paramétriques de Kruskal Wallis ( $\alpha=5\%$ ) sont calculés et réalisés à l'aide du logiciel R (GNU project).

### 3. Résultats

Les 4 cultures mixtes *Dunaliella sp.*-bactéries sélectionnées précédemment et les cultures de *Dunaliella sp.* axénique et xénique ont été réalisées en photobioréacteurs d'1 L en mode batch pendant 13 jours. Différents paramètres biologiques ont été suivis au sein de ces cultures pour valider les résultats préliminaires obtenus en microplaques (expérience 1) et approfondir l'étude des interactions *Dunaliella sp.*-bactéries.

#### ○ Contrôle des contaminations bactériennes

L'étude fine de l'effet d'une bactérie sélectionnée sur la croissance de *Dunaliella sp.* en culture nécessite son maintien en culture pendant l'expérience et l'absence d'autres souches bactériennes. Par ailleurs, les performances des cultures mixtes *Dunaliella sp.*-bactéries doivent pouvoir être comparées à un témoin de culture de *Dunaliella sp.* axénique, sans aucune souche bactérienne. Un contrôle des souches bactériennes présentes au sein des cultures représente une étape nécessaire au bon déroulement de l'étude. Les isolements bactériens sur Marine Agar réalisés ponctuellement au cours de l'expérience n'ont montré aucune colonie bactérienne à partir des échantillons des trois réplicats de cultures axéniques correspondant aux 3 photobioréacteurs. Ces résultats sont confirmés par les observations microscopiques en épifluorescence après marquage de l'ADN des échantillons au SYBRgreen. La culture dite axénique conserve donc bien ses qualités dans le temps et constitue la référence recherchée pour étudier l'effet des bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.* Par ailleurs, des colonies bactériennes

présentant un morphotype unique sont systématiquement observées sur les étalements issus des cultures mixtes. Dans tous les cas, ces morphotypes se sont révélés identiques aux souches mères de la collection bactérienne. Ces deux éléments suggèrent une absence de contamination des cultures au cours de l'expérience, ce qui est confirmé par les analyses RAPD (Figure 24), pour lesquelles les profils de bandes obtenus pour les bactéries isolées des cultures mixtes sont comparables à ceux obtenus avec les souches mères pures à l'exception des cultures *Dunaliella sp.*-SY015. En effet, pour les 2 amorces RAPD, les profils de bandes des clones 1 correspondant aux photobioréacteurs 2 et 3 sont différents de la souche mère et des autres profils. Il est donc probable qu'une contamination bactérienne soit survenue au cours de l'expérience ou lors de l'analyse RAPD. Les résultats obtenus pour la culture *Dunaliella sp.* -SY015 ne sont, par conséquent, pas exploités dans la suite de l'étude.

- **Dynamique de population bactérienne, COP et NOP bactériens**

Les résultats de dénombrements bactériens par cytométrie en flux permettent d'observer des tendances dans l'évolution des populations bactériennes au cours de l'étude (Figure 25 ; A). Pour les cultures mixtes et la culture xénique, une croissance des populations bactériennes est observée entre les prélèvements. En terme de concentration cellulaire bactérienne, des différences peuvent être constatées entre les cultures. La culture xénique présente la population bactérienne la moins dense avec une concentration de l'ordre d' $10^6$  cell.mL<sup>-1</sup> atteinte en phase stationnaire (Tableau 9). A l'opposé, la population de bactéries *Halomonas sp.* SY003 est celle qui s'est le plus développée au sein des cultures de microalgues avec une population bactérienne finale de  $10^4$  (3)  $10^6$  cell.mL<sup>-1</sup> en phase stationnaire. Les cultures associées aux souches bactériennes SY007 et SY244 connaissent quant à elles une colonisation modérée par les bactéries, avec une augmentation de l'ordre d'un facteur 100 de la population bactérienne au cours des cultures. Le nombre de cellules bactériennes par cellule algale (ratio B :A) est également très différent d'une condition à une autre (Tableau 9). Au sein des cultures mixtes *Dunaliella sp.*-SY007 et *Dunaliella sp.*-SY244, il existe respectivement en phase stationnaire 37 (13) et 8 (2) B :A. En revanche, la population bactérienne SY003 est largement majoritaire par rapport à la population algale puisque le ratio B :A estimé est de 775 (4). Le ratio B :A au sein de la culture xénique est faible, 2 (1) B :A, confirmant la faible importance de la population bactérienne relativement à la population algale au sein de cette culture. Ces souches bactériennes étant majoritairement retenues sur les filtres GF/C utilisés pour l'analyse de la biomasse algale, l'estimation de la part de C et de N bactérien dans le COP et NOP dosé est nécessaire. Les quotas des souches bactériennes SY003, SY007 et SY244 sont estimés parallèlement à cette expérience et présentés dans le Tableau 8. Les deux bactéries de type bacille, la SY007 et la SY244, ont des quotas cellulaires en carbone et azote supérieurs aux quotas de la souche SY003 présentant des cellules de type coque. A partir de ces valeurs, une estimation du pourcentage de C et N bactérien dosé sur les filtres GF/C est possible (Tableau 8). Les résultats obtenus montre que le

carbone bactérien dosé dans le COP est faible puisqu'il représente au maximum 10 % du COP dosé et cela en toute fin d'expérience et pour la souche SY003. Les valeurs de COP dosé sur les filtres GF/C représente donc un bon indicateur de la biomasse algale carbonée. En revanche, la contribution des bactéries au NOP est non négligeable pour les souches SY007 et SY003 avec des valeurs respectives de 15 (5) % et 34 (1) % du NOP (Tableau 8).

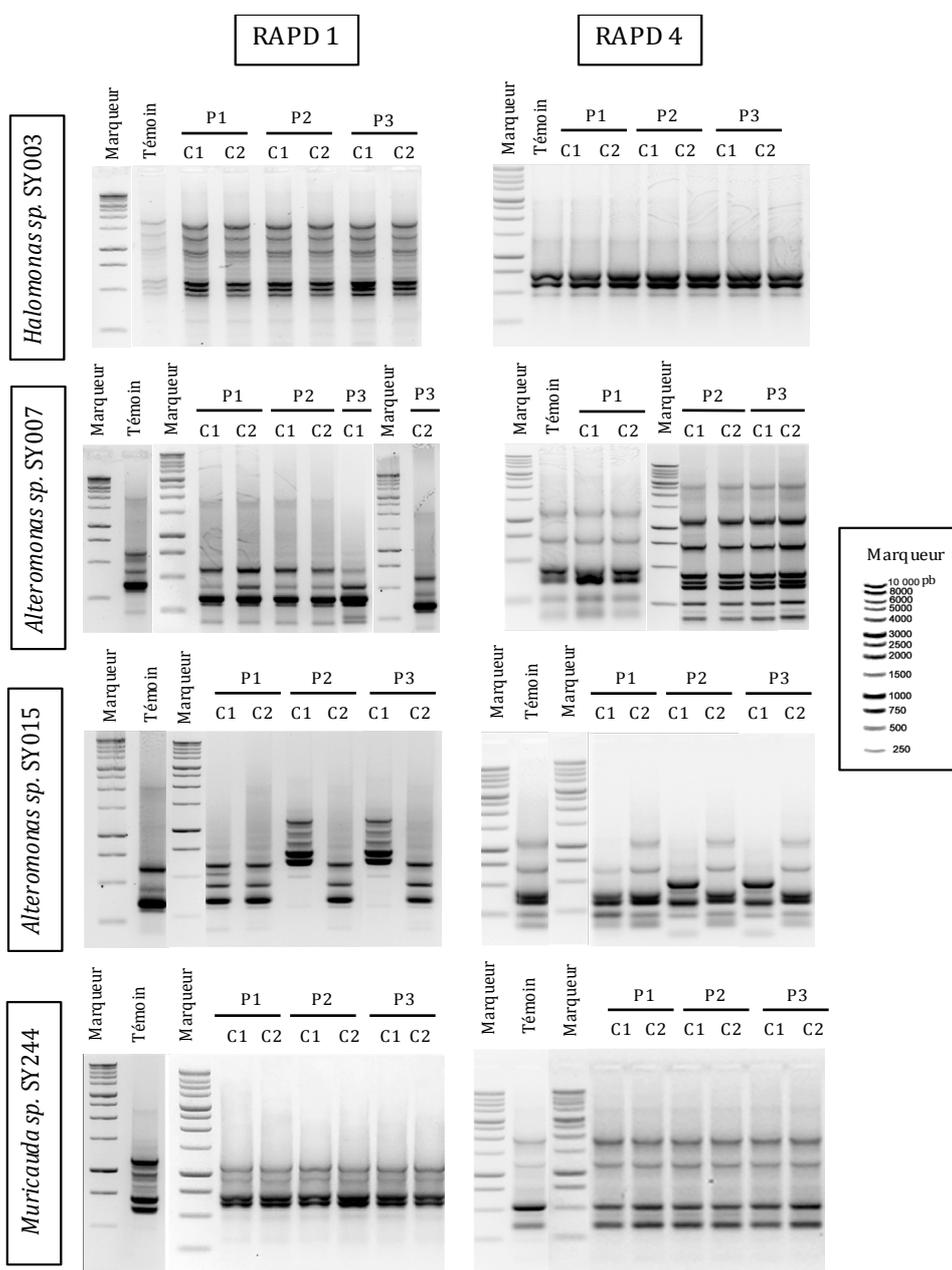


Figure 24 : Profils d'électrophorèse des analyses RAPD 1 et 4 (random amplified polymorphic DNA) réalisés pour 2 colonies bactériennes par échantillon correspondant aux cultures mixtes. Un marqueur (Marqueur) correspondant à un mélange de séquences de taille connu sert de référence. Les profils obtenus sont comparés au profil de la souche mère pure de la bactérie correspondante (Témoin). P représente le photobioréacteur suivi de son numéro, C représente la colonie bactérienne analysée suivi de son numéro.

Les valeurs d'azote bactérien ainsi calculées sont donc soustraites aux valeurs de NOP total afin d'obtenir une estimation du NOP d'origine algal en phase stationnaire.

**Tableau 8 : Morphologies, quotas et contribution des bactéries au carbone et à l'azote organique particulaire (COP et NOP) dosé sur les filtres GF/C en phase stationnaire. Les quotas des bactéries de la culture xénique ne pouvant être déterminés, les valeurs obtenues avec la souche SY003, morphologiquement proche, leur sont attribués. Les valeurs correspondent aux médianes associées à l'écart interquartile (IQR).**

	Xénique	SY003	SY007	SY244
Morphologie	coque	coque	bacille	bacille
Q <sub>C</sub> (fmol C.cell <sup>-1</sup> )	6.4 (0.3)	6.4 (0.3)	27.7 (4.7)	18.3 (0.3)
Q <sub>N</sub> (fmol N.cell <sup>-1</sup> )	1.3 (0.1)	1.3 (0.1)	5.1 (0.9)	3.6 (0.1)
% COP total	0.05 (0.05)	9.6 (0.2)	3.6 (1.2)	0.41 (0.2)
% NOP total	0.2 (0.2)	33.8 (0.9)	14.6 (5.1)	2.1 (0.81)

○ **Taux de croissance maximal de *Dunaliella sp.***

La présence de bactéries affecte la croissance de *Dunaliella sp.* comme le montre le graphique représentant l'évolution du carbone organique particulaire (COP) en fonction du temps (Figure 25 ; B). Quelle que soit la souche bactérienne testée, l'influence des bactéries sur les cultures de *Dunaliella sp.* en photobioréacteurs se traduit par une baisse systématique de  $\mu_{max}$  de l'algue (Tableau 9). Les bactéries présentes dans la culture xénique et la bactérie *Halomonas sp.* SY003, ont pour effet de diminuer de manière importante le  $\mu_{max}$  de *Dunaliella sp.* avec des baisses constatées de 44 et 53 % respectivement. La souche *Muricauda sp.* SY244 entraîne une inhibition plus modérée de  $\mu_{max}$  de l'ordre de 25 %. Enfin, la souche *Alteromonas sp.* SY007 n'altère pas de manière significative le  $\mu_{max}$  de *Dunaliella sp.*

Les valeurs de  $\mu_{max}$  calculées au cours de cette expérience (expérience 2) à partir des cinétiques d'accumulation du carbone, sont comparées à celles obtenues pendant l'expérience de criblage en microplaques (expérience 1), estimées quant à elles à partir des cinétiques de fluorescence de la chl *a in vivo*. Une corrélation positive est constatée entre les  $\mu_{max}$  des deux expériences ( $\rho = 0,91$  ; Pvalue = 0,042 ; pente = 1) visible sur le graphique A de la Figure 26. Seul le  $\mu_{max}$  calculé en présence de la bactérie SY003 en photobioréacteur est en faible désaccord avec ceux estimés en microplaques.

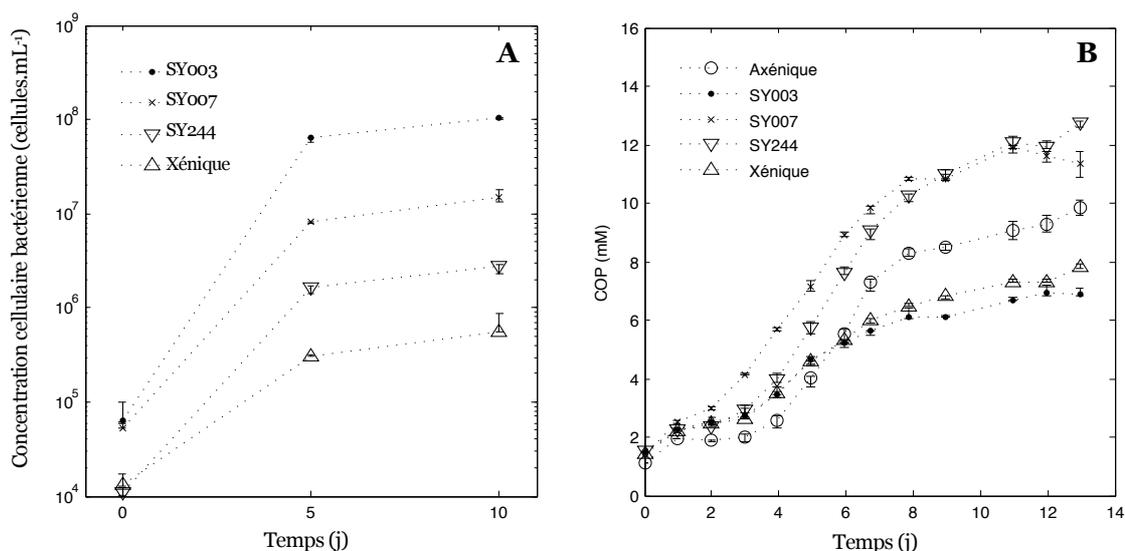


Figure 25 : (A) Concentration cellulaire bactérienne exprimée en  $\text{cell.mL}^{-1}$  mesurée par cytométrie en flux à trois temps différents de la phase expérimentale : au lancement de l'expérience (0), à 5 jours et à 10 jours. (B) Carbone organique particulaire (COP) en mM dosé sur les filtres GF/C en fonction du temps en jour. Chaque symbole représente la médiane et la barre d'erreur l'IQR ( $n=3$ ).

#### ○ Gain de biomasse de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire

Au terme de l'expérience 2, il apparaît que l'accumulation de biomasse de *Dunaliella sp.* au cours des cultures en batch est fortement influencée par les populations bactériennes. Cette influence est clairement visible sur l'évolution du COP en fonction du temps (Figure 25 ; B). Le gain de biomasse carbonée ( $\Delta X_{max}$ ) calculé pour les cultures xéniques et en présence de la bactérie *Halomonas sp.* SY003 est diminué de 25 et de 33 % respectivement, par rapport au témoin de culture axénique (Tableau 9). Au contraire, les bactéries *Alteromonas sp.* SY007 et *Muricauda sp.* SY244 influencent positivement  $\Delta X_{max}$  avec des augmentations significatives de 31 et de 35 % respectivement.

Le  $\Delta X_{max}$  atteint en phase stationnaire peut aussi s'exprimer en terme de concentration cellulaire algale (Tableau 9). Le plus fort effet négatif est toujours attribué aux bactéries *Halomonas sp.* SY003 puisqu'en présence de celles-ci le  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* est altéré de 61 %. En revanche, contrairement aux résultats obtenus pour  $\Delta X_{max}$  calculés à partir du carbone particulaire, la bactérie SY007 permet d'obtenir le meilleur accroissement de population cellulaire pour *Dunaliella sp.* alors qu'en présence de la bactérie SY244, le  $\Delta X_{max}$  est identique à celui obtenu pour le témoin axénique. Cette contradiction apparente suggère des quotas cellulaires en carbone variables pour *Dunaliella sp.*, selon les bactéries associées.

De même que précédemment observé pour  $\mu_{max}$ , les valeurs de  $\Delta X_{max}$  calculées au cours de cette étude (expérience 2) sont comparées à celles obtenues pendant l'expérience de criblage à partir des cultures en microplaques (expérience 1). Une bonne adéquation entre les résultats des deux expériences est

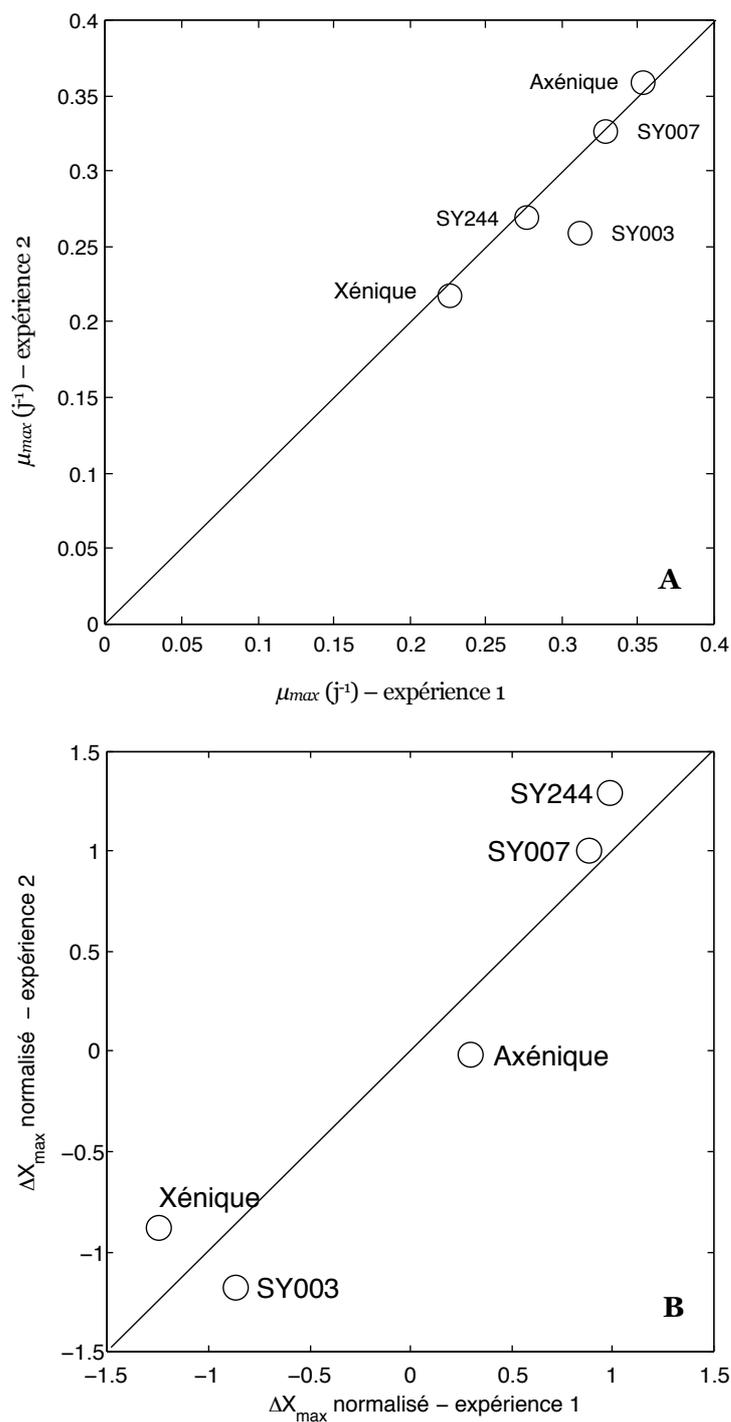


Figure 26 : Correlation entre les paramètres de croissance ( $\mu_{max}$  et  $\Delta X_{max}$ ) estimés lors des deux expériences : en microplaques et photobioréacteurs d'1 L. La droite tracée sur chaque graphique représente la corrélation 1 :1. Les valeurs de  $\Delta X_{max}$  estimées par la fluorescence pour les cultures en microplaques et par le carbone pour les cultures en photobioréacteurs sont normalisées pour en permettre la comparaison.

également observée et confirmée par la corrélation positive ( $\rho=0,95$  ; Pvalue= 0,042 ; pente= 1) visible sur le graphique B de la Figure 26.

○ **Biovolume et quota cellulaire de *Dunaliella sp.***

En phase stationnaire, le quota en carbone ( $Q_C$ ) des cellules de *Dunaliella sp.* est significativement différent d'une culture à l'autre (Tableau 9). Les plus faibles valeurs sont observées en présence de la souche SY007 et en condition xénique. Le plus fort  $Q_C$  est observé en présence de la souche SY244 avec une valeur de 22,4 (1,0) pmolC.cell<sup>-1</sup>. Ce résultat semble expliquer l'apparente contradiction constatée précédemment entre les  $\Delta X_{max}$  exprimés en concentration cellulaire et en carbone. En effet, en présence de la souche SY244 et en phase stationnaire, la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* est voisine de celle du témoin. En revanche, le fort  $Q_C$  de ces cellules permet d'obtenir une forte biomasse carbonée. Ces différences de  $Q_C$  peuvent être mises en relation avec les variations de biovolumes cellulaires constatées entre les différentes cultures (Tableau 9). En effet, le biovolume de *Dunaliella sp.* estimé à partir des données du compteur de particules, varie de manière significative en fonction des conditions. De même qu'observé avec le  $Q_C$ , le biovolume le plus important est calculé en présence de la souche SY244, avec 411 (21)  $\mu\text{m}^3$ . Les plus faibles valeurs de biovolumes sont également estimées en présence de la souche SY007 et en condition xénique. Ces observations sont confirmées par l'existence d'une corrélation positive ( $\rho=0,98$  ; Pvalue= 0,0) entre le biovolume et le  $Q_C$  de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire.

L'azote cellulaire total appelé quota d'azote, exprimé par cellule ( $Q_N$ ) ou par unité de carbone (N : C), est calculé pour chacune des conditions (Tableau 9). Toutes les souches bactériennes testées influencent de manière significative l'azote par unité de biomasse avec une augmentation des deux paramètres  $Q_N$  et le N : C. C'est pour les cultures mixtes *Dunaliella sp.* - *Halomonas sp.* SY003 que les plus fortes valeurs de  $Q_N$  sont atteintes avec une augmentation par rapport au témoin de 79 % pour  $Q_N$  et de 100 pour N : C. Les souches *Alteromonas sp.* SY007 et SY244 induisent également une augmentation importante du  $Q_N$  (0,82 (0,12) et 0,89 (0,06) pmol.cell<sup>-1</sup>) de *Dunaliella sp.* Par ailleurs, il est notable que *Dunaliella sp.* en conditions xéniques possède un contenu en azote remarquablement proche de celui observé en conditions axéniques.

Enfin, l'influence des bactéries sur le rendement d'incorporation de l'azote ( $R_N$ ) est également observée au cours de cette étude (Tableau 9). Le  $R_N$  du témoin axénique s'avère faible, avec une incorporation de seulement un quart de l'azote initialement disponible dans le milieu. En revanche, en présence des souches SY007 et SY244, plus de la moitié de l'azote apporté par le milieu de culture est assimilé dans la biomasse algale ( $R_N$  de 56 (3) et 56 (4) % respectivement), ce qui représente un gain de 115 % par rapport au témoin. Bien qu'inférieur à celui des cultures SY007 et SY244,  $R_N$  obtenu en condition xénique est légèrement amélioré par rapport au témoin axénique. Enfin, la souche SY003 altère l'incorporation de

Tableau 9 : Taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) de *Dunaliella sp.*, le gain en biomasse maximal ( $\Delta X_{max}$ ) de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire exprimé en concentration cellulaire et en carbone, le quota cellulaire en carbone ( $Q_C$ ), le quota cellulaire en azote ( $Q_N$ ), le ratio carbone : azote (C:N), le biovolume de *Dunaliella sp.*, le rendement de l'azote ( $R_N$ ), le ratio bactéries : algues, la concentration cellulaire bactérienne. Les valeurs représentent les médianes associées à l'écart interquartile correspondant entre parenthèses (IQR). Les valeurs dont les lettres ne sont pas statistiquement différentes (Kruskal-Wallis,  $\alpha=5\%$ ).

	C. axénique	SY003	SY007	SY244	C. xénique	Statistiques
$\mu_{max}$ <i>Dunaliella sp.</i> ( $j^{-1}$ )	<b>0,36<sup>a</sup> (0,05)</b>	0,26 <sup>b</sup> (0,05)	0,33 <sup>a</sup> (0,01)	0,27 <sup>b</sup> (0,01)	0,22 <sup>b</sup> (0,01)	P=0,018 (n=3)
$\Delta X_{max}$ ( $10^6$ cell.mL <sup>-1</sup> )	<b>0,36<sup>a</sup> (0,06)</b>	0,14 <sup>b</sup> (0,01)	0,47 <sup>c</sup> (0,04)	0,37 <sup>a</sup> (0,04)	0,33 <sup>a</sup> (0,03)	P=14.10 <sup>-5</sup> (n=6)
$\Delta X_{max}$ (C mM)	<b>8,0<sup>a</sup> (0,5)</b>	5,4 <sup>b</sup> (0,5)	10,5 <sup>c</sup> (0,3)	10,8 <sup>c</sup> (0,5)	6,0 <sup>d</sup> (0,3)	P=2,2.10 <sup>-5</sup> (n=6)
$Q_C$ (pmol.cell <sup>-1</sup> )	<b>20,6<sup>a</sup> (0,6)</b>	19,6 <sup>b</sup> (0,6)	17,2 <sup>c</sup> (0,9)	22,4 <sup>d</sup> (1,0)	14,7 <sup>e</sup> (0,4)	P=3,6.10 <sup>-8</sup> (n=9)
$Q_N$ (pmol.cell <sup>-1</sup> )	<b>0,71<sup>a</sup> (0,04)</b>	0,81 <sup>b</sup> (0,07)	0,72 <sup>a</sup> (0,05)	0,87 <sup>c</sup> (0,05)	0,65 <sup>d</sup> (0,08)	P=2,73.10 <sup>-7</sup> (n=9)
C:N (mole C: mole N)	<b>29,6<sup>a</sup> (1,4)</b>	24,4 <sup>b</sup> (1,3)	24,1 <sup>bc</sup> (2,4)	25,6 <sup>d</sup> (0,5)	22,8 <sup>c</sup> (1,7)	P=3,2.10 <sup>-8</sup> (n=9)
Biovolume <i>Dunaliella sp.</i> ( $\mu m^3$ )	<b>384<sup>a</sup> (15)</b>	350 <sup>b</sup> (15)	337 <sup>c</sup> (8)	411 <sup>d</sup> (21)	285 <sup>e</sup> (16)	P=8,9.10 <sup>-7</sup> (n=9)
$R_N$ (%N/N NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	<b>26<sup>a</sup> (9)</b>	19 <sup>b</sup> (2)	56 <sup>c</sup> (3)	56 <sup>c</sup> (4)	34 <sup>d</sup> (5)	P=6,91.10 <sup>-7</sup> (n=9)
Ratio Bactéries : Algues (cellule : cellule)	<b>0<sup>a</sup> (0)</b>	775 <sup>b</sup> (4)	37 <sup>c</sup> (13)	8 <sup>a</sup> (2)	2 <sup>a</sup> (1)	P=0,009 (n=3)
bactéries ( $10^6$ .cell.ml <sup>-1</sup> )	<b>0<sup>a</sup> (0)</b>	104 <sup>b</sup> (3)	15 <sup>c</sup> (5)	3 <sup>a</sup> (1)	1 <sup>a</sup> (0)	P=0,008 (n=3)

l'azote dans la biomasse de *Dunaliella sp.*, puisque le  $R_N$  constaté en phase stationnaire pour cette condition est de seulement 19 (2) %, valeur inférieure de 27 % à celle du témoin.

## 4. Discussion

### ○ Outils et méthodes de sélection de cultures mixtes *Dunaliella sp.* -bactéries

La sélection de bactéries améliorant les performances de croissance de *Dunaliella sp.* a été proposée en deux étapes : une première étape dite de criblage en microplaques (expérience 1) et une deuxième dite de validation et de caractérisation en photobioréacteurs (expérience 2). La première phase de criblage a permis de sélectionner 2 souches bactériennes *Alteromonas sp.* SY007 et *Muricauda sp.* SY244 pour leurs effets stimulants sur l'accumulation de biomasse de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire. Les contraintes propres au dispositif de culture en microplaque, évoquées précédemment, soulèvent la question de la représentativité des résultats obtenus au cours de cette étude. L'expérience 2 est alors conçue de manière à, d'une part, confronter ces résultats à ceux obtenus en système de culture classique et éprouvé, et d'autre part poursuivre l'étude des deux souches bactériennes sélectionnées. Le dispositif expérimental est constitué de 18 photobioréacteurs équipés de manière à réaliser les cultures en triplicat et à assurer le maintien de conditions stériles pour la culture et les prélèvements. L'influence des bactéries sur la croissance et l'accumulation de carbone et d'azote chez *Dunaliella sp.* est déterminée par comparaison à une culture axénique mais aussi par rapport à la culture de la souche initiale xénique. Une corrélation positive des résultats obtenus entre ces deux expériences est démontrée et pour les deux paramètres de croissance,  $\mu_{max}$  et  $\Delta X_{max}$ , calculés. Cette tendance montre une bonne adéquation des résultats obtenus dans les deux phases expérimentales. Le suivi de la croissance algale par méthode indirecte à travers la mesure de la fluorescence de la chl *a* permet donc d'estimer correctement  $\mu_{max}$  et  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* Par ailleurs, ces résultats suggèrent plus globalement que, malgré les contraintes du système (volume, agitation et transferts de gaz) la croissance de cette microalgue au sein du système de criblage est comparable à celle obtenue au sein de systèmes de cultures plus éprouvés. L'outil de criblage des associations en microplaques représente donc un dispositif de sélection de cultures mixtes *Dunaliella sp.* -bactéries performant. Celui-ci permet de réaliser un gain de temps considérable afin d'étudier, uniquement les couples intéressants, en système de culture classique. D'autres auteurs avaient déjà constaté que la culture de microalgues en microplaques 96 puits représentait une alternative intéressante pour conserver et maintenir avec succès une collection de souches microalgales de différentes espèces (Nowack *et al.* 2005). Une récente étude montrait également le fort potentiel d'un tel outil pour déterminer les meilleures conditions d'éclairement d'une culture de *Dunaliella tertiolecta* afin d'optimiser son taux de croissance et son efficacité photosynthétique en vue d'une production de biofuel (Mertiri *et al.* 2011).

- **Suivi des populations bactériennes**

A l'inverse des cultures en microplaques, le volume des cultures en photobioréacteurs autorise l'analyse de paramètres biologiques supplémentaires et notamment ceux concernant l'évolution des populations bactériennes au sein des cultures mixtes. Les populations bactériennes au sein des photobioréacteurs ont été régulièrement analysées par isolements afin de contrôler la présence des bactéries sélectionnées au sein de leurs cultures respectives et de vérifier l'absence de contamination. Les isolements n'ont révélés aucune contamination bactérienne apparente dans les cultures mixtes et dans les cultures axéniques. En revanche, les analyses RAPD, plus robustes, ont détecté la présence d'un contaminant bactérien au sein de deux des réplicats de culture de *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY015. L'effet de cette bactérie sur la croissance de *Dunaliella sp.* au cours de cette étude n'est donc pas exploité. Par ailleurs, ce résultat démontre surtout que la pratique d'isolements bactériens, basés sur l'analyse phénotypique des colonies formées, n'est pas suffisante pour s'assurer de l'absence de contamination. L'étude approfondie des interactions entre microalgues et bactéries nécessite l'usage d'outils performants du domaine de la biologie moléculaire tel que la RAPD. D'autres techniques telles que la DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), la SSCP (*single strand conformation polymorphism*) ou la RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par exemple, sont également adaptées pour l'analyse des populations bactériennes et deviennent d'autant plus indispensables à utiliser pour l'étude de systèmes multispécifiques au sein desquels des consortia bactériens cohabitent.

- **Contribution des bactéries au carbone et à l'azote organique particulaire**

Le test de rétention cellulaire mené en parallèle de cette expérience a révélé que l'utilisation des filtres GF/C ne permettait pas d'isoler les algues des bactéries pour l'analyse de la composition de la biomasse algale. Les quotas bactériens en carbone et en azote estimés à partir de cultures pures des souches SY003, SY007 et SY244 sont relativement forts comparés aux valeurs moyennes citées dans la littérature pour des bactéries marines (Fukuda *et al.* 1998). Cependant, ces fortes valeurs sont en accord avec des quotas bactériens calculés par d'autres auteurs et correspondant à des bactéries de biovolumes importants (Gundersen *et al.* 2002). Ces auteurs ont montré que les quotas élémentaires sont liés linéairement et positivement au biovolume cellulaire bactérien. Les observations microscopiques des souches SY007 et SY244 associées aux plus forts quotas cellulaires présentaient justement des cellules d'assez grande taille pour des bactéries. La longueur des bacilles était en moyenne de 1 à 2  $\mu\text{m}$  et pouvaient atteindre jusqu'à 3 à 4  $\mu\text{m}$ . La détermination de ces quotas cellulaires conjuguée à la mesure des concentrations cellulaires bactériennes au cours de l'expérience, a permis de réaliser une estimation de la contribution des bactéries au carbone et à l'azote organique particulaire (COP et NOP) retenu sur les filtres GF/C. Les résultats obtenus montrent une faible contribution des bactéries au COP qui demeure par conséquent un bon estimateur du carbone fixé par les algues. En revanche, l'azote bactérien représente une part non négligeable du NOP dosé sur les filtres GF/C. Il est connu que les cellules bactériennes contiennent plus

d'azote par carbone que les microalgues : le ratio C :N bactérien est, en effet, nettement inférieur à celui des microalgues. Heldal *et al.* (1996) notaient qu'en fonction du taux de croissance, le C :N bactérien varie de 1,5 en pleine croissance à 15 environ en phase stationnaire.

Cette contribution importante de l'N bactérien dans le dosage du NOP, impose alors de soustraire cet N au NOP total de manière à obtenir une estimation de l'N algal en phase stationnaire.

○ **Effets des bactéries sur la croissance algale**

L'influence des souches bactériennes SY003, SY007 et SY244 sur les performances de croissance de *Dunaliella sp.* est estimée à travers le calcul de  $\mu_{max}$  et  $\Delta X_{max}$ . En accord avec la phase expérimentale de criblage, au cours de cette étude, aucune des souches bactériennes testées n'a stimulé le  $\mu_{max}$  de *Dunaliella sp.* Les souches *Muricauda sp.* SY244, *Halomonas sp.* SY003 et la communauté bactérienne de la souche xénique ont toutes diminué significativement le  $\mu_{max}$  alors que la souche *Alteromonas sp.* SY007 n'a eu aucun effet. De même qu'il a été expliqué concernant les résultats de croissance en microplaques, des composés bactériens toxiques pour *Dunaliella sp.* et émis dans le milieu de culture pourraient être impliqués dans cette altération du  $\mu_{max}$  (Amaro *et al.* 2005). Ces effets algicides ont déjà été répertoriés par le passé chez des souches bactériennes appartenant au genre *Dietzia* (Kim *et al.* 2008), bactéries présentes dans la culture xénique, plus rarement concernant le genre *Halomonas* (Su *et al.* 2011) et à notre connaissance jamais répertorié chez des bactéries du genre *Muricauda*. En revanche, l'activité algicide à travers l'émission de composés toxiques extracellulaires est connue chez certaines souches du genre *Alteromonas sp.* (Lee *et al.* 2008, Cho 2012) alors que cet effet n'est pas observé sur la croissance de *Dunaliella sp.* en présence de la souche *Alteromonas sp.* SY007 au cours de cette étude. Ce résultat suggère une résistance de *Dunaliella sp.* aux effets de ces composés toxiques ou une absence de production de ceux-ci par la souche SY007.

En phase stationnaire, la concentration cellulaire ainsi que l'accumulation de carbone dans la biomasse algale sont sensiblement affectés par la présence des bactéries testées et en condition de carence azotée. La reprise de croissance pour toutes les cultures est constatée en réponse à un pulse d'azote confirmant la limitation des cultures algales par cet élément. La limitation azotée est aussi suggérée par les fortes valeurs du C :N algal constatées en phase stationnaire. Dans ces conditions et en accord avec les résultats obtenus en microplaques, les souches SY007 et SY244 augmentent significativement, de 31 et 35 % respectivement, l'accumulation de biomasse ( $\Delta X_{max}$ ) carbonée de *Dunaliella sp.* tandis que  $\Delta X_{max}$  inférieurs sont enregistrés pour la culture xénique (-25 %) et en présence de la bactérie SY003 (-33 %). Par ailleurs, des résultats en apparence contradictoires sont constatés au niveau des  $\Delta X_{max}$  calculés à partir de la concentration cellulaire algale et à partir du carbone organique particulaire. Ces observations suggèrent des variations du quota cellulaire carboné ( $Q_C$ ) de *Dunaliella sp.* selon les conditions qui sont corrélées positivement à des variations de biovolumes. Cette corrélation est connue chez les microalgues dans la littérature tel que Verity *et al.* (1992) l'ont montré précédemment. En revanche, l'origine de

l'accumulation différentielle de carbone selon la présence de certaines souches bactériennes demeure complexe à déterminer sans analyses complémentaires. A notre connaissance une seule publication a présenté des différences de diamètre cellulaire selon la présence de bactéries. Sans expliquer le phénomène, De-Bashan, Bashan *et al.* (2002) avaient observé un gain de 62 % du diamètre de *Chlorella vulgaris* en présence de la bactérie *Azospirillum brasilense*.

Ces résultats démontrent l'utilité et la robustesse de la mesure du carbone organique particulaire comme estimateur de la biomasse algale, intégrant les variations de biovolumes qui interviennent entre les différentes phases de croissance d'une même culture et entre des conditions de cultures différentes.

○ **Interactions *Dunaliella sp.* -bactéries négatives : compétition et amensalisme**

L'altération importante de -33 % et de -25 % du  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* estimé à partir du carbone organique particulaire et observé en présence de la bactérie *Halomonas sp.* SY003 et pour les souches xéniques respectivement, suggère une compétition pour la ressource azotée limitante et/ou un effet toxique de composés bactériens émis dans le milieu de culture. La reprise de croissance de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire en réponse au pulse d'azote confirme la carence azotée des cellules et donc la disparition complète d'azote sous forme minérale dans le milieu de culture. Le fort développement des populations bactériennes de la souche SY003 associé à un très faible rendement de l'azote chez *Dunaliella sp.* semblent renforcer l'hypothèse d'une compétition pour la ressource azotée minérale. Sans source de carbone organique externe, la bactérie SY003 se développe à partir de matière organique d'origine algale issue de l'exsudation et/ou de la mortalité cellulaire, pour couvrir ses besoins en carbone. En revanche, il semblerait que les bactéries n'accèdent pas à la part d'azote disponible dans cette matière organique ou que la métabolisation de cette matière organique ne permette pas de couvrir ses besoins en azote. Il est connu que, lorsque les besoins des bactéries hétérotrophes ne sont pas couverts par l'assimilation de la matière organique disponible dans le milieu, elles utilisent les éléments inorganiques dissous comme source d'éléments indispensables à leur survie (Bratbak & Thingstad 1985, Joint *et al.* 2002, Mindl *et al.* 2005). De plus, la majorité des bactéries est capable d'utiliser l'ammonium comme source d'azote contrairement au nitrate (Madigan & Martinko 2007). Une compétition pour la ressource minérale azotée au profit de la bactérie SY003 et au détriment de *Dunaliella sp.* est donc probable au sein de ces cultures. En revanche, l'émission de composés toxiques par ces bactéries ne peut totalement être écartée, d'autant plus que cette hypothèse est suggérée pour expliquer l'altération du  $\mu_{max}$  constatée en présence de cette bactérie en début de culture. L'altération du  $\mu_{max}$  de *Dunaliella sp.* par des composés bactériens toxiques pourrait permettre ensuite aux bactéries de prendre l'avantage dans la compétition avec les cellules algales pour la ressource minérale azotée.

En revanche, au sein de la culture xénique, une compétition pour la ressource azotée au profit des communautés bactériennes présentes, est moins plausible pour expliquer l'altération de 25 % du  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* au sein de ces cultures. Malgré une inhibition sensible de la croissance algale au niveau

du  $\mu_{max}$  et du  $\Delta X_{max}$ , les populations bactériennes se sont très peu développées et le  $R_N$  algal n'est pas altéré. De plus, le faible  $Q_C$  associé au faible biovolume des cellules algales au sein de la culture xénique suggèrent une difficulté de ces cellules à fixer le carbone par rapport aux témoins axéniques mais aussi par rapport aux autres cultures en générale. Ces résultats semblent plus tôt favorables à l'hypothèse d'un effet toxique de composés bactériens présents au sein des cultures. La reprise de croissance en phase stationnaire après le pulse d'azote pourrait alors s'expliquer par une pathogénicité moindre en condition d'azote non limitant. Il a déjà été montré que la pathogénicité de bactéries envers les végétaux supérieurs peut être accrue en condition de limitation azotée (Snoeijers *et al.* 2000).

○ **Interactions *Dunaliella sp.* -bactéries positives : mutualisme**

En présence des bactéries SY007 et SY244, le  $\Delta X_{max}$  de *Dunaliella sp.* calculé à partir du carbone organique particulaire est significativement augmenté de 31 et 35 % respectivement par rapport au témoin axénique. Par ailleurs, les  $R_N$  calculés pour *Dunaliella sp.* en présence de ces deux bactéries sont particulièrement importants et représentent un gain de 115 % pour les deux souches. Ces résultats indiquent, contrairement au témoin axénique, qu'une plus grande part de l'azote apporté initialement par le milieu de culture est transféré vers le compartiment algale pour la fixation de carbone et donc pour sa croissance. Une reminéralisation de l'azote par les bactéries à partir de la matière organique algale pourrait être à l'origine de ces gains constatés en fin de culture. Les bactéries SY007 et SY244 assuraient ainsi un meilleur recyclage de la matière permettant d'améliorer considérablement les rendements des cultures de *Dunaliella sp.*. L'exsudation de composés organiques chez les microalgues représente en général autour de 10 % du carbone photoassimilé et peut atteindre jusqu'à 70% (Lancelot 1979, Mague *et al.* 1980, Grossart & Simon 2007). La production de substances extracellulaires a déjà été observée chez *Dunaliella salina* (Giordano *et al.* 1994, Mishra & Jha 2009). Le faible  $R_N$  de 26 (9) % calculé pour les cultures axéniques semble suggérer que, dans les conditions expérimentales appliquées au cours de cette étude, *Dunaliella sp.* exsude une part importante de l'azote minéral assimilé.

## 5. Conclusion

La convergence des résultats obtenus lors de l'étape de criblage des associations en microplaques (expérience 1) et l'étape de caractérisation en photobioréacteurs (expérience 2), a permis de valider les résultats obtenus et de démontrer le fort potentiel d'un tel outil pour des études de criblages. Les effets stimulants des bactéries pré-sélectionnées *Muricauda sp. SY244* et *Alteromonas sp. SY007* sur la biomasse de *Dunaliella sp.* ont été confirmés par la mesure de l'accumulation du carbone et de l'azote dans les cultures. De plus, l'hypothèse du recyclage de l'azote piégé dans la matière organique d'origine algale par la reminéralisation bactérienne semble être à l'origine d'une meilleure production de biomasse d'une part et d'un meilleur rendement de l'azote des cultures d'autre part. Bien que ces deux souches aient induit des effets proches en phase stationnaire, la bactérie *Alteromonas sp. SY007* est sélectionnée pour la suite de l'étude compte tenu de ses effets stimulants importants sur la productivité de *Dunaliella sp.* en culture tout en n'altérant pas le taux de croissance.

---

PARTIE 3- ÉTUDE DES FLUX D'AZOTE EN CULTURE  
CONTINUE D'UN SYSTÈME BISPÉCIFIQUE  
*DUNALIELLA SP.* -BACTÉRIES

---



## 1. Introduction

Les expériences de comparaison des potentiels de croissance en microplaques (expérience 1) et en photobioréacteurs de 1 L (expérience 2) ont permis de montrer l'influence de bactéries sur la croissance de *Dunaliella sp.*, à travers le calcul du taux de croissance maximal et de l'accumulation de biomasse algale en fin de batch. Parmi les couples *Dunaliella sp.* -bactéries montrant des performances de croissance supérieures, l'association de *Dunaliella sp.* avec la bactérie *Alteromonas sp.* SY007 a particulièrement attiré notre attention. Communes des environnements marins côtiers et océaniques (Ivanova 2004), les bactéries du genre *Alteromonas*, appartiennent au groupe des  $\gamma$ -*Proteobacteria* et présentent des cellules en batonnet pourvues d'une paroi de type Gram négative, mobiles au sein de la colonne d'eau grâce à la présence d'un flagelle polaire (Baumann *et al.* 1972). Chimio-organotrophes et hétérotrophes, elles sont capables de puiser leur énergie et leur besoin en carbone à partir d'une large variété de substrats organiques tels que des glucides, acides gras monocarboxyliques et acides aminés (Baumann *et al.* 1972). De nombreux auteurs ont par le passé décrit l'activité algicide de certaines souches bactériennes du genre *Alteromonas* contre quelques espèces microalgales par l'émission de composés toxiques extracellulaires (Kim *et al.* 2008, Lee *et al.* 2008, Cho 2012). A l'inverse, au cours de notre étude, nous avons constaté un effet promoteur significatif sur la croissance de *Dunaliella sp.* en présence de la bactérie *Alteromonas sp.* SY007. La productivité de la culture algale, exprimée en biomasse carbonée, est en effet augmentée de 31 % et le rendement de l'azote de 115 % par rapport au témoin axénique. Ces résultats peuvent s'expliquer par un recyclage de l'azote organique algal en azote minéral par la reminéralisation bactérienne. A échelle industrielle, l'apport d'engrais pour la nutrition des microalgues représente un coût financier non négligeable. Par conséquent, augmenter le rendement de production tout en maximisant le rendement d'assimilation des éléments minéraux, et notamment ici de l'azote, représente un atout important, potentiellement très intéressant pour la valorisation des microalgues dans de nombreux domaines.

L'objectif de cette troisième partie est d'approfondir l'étude des interactions entre ces deux organismes en mesurant les flux d'azote entre les compartiments particulaires et dissous sous forme organique et minérale. L'ensemble de la méthode choisie vise notamment à éprouver la capacité de reminéralisation des bactéries, observée en batch d'1 litre. Un dispositif expérimental spécialement développé pour l'étude propose la réalisation de l'expérience en culture continue afin de caractériser les flux azotés pour un état stable permis au moment de l'équilibre des cultures. La limitation azotée des cultures est favorisée afin de se rapprocher des conditions expérimentales précédentes. Deux conditions de limitation azotée sont appliquées au système : un débit de  $0,3 \text{ j}^{-1}$  proche (90 %) du taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) de *Dunaliella sp.* observé en photobioréacteur de 1 L et un débit faible de  $0,05 \text{ j}^{-1}$  représentant 15 % du  $\mu_{max}$ , qui correspond à des conditions de plus forte limitation azotée.

## 2. Matériel et méthode

### A. Mise au point de méthode : test de rétention différentielle des bactéries et des microalgues sur filtres pour analyse élémentaire (CHN)

L'estimation des flux d'éléments entre les compartiments particulaires (algues et bactéries) et dissous impose la compartimentation des échantillons pour les analyses C N. Au sein du particulaire, la séparation du compartiment bactérien et algal est, pour cette raison, souhaitée. Par ailleurs, une rétention des bactéries SY007 en culture pure sur les filtres GF /C a précédemment été mise en évidence lors de l'expérience 2. Une étape de mise au point est alors nécessaire pour déterminer le protocole adapté reposant sur le principe de filtration différentielle. La rétention différentielle de *Dunaliella sp.* et de la souche bactérienne *Alteromonas sp.* SY007 est donc testée sur 2 références de filtres en fibre de verre (Whatman) : GF/D (2,7  $\mu\text{m}$ ) et GF/F (0,7  $\mu\text{m}$ ). Pour se rapprocher des conditions expérimentales, c'est une culture mixte *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY007 qui est cette fois utilisée pour les tests. Celle-ci est partagée en 9 aliquots de 10 mL dont 3 ne subissent aucun traitement et représentent les témoins. Le reste des aliquots subit une filtration sur filtre en fibre de verre, préalablement brûlés à 450 °C pendant 4 heures. Chaque filtrat est récupéré et placé dans un tube. Pour les 12 échantillons (6 filtrats et 3 témoins) ainsi constitués, la concentration en bactéries et en microalgues est ensuite déterminée par cytométrie en flux (Accuri, Becton dickinson) après fixation au formaldéhyde (2% final) et marquage au SYBRgreen (1x final). Le pourcentage de cellules algales et bactériennes retenues sur les différents filtres est ensuite estimé par comparaison aux cultures témoins.

### B. Dispositif de culture continue et analyses

#### ○ Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental de culture continue développé pour l'étude a été conçu pour permettre la réalisation de cultures à long terme sans rupture de conditions de stérilité. Le système complet et entièrement assemblé est stérilisable par autoclavage (120 °C, 20 min). Seule, la réserve d'eau de mer artificielle enrichie, stérile et à usage unique, est connectée au dispositif après la stérilisation. Afin de proscrire l'entrée de contaminants, toutes les entrées et sorties de gaz sont réalisées à travers des filtres de 0,22  $\mu\text{m}$  alors que le photobioréacteur est maintenu sous faible pression positive.

Le système est constitué des éléments suivants (Figure 27) :

-Une réserve (A) de 20 L (Flexboy, Sartorius) contenant le milieu de culture permet d'alimenter le photobioréacteur (G) en éléments nutritifs au débit déterminé par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (E). Un port relié à un filtre hydrophile 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartobran 300, Sartorius) autorise le remplissage en eau de mer artificielle (ASW) et en condition stérile de la réserve tandis qu'un septum permet d'injecter la solution d'enrichissement grâce à une seringue stérile connectée à un filtre 0,22  $\mu\text{m}$

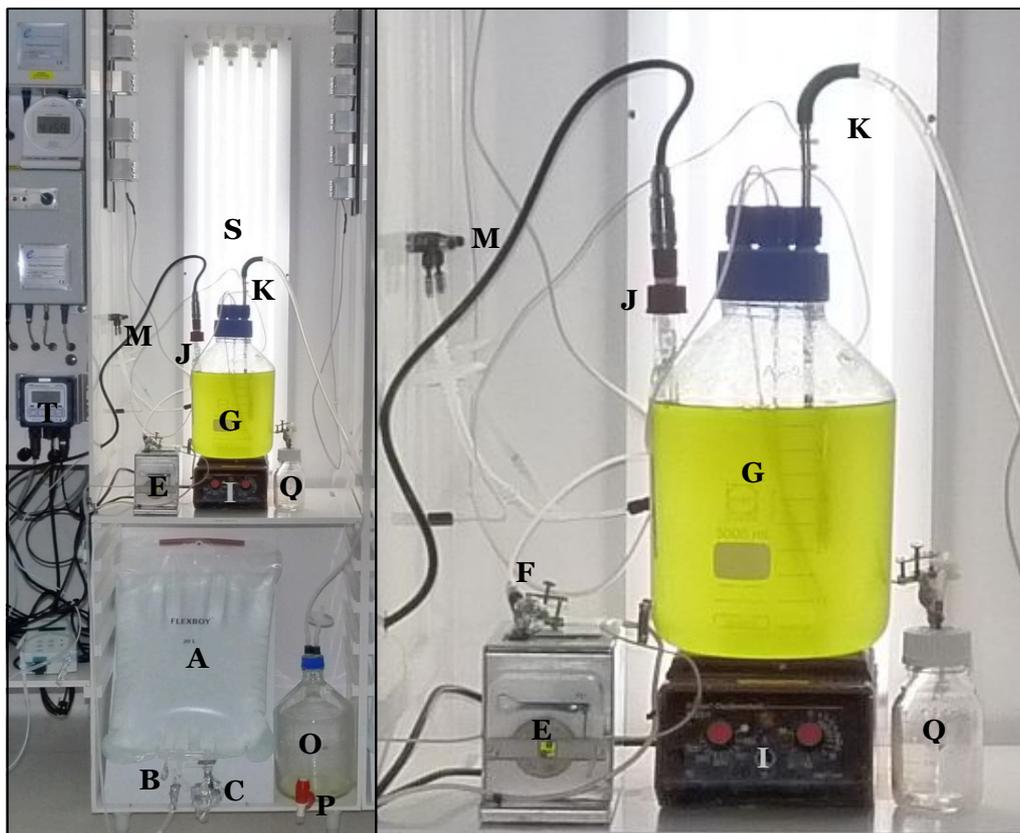
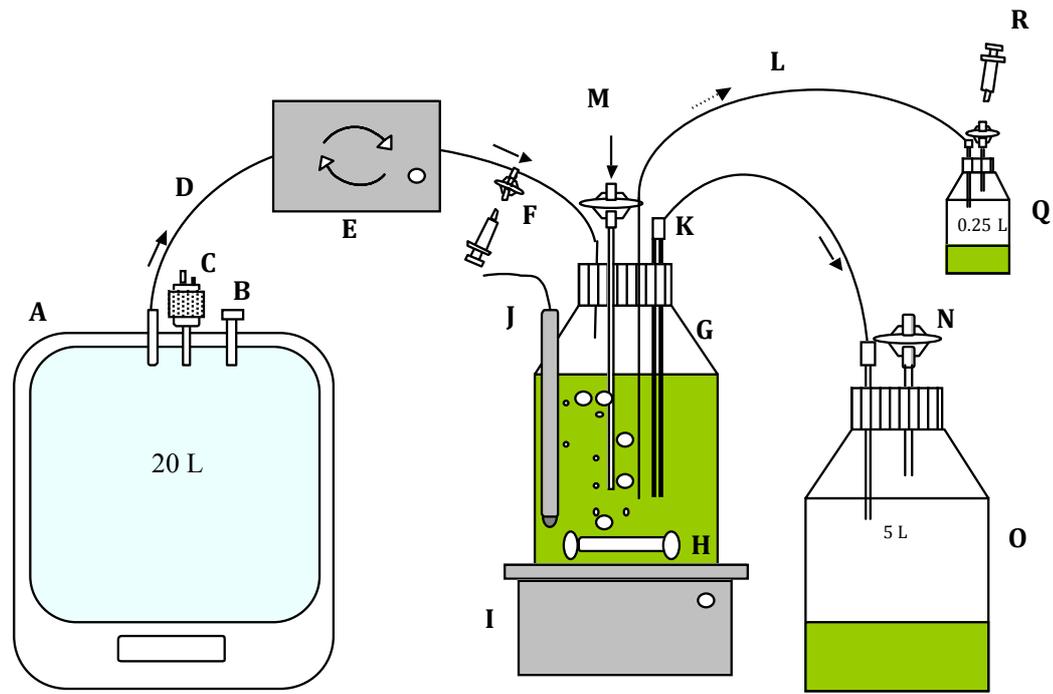


Figure 27 : Représentation schématique et photographies du dispositif expérimental de culture constitué des éléments suivants : (A) une réserve de milieu de culture disposant (B) d'un port d'injection et (C) d'un filtre 0,22  $\mu\text{m}$ , (D) un tube connectant la réserve au photobioréacteur, (E) une pompe péristaltique, (F) un port d'injection, (G) un photobioréacteur de 5 L, (H) un barreau aimanté à ailettes, (I) un agitateur magnétique, (K) un tube en inox permettant la récolte de la culture, (L) un tube relié au système de prélèvement, (M) une arrivée d'air avec ou sans  $\text{CO}_2$ , (N) filtre à gaz 0,22  $\mu\text{m}$ , (O) un système de récolte d'une capacité de 5 L, (P) un robinet de vidange, (Q) un système de prélèvement en condition stérile, (R) seringue de 50 mL, (S) une rampe de 6 tubes fluorescents et (T) un régulateur pH.

et équipée d'une aiguille. Un port d'injection (F) est positionné sur le circuit d'alimentation du photobioréacteur et équipé d'un filtre 0,22 µm. Celui-ci permet d'injecter ponctuellement et stérilement à l'aide d'une seringue de la solution d'enrichissement dans la culture lorsque le système fonctionne en mode batch.

-Le photobioréacteur (G) est constitué d'une bouteille de 5 L (Duran) à col large GLS80 fermée par un bouchon équipé d'un joint torique assurant l'étanchéité et disposant de 4 ports GL18 étanches. Le premier port est relié à la réserve et permet l'entrée du milieu de culture par un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 3,2 mm de diamètre. Le second port permet à un deuxième tube PTFE (M), plongeant dans la culture, d'appliquer un bullage d'air constant permettant la mise sous pression du système et le balayage de l'oxygène produit par la culture. Le troisième port est utilisé pour le système de prélèvement décrit ci-après. Enfin, le dernier port permet l'insertion d'un tube inox (K) de 6 mm de diamètre plongeant dans la culture autorisant la récolte et la mise à la masse électrique du photobioréacteur. Le photobioréacteur dispose d'un port pH étanche latéral réalisé sur mesure. L'électrode pH (J) stérilisable (Mettler-Toledo, Inpro 3100/225) est reliée à un système de contrôle qui commande l'injection de CO<sub>2</sub> par le biais d'une électrovanne, dès lors que le pH est supérieur à la consigne. L'homogénéisation de la culture est assurée par un système d'agitation magnétique par l'intermédiaire d'un aimant (H) en PTFE à ailettes. Le photobioréacteur est placé devant une rangée de 6 tubes fluorescents (Osram, 54W965) relié à un potentiomètre permettant le réglage de l'éclairage de la culture.

-La récolte de la culture repose ici sur le principe de mise en surpression du photobioréacteur. En effet, celui-ci est totalement hermétique à l'exception du tube inox relié au système de récolte constitué d'une deuxième bouteille de 5 L (O), elle-même disposant d'une sortie d'air filtrée. L'air bullé dans le réacteur ne peut être évacué que par cette voie. Sous l'effet du débit d'entrée, le volume du réacteur augmente obstruant l'unique orifice de sortie d'air placé sur le tube inox. A ce moment, la surpression du réacteur impose une purge d'une partie du volume de culture récupérée dans le système de récolte. Celui-ci est pesé quotidiennement de manière à contrôler le débit appliqué au système. Un robinet (P) permet ensuite d'évacuer la récolte.

-Le système de prélèvement (Q) est constitué d'une bouteille (Duran) de 250 mL équipée d'un bouchon à 2 ports. Le premier permet la connexion au photobioréacteur à l'aide deux raccords « luer-lock » tandis que le second est relié à un filtre 0,22 µm permettant l'insertion d'une seringue. Lors du prélèvement, la pince fermant le port de prélèvement est retirée et la seringue est actionnée : la bouteille se remplit du prélèvement jusqu'au volume souhaité. La pince est repositionnée pour fermer le port de prélèvement. Une nouvelle bouteille préalablement lavée à l'acide chlorhydrique pendant une nuit (HCl, 10 % v:v), rincée et stérilisée (120 °C, 20 min), remplace la bouteille contenant le prélèvement. Cette opération s'effectue à la flamme et après désinfection des supports à l'éthanol 70°. De cette façon, la culture et le prélèvement sont tous deux protégés des contaminations. Le système de culture est placé en

chambre thermostatée afin de disposer d'une température déterminée et stable dans le temps. L'ensemble du dispositif est conçu pour être déplacé en un seul tenant afin d'intervenir sous hotte à flux laminaire si nécessaire. Le remplacement de la réserve est réalisé de cette façon. Quatre dispositifs expérimentaux similaires ont été utilisés pour cette étude, afin de permettre la comparaison de deux conditions en réplique.

○ **Modèles biologiques et préparations des inocula**

La souche de *Dunaliella sp.* axénique et la culture mixte *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY007 sont transférées (Figure 28), 10 jours avant l'expérience, dans un volume de 1 L d'ASW filtrée sur 0,22 µm et enrichi par le milieu de Walne modifié : sans ajout de vitamines et dont l'apport d'azote (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) final représente 1,17 mM (N :P = 7 :1). Les deux inocula ainsi constitués sont placés à 20 °C, sous éclairage continu de 150 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> pendant 10 jours.

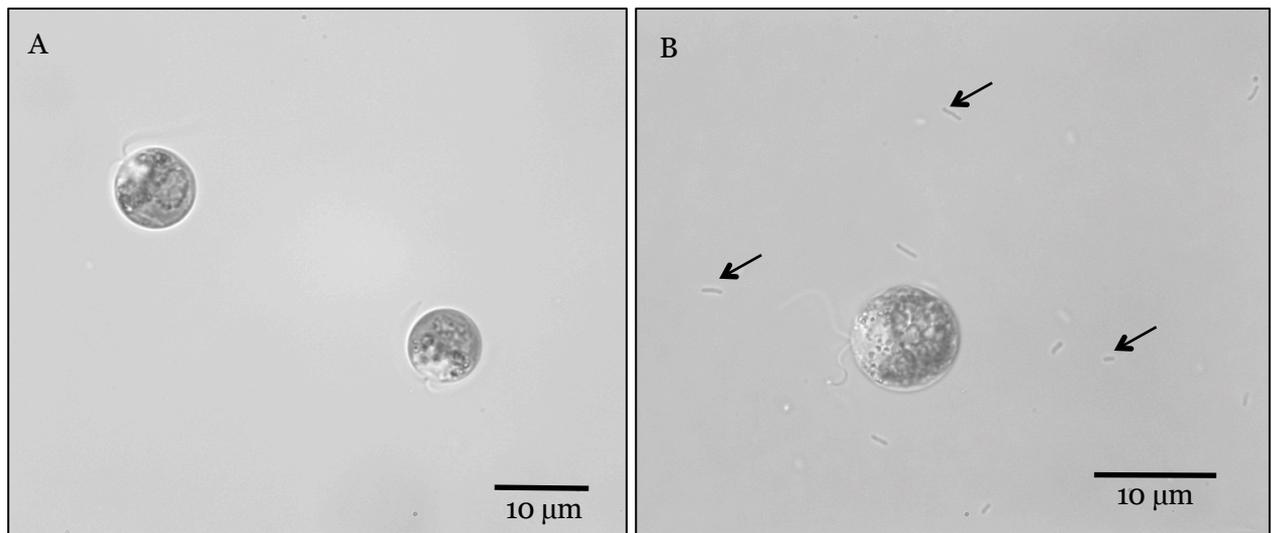


Figure 28 : Photographie au microscope photonique (objectif x100) des cultures utilisées pour l'expérience : A, la culture de *Dunaliella sp.* axénique ; B, la culture mixte *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* SY007 (flèche). Les observations microscopiques des cellules bactériennes montrent des bacilles de taille importante et variée situés autour de 1 à 2 µm et allant jusqu'à 4 µm pour les plus grandes.

○ **Conditions de culture**

Chacun des 2 inocula permet d'ensemencer 2 photobioréacteurs de 5 L avec une concentration initiale souhaitée de 0,15.10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> de *Dunaliella sp.*. L'inoculum axénique est transféré dans les photobioréacteurs R1 et R2 et la culture mixte *Dunaliella sp.*-*Alteromonas sp.* SY007 dans les photobioréacteurs R3 et R4.

Pour chaque photobioréacteur, 5 L d'ASW sont ajoutés après filtration préalable à 0,22 µm et un enrichissement par le milieu de Walne modifié : sans ajout de vitamines et dont l'apport d'azote (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) final représente 166 µM (N :P = 1 :1) afin de garantir une limitation azotée des cultures, quelque soit le taux de dilution appliqué. Les réserves des photobioréacteurs sont remplies à 20 L à l'aide de la même préparation avant d'être connectées au système de culture.

Les cultures sont placées à une température moyenne de 23 °C, sous éclairage continu de 250 µmol de photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et régulée au pH de consigne 7,7.

Deux conditions de culture continue sont appliquées séquentiellement aux 4 photobioréacteurs : le taux de dilution est tout d'abord fixé à 0,05 j<sup>-1</sup> pendant 35 jours puis à 0,3 j<sup>-1</sup> pendant 40 jours. Ensuite, une phase de culture en batch est réalisée pendant 7 jours. Au cours de cette phase, les pompes péristaltiques sont désactivées et une injection de milieu de Walne est effectuée, par le port d'injection (F), correspondant à un apport d'azote de 415 µmoles pour 5 litres soit une concentration de 83 µM.

#### ○ **Suivi des populations**

Les croissances algales et bactériennes sont suivies quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience (82 jours) excepté au début de la période de culture en batch pour laquelle 2 prélèvements sont réalisés pendant 3 jours. Le suivi de population microalgale est effectué par dénombrement cellulaire au compteur de particules (HIAC, Hach Ultra) après dilution de l'échantillon. Cette dilution permet de disposer d'échantillons d'une concentration cellulaire cible de 5000 cellules.mL<sup>-1</sup> pour un dénombrement optimal par le compteur de particules. Les classes de tailles de 4 à 12 µm sont ensuite considérées pour évaluer la concentration cellulaire algale totale de l'échantillon. Le dénombrement bactérien est réalisé par cytométrie en flux (ACCURI, Becton Dickinson) sur échantillon brût après dilution, ajout de formaldéhyde à 2%, marquage de l'ADN au SYBRgreen® 1 (Lonza, USA, concentration finale 1x) et 10 min à l'obscurité.

#### ○ **Contrôle des contaminations bactériennes (isolements et RAPD)**

Pour les 4 photobioréacteurs, des isolements bactériens sur Marine Agar sont réalisés une fois par semaine et placés à 20 °C, à l'obscurité pendant 10 jours avant observation des colonies bactériennes formées.

Les colonies bactériennes obtenues à partir des prélèvements sur les cultures mixtes (R3 et R4) en fin d'expérience sont conservées pour analyse ultérieure en RAPD (random amplified polymorphic DNA ou amplification aléatoire d'ADN polymorphe), afin de contrôler l'absence de contaminations bactériennes exogènes. Les colonies sont transférées sur milieu liquide (Marine Broth) et mises en culture pendant 1 à 3 jours selon la croissance bactérienne et à 25 °C. Une extraction d'ADN est ensuite réalisée selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989). La première étape consiste à lyser les cellules bactériennes. Celles-ci sont récupérées par centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C) de la culture et transférées dans 500 µL de

tampon Tris-EDTA. Ensuite, 25 µL de lysosyme à 20 mg.mL<sup>-1</sup> sont ajoutés avant incubation à 37 °C pendant 45 min. Une seconde incubation est nécessaire à 55 °C pendant 1 heure après l'ajout de 60 µL de SDS à 10 % (p/v) et 6 µL de protéinase k à 10mg.mL<sup>-1</sup>. L'échantillon subit ensuite une étape de purification qui débute par l'ajout de 100 µL de chlorure de sodium 5 M et 700 µL de phénolchloroforme isoamylé (25 /24 /1, v/v/v). Après émulsion et centrifugation (10 000g, 10 min, 4 °C) la phase aqueuse est récupérée et subit un deuxième lavage avec 700 µL de chloroforme. La phase aqueuse est à nouveau récupérée après émulsion et centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C). Enfin, La troisième étape consiste à précipiter l'ADN avec 700 µL d'isopropanol à -20 °C pendant minimum 10 min. L'ADN est ensuite récupéré après centrifugation de la culture (10 000 g, 10 min, 4 °C) et élimination du surnageant. Le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol à 70 % avant de subir une dernière centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C). Après élimination du surnageant, l'ADN est séché à température ambiante pendant 1 heure et ensuite repris dans 30 µL de tampon Tris-EDTA dans lequel il est conservé à 4 °C, jusqu'à la PCR. Les brins d'ADN extraits subissent ensuite deux amplifications parallèles par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les deux amorces (Amersham), RAPD1 (5'-AAGAGCCCGT-3') et RAPD4 (5'-GGTGCGGGAA-3') choisies s'hybrident selon la présence du motif correspondant sur la séquence d'ADN et permettent ainsi l'amplification de séquences de différentes longueurs. Le mélange pour PCR (25 µL) ajouté à l'échantillon contenant environ 15 ng d'ADN est constitué de : 0,6 µM d'amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 dose 1x de tampon Go taq (Go taq kit, Promega) et 0,75 unité d'enzyme taq polymérase (Go taq kit, Promega). L'amplification (MyCycler, BIO-RAD) se déroule ensuite selon la procédure suivante : 5 min à 95 °C, puis 45 cycles de 1 min à 95 °C, 1 min à 36 °C et 2 min à 72 °C, et enfin 5 min à 72 °C. Enfin, une migration des 15 µL de produits de PCR est effectuée sur gel d'agarose à 1,5 %, contenant du bromure d'éthidium (BET) à 30 ‰. Un profil de bandes est observé après révélation du BET aux rayonnements ultra violets.

○ **Dosage du carbone (COP) et de l'azote particulaire (NOP) par analyseur élémentaire (CHN)**

Une fois par jour, 2 échantillons de chaque culture correspondant à 3.10<sup>6</sup> de cellules microalgales sont filtrés indépendamment sur filtres en fibre de verre GF/D (2,7 µm, Whatman) et GF/F (0,7 µm, Whatman) préalablement brûlés à 450°C pendant 4 heures (Figure 29). Le filtre à 2,7 µm retenant les cellules de *Dunaliella sp.* permet d'estimer le carbone et l'azote particulaire contenu dans les cellules microalgales. Le filtre à 0,7 µm retient les cellules de *Dunaliella sp.* et les bactéries *Alteromonas sp.* SY007. La différence de matière entre les deux filtres représente donc le carbone et l'azote des particules d'une taille de 0,7 à 2,7 µm correspondant notamment à celle des cellules d'*Alteromonas sp.* SY007 et à d'éventuels débris cellulaire de *Dunaliella sp.*

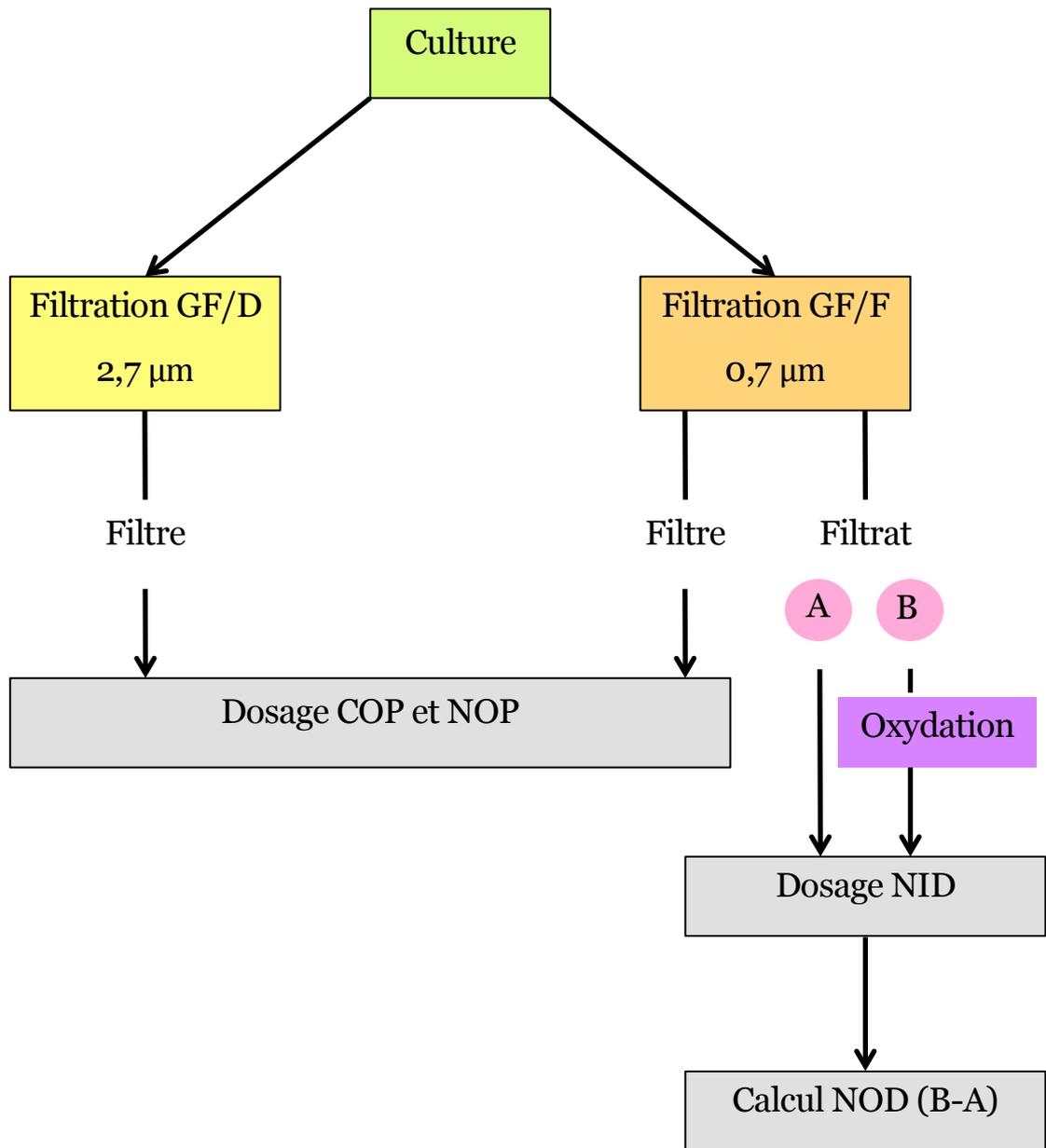


Figure 29 : Représentation schématique des analyses réalisées pour chaque culture et pour chaque prélèvement : le dosage du carbone organique particulaire (COP), de l'azote organique particulaire (NOP) avec deux seuils de filtrations différents (0,7 et 2,7 µm) et le dosage de l'azote inorganique dissous (NID) avant et après oxydation chimique permettant d'accéder par différence à la quantité d'azote organique dissous (NOD).

Les échantillons filtrés sont ensuite déshydratés à 70 °C pendant 24 heures avant analyse du carbone (COP) et de l'azote (NOP) organique particulaire retenu sur le filtre par analyseur élémentaire CHN (Thermoscientific, Flash 2000).

○ **Dosage de l'azote organique (NOD) et inorganique (NID) dissous**

Chaque jour, un échantillon de chaque photobioréacteur est filtré sur filtre GF/F (0,7 µm, Whatman). Le filtrat est ensuite partagé en deux sous échantillons (A et B) qui permettent de déterminer la concentration d'azote organique et inorganique dissous (Figure 29). Le sous-échantillon B sert à déterminer l'azote total présent dans le filtrat (organique et minéral) alors que seul l'azote minéral est dosé dans le sous-échantillon A. La différence entre les deux (B-A) permet de déterminer la quantité d'azote organique dissous dans la culture.

Après filtration, le premier sous-échantillon (A) est conservé à -20 °C jusqu'au dosage de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et des nitrates-nitrites (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Le deuxième sous-échantillon (B) subit une oxydation humide selon la méthode dite de « wet-oxydation » mise au point par Pujo-Pay et Raimbault (Pujo-Pay & Raimbault 1994). Pour la totalité de ces analyses, l'ensemble des flacons en plastique et en PTFE, la verrerie et le dispositif filtrant en verre sont préalablement baignés dans l'acide chlorhydrique (HCl) 10% (v:v) et rincés abondamment avec de l'eau ultra pure (18,2 Ω) immédiatement avant leur utilisation. La wet-oxydation permet d'oxyder l'azote organique et minéral sous forme de nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Le réactif est préparé de la manière suivante : pour 100 mL de réactif, 6 g de peroxodisulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) sont dissous à 45°C dans 28 mL d'une solution de soude à 1,5 M (NaOH). 3 g d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) sont ensuite dissous dans la solution ainsi préparée. Celle-ci est complétée à 100 mL avec de l'eau ultra pure (18,2 Ω). Dans un flacon en PTFE, 5 mL de réactif sont ajoutés à un volume de filtrat de culture (correspondant à environ 20 µM d'azote). Le volume est ensuite complété avec de l'eau ultra pure jusqu'à 45 mL. L'opération est réalisée en triplicat pour chaque échantillon et 3 blancs de mesure sont également réalisés en omettant l'étape de filtration de culture. L'ensemble des flacons est ensuite placé dans une enceinte d'autoclavage pendant 30 min à 120 °C et 1 bar. Chaque échantillon est ensuite transféré dans un tube de 50 mL et conservé à -20 °C avant dosage.

Le dosage des nitrates et nitrites présents dans les 2 sous-échantillons A et B est réalisé sur auto-analyseur (Autoanalyzer II, Seal Analytical) par dosage colorimétrique selon Bendschneider et Robinson (Bendschneider & Robinson 1952). Celui-ci est basé sur la réduction des nitrates en nitrites par passage sur une colonne cadmium-cuivre, qui sont ensuite diazotés par le para-aminobenzènesulfamide. Les composés diazoïques ainsi formés réagissent avec le chlorhydrate de N-naphtyl éthylènediamine donnant un colorant azoïque. La mesure de l'absorption s'effectue ensuite à 540 nm.

Le dosage de l'ammonium, réalisé sur les sous-échantillons A, est basé sur la méthode de Koroleff (1983) et Solorzano (1969) réalisé sur auto-analyseur (Autoanalyzer II, Seal Analytical). L'ammonium présent réagit avec l'hypochlorite pour former une monochloramine qui en présence de phénol et d'un

catalyseur, l'ion nitroprussiate, forme un bleu d'indophenol. La mesure de l'absorption s'effectue ensuite à 630 nm.

○ **Calculs et statistiques**

Les calculs réalisés sur la phase de culture continue à  $D=0,05 \text{ j}^{-1}$  concernent la période du 27 au 34<sup>ème</sup> jour inclus alors qu'à  $D=0,3 \text{ j}^{-1}$  la période considérée s'étale du 50 au 59<sup>ème</sup> jour inclus. Ces deux périodes peuvent être assimilées à des phases d'équilibre des cultures.

Les quotas cellulaires en carbone ( $Q_C$ ) et en azote ( $Q_N$ ) des microalgues, représentent la quantité totale de l'élément considéré sous toutes ses formes et par cellule.  $Q_C$  et  $Q_N$  sont calculés en divisant le COP (>2,7  $\mu\text{m}$ ) et le NOP (>2,7  $\mu\text{m}$ ) respectivement, par la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* déterminée à partir du compteur de particules HIAC. Le ratio C :N représente le rapport entre le nombre de mole de carbone sur le nombre de mole d'azote contenus dans la biomasse algale. Le ratio N :C correspond au rapport inverse entre ces deux valeurs.

Le rendement de l'azote ( $R_N$ ), exprimé en pourcentage, correspond à la part de l'azote retrouvée dans la biomasse algale (NOP >2,7  $\mu\text{m}$ ) à l'équilibre par rapport à l'apport d'azote dans le système.

Les taux de croissance maximaux ( $\mu_{max}$ ) de *Dunaliella sp.* et d'*Alteromonas sp.*, pendant la culture en batch, sont calculés grâce à l'équation suivante :

$$\mu_{max} = \frac{\Delta \ln X}{\Delta t} \quad \text{Équation 9}$$

Avec :

$X$ , la concentration en carbone particulaire COP (>2,7  $\mu\text{m}$ ) (*Dunaliella sp.*) ou la concentration cellulaire bactérienne (*Alteromonas sp.*)

$t$ , le temps en jour

Le gain en biomasse algale ( $\Delta X_{max}$ ) est calculé au moment de la phase stationnaire à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta X_{max} = X_f - X_i \quad \text{Équation 10}$$

Avec :

$X_i$ , la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* ( $10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ ) au début de la période de culture en batch (jour 75)

$X_f$  la concentration cellulaire moyenne de *Dunaliella sp.* ( $10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ ) au moment de la phase stationnaire (moyenne de 6 valeurs obtenues sur la période du 77,8 au 82<sup>ème</sup> jour).

Les résultats sont présentés sous la forme des valeurs médianes associées à la valeur de l'écart interquartile (IQR) correspondante présentée dans le texte entre parenthèse. Ces valeurs ainsi que les tests statistiques non paramétriques de Kruskal Wallis ( $\alpha=5\%$ ) sont calculés et réalisés à l'aide du logiciel R (GNU project).

### 3. Résultats

#### A. Mise au point des méthodes

##### ○ Réention cellulaire différentielle sur filtre pour analyse élémentaire C et N

L'étude des flux de carbone et d'azote entre les organismes *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp. SY007* en culture demande un effort de compartimentation des analyses réalisées sur filtre pour doser d'une part le C et N algal et d'autre part le C et N bactérien. Le pourcentage de cellules retenues sur les 2 filtres testés est estimé par soustraction des cellules recueillies dans le filtrat aux cellules présentes dans la culture témoin. Les 2 filtres testés retiennent la totalité des cellules de *Dunaliella sp.* puisque aucune cellule algale n'est détectée dans chaque filtrat. Les filtres GF/F ( $0,7\ \mu\text{m}$ ) retiennent la quasi totalité des bactéries présentes dans la culture filtrée : 99 (0) % (Figure 30). Les filtres GF/F peuvent être choisis pour doser les cellules algales et bactériennes. En revanche, les filtres GF/D ( $2,7\ \mu\text{m}$ ) ne retiennent pas uniquement les algues puisque 29 (3) % des cellules bactériennes restent piégées sur ces filtres. Des filtres en fibres de verre de maillage supérieur n'étant pas disponibles sur le marché à notre connaissance, une compartimentation approximative est possible en réalisant une série de deux filtrations parallèles à l'aide des filtres GF/F et GF/D. La première filtration sur filtres GF/F permet de récupérer l'ensemble des cellules algales et bactériennes tandis qu'une deuxième filtration sur GF/D permet de récupérer les cellules algales et une part minoritaire des cellules bactériennes. La différence donne une valeur de carbone et d'azote correspondant à 71 % des cellules bactériennes.

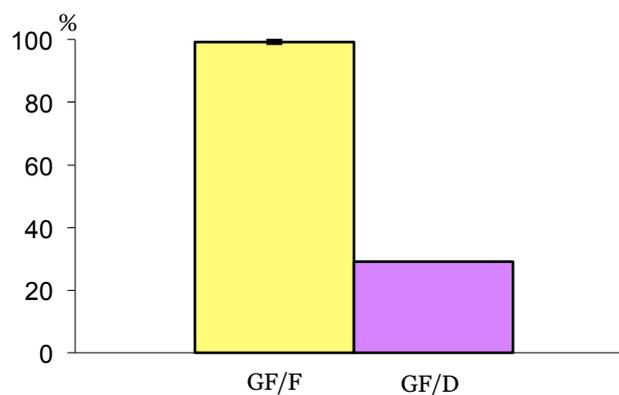


Figure 30 : Pourcentage de bactéries *Alteromonas sp. SY007* retenues sur les filtres GF/F ( $0,7\ \mu\text{m}$ ) et GF/D ( $2,7\ \mu\text{m}$ ). Chaque valeur représente la médiane ( $n = 3$ ) et la barre d'erreur l'IQR.

## B. Culture continue du modèle bispécifique *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.*

### ○ Contrôle des contaminations bactériennes

L'étude fine de l'effet de la bactérie SY007 sélectionnée sur la croissance de *Dunaliella sp.* nécessite son maintien en culture pendant l'expérience et l'absence d'autres souches bactériennes. De même, aucune cellule bactérienne ne doit être observée au sein des cultures de *Dunaliella sp.* axéniques. Un contrôle des souches bactériennes présentes au sein des cultures représente une étape nécessaire au bon déroulement de l'étude. Tout d'abord, les isollements bactériens sur Marine Agar ne montrent aucune colonie bactérienne à partir des échantillons des photobioréacteurs 1 et 2 correspondant aux cultures axéniques et cela pour la totalité de l'expérience. Ces résultats sont confirmés par les analyses en cytométrie en flux (Figure 33) pour lesquelles aucune population bactérienne n'est observée. Les deux cultures R1 et R2 conservent donc leur caractère axénique pendant les 82 jours d'expérience.

Pour les échantillons de cultures mixtes correspondant aux photobioréacteurs R3 et R4, des colonies bactériennes sont systématiquement observées sur Marine Agar. Un seul morphotype, comparable à celui de la souche mère d'*Alteromonas sp.* SY007 conservée à -80 °C, est constaté. L'analyse RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe) réalisé avec deux amorces différentes (RAPD1 et RAPD4) et à partir de 2 colonies prélevées au hasard, nous permet d'obtenir, après migration des produits de PCR, des profils de bandes caractéristiques d'une seule espèce bactérienne (Figure 31).

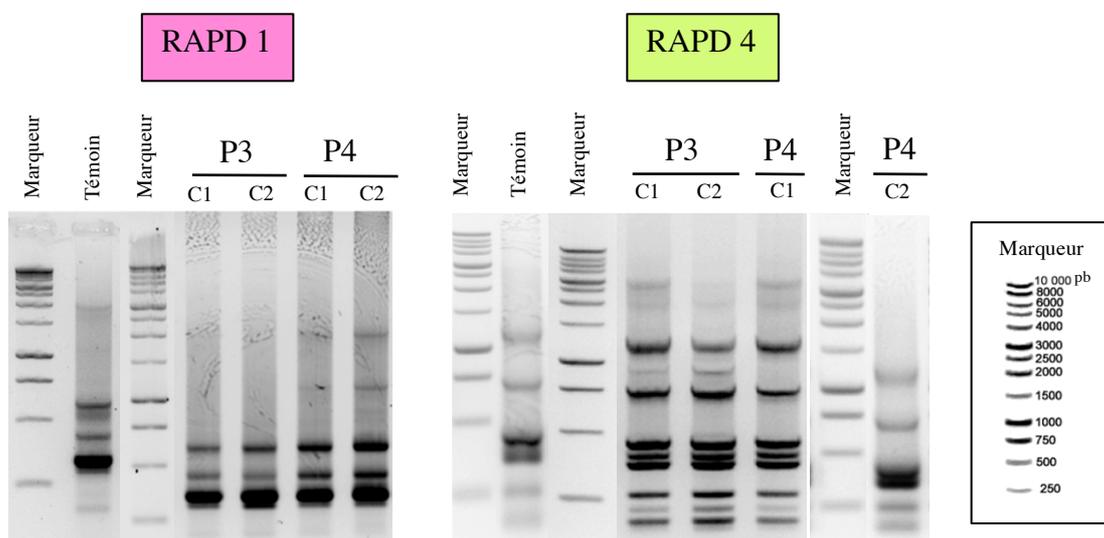


Figure 31 : Profils d'électrophorèse des analyses RAPD 1 et 4 (random amplified polymorphic DNA) réalisés sur 2 clones (C1 et C2) par échantillon correspondant aux cultures mixtes des photobioréacteurs 3 (P3) et 4 (P4). Un marqueur (Marqueur) correspondant à un mélange de séquences de tailles connues sert de référence de taille. Les profils obtenus sont comparés au profil de la souche mère d'*Alteromonas sp.* SY007 (Témoin).

Pour les deux types d'amorces utilisées, les profils obtenus pour les bactéries isolées des photobioréacteurs R3 et R4 sont comparables à ceux obtenus avec la souche mère d'*Alteromonas sp.* SY007. Les résultats de ces différentes analyses complémentaires confirment donc d'une part, l'absence de contamination dans l'ensemble des 4 photobioréacteurs et d'autre part, la présence de la bactérie *Alteromonas sp.* SY007 dans les cultures mixtes des photobioréacteurs R3 et R4.

#### ○ États d'équilibres et taux de dilution

Après 35 jours d'expérience au taux de dilution de  $0,05 \text{ j}^{-1}$ , le système atteint un état proche de l'état d'équilibre, comme le montrent les courbes des différents paramètres mesurés (Figure 32, Figure 33, Figure 34, Figure 35). L'azote total dans le système n'est en effet pas stabilisé à 35 jours mais tend vers un état proche de l'équilibre. Ceci peut s'expliquer par l'apport d'azote par les *inocula* au lancement de l'expérience et par le faible taux de dilution appliqué au système. En effet, préalablement à l'expérience proprement dite, les *inocula* ont été cultivés sur un milieu d'enrichissement 7 fois plus riche en azote pour produire suffisamment de biomasse ce qui a pour conséquence un apport d'azote important dans le système par l'inoculum. Cet apport est visible à 4 jours d'expérience puisque la concentration cellulaire atteint une valeur supérieure à celle de l'équilibre grâce à la mobilisation des quotas d'azote cellulaires pour la croissance. Le faible taux de dilution implique un temps de séjour long dans le photobioréacteur expliquant la lenteur du système à lessiver l'apport azoté initial avant d'atteindre l'état d'équilibre. Au terme de 27 jours de culture, l'ensemble des analyses effectuées montre une stabilité dans le temps nous permettant d'analyser cette phase de l'expérience en considérant un pseudo état d'équilibre. Les calculs réalisés sur cette phase de culture continue concernent la période du 27 au 34<sup>ème</sup> jour inclus.

D'autre part, pour le deuxième taux de dilution choisi à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ , à partir du 65<sup>ème</sup> jour, nous pouvons constater que le taux de dilution augmente pour les 4 photobioréacteurs mais particulièrement pour les R3 et R4 (Figure 32). Ce phénomène s'explique par la dérive des pompes péristaltiques dans le temps et par l'usure des tubes péristaltiques fortement mobilisés au cours d'une telle expérience. Une baisse anormale des valeurs de nombreuses analyses est justement observée à cette période. Par conséquent, cette période du 65<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> jour ne sera pas considérée dans l'analyse des résultats. Les calculs réalisés sur cette phase de culture continue concernent la période du 50 au 59<sup>ème</sup> jour inclus.

#### ○ Dynamiques de populations microalgales et bactériennes

L'augmentation du taux de dilution de  $0,05$  à  $0,3 \text{ j}^{-1}$  n'a pas affecté significativement la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* au sein des photobioréacteurs (Figure 32, Tableau 10). En revanche, la concentration cellulaire microalgale est significativement inférieure de 27 et 22 % en présence de la bactérie SY007 et pour les deux taux de dilution appliqués respectivement (Tableau 10).

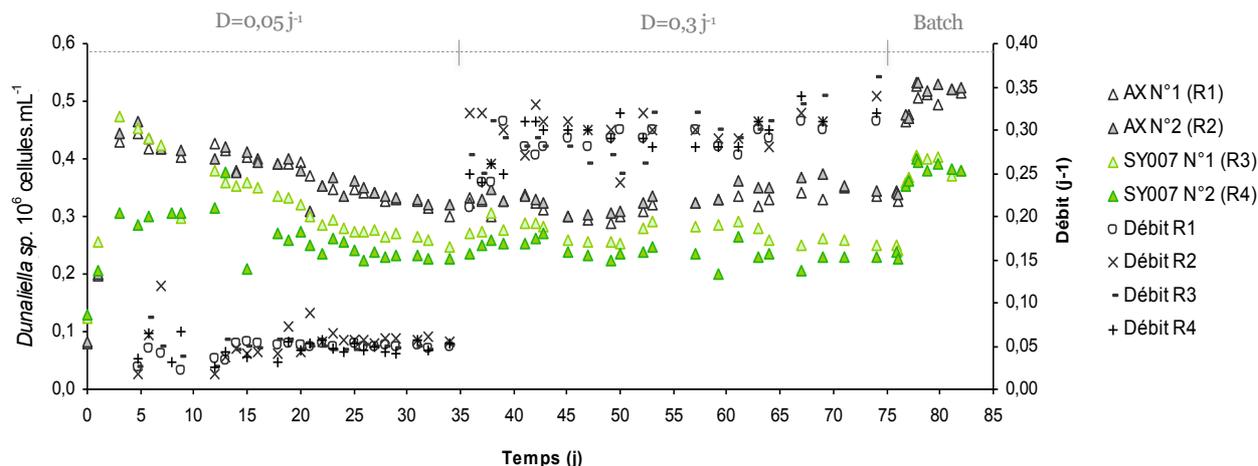


Figure 32 : Évolution de la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* et du débit des cultures continues en fonction du temps.

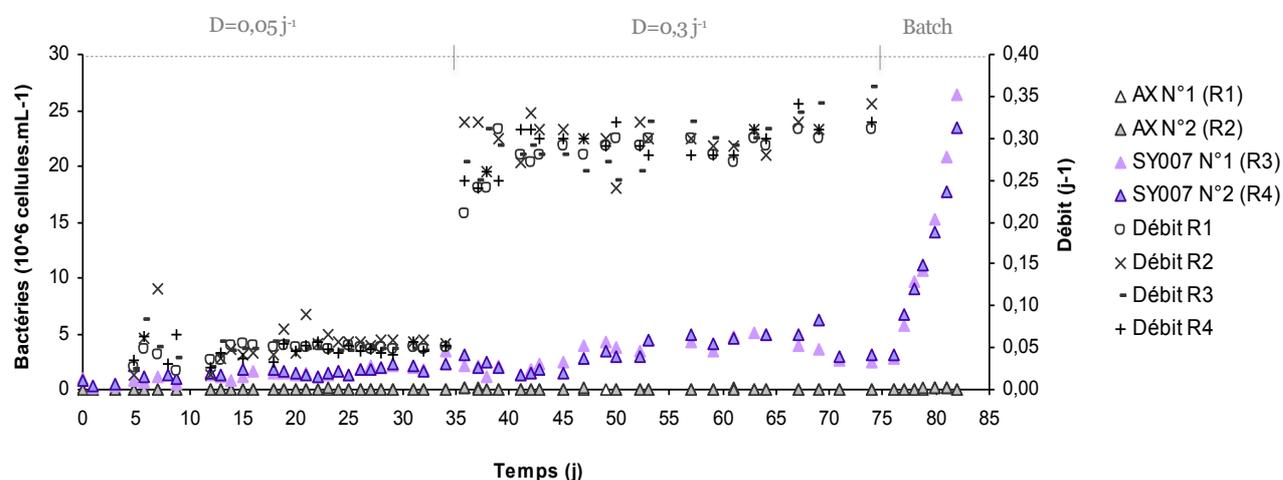


Figure 33 : Évolution de la concentration cellulaire d'*Alteromonas sp.* et du débit des cultures continues en fonction du temps.

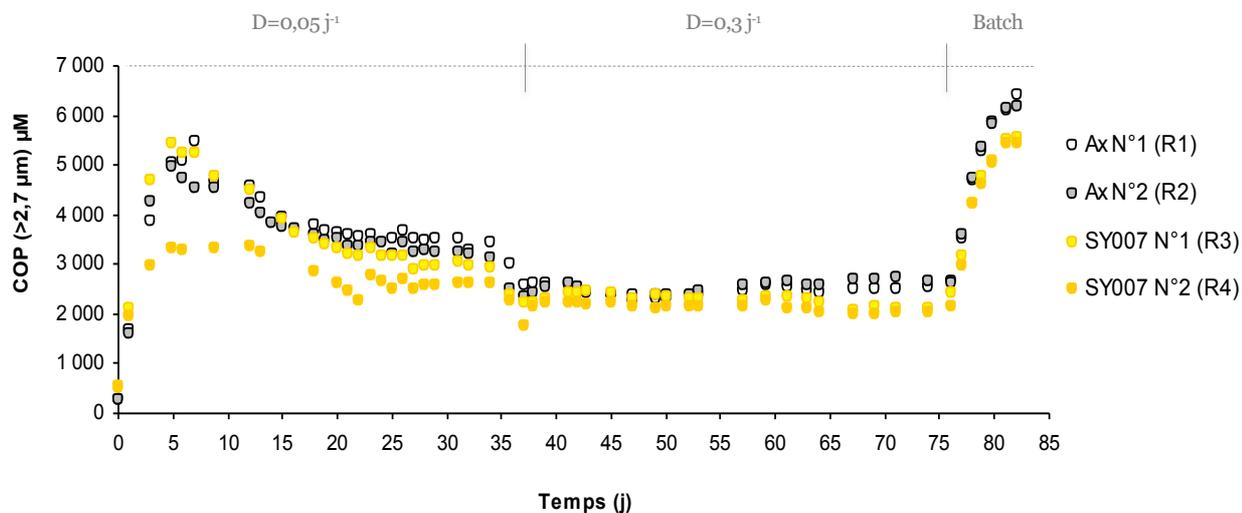


Figure 34 : Évolution du carbone organique particulaire (COP > 2,7  $\mu$ m) en fonction du temps.

La concentration bactérienne, quant à elle, augmente significativement de 80 % avec le taux de dilution et passe de  $2,1 \cdot 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$  à  $3,9 \cdot 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$  (Figure 33). Nous avons précédemment constaté qu'il n'y avait pas d'effet du changement de débit de  $0,05$  à  $0,3 \text{ j}^{-1}$  sur la concentration cellulaire de *Dunaliella sp.* De ce fait, le nombre de cellules bactériennes par cellule de *Dunaliella sp.*, appelé le ratio bactéries : algues est affecté par le changement de taux de dilution. En effet, ce ratio évolue de 8 (2) bactéries par algue à 15 (5) (Tableau 10).

- **Évolution du carbone organique particulaire (COP) et du quota cellulaire de carbone ( $Q_C$ )**

Compte tenu du taux de rétention de 29 % des bactéries sur les filtres GF/D ( $2,7 \mu\text{m}$ ) utilisés pour estimer le carbone algal, une estimation de la contribution du carbone bactérien au COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) est indispensable. Pour ce faire, les données de concentration cellulaire bactérienne aux deux états d'équilibre et la valeur du quota cellulaire de carbone de la souche SY007 estimée lors de l'expérience 2 sont utilisées. Comme il a pu être observé au cours de l'expérience 2, la contribution du carbone bactérien au COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) est négligeable puisqu'elle représente 0,6 % à  $0,05 \text{ j}^{-1}$  et 1,3 % à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ . Ce résultat suggère donc que le COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) est un bon estimateur du carbone algal au cours de cette étude malgré la séparation imparfaite des microalgues et des cellules bactériennes à ce seuil de filtration.

Dans les cultures mixtes, la présence des bactéries affecte significativement la quantité de COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) et donc le carbone contenu dans la population de *Dunaliella sp.* (Figure 34, Tableau 10). Une diminution de 15 % du COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) est en effet notée à  $0,05 \text{ j}^{-1}$  tandis qu'une diminution moindre de 4 % est constatée pour le taux de dilution de  $0,3 \text{ j}^{-1}$ , par rapport aux cultures axéniques. Au contraire de ce qui a été enregistré pour les populations cellulaires de microalgues, l'écart de COP entre les cultures mixtes et les cultures axéniques n'est pas équivalent pour les deux taux de dilution. Pour les deux types de cultures, l'augmentation du taux de dilution de  $0,05 \text{ j}^{-1}$  à  $0,3 \text{ j}^{-1}$  n'a pas d'effet sur les concentrations cellulaires algales alors que les biomasses algales carbonées sont inférieures. Ces résultats suggèrent des différences de quotas en carbone ( $Q_C$ ) des cellules algales, représentant le carbone sous toutes ses formes contenu au sein d'une cellule algale. Celui-ci est justement affecté significativement par la présence de la bactérie SY007 (Tableau 10). En culture mixte, le  $Q_C$  est significativement augmenté par rapport au témoin axénique et cette augmentation n'est pas équivalente aux deux taux de dilution puisqu'elle est de 10 % à  $0,05 \text{ j}^{-1}$  et de 14 % à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ . Ces différences sont à mettre en parallèle des variations de biovolume cellulaire chez *Dunaliella sp.* observées en fonction des conditions expérimentales (Tableau 10). Le biovolume algal est toujours supérieur en présence de la bactérie SY007 : +17 % à  $0,05 \text{ j}^{-1}$  et + 24 % à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ . Ces modifications de biovolume et de  $Q_C$  d'une part, et des variations de population d'autres parts, résultent en un niveau de biomasse carbonée presque identique à  $0,3 \text{ j}^{-1}$  pour les cultures axéniques et les cultures mixtes (Tableau 10).

**Tableau 10 : Concentration cellulaire de *Dunaliella sp.*, carbone organique particulaire (COP), quotas en carbone ( $Q_C$ ) et en azote ( $Q_N$ ) des cellules de *Dunaliella sp.*, ratio carbone :azote (C :N), biovolume des cellules algales, rendement de l'azote ( $R_N$ ), ratio bactérie :algue, azote organique particulaire (NOP), COP et C :N correspondant au compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$ , azote organique dissous (NOD), azote inorganique dissous (NID). Les colonnes témoins représentent les valeurs médianes obtenues pour les deux cultures axéniques et SY007 celles obtenues pour les deux cultures mixtes *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY007. Les valeurs affichées correspondent aux valeurs médianes (n=12 valeurs pour 0,05  $\text{j}^{-1}$  et n=10 valeurs pour 0,3  $\text{j}^{-1}$ ). Les IQR correspondant sont donnés entre parenthèses. Les résultats des tests statistiques ( $\alpha = 5\%$ ) de Kruskal Wallis sont présentés à l'aide des lettres en exposant et les probabilités affichées en dernière colonne. Des lettres différentes impliquent une différence statistiquement significative entre les valeurs.**

	D=0,05 $\text{j}^{-1}$		D=0,3 $\text{j}^{-1}$		Statistiques
	Témoins	SY007	Témoins	SY007	
<i>Dunaliella sp.</i> ( $10^6$ cell.mL $^{-1}$ )	<b>0,33<sup>a</sup> (0,01)</b>	0,24 <sup>b</sup> (0,03)	<b>0,32<sup>a</sup> (0,01)</b>	0,25 <sup>b</sup> (0,05)	P=2,4.10 $^{-7}$
COP [ $>2,7 \mu\text{m}$ ] ( $\cdot 10^3 \mu\text{M}$ )	<b>3,3<sup>a</sup> (0,2)</b>	2,8 <sup>b</sup> (0,4)	<b>2,4<sup>c</sup> (0,2)</b>	2,3 <sup>d</sup> (0,2)	P=2,1.10 $^{-8}$
$Q_C$ [ $>2,7 \mu\text{m}$ ] (pmol.cell $^{-1}$ )	<b>10,2<sup>a</sup> (0,9)</b>	11,2 <sup>b</sup> (0,5)	<b>7,7<sup>c</sup> (0,4)</b>	8,8 <sup>d</sup> (0,9)	P=1,7.10 $^{-7}$
$Q_N$ [ $>2,7 \mu\text{m}$ ] (pmol.cell $^{-1}$ )	<b>0,60<sup>a</sup> (0,02)</b>	0,65 <sup>b</sup> (0,05)	<b>0,60<sup>a</sup> (0,02)</b>	0,65 <sup>b</sup> (0,04)	P=8,6.10 $^{-5}$
C :N [ $>2,7 \mu\text{m}$ ] (mole:mole)	<b>17<sup>a</sup> (1)</b>	17 <sup>a</sup> (1)	<b>13<sup>b</sup> (1)</b>	13 <sup>b</sup> (1)	P=1,9.10 $^{-7}$
Biovolume <i>D. Salina</i> ( $\mu\text{m}^3$ )	<b>221<sup>a</sup> (21)</b>	259 <sup>b</sup> (15)	<b>191<sup>c</sup> (22)</b>	237 <sup>d</sup> (39)	P=5,9.10 $^{-7}$
$R_N$ [ $>2,7 \mu\text{m}$ ] (%)	<b>78<sup>a</sup> (3)</b>	68 <sup>b</sup> (7)	<b>79<sup>a</sup> (2)</b>	72 <sup>b</sup> (5)	P=4,9.10 $^{-4}$
Ratio Bactéries : Algues (cellule : cellule)	<b>0<sup>a</sup> (0)</b>	8 <sup>b</sup> (2)	<b>0<sup>a</sup> (0)</b>	15 <sup>c</sup> (5)	P= 5,6.10 $^{-8}$
COP [0,7-2,7 $\mu\text{m}$ ] ( $\mu\text{M}$ )	<b>113,1<sup>a</sup> (54,2)</b>	174,5 <sup>c</sup> (52,8)	<b>32,4<sup>b</sup> (24,5)</b>	70,8 <sup>ab</sup> (29,8)	P=0,03
NOP [0,7-2,7 $\mu\text{m}$ ] ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,9<sup>a</sup> (7,4)</b>	29,7 <sup>b</sup> (11,1)	<b>-1,2<sup>a</sup> (5,9)</b>	15,0 <sup>c</sup> (4,2)	P=2,1.10 $^{-7}$
C:N [0,7-2,7 $\mu\text{m}$ ] (mole:mole)	-	6 <sup>a</sup> (1)	-	5 <sup>a</sup> (2)	P=0,43
NOD ( $\mu\text{M}$ )	<b>68,3<sup>a</sup> (7,5)</b>	75,9 <sup>b</sup> (3,5)	<b>57,8<sup>c</sup> (7,2)</b>	51,1 <sup>d</sup> (4,1)	P=2,2.10 $^{-4}$
NID ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,1<sup>a</sup> (0,2)</b>	0,8 <sup>a</sup> (2,0)	<b>0,0<sup>a</sup> (0,0)</b>	0,1 <sup>a</sup> (0,1)	P=0,61

Le COP du compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$  qui comprend 71 % de la population bactérienne, représente dans toutes les conditions une quantité très faible de carbone (jusqu'à 6 %) relativement au COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) (Tableau 10). Du fait de ce faible niveau, la variabilité constatée entre les données et selon les conditions est importante, ce qui limite les approches statistiques. Sous les deux taux de dilution 0,05 et 0,3  $\text{j}^{-1}$ , la quantité médiane de carbone organique observée est supérieure de 54 % et de 118 % respectivement dans les cultures mixtes. Malgré la variabilité du jeu de données, il existe un effet significatif des bactéries sur le COP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ) à 0,05  $\text{j}^{-1}$ . A forte dilution, la différence observée n'est pas significative. L'augmentation du taux de dilution a, quant à elle, pour effet de diminuer significativement la quantité de COP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ) dans les 2 types de cultures.

#### o Évolution de l'azote organique particulaire (NOP)

Le compartiment NOP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) est le plus riche en azote représentant 62 à 78 % de l'azote total selon les conditions expérimentales (Figure 35 ; Figure 36). Compte tenu de la rétention de 29 % de la population bactérienne sur les filtres GF/D, la contribution de l'azote bactérien au NOP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) est estimée de la même manière que précédemment pour le COP ( $>2,7 \mu\text{m}$ ). Cette estimation montre que

L'azote bactérien représente approximativement 2 % du NOP à 0,05 j<sup>-1</sup> et 3,4 % à 0,3 j<sup>-1</sup>. Dans le cadre de l'étude des flux d'azote entre les différents compartiments (Figure 36), cette part d'azote bactérien est d'autant plus négligeable qu'elle représente seulement 1,2 % de l'azote total à 0,05 j<sup>-1</sup> et 2,4 % à 0,3 j<sup>-1</sup>. Nous pouvons donc considérer que le compartiment NOP (>2,7 µm) est un bon estimateur de l'azote algal au cours de cette expérience.

La présence de bactéries affecte significativement la quantité d'azote fixée dans la biomasse algale qui baisse de 17 % à 0,05 j<sup>-1</sup> et de 8 % à 0,3 j<sup>-1</sup> relativement aux cultures axéniques. De même que le carbone, le quota d'azote (Q<sub>N</sub>) par cellule algale augmente significativement en présence de la souche SY007 et pour les deux taux de dilution (Tableau 10). Le quota d'azote exprimé relativement au carbone (C :N) est quant à lui identique au témoin axénique ce qui indique que Q<sub>C</sub> et Q<sub>N</sub> augmentent conjointement dans les mêmes proportions en présence de la bactérie (Tableau 10). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les augmentations du biovolume algal, évoquées précédemment. Le ratio C :N est également sensible au taux de dilution et montre une augmentation dans tous les types de cultures, avec le taux de dilution (Tableau 10). Le rendement de l'azote (R<sub>N</sub>), correspondant à la quantité d'azote fixée par la biomasse algale par rapport à l'azote disponible dans le système, est légèrement supérieur dans les cultures axéniques (78 et 79 % contre 68 et 72 % pour les cultures mixtes à 0,05 j<sup>-1</sup> et 0,3 j<sup>-1</sup> respectivement) aux deux taux de dilution (Tableau 10).

L'azote fixé par les particules d'une taille de 0,7 à 2,7 µm représente une quantité non négligeable de l'azote total dans les cultures mixtes (Figure 35 ; Figure 36) : 10 % de l'azote total à 0,05 j<sup>-1</sup> et diminue ensuite à 7 % avec l'augmentation du taux de dilution à 0,3 j<sup>-1</sup>. Cette quantité d'azote est matérialisée sur les graphiques correspondant à l'évolution de l'azote au sein des cultures mixtes en fonction du temps (Figure 35). La courbe du NOP > à 0,7 µm est située en dessus de celle du NOP > à 2,7 µm. Cette différence est d'autant plus visible pour le taux de dilution de 0,05 j<sup>-1</sup>. Le ratio C :N de ces particules est supérieur au sein des cultures mixtes mais cette différence n'est pas significative compte tenu de la variabilité observée (Tableau 10). En revanche, contrairement au cas du carbone, ce compartiment azoté (0,7 -2,7 µm) est très faible chez les témoins axéniques.

#### ○ Évolution de l'azote organique et inorganique dissous (NOD et NID)

L'azote inorganique dissous (NID), représentant l'azote présent dans les cultures sous forme d'ammonium, nitrate et nitrite, n'est pas présent au sein des différentes cultures (Tableau 10). Après 48 heures de culture, l'azote sous forme d'ammonium n'est plus observé dans les cultures, quels que soient les cultures et les taux de dilution appliqués (Figure 35). L'ammonium apporté est donc rapidement mobilisé vers les autres compartiments azotés organiques. Pour la totalité de l'expérience, le dosage de l'azote sous forme de nitrate et nitrite montre que ces formes azotées ne sont pas présentes dans les différentes cultures.

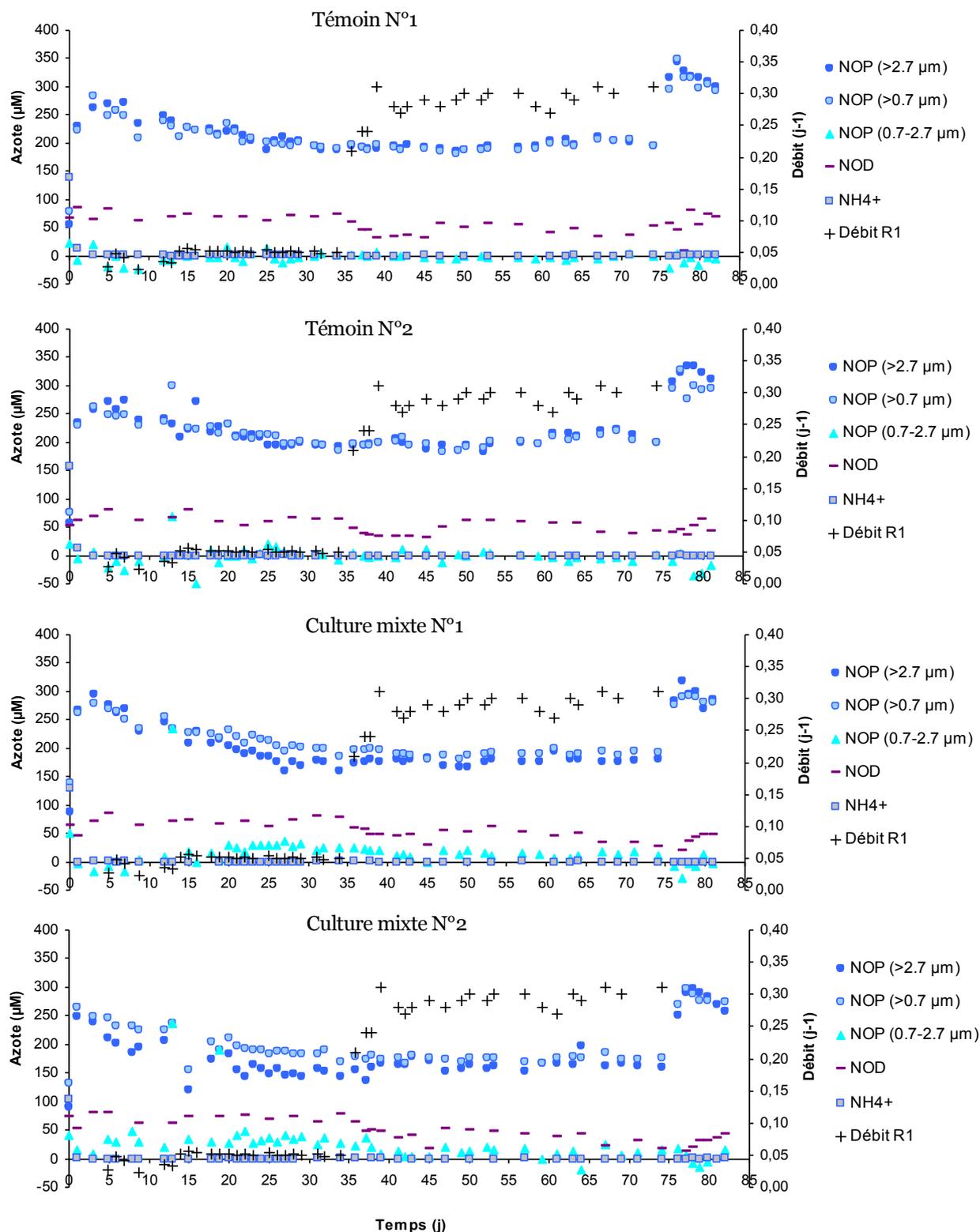
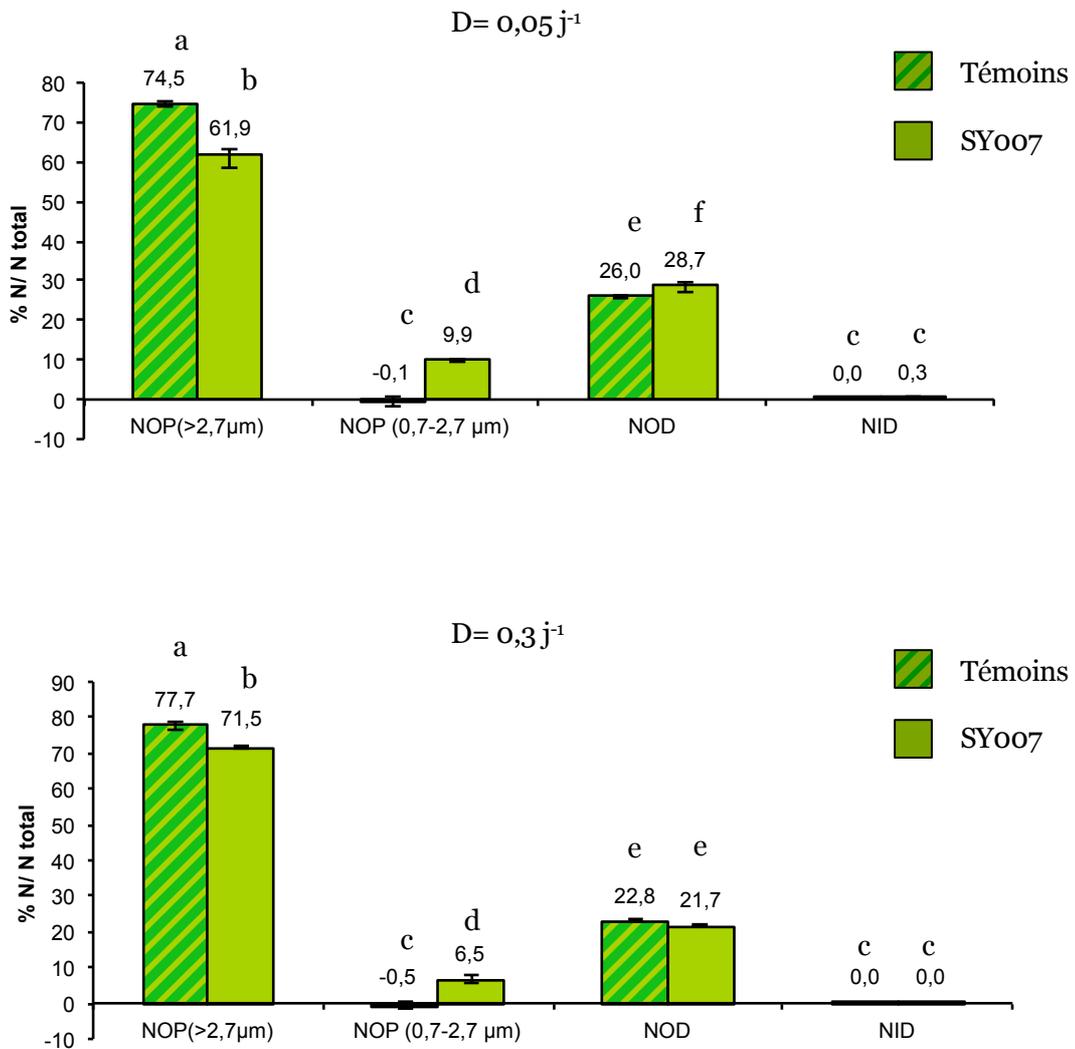


Figure 35 : Évolution des différents compartiments azotés et du taux de dilution appliqué au sein de chaque culture en fonction du temps.

L'azote organique dissous (NOD), défini comme l'azote organique récupéré dans le compartiment  $<0,7 \mu\text{m}$ , est la deuxième fraction de l'azote total la plus importante dans chaque culture puisqu'elle représente de 23 à 29 % de l'azote total selon les conditions (Figure 36). L'augmentation du taux de

dilution a pour effet de légèrement diminuer le NOD (Figure 35 ; Tableau 10). En revanche, la présence de bactéries ne semble pas affecter ce compartiment aux deux taux de dilution même si une différence significative de + 2,5 % est observée en culture mixte et à 0,05 j<sup>-1</sup> (Figure 36).



**Figure 36 : Répartition de l'azote par compartiment exprimé en pourcentage d'azote par rapport à l'azote total pour les cultures témoins et mixtes. Chaque donnée représente la médiane obtenue pour 6 valeurs, dont 3 par réplicat de culture. La barre d'erreur représente l'IQR. Les lettres correspondent aux résultats de tests statistiques de Kruskal Wallis pour une erreur  $\alpha$  de 5% avec une probabilité de  $P=2,10 \cdot 10^{-7}$  pour  $D=0,05 \text{ j}^{-1}$  et  $P=2,27 \cdot 10^{-7}$  pour  $D=0,3 \text{ j}^{-1}$ . Pour un même graphique, des lettres différentes correspondent à une différence statistiquement significative entre les conditions.**

C. Culture en batch du modèle bispécifique *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.*

La culture en batch est lancée le 75<sup>ème</sup> jour de l'expérience après injection d'un volume de milieu de Walne correspondant à la moitié de l'apport initial. L'azote apporté correspond à 83  $\mu\text{M}$ . Les populations algales des 4 photobioréacteurs sont stimulées par cet apport d'éléments nutritifs. Les taux de croissance de *Dunaliella sp.* calculés pour les deux conditions sont très proches de 0,3  $\text{j}^{-1}$  pour les cultures axéniques et pour les cultures mixtes (Tableau 11). Au moment de la phase stationnaire, le gain ( $\Delta X_{max}$ ) en concentration cellulaire algale est sensiblement plus faible de 20 % (Tableau 11) dans les cultures mixtes. Le gain ( $\Delta X_{max}$ ) en biomasse carbonée n'est, quant à lui, que légèrement inférieur (7 %) au sein des cultures mixtes par rapport aux témoins (Tableau 11).

Tableau 11 : Taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) de *Dunaliella sp.*, gain de biomasse en phase stationnaire ( $\Delta X_{max}$ ) exprimé en concentration cellulaire et en carbone, ratio carbone : azote (C :N), biovolume algal en phase stationnaire, ratio bactéries :algues en phase stationnaire, taux de croissance d'*Alteromonas sp.* SY007, azote organique dissous (NOD) et azote inorganique dissous (NID), calculés pour la phase de culture en batch. Les données présentées sont les valeurs brutes estimées pour chaque réplicat de culture (R). \*calculés à partir du dernier point de mesure faute de stabilité à la fin de l'expérience.

	Témoins		SY007	
	R1	R2	R3	R4
$\mu_{max}$ <i>Dunaliella sp.</i> ( $\text{j}^{-1}$ )	<b>0,30</b>	<b>0,31</b>	0,29	0,35
$\Delta X_{max}$ <i>Dunaliella sp.</i> ( $\cdot 10^6$ cell.mL <sup>-1</sup> )	<b>0,18</b>	<b>0,18</b>	0,14	0,15
$\Delta X_{max}$ <i>Dunaliella sp.</i> [COP >2,7 $\mu\text{m}$ ] ( $\cdot 10^3$ $\mu\text{M}$ )*	<b>3,9</b>	<b>3,6</b>	3,5	3,4
C :N [>2,7 $\mu\text{m}$ ] (pmol.cell <sup>-1</sup> )*	<b>21</b>	<b>20</b>	20	21
Biovolume <i>Dunaliella sp.</i> ( $\mu\text{m}^3$ )	<b>256</b>	<b>263</b>	314	336
Ratio Bactéries :Algues (cellule : cellule)*	<b>0</b>	<b>0</b>	70	62
$\mu_{max}$ <i>Alteromonas sp.</i> ( $\text{j}^{-1}$ )	-	-	0,66	0,56
NOD ( $\mu\text{M}$ )	<b>68,6</b>	<b>53,6</b>	46,8	35,6
NID ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	0,2	0,3

De même qu'en culture continue, ces divergences sont à mettre en parallèle avec les différences de biovolumes observés chez *Dunaliella sp.* en phase stationnaire. Ceux-ci sont en moyenne 25 % supérieurs en présence de la bactérie (Tableau 11). Le ratio C :N des particules d'une taille supérieure à 2,7  $\mu\text{m}$  est très proche d'une culture à l'autre (C :N autour de 20,5).

La population bactérienne se développe rapidement dès le lancement de la culture en batch. Les concentrations cellulaires augmentent de plus de 500 % sans être stabilisées à la fin de l'expérience. De

ce fait, le ratio B :A augmente lui aussi de manière importante et atteint pour le dernier point une valeur moyenne de 66 bactéries par algue. Le taux de croissance bactérien a doublé en passant du mode de culture continue au batch puisque celui-ci évolue de  $0,3 \text{ j}^{-1}$  à  $0,6 \text{ j}^{-1}$ . En revanche, alors que la population bactérienne augmente fortement, les valeurs de COP et de NOP du compartiment  $0,7\text{-}2,7 \mu\text{m}$  n'évoluent pas en ce sens et sont plutôt stables (Figure 35). Il faut noter qu'en parallèle les valeurs de NOD estimées après filtration sur  $0,7 \mu\text{m}$  augmentent du début du batch jusqu'à la phase stationnaire au sein des cultures mixtes alors qu'au sein des témoins, ce compartiment azoté est relativement stable (Figure 35). Malgré cette augmentation au sein des cultures mixtes, à la fin de l'expérience des valeurs de NOD supérieures sont observées au sein des cultures axéniques (Tableau 11).

#### 4. Discussion

La bactérie *Alteromonas sp. SY007* a été sélectionnée à l'issue des phases de criblage en microplaques (expérience 1) et de caractérisation en photobioréacteur (expérience 2) pour son influence positive sur la production en biomasse carbonée de *Dunaliella sp.* L'hypothèse du recyclage de l'azote organique d'origine algale en azote minéral par la reminéralisation bactérienne a été avancée pour expliquer le gain de biomasse microalgale en présence de la bactérie SY007. L'objectif de cette étude est donc de poursuivre l'analyse de cette interaction particulière entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp. SY007* à fort potentiel valorisable, à travers un effort de compartimentation des cultures.

- **Etude des interactions en culture continue et méthode**

Les expériences 1 et 2 menées en batch ont permis de mettre en évidence une amélioration du rendement de production des cultures de *Dunaliella sp.* en phase stationnaire et en présence de la bactérie SY007. Cependant, tel que nous l'avons évoqué précédemment lors de l'introduction de ce travail (cf introduction générale), la culture en batch est simple d'utilisation mais la biomasse et les facteurs environnementaux (éclairage, quantité de nutriments) varient constamment au cours de la culture. La culture continue est donc proposée à ce stade de l'étude puisque ce mode de culture propose l'analyse d'états stables au moment de l'équilibre du système et permet donc d'étudier plus finement les réponses physiologiques. De plus, en vue d'une application industrielle future envisagée par le projet Symbiose, l'étude des rendements d'une culture mixte en culture continue, qui propose une production automatisée et une qualité constante de la culture, est intéressante. Un dispositif expérimental de culture continue est alors spécialement développé pour l'étude et propose de réaliser des cultures en conditions stériles afin d'éviter l'entrée de contaminants dans le système. L'objectif est de conserver l'axénie des cultures témoins et de pouvoir observer l'influence de la seule bactérie *Alteromonas sp. SY007* sur la croissance de *Dunaliella sp.* Le principe repose sur un montage stérilisable d'un seul tenant, manipulable sous une hotte à flux laminaire pour le lancement de l'expérience et le remplacement des

réserves d'éléments nutritifs. L'entrée de contaminants est évitée par le maintien d'une surpression constante dans le photobioréacteur et par le développement d'un système de prélèvement adapté. Ce dispositif se montre particulièrement efficace puisque aucune contamination n'est observée pour les quatre photobioréacteurs en 82 jours d'expérience, représentant au total 16 changements de réserve, 340 prélèvements et 328 vidanges des systèmes de récolte. Ces résultats suggèrent que le matériel choisi, le montage proposé et la méthode appliquée au lancement de l'expérience mais aussi pour les prélèvements et la maintenance des réacteurs sont adaptés pour ce type d'étude contraignant.

La bactérie SY007 sélectionnée s'est maintenue en association avec *Dunaliella sp.* en culture continue sur la totalité de l'expérience. Ce résultat suggère une certaine stabilité du couple *Dunaliella sp.*-*Alteromonas sp.* SY007 qui est cultivable en mode batch (expérience 1 et 2) ou en mode continu (expérience 3) selon les applications cibles.

Enfin, pour cette expérience une compartimentation du système bispécifique est réalisée afin d'estimer la répartition de l'azote et du carbone entre les différents compartiments : microalgal, bactérien, organique et minéral dissous. Pour ce faire, 2 filtres GF de maillage différents (0,7 et 2,7  $\mu\text{m}$ ) sont testés afin de réaliser une séparation optimale des différents compartiments. Les résultats obtenus montrent qu'une séparation parfaite de *Dunaliella sp.* et de la bactérie SY007 n'est pas envisageable compte tenu de la gamme de taille de la bactérie. Une partie des cellules bactériennes (29 %) est retenue sur les filtres GF/D d'un maillage pourtant large de 2,7  $\mu\text{m}$ . Le carbone et l'azote du compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$  calculés par différence entre les filtrations sur GF/D (>2,7  $\mu\text{m}$ ) et GF/F (>0,7  $\mu\text{m}$ ) représente la part de carbone et d'azote correspondant à 71 % de la population bactérienne. En revanche, la contribution de l'azote et du carbone bactérien au COP et NOP (>2,7  $\mu\text{m}$ ) estimée par le calcul est négligeable et ne modifie pas les tendances ni les conclusions de l'étude. Ce compartiment peut donc être assimilé au compartiment microalgal.

#### ○ **Population bactérienne et croissance en culture continue**

Au cours de cette étude, les populations bactériennes d'*Alteromonas sp.* SY007 se sont maintenues en association avec *Dunaliella sp.* en culture continue et en batch. Aux deux taux de dilution appliqués, les populations bactériennes se sont stabilisées pour atteindre un état d'équilibre. Avec l'augmentation du taux de dilution, la densité de bactéries double. Une croissance supérieure des bactéries est donc observée malgré un lessivage plus important de la culture. Ce résultat suggère une limitation moindre des cellules bactériennes pour le deuxième taux de dilution. Pour les deux équilibres, le compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$ , correspondant à 71 % de la population bactérienne, ne renferme qu'une faible part de l'azote et surtout du carbone du système global. Les valeurs de ratio C:N de 5 (1) et 6 (2), obtenues pour ce compartiment selon les conditions sont différentes de celles obtenues pour les cultures axéniques et correspondent d'une part, au C:N de 5 estimé au préalable sur une culture pure d'*Alteromonas sp.* et d'autre part, à des valeurs typiquement rencontrées chez les bactéries (Fukuda *et al.* 1998). Au sein des

cultures mixtes, le compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$  présente donc les caractéristiques d'un compartiment majoritairement bactérien.

Chez les témoins axéniques, le compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$  renferme également de la matière organique carbonée, mais à un niveau plus faible que dans les cultures mixtes, et caractérisée par un faible taux d'azote. Cette matière organique riche en carbone, qui ne peut être d'origine bactérienne, pourrait représenter des débris cellulaires issus de la mortalité algale et/ou de la matière organique exsudée par les algues. En effet, chez les microalgues, les composés exsudés sont généralement riches en carbone, puisque 80 à 90% de la matière organique exsudée est composée de glucides et particulièrement de polysaccharides (Myklestad 1995, Smith & Underwood 2000, Mishra *et al.* 2011). Sans analyses supplémentaires, il est difficile de conclure quant à la présence de ces macromolécules au sein des cultures mixtes. Cependant compte-tenu des valeurs de C:N du compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$  au sein des cultures mixtes, correspondant à des C:N typiquement bactériens, il semblerait que la part cette matière organique soit négligeable par rapport à la population bactérienne. Il est également vraisemblable qu'une part de cette matière organique ait pu être consommée par la bactérie *Alteromonas sp.* se développant par hétérotrophie.

De manière étonnante, alors que la concentration cellulaire bactérienne augmente avec le taux de dilution, le COP et NOP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ) diminuent au sein des cultures mixtes. Chez les cultures axéniques une diminution du COP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ) est également observée suggérant que les débris cellulaires et/ou l'exsudation de matière organique sont d'un moindre niveau à 0,3  $\text{j}^{-1}$ . Cependant, il ne s'agit pas du même phénomène observé en culture mixte puisque nous avons précédemment démontré que ce compartiment 0,7-2,7  $\mu\text{m}$  semble majoritairement bactérien dans les cultures mixtes. Cette apparente contradiction entre les données de concentrations cellulaires bactériennes et les valeurs de COP et NOP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ) peut s'expliquer par des différences de biovolumes bactériens aux deux états d'équilibre étudiés. En effet, comme chez les microalgues, des variations de biovolume sont observées chez les bactéries en fonction des conditions de culture (Chrzanowski *et al.* 1996, Fagerbakke *et al.* 1996, Vrede *et al.* 2002). Gundersen *et al.* (2002) ont également montré une relation linéaire chez les bactéries entre les quotas cellulaires d'éléments et le volume cellulaire. La diminution du volume bactérien ici observée avec l'augmentation du taux de dilution est estimée à un facteur de 1,5 : ordre de grandeur plausible compte-tenu de la variation de taille déjà observée chez cette souche bactérienne.

Par ailleurs, au moment du changement de mode de culture, du continu au batch, l'augmentation importante de la population bactérienne ne se traduit pas par une évolution en conséquence du COP et du NOP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ). Alors que l'effectif de la population bactérienne est multiplié par plus de 500, le COP diminue et les valeurs de NOP (0,7-2,7  $\mu\text{m}$ ) tendent vers des valeurs nulles. Ce résultat met en évidence, dans ce cas précis, un changement de biovolume bactérien qui pourrait être suffisant pour entraîner une rétention différente des bactéries sur les filtres utilisés. Il n'est pas possible d'exclure

totallement l'hypothèse d'une rétention supérieure des bactéries sur les filtres GF/D de 2,7  $\mu\text{m}$ , en lien avec un accroissement du biovolume bactérien. Cependant les valeurs de ratio C :N ( $>2,7 \mu\text{m}$ ) estimées au sein des cultures mixtes au cours du batch demeurent identiques aux valeurs estimées pour les cultures témoins. Or, une rétention importante des bactéries, plus riches en azote relativement au carbone, aurait entraîné une baisse du ratio C :N ( $>2,7 \mu\text{m}$ ). A l'inverse, une diminution du biovolume bactérien conduisant à une moindre rétention bactérienne sur les filtres GF /F est envisageable. Dans ce cas, les bactéries se retrouvent au sein du filtrat récupéré pour les analyses d'azotes NOD et NID. De manière intéressante, au sein des cultures mixtes, les valeurs de NOD augmentent nettement du début du batch jusqu'à la phase stationnaire d'environ 45  $\mu\text{M}$ . Cette augmentation conjointe avec l'augmentation de la population bactérienne traduirait leur présence au sein du compartiment inférieur à 0,7  $\mu\text{m}$  pendant la période du batch. L'ensemble de ces résultats montre que la compartimentation de cultures mixtes, par l'utilisation de seuils de filtration fixes, ne permet pas à elle seule une évaluation simple et rigoureuse des compartiments sous toutes les conditions écophysiologicals. La synthèse des résultats de compartimentation et des autres types d'analyses effectuées au cours de cette étude (cytométrie, éléments dissous et particulaires) permet néanmoins d'élaborer des hypothèses quant à l'évolution des deux types de populations.

- **Compétition entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* SY007 pour l'azote minéral**

Tout d'abord, un effet sur la physiologie de *Dunaliella sp.* est constaté en présence de la bactérie SY007 et dans les trois conditions de culture. Au sein des cultures mixtes, les quotas cellulaires en carbone et en azote sont significativement augmentés, de manière proportionnelle, puisque les ratio C :N demeurent identiques à ceux des cultures axéniques. Ces résultats peuvent être mis en relation avec l'augmentation significative du biovolume algal observée au cours de l'étude en continu et en batch au sein des cultures mixtes. Chez les microalgues une relation linéaire et positive entre le quota carbone et le volume cellulaire est connue (Shuter 1978, Claustre & Gostan 1987, Verity *et al.* 1992). L'influence des bactéries sur le volume cellulaire avait précédemment été observée lors de l'expérience 2. En revanche, la bactérie SY007 au cours de l'expérience 2 avait significativement diminué le biovolume de *Dunaliella sp.* par rapport au témoin axénique et en phase stationnaire alors qu'ici l'effet est inversé. Cet effet des bactéries est néanmoins difficilement explicable en l'absence de données complémentaires et de références bibliographiques explicatives. En outre, ces résultats illustrent l'intérêt du dosage du carbone organique particulaire pour le suivi de la biomasse algale grâce à son pouvoir intégrateur. Son usage en complément des autres analyses habituellement pratiquées telles que le dénombrement cellulaire par exemple est donc essentiel.

Outre l'effet constaté sur la physiologie de *Dunaliella sp.*, la bactérie SY007 a diminué les performances de culture de cette microalgue en culture continue et en batch au cours de cette expérience. Au sein des cultures mixtes, la biomasse carbonée algale et le rendement de l'azote ( $R_N$ ) sont diminués à 0,05  $\text{j}^{-1}$  et

dans une moindre mesure à  $0,3 \text{ j}^{-1}$  et en batch. Dans le contexte de limitation azotée, ces résultats suggèrent une compétition pour la ressource azotée minérale entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* SY007. En effet, les bactéries dites hétérotrophes telles que la bactérie *Alteromonas sp.* SY007 captent les éléments nécessaires à leur croissance et principalement le carbone, l'azote et le phosphore, par ordre d'importance, à partir d'éléments organiques (Madigan & Martinko 2007). Sans apport de matière organique exogène par la solution d'enrichissement au cours de cette expérience, la bactérie *Alteromonas sp.* SY007 ne peut se développer qu'à partir de la matière organique produite par les cellules de *Dunaliella sp.* Il peut s'agir de matière organique issue de mortalité et/ou d'exsudation cellulaire. L'exsudation de composés organiques chez les microalgues déjà observée chez *D. salina* (Giordano *et al.* 1994, Mishra & Jha 2009) représente en général autour de 10 % et peut atteindre jusqu'à 70% du carbone photoassimilé (Lancelot 1979, Mague *et al.* 1980, Grossart & Simon 2007). Les composés exsudés sont généralement riches en carbone et l'élément limitant la croissance des microalgues, tel que l'azote pour notre étude, sera peu présent relativement au carbone dans les substances exsudées (Myklestad 1995, Smith & Underwood 2000, Mishra *et al.* 2011). Or, lorsque les besoins des bactéries hétérotrophes ne sont pas couverts par la métabolisation de la matière organique disponible, celles-ci peuvent utiliser les éléments inorganiques dissous présents dans le milieu de culture pour assurer leur développement (Bratbak & Thingstad 1985, Joint *et al.* 2002, Mindl *et al.* 2005). De plus, la majorité des bactéries est capable d'utiliser l'ammonium comme source d'azote contrairement au nitrate (Madigan & Martinko 2007). D'autre part, Baumann *et al.* en 1972 avaient déjà établi que les bactéries du genre *Alteromonas sp.* sont capables de se développer à partir d'ammonium comme seule source d'azote. Dans notre cas, il semble que la bactérie *Alteromonas sp.* compense donc son besoin azoté en disposant de l'ammonium apporté par le milieu de culture pour poursuivre sa croissance, et entre ainsi en compétition directe avec *Dunaliella sp.* Une part de l'azote apporté par le milieu de culture, mobilisé dans la biomasse bactérienne, n'est plus disponible pour la croissance algale, diminuant ainsi la biomasse carbonée et le rendement azoté des cultures de *Dunaliella sp.* par rapport aux témoins axéniques.

- **Effet du taux de dilution**

L'augmentation du taux de dilution de  $0,05$  à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ , correspondant à 15 et 90 % du  $\mu_{max}$  observé pour *Dunaliella sp.*, n'affecte pas fortement la biomasse algale tel qu'il est attendu. Or, une culture continue dont le taux de dilution tend vers le  $\mu_{max}$  impose une culture cellulaire très peu dense et proche du lessivage. Ces résultats suggèrent donc que le réel  $\mu_{max}$  de *Dunaliella sp.*, au sein de ce dispositif de culture particulier, doit être nettement supérieur à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ .

La compétition entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* SY007 est relativement peu affectée par les changements de taux de dilution appliqués aux cultures. La compétition est néanmoins légèrement plus forte au faible taux de dilution et particulièrement visible au niveau de la biomasse algale et du

rendement de l'azote. Comme le notent Bratbak et Thingstad (1985), la réduction du taux de dilution a pour effet de durcir les conditions de limitation par l'azote dans les cultures. Une plus forte limitation des cellules de *Dunaliella sp.* en azote est effectivement observée à  $0,05 \text{ j}^{-1}$  puisque le C:N des cellules algales est significativement supérieur à celui observé à  $0,3 \text{ j}^{-1}$ , pour les cultures axéniques comme pour les cultures mixtes.

○ **Interactions *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* : du mutualisme à la compétition**

Des résultats en apparence divergents sont obtenus au cours de cette étude puisque, à l'inverse de l'expérience 3, les expériences 1 et 2 montraient un effet promoteur de la bactérie *Alteromonas sp.* SY007 sur les rendements de production de cultures de *Dunaliella sp.* Les interactions de type mutualisme observées en batch entre ces deux organismes pendant les expériences 1 et 2 se transforment en compétition en culture continue et en batch au cours de l'expérience 3. L'analyse de ces résultats a permis d'identifier des facteurs influençant la nature des interactions entre ces deux organismes, qui reposent principalement sur la valeur C:N des exsudats algaux (1) mais également sur le mode (2) et les conditions initiales (3) de culture.

Tout d'abord, la compétition pour l'ammonium entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* repose principalement sur le recouvrement des besoins azotés des cellules bactériennes par l'assimilation de la matière organique d'origine algale. Lorsque l'azote organique assimilable par les cellules bactériennes n'est pas suffisamment présent relativement au carbone, c'est à dire lorsque le C:N des exsudats est élevé, les bactéries du genre *Alteromonas sp.* peuvent utiliser l'ammonium pour poursuivre leur croissance et entrent de ce fait en compétition directe avec *Dunaliella sp.* (Baumann *et al.* 1972, Madigan & Martinko 2007). D'autre part, outre la compétition pour la ressource minérale azotée, un C:N élevé de la matière organique substrat de la croissance bactérienne correspond à une condition défavorable à la reminéralisation bactérienne (Tezuka 1990). La relation mutualiste observée entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* au cours des expériences 1 et 2 repose quant à elle sur la remise à disposition d'azote par la reminéralisation bactérienne favorisée par un faible C:N de la matière organique assimilée (Tezuka 1990). Le C:N des exsudats d'origine algale représente donc un déterminant essentiel des interactions microalgues-bactéries qui dépendent donc directement du niveau d'exsudation d'azote organique relativement à celui du carbone par les microalgues. Or d'après Baklouti *et al.* (2006) l'exsudation d'azote par les microalgues est maximale quand  $Q_N$  tend vers  $Q_{N_{max}}$  et en présence d'un substrat non limitant c'est à dire dans les conditions où  $\mu$  tend vers  $\mu_{max}$ . L'augmentation de l'exsudation de matériel organique serait une réponse à l'accumulation de matière organique dissoute dans les cellules en conditions de nutriments en excès, générant un fort gradient au niveau de la membrane (Baklouti *et al.* 2006). Selon Baklouti, le taux d'azote exsudé est alors fonction du taux de dilution appliqué et de l'azote résiduel minéral. D'autre part, d'après la même étude, le niveau d'exsudation de carbone organique est maximal quand  $Q_N$  tend vers  $Q_{N_{min}}$  c'est à dire dans les conditions où  $\mu$  tend vers

zéro. Par conséquent, lorsque  $\mu$  tend vers zéro, le taux d'exsudation d'azote est minimal alors que le taux d'exsudation de carbone est maximal, correspondant donc à un C:N des exsudats maximal, conditions favorables à la compétition entre *Alteromonas sp.* et *Dunaliella sp.* En d'autres termes, en culture continue plus le taux de dilution s'éloigne du  $\mu_{max}$  et tend vers zéro, plus la compétition sera favorisée entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* Une compétition plus intense entre ces deux organismes à  $0,05 \text{ j}^{-1}$  était précisément observée au cours de cette étude.

Ensuite, le mode de culture (batch ou continu) représente également un facteur pouvant influencer la nature des interactions du mutualisme à la compétition entre *Alteromonas sp.* et *Dunaliella sp.* Tout d'abord, dans les cultures en batch (expériences 1 et 2) et au moment du  $\mu_{max}$ , le taux d'exsudation de l'azote organique est maximal et celui du carbone minimal. A ce stade, les populations bactériennes présentes se développent sans compétition à partir des exsudats à faible C:N et peuvent aussi réaliser une reminéralisation d'une partie de cet azote. A l'équilibre, le débit constant appliqué au système efface l'historique de la culture et lessive la matière organique exsudée précédemment. Au cours des équilibres des cultures en continu de l'expérience 3, les algues sont en présence de très faibles concentrations résiduelles d'ammonium puisqu'il s'agit de l'élément limitant. Aucune forme azotée minérale n'est ainsi observée dans le milieu de culture. Le niveau d'exsudation d'azote et de carbone organique dépend donc du débit appliqué au système. Plus le taux de dilution s'éloigne du  $\mu_{max}$  et tend vers zéro, plus la compétition sera favorisée entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* Nous avons précédemment établi que le premier débit testé ( $0,05 \text{ j}^{-1}$ ) mais aussi le deuxième ( $0,3 \text{ j}^{-1}$ ) correspondent à des  $\mu$  faibles pour *Dunaliella sp.* au sein de ce dispositif de culture particulier. En conséquence, l'exsudation d'azote organique par les algues doit être faible relativement à celle du carbone (C:N des exsudats élevé). Les  $R_N$  estimés en culture continue et pour les deux taux de dilution confirment cette hypothèse puisqu'une plus faible exsudation d'azote est observée par rapport au cas des cultures en batch (expérience 1 et 2), pour lesquelles  $R_N$  étaient plus faibles. Par rapport aux expériences 1 et 2, la réduction de la quantité d'azote exsudé dans le milieu de culture relativement à la quantité de carbone organique disponible (C:N des exsudats élevé), aux deux taux de dilution testés en culture continue, a probablement favorisé la compétition des bactéries pour l'azote minéral constamment injecté dans la culture en continu.

Enfin, les conditions initiales de culture peuvent également intervenir sur la nature des interactions et permettent d'expliquer les divergences de résultats des cultures en batch au cours des différentes expériences : il s'agit du ratio bactéries : algues au sein de la culture en batch. En effet, l'hypothèse reposant sur le mode de culture et le choix des taux de dilution ne permet pas d'expliquer à elle seule les effets délétères des bactéries lorsque les cultures continues sont placées en mode batch à la fin de l'expérience 3. Lors des expériences 1 et 2, les cultures étaient initiées avec un ratio B:A faible (0,3) en raison d'une centrifugation initiale destinée à éliminer l'azote résiduel, mais abattant également la population bactérienne. L'azote apporté au démarrage de l'expérience est ensuite rapidement mobilisé dans la biomasse algale, majoritaire en ce début de culture et sa concentration résiduelle décroît

rapidement vers zéro lorsque le taux de croissance des algues commence à diminuer. Par la suite, sans apport de matière organique exogène et en l'absence d'azote minéral, les bactéries, qui ont initié parallèlement une croissance, se trouvent alors totalement dépendantes de l'azote organique d'origine algal pour assurer leur développement par hétérotrophie et par conséquent, ne peuvent entrer en compétition vis-à-vis de la ressource azotée minérale déjà consommée. Outre l'absence de compétition, en ce début de culture, le C :N des exsudats étant minimal, la reminéralisation de l'azote par les bactéries est favorisée. Le batch de l'expérience 3, quant à lui, fait suite à un état d'équilibre et est initié avec un ratio B :A de 15 au moment de l'injection du milieu d'enrichissement c'est à dire au démarrage du batch. De plus, ce batch fait suite à état d'équilibre où les conditions de croissance de *Dunaliella sp.*, éloignées du réel taux de croissance maximal, impliquaient un C :N fort des exsudats. La population bactérienne sortant donc d'une période de limitation par l'azote, et au contraire des expériences 1 et 2, étant dès le début bien développée, a pu séquestrer une partie de l'ammonium disponible dans le milieu, expliquant une biomasse algale inférieure en phase stationnaire pour les cultures mixtes. Grâce au dosage de l'azote inorganique présent dans le milieu de culture, nous avons pu constater que l'ammonium a été très rapidement mobilisé par les biomasses biologiques (algues et bactéries) en début de batch. Par conséquent, les populations bactériennes se sont ensuite développées à partir de l'azote organique disponible au sein des cultures. En l'absence de données supplémentaires, il est difficile de conclure quant à la présence ou l'absence d'une reminéralisation de la matière organique algale par les bactéries au sein des cultures mixtes et pour cette phase de l'expérience. En revanche, considérant l'effet négatif des bactéries sur la biomasse algale en phase stationnaire, il est probable que ce mécanisme de remise à disposition d'azote utilisable par les algues, n'ait pas suffi à compenser la séquestration bactérienne d'ammonium. Par conséquent, il semble important de considérer le ratio bactéries : algues dès lors qu'une culture mixte en mode batch est envisagée. Une faible inoculation des bactéries par rapport aux microalgues au lancement d'un batch serait préférable afin de permettre la séquestration totale de la source minérale limitante au sein de la biomasse algale et ainsi défavoriser la compétition entre les deux organismes cultivés.

Le basculement du type d'interaction du mutualisme à la compétition entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* SY007 résulte probablement d'un effet multifactoriel lié au mode de culture et plus généralement aux conditions de culture des différentes expériences. Ces résultats illustrent le fragile équilibre des interactions algues-bactéries en culture entre compétition et mutualisme précédemment constaté par plusieurs auteurs qui montraient l'influence des conditions de culture et notamment de la nature de la limitation (Bratbak & Thingstad 1985, Joint *et al.* 2002, Mindl *et al.* 2005, Danger, Leflaive, *et al.* 2007). Danger, Leflaive *et al.* (2007) avaient par exemple montré que la nature de la limitation pouvait générer des interactions de différente nature entre *Scenedesmus obliquus* et une communauté bactérienne : compétition (P limité), commensalisme (N limité) ou mutualisme (eutrophie). Bratbak et Thingstad (1985) avaient eux aussi mis en évidence ce phénomène le qualifiant de paradoxe : en

condition de limitation défavorable pour la croissance algale, les microalgues semblent indirectement favoriser, par l'augmentation de leur production d'exsudats, le comportement compétiteur des bactéries hétérotrophes. Le fort ratio C :N de ces exsudats favorise à son tour la compétition des bactéries pour la ressource minérale limitante.

## 5. Conclusion

Le dispositif expérimental et les protocoles de culture développés au laboratoire pour l'étude ont permis de mener à terme une expérience de 82 jours en condition stérile, indispensable pour l'étude des interactions microalgues-bactéries. Le comportement observé au cours des deux premières expériences en batch dans les cultures mixtes, qui s'est traduit par un gain de productivité pour *Dunaliella sp.* par rapport aux cultures axéniques, n'est pas retrouvé pour l'expérience de culture en continu, dans laquelle une baisse de productivité de la culture de microalgue est obtenue. En culture continue à l'équilibre, les résultats soulignent la mise en place d'une situation de compétition pour la ressource minérale azotée limitante, associée à l'absence de reminéralisation bactérienne, résultant en une baisse de rendement de la culture microalgale. L'analyse de ces résultats a permis d'identifier des facteurs influençant la nature des interactions entre ces deux organismes, qui reposent principalement sur la valeur C :N des exsudats algaux mais également sur le mode de culture. Le ratio bactéries : algues semble également un facteur déterminant la nature des interactions dès lors qu'une culture en batch est envisagée. L'ensemble de ces facteurs ont vraisemblablement contribué à faire basculer la nature des interactions entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* du mutualisme à la compétition, démontrant la fragilité de cet équilibre entre les différentes interactions et la complexité de leur étude.



---

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

---



Positionnée au sein d'un contexte à fort potentiel valorisable grâce à l'émergence du projet SYMBIOSE, la présente étude proposait de sélectionner en système simplifié des bactéries permettant d'améliorer les rendements de culture d'une microalgue déjà valorisée mondialement et à fort potentiel pour de nombreuses nouvelles applications : *Dunaliella*. L'objectif de cette étude consistait à sélectionner une souche bactérienne améliorant les rendements de production d'une souche du genre *Dunaliella* à salinité normale. Après axénisation de la souche microalgale, étape indispensable, un protocole de sélection de couples *Dunaliella sp.*-bactéries en deux étapes est proposé pour répondre à l'objectif fixé. Une première phase de criblage des couples en microplaques est réalisée et malgré les contraintes apparentes liées au dispositif de culture (mesure indirecte de la croissance algale, absence d'agitation et d'échanges gazeux, culture en microvolumes), une croissance algale conforme à celle rencontrée en systèmes de culture plus éprouvés est obtenue lors de la deuxième phase expérimentale, validant la pertinence de la démarche de sélection. Parmi la collection bactérienne constituée au laboratoire, regroupant les groupes taxonomiques des CFB, proteobactéries ( $\alpha$  et  $\gamma$ ) et gram+, la grande majorité influence négativement le taux de croissance maximal et le gain de biomasse de *Dunaliella sp.* mesuré en phase stationnaire sous limitation azotée. Les baisses de performances de croissance microalgales peuvent être attribuées à la production de substances bactériennes phycotoxiques (Mayali & Azam 2004, Salomon & Imai 2006) et/ou à une compétition des bactéries pour les ressources minérales (Rhee 1972, Meseck *et al.* 2007). Néanmoins, une amélioration importante du gain de biomasse et du rendement de l'azote ont pu être observés en présence de deux souches bactériennes *Muricauda sp.* SY244 et *Alteromonas sp.* SY007. En conditions de limitation azotée, la reminéralisation bactérienne pourrait expliquer un recyclage de la matière organique azotée et une remise à disposition d'azote utilisé par *Dunaliella sp.* pour poursuivre sa croissance et ainsi retarder le moment de la phase stationnaire. Ce type d'interaction mutualiste présente un intérêt pour la valorisation puisqu'une telle association permettrait d'améliorer considérablement les rendements de culture de *Dunaliella sp.* en recyclant la matière organique exsudée, et donc perdue, pour produire plus de biomasse algale. Ces résultats encourageants ont permis de répondre à l'objectif premier de l'étude consistant à sélectionner un couple *Dunaliella sp.*-bactéries aux performances de culture améliorées. Compte tenu de l'hypothèse de recyclage azoté proposée lors de l'analyse des résultats de la seconde expérience, la troisième phase expérimentale avait pour objectif d'analyser les flux d'azote entre ces deux microorganismes et leur milieu en condition de limitation par l'azote et en système de culture continue. La compartimentation de la culture mixte, nécessaire à l'analyse des flux, par l'utilisation de seuils de filtration fixes n'a pas permis à elle seule une évaluation simple et rigoureuse des compartiments sous toutes les conditions écophysiologicals. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude ont néanmoins permis d'élaborer des hypothèses, cependant des expériences complémentaires basés sur l'usage d'isotopes du carbone et de l'azote principalement permettraient de qualifier finement les flux entre les organismes et leur milieu, et de consolider les hypothèses proposées. De tels travaux ont déjà montré des résultats

intéressants dans des études d'écologie visant à identifier les transferts de matière au sein de chaînes trophiques ou d'écosystèmes particuliers (Münster 1993, van Oevelen *et al.* 2006).

Au cours de l'expérience 3 de la présente étude, le mutualisme entre *Dunaliella sp.* et *Alteromonas sp.* SY007 n'a plus été observé et remplacé par une interaction de type compétition pour la ressource minérale azotée entraînant cette fois une baisse de rendement de la culture algale. L'analyse de ces résultats en apparence contradictoires a permis d'identifier les facteurs influençant la nature des interactions entre ces deux organismes et de mieux connaître les modalités de culture en vue d'une future valorisation. Les performances de culture de *Dunaliella sp.* peuvent être améliorées significativement en batch à condition de réaliser une inoculation faible d'*Alteromonas sp.* par rapport aux microalgues. En revanche, en l'absence de données supplémentaires la culture de ce système bispécifique en mode continu ne permet pas pour le moment de conserver les bénéfices observés en batch. Il serait intéressant de mener des expériences complémentaires à un taux de dilution tendant vers le réel taux de croissance maximal de *Dunaliella sp.* qui pourraient permettre, selon notre hypothèse, d'observer un éventuel retour à une interaction de type mutualisme et à une augmentation du rendement d'azote pour les algues. En effet, en se plaçant à un taux de dilution tendant vers le taux de croissance maximal de *Dunaliella sp.*, le C:N des exsudats d'origine algale est minimisé par une forte exsudation azotée et une faible exsudation carbonée, condition favorable au mutualisme mais jamais testé à ce jour en culture de type continu. L'observation du comportement des bactéries vis-à-vis de la ressource minérale azotée en condition de mutualisme favorisée permettrait de répondre définitivement à la question d'une application de cette culture mixte en mode continu.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude confirment et démontrent la complexité des interactions entre organismes, en dépit de la mise en place de système simplifié, et l'importance des paramètres environnementaux conditionnant le type d'interaction entre ces microorganismes comme évoqué précédemment par d'autres auteurs (Bratbak & Thingstad 1985, Gurung *et al.* 1999, Daufresne & Loreau 2001, Mindl *et al.* 2005, Danger, Leflaive, *et al.* 2007). La question du transfert de cultures mixtes à échelle industrielle et en milieu ouvert apparaît alors d'autant plus complexe et pose de multiples interrogations. La résilience de la culture *Dunaliella sp.* -*Alteromonas sp.* SY007 aux facteurs environnementaux d'une part, et aux contaminations bactériennes d'autres parts, représenterait un axe de recherche intéressant pour la suite de cette étude. Les cultures extérieures sont soumises aux rythmes nyctéméraux et subissent les variations météorologiques de température et de salinité (précipitation/évaporation). De plus, les systèmes de cultures, fermés ou ouverts, ne protègent pas des contaminations par d'autres organismes procaryotes ou eucaryotes. Il serait donc intéressant d'étudier la capacité de l'association à se maintenir en culture et d'analyser l'effet de ces perturbations sur les rendements de culture. L'ensemble de ces résultats permettrait de valider la faisabilité d'une valorisation de cette culture mixte et d'identifier les modalités de culture du couple en conditions de culture proches de conditions réelles de production industrielle. Un autre axe de recherche intéressant pour la

valorisation de culture algues-bactéries, consisterait à développer une approche écosystémique. Il s'agirait de mimer les écosystèmes naturels en cultivant des populations multispécifiques procaryotes et eucaryotes, où chaque espèce occupe une fonction précise et utile au recyclage de la matière. De cette manière, l'entrée de contaminant pourrait être défavorisée par l'occupation de toutes les niches écologiques et le recyclage plus complet de la matière au sein du système permettrait de maximiser les rendements de culture. L'étude d'un consortium microalgues-bactéries marin d'origine naturelle a récemment été publiée par Vasseur *et al.* (2012) et montrait l'effet bénéfique des communautés bactériennes multispécifiques sur la production de biomasse algale par le recyclage de la matière organique issue de la photosynthèse.

Les voies de valorisation des microalgues n'ont cessé de se développer au cours des dernières décennies. Du fait de leur diversité, leur étude promet de nombreuses découvertes tant sur le plan fondamental qu'appliqué. L'étude des communautés bactériennes associées aux cultures mais surtout la sélection de cultures mixtes performantes représente un axe de recherche prometteur et enrichissant pour la valorisation des microalgues.

*Répondre à une question implique d'en accepter mille autres*



---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



- Amaro AM, Fuentes MS, Ogalde SR, Venegas JA, Suarez-isla BA (2005) Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52:191–200
- Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX (2011) Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: *Science against microbial pathogens: communication current research and technological advances*, Formatex. Mendez-Vila A.
- Amin SA, Green DH, Hart MC, Küpper FC, Sunda WG, Carrano CJ (2009) Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:17071–17076
- Andersen RA (1992) Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* 1:267–292
- Andersen RA (2005) *Algal culturing techniques*, Elsevier, Academic Press. Physiological Society of America
- Avendaño RE, Riquelme CE (2001) Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 30:893–900
- Azam F, Fenchel T, Field J, Meyer-Reil R, Thingstad F (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 10:257–263
- Baklouti M, Diaz F, Pinazo C, Faure V, Quéguiner B (2006) Investigation of mechanistic formulations depicting phytoplankton dynamics for models of marine pelagic ecosystems and description of a new model. *Progress in Oceanography* 71:1–33
- Baldauf SL (2008) An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution* 46:263–273
- Bano N, Hollibaugh JT (2000) Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class proteobacteria in the arctic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1960–1969
- Baroli I, Melis A (1996) Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198:640–646
- Barzegari A, Hejazi MA, Hosseinzadeh N, Eslami S, Aghdam EM, Hejazi MS (2010) *Dunaliella* as an attractive candidate for molecular farming. *Molecular Biology Reports* 37:3427–3430
- De-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y (2008) Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology* 44:938–947
- De-Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, Lebsky VK, Bustillos JJ (2002) Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.*

when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Canadian Journal of Microbiology 48:514–521

De-Bashan LE, Moreno M, Hernandez JP, Bashan Y (2002) Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Research 36:2941–2948

Bates SS, Gaudet J, Kaczmarek I, Ehrman JM (2004) Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle; can bacteria produce domoic acid autonomously? Harmful Algae 3:11–20

Baumann L, Baumann P, Mandel M, Allen RD (1972) Taxonomy of Aerobic Marine Eubacteria. J Bacteriol 110:402–429

Baurain D, Brinkmann H, Petersen J, Rodríguez-Ezpeleta N, Stechmann A, Demoulin V, Roger AJ, Burger G, Lang BF, Philippe H (2010) Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in Cryptophytes, Haptophytes, and Stramenopiles. Molecular Biology and Evolution 27:1698–1709

Behrens PW (2005) Photobioreactors and fermentors : the light and dark sides of growing Algae. In: Algal culturing techniques, Elsevier, Academic Press.p 189–203

Bell WH, Lang JM, Mitchell R (1974) Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. Limnology and Oceanography 19:833–839

Bendschneider K, Robinson RJ (1952) A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. Journal of Marine Research 11:87–96

Benemann J (1992) Microalgae aquaculture feeds. Journal of Applied Phycology 4:233–245

Bennett JW, Chung K-T (2001) Alexander Fleming and the discovery of penicillin. In: Advances in Applied Microbiology. Academic Press, p 163–184

Berland BR, Bianchi MG, Maestrini SY (1969) Etude des bactéries associées aux Algues marines en culture. Marine Biology 2:350–355

Bernard O, Bougaran G, Cadoret JP, Kaas R, Latrille E, Sialve B, Steyer JP (2009) Procédé de fixation de CO<sub>2</sub> et de traitement de déchets organiques par couplage d'un système de digestion anaérobie et d'un système de production de microorganismes photosynthétiques.

Bínová JT, Zahradník J (1998) Bacterial contamination of microalgal biomass during outdoor production and downstream processing. Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes 89:151–158

Blanco A, Moreno J, Campo J Del, Rivas J, Guerrero M (2007) Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. Applied Microbiology and

Biotechnology 73:1259–1266

Borde X, Guieysse B, Delgado O, Muñoz R, Hatti-Kaul R, Nugier-Chauvin C, Patin H, Mattiasson B (2003) Synergistic relationships in algal-bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresource Technology* 86:293–300

Borisova YV, Nogina TM (2000) Bacteria of the genus *Rhodococcus* accompanying green algae in nature and under conditions of laboratory cultivation. *Hydrobiological journal* 36:146

Borowitzka MA (1997) Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9:393–401

Borowitzka (2005) Culturing microalgae in outdoor ponds. In: *Algal culturing techniques*, Elsevier, Academic Press. p 205–218

Borowitzka MA, Huisman JM (1993) The Ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales): Effect of environmental conditions on aplanospore formation. *Botanica Marina* 36:233–244

Borowitzka MA, Siva C (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology* 19:567–590

Bowman JP (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* 5:220–241

Bratbak G, Thingstad TF (1985) Phytoplankton-bacteria interactions: An apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Marine ecology progress series* Oldendorf 25:23–30

Breuil M (1997) *Dictionnaire des Sciences de la Vie et de la Terre*, Breuil. Paris

Bruckner CG, Kroth PG (2009) Protocols for the removal of bacteria from seawater benthic diatom cultures. *Journal of Phycology* 45:981–986

Bruckner CG, Rehm C, Grossart H-P, Kroth PG (2011) Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. *Environmental Microbiology*:1052–1063

Bruhn JB, Gram L, Belas R (2007) Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 73:442–450

Cadoret JP, Bernard O (2008) La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie* 202:201–211

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, others (2007) Metabolites from algae with economical

impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146:60–78

Cavalier-Smith T (1999) Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: Euglenoid, Dinoflagellate, and Sporozoan plastid origins and the Eukaryote family tree 1,2. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46:347–366

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294–306

Cho JY (2012) Algicidal activity of marine *Alteromonas sp.* KNS-16 and isolation of active compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*

Cho J-Y, Choi J-S, Kong I-S, Park S-I, Kerr RG, Hong Y-K (2002) A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *Journal of Applied Phycology* 14:385–390

Chrzanowski T, Kyle M, Elser J, Sterner R (1996) Element ratios and growth dynamics of bacteria in an oligotrophic Canadian shield lake. *Aquatic Microbial Ecology* 11:119–125

Cifuentes AS, González MA, Inostroza I, Aguilera A (2001) Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *Journal of Phycology* 37:334–344

Claustre H, Gostan J (1987) Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: Possible ecological implications. *Marine ecology progress series Oldendorf* 40:167–174

Cole JJ (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystem. *Annual reviews of ecology and systematics* 13:291–314

Coleman AW, Pröschold T (2005) Control of sexual reproduction in Algae in culture. In: *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press; *Physiological Society of America*. Andersen Robert A., p 389–397

Collet P, Hélias A, Lardon L, Ras M, Goy R-A, Steyer J-P (2011) Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells* 102:207–214

Combes C (2001) *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press

Combes C (2002) *Interactions durables : Ecologie et Evolution du parasitisme*. Dunod

Connell L, Cattolico RA (1996) Fragile algae: axenic culture of field-collected samples of *Heterosigma carterae*. *Marine Biology* 125:421–426

Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter Cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1692–1697

- Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG (2005) Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438:90–93
- Croft MT, Warren MJ, Smith AG (2006) Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell* 5:1175–1183
- Crump BC, Armbrust EV, Baross JA (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, Its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3192–3204
- Dakhama A, Noüe J, Lavoie M (1993) Isolation and identification of antialgal substances produced *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 5:297–306
- Danger M, Leflaive J, Oumarou C, Ten-Hage L, Lacroix G (2007) Control of phytoplankton-bacteria interactions by stoichiometric constraints. *Oikos* 116:1079–1086
- Danger M, Oumarou C, Benest D, Lacroix G (2007) Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Functional Ecology* 21:202–210
- Daufresne T, Loreau M (2001) Ecological stoichiometry, primary producers-decomposer interactions, and ecosystem persistence. *Ecology* 82:3069–3082
- DeLong EF, Franks DG, Alldredge AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* 38:924–934
- Delwiche (1999) Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *The American Naturalist* 154:S164–S177
- Dobson SJ, Franzmann PD (1996) Unification of the genera *Deleya* (Baumann *et al.* 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:550–558
- Doucette GJ (1995) Interactions between bacteria and harmful algae: A review. *Natural Toxins* 3:65–74
- Droop MR (1967) A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *British Phycological Bulletin* 3:295 – 297
- Ducklow H (2008) Bacterial production and biomass in the oceans. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, New York Wiley. D. Kirchman
- Eisentraeger A, Dott W, Klein J, Hahn S (2003) Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:346–354
- Escalera L, Reguera B, Takishita K, Yoshimatsu S, Koike K, Koike K (2010) Cyanobacterial endosymbionts in the benthic dinoflagellate *Sinophysis canaliculata* (Dinophysiales,

Dinophyceae). Protist In Press, Corrected Proof

Essam T, Tamer E, Amin MA, El Tayeb, Mattiasson B, Guieysse B, Ossama ET, Bo M, Benoit G (2006) Biological treatment of industrial wastes in a photobioreactor. *Water science and technology* 53:117

Fagerbakke K, Heldal M, Norland S (1996) Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 10:15–27

Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJR (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305:354–360

Fouilland E (2012) Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11:1–4

Fouilland E, Mostajir B (2010) Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters. *FEMS Microbiology Ecology* 73:419–429

Fukami K, Nishijima T, Ishida Y (1997) Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* 358:185–191

Fukuda, Ogawa, Nagata, Koike (1998) Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3352–3358

Gardes A, Iversen MH, Grossart H-P, Passow U, Ullrich MS (2011) Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *The International Society for Microbial Ecology journal* 5:436–445

Geng H, Belas R (2010) Molecular mechanisms underlying roseobacter-phytoplankton symbioses. *Current Opinion in Biotechnology* 21:332–338

Geng D, Wang Y, Wang P, Li W, Sun Y (2003) Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 15:451–456

Giordano M (2001) Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO<sub>2</sub> and high N concentrations. *Journal of Plant Physiology* 158:577–581

Giordano M, Davis JS, Bowes G (1994) Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO<sub>2</sub>, nitrogen and salinity. *Journal of Phycology* 30:249–257

Gladue R, Maxey J (1994) Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 6:131–141

Godos I De, Vargas VA, Blanco S, González MCG, Soto R, García-Encina PA, Becares E,

- Muñoz R (2010) A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology* 101:5150–5158
- González MA, Coleman AW, Gómez PI, Montoya R (2001) Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology* 37:604–611
- Green DH, Llewellyn LE, Negri AP, Blackburn SI, Bolch CJS (2004) Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiology Ecology* 47:345–357
- Griffiths MJ, Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21:493–507
- Grossart HP (2010) Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environmental Microbiology Reports* 2:706–714
- Grossart HP, Simon M (2007) Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* 47:163–176
- Guerrini F, Mazzotti A, Boni L, Pistocchi R (1998) Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology* 15:247–253
- Guillard RRL (2005) Purification methods for microalgae. In: *Algal culturing techniques*, Elsevier, Academic Press-Physiological Society of America. Andersen Robert A.
- Gundersen K, Heldal M, Norland S, Purdie DA, Knap AH (2002) Elemental C, N, and P cell content of individual bacteria collected at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. *Limnology and Oceanography* 47:1525–1530
- Gurung TB, Urabe J, Nakanishi M (1999) Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquatic Microbial Ecology* 17:27–35
- Haines KC, Guillard RRL (1974) Growth of vitamin B12-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamins B12-producing marine bacteria. *Journal of Phycology* 10:245–252
- Harrison PJ, Berges JA (2005) Marine culture media. In: *Algal culturing techniques*, Elsevier, Academic Press. Andersen Robert A.
- Heldal M, Norland S, Fagerbakke KM, Thingstad F, Bratbak G (1996) The elemental composition of bacteria: A signature of growth conditions? *Marine Pollution Bulletin* 33:3–9
- Hold GL, Smith EA, Harry Birkbeck T, Gallacher S (2001) Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC

253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 36:223–234

Hosseini Tafreshi A, Shariati M (2009) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107:14–35

Hu Q (2004) Environmental effects on cell composition. In: *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Blackwell Publishing Ltd. Amos Richmond

Imai I, Fujimaru D, Nishigaki T, Kurosaki M, Sugita H (2006) Algicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *African Journal of Marine Science* 28:319–323

Imam SH, Bard RF, Tosteson TR (1984) Specificity of marine microbial surface interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 48:833–839

Ivanova EP (2004) Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1773–1788

Ivanova EP, Bakunina IY, Sawabe T, Hayashi K, Alexeeva YV, Zhukova NV, Nicolau DV, Zvaygintseva TN, Mikhailov VV (2002) Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus Evanesens*. *Microbial Ecology* 43:242–249

Jin E, Polle JEW (2009) Carotenoid biosynthesis in *Dunaliella* (Chlorophyta). In: *The Alga Dunaliella*, Science Publishers. A. Ben-Amotz, J. E.W. Polle, D. V. Subba Rao, p 1–15

Joint I, Henriksen P, Fonnes GA, Bourne D, Thingstad TF, Riemann B (2002) Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology* 29:145–159

Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism*, New York : Academic Press. Munro, H. N., Allison J. B., p 21–123

Kaczmarek I, Ehrman JM, Bates SS, Green DH, Léger C, Harris J (2005) Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* 4:725–741

Kawafune K, Hongoh Y, Hamaji T, Nozaki H (2012) Molecular identification of rickettsial endosymbionts in the non-phagotrophic Volvocalean green algae. *PLoS ONE* 7:e31749

Kazamia E, Aldridge DC, Smith AG (2012) Synthetic ecology – A way forward for sustainable algal biofuel production? *Journal of Biotechnology* 162:163–169

- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274:1–14
- Keshtacher-Liebson E, Hadar Y, Chen Y (1995) Oligotrophic bacteria enhance algal growth under iron-deficient conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2439–2441
- Kim M-J, Jeong S-Y, Lee S-J (2008) Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*. *Journal of Applied Phycology* 20:1069–1078
- Kirchman DL (2002) The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 39:91–100
- Kleinegris D, Es M van, Janssen M, Brandenburg W, Wijffels R (2010) Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology* 22:645–649
- Klug JL (2005) Bacterial response to dissolved organic matter affects resource availability for algae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62:472–481
- Koroleff F (1983) Direct determination of ammonia in natural sea waters as indophenol blue. In: *Methods of seawater analysis*, Grassoff. p 150–157
- Lakaniemi A-M, Intihar VM, Tuovinen OH, Puhakka JA (2011) Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microbial Biotechnology* 5:69–78
- Lamers PP, Laak CCW van de, Kaasenbrood PS, Lorier J, Janssen M, Vos RCH De, Bino RJ, Wijffels RH (2010) Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering* 106:638–648
- Lancelot C (1979) Gross excretion rates of natural marine phytoplankton and heterotrophic uptake of excreted products in the southern North Sea, as determined by short-term kinetics. *Marine Ecology Progress Series* 1:179–186
- Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, Hankamer B (2012) Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends in Biotechnology* 30:198–205
- Lee Y-K (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 13:307–315
- Lee B-K, Katano T, Kitamura S-I, Oh M-J, Han M-S (2008) Monitoring of algicidal bacterium, *Alteromonas* sp. Strain A14 in its application to natural *Cochlodinium polykrikoides* blooming seawater using fluorescence in situ hybridization. *The Journal of Microbiology* 46:274–282
- Leonardi PI, Cáceres EJ (2004) Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus. *Journal of Phycology* 30:642–653

- Levy JL, Stauber JL, Wakelin SA, Jolley DF (2009) The effect of bacteria on the sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays. *Chemosphere* 74:1266–1274
- Liu J, Lewitus AJ, Brown P, Wilde SB (2008) Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton. *Harmful Algae* 7:1–10
- Loeblich LA (1982) Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 62:493–508
- Loh J, Pierson EA, Pierson III LS, Stacey G, Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 5:285–290
- Long RA, Azam F (2001) Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4975–4983
- Lyman J, Fleming RH (1940) Composition of seawater. *Journal of Marine Research* 3:134–146
- Madigan M, Martinko J (2007) *Biologie des micro-organismes Brock*, 11e édition. Pearson
- Mague TH, Friberg E, Hugues DJ, Morris I (1980) Extracellular release of carbon by marine phytoplankton ; a physiological approach. *Limnology and Oceanography* 25:262–279
- Marchetti J, Bougaran G, Dean L Le, Mégrier C, Lukomska E, Kaas R, Olivo E, Baron R, Robert R, Cadoret JP (2012) Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture* 326–329:106–115
- Mayali X, Azam F (2004) Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51:139–144
- Mendoza H, Jara A de la, Freijanes K, Carmona L, Ramos AA, Sousa Duarte V de, Serafim Varela JC (2008) Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electronic Journal of Biotechnology* 11:0–0
- Mertiri T, Chen M, Holland T, Basu AS (2011) Optical microplates for photonic high throughput screening of algal photosynthesis and biofuel production. In: 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC. IEEE, p 482–485
- Meseck SL, Smith BC, Wikfors GH, Alix JH, Kapareiko D (2007) Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. *Journal of Applied Phycology* 19:229–237
- Miller TR, Hnilicka K, Dziedzic A, Desplats P, Belas R (2004) Chemotaxis of *Silicibacter Sp.* strain TM1040 toward Dinoflagellate products. *Applied and Environmental Microbiology*

70:4692–4701

Mindl B, Sonntag B, Pernthaler J, Vrba J, Posch RP (2005) Effects of phosphorus loading on interactions of algae and bacteria: reinvestigation of the “phytoplankton– bacteria paradox” in a continuous cultivation system. *Aquatic Microbial Ecology* 38:203–213

Mishra A, Jha B (2009) Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology* 100:3382–3386

Mishra A, Kavita K, Jha B (2011) Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*. *Carbohydrate Polymers* 83:852–857

Mishra A, Mandoli A, Jha B (2008) Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:1093–1101

Mitsutani A, Yamasaki I, Kitaguchi H, Kato J, Ueno S, Ishida Y (2001) Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas sp.* strain A25 by two-dimensional electrophoresis. *Phycologia* 40:286–291

Molina Grima E, Belarbi E-H, Ación Fernández F., Robles Medina A, Chisti Y (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20:491–515

Montoya H, Olivera A (1993) *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Peru. *Hydrobiologia* 267:155–161

Morita M, Watanabe Y, Saiki H (2000) Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology and Bioengineering* 69:693–698

Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, Giovannoni SJ (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420:806

Mouget J, Dakhama A, Lavoie MC, Noüe J (1995) Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiology Ecology* 18:35–43

Mulderij G, Donk E Van, Roelofs JGM (2003) Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*. *Hydrobiologia* 491:261–271

Munn CB (2004) Symbiotic associations. In: *Marine Microbiology*, Cromwell Press. Watts A., p 167–181

Muñoz R, Guieysse B, Mattiasson B (2003) Phenanthrene biodegradation by an algal-bacterial consortium in two-phase partitioning bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:261–267

- Muñoz R, Jacinto M, Guieysse B, Mattiasson B (2005) Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal–bacterial bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:699–707
- Münster U (1993) Concentrations and fluxes of organic carbon substrates in the aquatic environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 63:243–274
- Mussnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150:51–56
- Myklestad SM (1995) Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of The Total Environment* 165:155–164
- Naik MM, Pandey A, Dubey SK (2012) Bioremediation of metals mediated by marine bacteria. In: Satyanarayana T, Johri BN (eds) *Microorganisms in Environmental Management*. Springer Netherlands, p 665–682
- Nicolas J-L, Corre S, Cochard J-C (2004) Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microbial Ecology* 48:400–413
- Nowack ECM, Podola B, Melkonian M (2005) The 96-well twin-layer system: a novel approach in the cultivation of microalgae. *Protist* 156:239–251
- Oevelen D van, Soetaert K, Middelburg JJ, Herman PMJ, Moodley L, Hamels I, Moens T, Heip CHR (2006) Carbon flows through a benthic food web: Integrating biomass, isotope and tracer data. *Journal of Marine Research* 64:453–482
- Oren A (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems* 1:2
- Park Y, Je K-W, Lee K, Jung S-E, Choi T-J (2008) Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia* 598:219–228
- Park J, Jin H-F, Lim B-R, Park K-Y, Lee K (2010) Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101:8649–8657
- Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45:11–36
- Piel J (2004) Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports* 21:519–538
- Pinhassi J, Zweifel U, Hagstrom A (1997) Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3359–3366
- Polle JEW, Tran D, Ben-Amotz A (2009) History, distribution and habitats of Algae of the genus *Dunaliella* TEODORESCO (Chlorophyceae). In: *The Alga Dunaliella*, Science

- Publishers. A. Ben-Amotz, J. E.W. Polle, D. V. Subba Rao, p 1–15
- Pujo-Pay M, Raimbault P (1994) Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology-Progress Series* 105:203–207
- Rausch de Traubenberg C, Géraud M-L, Soyer-Gobillard M-O, Emdadi D (1995) The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria: I. An ultrastructural study. *European Journal of Protistology* 31:318–326
- Rhee G-Y (1972) Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate. *Limnology and Oceanography* 17:505–514
- Rico-Mora R, Voltolina D, Villaescusa-Celaya JA (1998) Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering* 19:1–6
- Riquelme CE, Fukami K, Ishida Y (1988) Effects of bacteria on the growth of a marine diatom, *Asterionella glacialis*. *Japan Society of Microbial Ecology* 3:29–34
- Rooney-Varga JN, Giewat MW, Savin MC, Sood S, LeGresley M, Martin JL (2005) Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology* 49:163–175
- Safonova E, Kvitko KV, Iankevitch MI, Surgko LF, Afti IA, Reisser W (2004) Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia. *Engineering in Life Sciences* 4:347–353
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425
- Salomon PS, Imai I (2006) Pathogens of harmful microalgae. In: Granéli E, Turner JT (eds) *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, p 271–282
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapp M, Schwaderer AS, Wiltshire KH, Hoppe H-G, Gerdt G, Wichels A (2007) Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial Ecology* 53:683–699
- Sapp M, Wichels A, Wiltshire KH, Gerdt G (2007) Bacterial community dynamics during the winter–spring transition in the North Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 59:622–637
- Schäfer H, Abbas B, Witte H, Muyzer G (2002) Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiology Ecology* 42:25–35
- Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG (2010) Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 21:277–

286

Selje N, Brinkhoff T, Simon M (2005) Detection of abundant bacteria in the weser estuary using culture-dependent and culture-independent approaches. *Aquatic microbial ecology* 39:17–34

Shen Y, Yuan W, Pei ZJ, Wu Q, Mao E (2009) Microalgae mass production methods. *American Society of Agricultural Engineers* 52:1275–1287

Shuter BJ (1978) Size dependence of phosphorus and nitrogen subsistence quotas in unicellular microorganisms. *Limnology and Oceanography*:1248–1255

Sialve B, Bernet N, Bernard O (2009) Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances* 27:409–416

Simón-Mateo C, Depuydt S, Oliveira Manes CL De, Cnudde F, Holsters M, Goethals K, Vereecke D (2006) The phytopathogen *Rhodococcus fascians* breaks apical dominance and activates axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism. *Molecular Plant Pathology* 7:103–112

Skjelbred B, Edvardsen B, Andersen T (2012) A high-throughput method for measuring growth and loss rates in microalgal cultures. *J Appl Phycol* 24:1589–1599

Skulberg OM (2000) Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12:341–348

Sleytr UB, Messner P, Pum D, Sara M (1999) Crystalline bacterial cell surface layers (Slayers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angewandte Chemie International Edition* 38:1034–1054

Smith DC, Steward GF, Long RA, Azam F (1995) Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 42:75–97

Smith DJ, Underwood GJC (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology* 36:321–333

Snoeijers SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ, Wit PJGM De (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 106:493–506

Solorzano L (1969) Determination of ammonia in natural sea waters by the phenol-hypochlorite method. *American Society of Limnology and Oceanography* 14:799–801

Sonnenschein EC, Gärdes A, Seebah S, Torres-Monroy I, Grossart H-P, Ullrich MS (2011) Development of a genetic system for *Marinobacter adhaerens* HP15 involved in marine aggregate formation by interacting with diatom cells. *Journal of Microbiological Methods*

87:176–183

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101:87–96

Su J, Yang X, Zheng T, Hong H (2007) An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*—a PSP-producing dinoflagellate. *Journal of Microbiological Methods* 69:425–430

Su J, Yang X, Zhou Y, Zheng T (2011) Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Biological Control* 56:132–138

Subashchandrabose SR, Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances* 29:896–907

Subba Rao DV (2009) Cultivation, growth media, division rate and applications of *Dunaliella* species. In: *The Alga Dunaliella*, Science Publishers. A. Ben-Amotz, J. E.W. Polle, D. V. Subba Rao, p 1–15

Sydney EB, Sturm W, Carvalho JC de, Thomaz-Soccol V, Larroche C, Pandey A, Soccol CR (2010) Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology* 101:5892–5896

Tai V, Paulsen IT, Phillippy K, Johnson DA, Palenik B (2009) Whole-genome microarray analyses of *Synechococcus–Vibrio* interactions. *Environmental Microbiology* 11:2698–2709

Teodoresco EC (1905) Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocaceae-Polyblepharideae. *Beih Bot Zentralblatt* 18:215–232

Tezuka Y (1990) Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates. *Microbial Ecology* 19:227–238

Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ (2012) Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*

Trejo A, de-Bashan LE, Hartmann A, Hernandez J-P, Rothballer M, Schmid M, Bashan Y (2012) Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environmental and Experimental Botany* 75:65–73

Uribe P, Espejo RT (2003) Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:659–662

Vasseur C, Bougaran G, Garnier M, Hamelin J, Leboulanger C, Chevanton M Le, Mostajir B, Sialve B, Steyer J-P, Fouilland E (2012) Carbon conversion efficiency and population

dynamics of a marine algae–bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 119:79–87

Verity PG, Robertson CY, Tronzo CR, Andrews MG, Nelson JR, Sieracki ME (1992) Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnology and oceanography* 37:1434–1446

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:655–671

Vonshak A, Torzillo G (2004) Environmental stress physiology. In: *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Blackwell Publishing Ltd. Amos Richmond

Vrede K, Heldal M, Norland S, Bratbak G (2002) Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2965–2971

Walne PR (1966) Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Investigations Series II* 25

Watanabe K, Takihana N, Aoyagi H, Hanada S, Watanabe Y, Ohmura N, Saiki H, Tanaka H (2005) Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS Microbiology Ecology* 51:187–196

Weldy CS, Huesemann MH (2007) Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light Intensity. *Journal of Undergraduate Research* 7:115–122

Wolfaardt GM, Lawrence JR, Robarts RD, Caldwell DE (1994) The role of interactions, sessile growth and nutrient amendments on the degradative efficiency of a microbial consortium. *Canadian journal of microbiology* 40:331–340

Zeng X, Danquah MK, Chen XD, Lu Y (2011) Microalgae bioengineering: From CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:3252–3260





---

ANNEXE

---



## Liste des communications

### **Publication pour revue internationale à comité de lecture**

- *Screening and selection of growth-promoting bacteria for the microalgae Dunaliella.*

Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Lukomska E., Bérard J.-B., Fouilland E., Bernard O., Cadoret J.-P.

Algal Research, 2013, volume 2, issue 3, p 212-222.

- *Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae–bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion.*

Vasseur C., Bougaran G., Garnier M., Hamelin J., Leboulanger C., Le Chevanton M., Mostajir B., Sialve B., Steyer J.-P. and Fouilland E.

Bioresource Technology, 2012, volume 119 p 79-87.

### **Communications orales**

- *Selection of growth promoting bacteria for microalgae,*

Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Bérard J.-B., Fouilland E., Bernard O., Cadoret J.-P.

Young Algaeneers Symposium, Wageningen Pays-Bas, 14-16 Juin 2012.

- *Sélection de souches bactériennes d'intérêt pour la culture de microalgues,*

Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Bérard J.-B., Fouilland E., Bernard O., Cadoret J.-P.

1<sup>ères</sup> journées scientifiques de l'école doctorale VENAM, Angers, Octobre 2011.

### **Poster**

- *Sélection de souches bactériennes d'intérêt pour la culture de microalgues.*

Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Bérard J.-B., Fouilland E., Bernard O., Cadoret J.-P.

Algues : filières du future, Romainville, 2010.



# Publication Algal Research 2013

Algal Research 2 (2013) 212–222



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Algal Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/algal](http://www.elsevier.com/locate/algal)

### Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures

M. Le Chevanton<sup>a</sup>, M. Garnier<sup>a,\*</sup>, G. Bougaran<sup>a</sup>, N. Schreiber<sup>a</sup>, E. Lukomska<sup>a</sup>, J.-B. Bérard<sup>a</sup>, E. Fouilland<sup>b</sup>, O. Bernard<sup>c</sup>, J.-P. Cadoret<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues, IFREMER, rue de l'Île d'Yeu, 44300 NANTES, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'Ecologie des Systèmes Marins Côtiers, UMR 5119 ECOSYM (Université Montpellier 2, CNRS, IRD, IFREMER, Université Montpellier 1), Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral, 2 rue des chantiers, 34200 SETE, France

<sup>c</sup> Biological Control of Artificial Ecosystem, INRIA, BP093, 06902 SOPHIA-ANTIPOLIS cedex, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 30 January 2013

Received in revised form 29 March 2013

Accepted 13 May 2013

Available online 7 June 2013

##### Keywords:

Microalgae

*Dunaliella*

Bacteria

Interaction

Bacterial diversity

#### ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that bacteria influence microalgal metabolism, suggesting that the selection and characterization of growth-promoting bacteria should offer a new strategy for improving industrial algal cultivation. In the present study, 48 cultivable bacteria were isolated from marine microalgae species and identified using 16S rRNA phylogenetic analysis. The recovered bacteria were found to be members of the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) and gram-positive monophyletic clusters. To address the effect of these bacteria on the growth of *Dunaliella* sp. individually, an experimental high-throughput tool was developed to simultaneously compare replicated associations. A two-step approach was used to monitor growth rate and biomass accumulation of *Dunaliella* sp. in mixed culture with bacteria, which proved the high-throughput device to be an efficient tool for the selection of growth-promoting bacteria. Depending on the bacterial strain involved, inhibitory effects were recorded for maximal microalgal growth rate, whereas inhibitory and stimulating effects were registered on microalgal biomass accumulation and nitrogen incorporation. Organic nitrogen remineralization by *Alteromonas* sp. SY007 and *Muricauda* sp. SY244 is discussed to explain the higher biomass and ammonium incorporation of *Dunaliella* sp. obtained under nitrogen-limited conditions. These bacteria could be considered as helpers for N accumulation in *Dunaliella* sp. cells.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

There is a diverse array of current and potential applications for microalgae, which includes food, animal feed, healthcare, energy and phytoremediation [1–3]. The boom of microalgal value-adding over recent decades has drawn attention to the study of bacteria–microalgal interactions in applied algal cultivation [4,5]. Bacteria can compete with microalgae for the limited resources [6,7] or even produce toxic substances against microalgae [8], all of which can decrease culture yields. Axenic microalgae cultures appear to be too unrealistic and labor-intensive for large-scale cultivation, but the addition of selected probiotic bacteria may be beneficial to cultures of microalgae as a preventive action against an inhibiting bacterial population [9,10]. Such added bacteria may also increase microalgal growth rates, and thus enhance culture yields, through the synthesis of growth-promoting

compounds [11–13] such as vitamins, or by improving nutrient supply through remineralization of organic nitrogen excreted by microalgae [14]. The strong influence that bacteria can have on maximal growth rate and cell density of different microalgae species was demonstrated by Liu et al. by the addition of a *Bacillus* strain to microalgal cultures [15]. Aside from growth, other aspects of microalgal metabolism may be affected by bacteria such as cell size, pigment and lipid content, and variety of fatty acids, observed in the association of *Chlorella vulgaris* cells with *Azospirillum brasilense* [16], for example. In addition, toxin production [17], extracellular secretions [18] and cell aggregation [19] are all parameters that may potentially be affected in microalgae grown in association with some heterotrophic prokaryotes.

New strategies for the production of biogas through anaerobic digestion lead to a high amount of ammonium. A coupling with the production of microalgae has been suggested as an effective way to use this huge quantities of nitrogen required for microalgae-based biofuel production [20]. The proposed process results in the recycling of nitrogen and flux of ammonium back to the microalgae culture. Additionally, the use of *Dunaliella* sp. has been proposed for carbon dioxide and ammonium remediation [21], biofuel production [22] and methane production [23]. Indeed, *Dunaliella* sp. exhibits ecological valence for major

Abbreviations:  $\mu_{max}$ , maximal growth rate;  $\Delta X_{max}$ , maximal biomass increase at stationary phase; C:N, carbon:nitrogen ratio; Chl *a*, chlorophyll *a*; RAPD, random amplification of polymorphic DNA.

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 37 43 36; fax: +33 2 40 37 40 71.

E-mail address: [matthieu.garnier@ifremer.fr](mailto:matthieu.garnier@ifremer.fr) (M. Garnier).

environmental factors such as irradiance, pH, salinity and temperature: this makes them good candidates for large-scale cultivation [24] and means that they could be coupled to anaerobic digestion and nutrient recycling. However, to the best of our knowledge, the selection of growth-promoting bacteria has not been used, to date, as a method to increase the industrial production of *Dunaliella* sp.

In the present study, we focused on selecting bacteria that promote growth for *Dunaliella* sp. SAG 19.3 in a specific context: the coupling of anaerobic digestion to microalgae production. In particular, we tested the ability of bacteria to increase growth and nitrogen incorporation for this microalgae. Accordingly, ammonium-limiting conditions were used to evaluate the effects of bacteria. This study was also conducted without vitamin enrichment in order to test for bacteria ability to supply vitamins to microalgae. The first part of this research consisted of isolating and characterizing cultivable bacteria from various microalgal cultures for subsequent testing in association with *Dunaliella* sp. SAG 19.3. In a high-throughput experiment we first screened a large number of microalgae–bacteria associations for their effect on microalgae growth. Three selected bacteria strains with potential growth altering effects on *Dunaliella* sp. were further tested in a flask experiment. Results highlighted the growth altering effects on *Dunaliella* sp. SAG 19.3 and influence of these bacteria on nitrogen incorporation in microalgae.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algal strain, maintenance and purification

*Dunaliella* sp. SAG 19.3 was obtained from the culture collection of algae at the University of Goettingen (SAG) Germany, and maintained at 20 °C under continuous light with daylight fluorescent tubes (50 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Cultures were performed in sterile Erlenmeyer flasks filled with artificial seawater (ASW, salinity 35) [25] filtered at 0.22 μm and enriched with modified Walne's medium [26]. Ammonium was used as a nitrogen source (1.17 mM) and vitamins were omitted. The initial *Dunaliella* sp. culture obtained from the SAG collection will hereinafter be referred as the xenic culture.

To eliminate bacteria initially associated with *Dunaliella* sp. SAG 19.3 and to obtain axenic cultures, cells were harvested by centrifugation (500g for 3 min at 20 °C) just before the stationary phase, then transferred to a fresh Erlenmeyer flask containing enriched ASW (as described above) and a specific mix of antibiotics based on Cho et al. [27]: 1250 μg ampicillin, 250 μg gentamicin, 500 μg kanamycin, and 2500 μg neomycin were added per mL of culture. A first 7-day antibiotic treatment was conducted, followed by a 20-day batch culture without treatment. Cells were then washed with sterile seawater to eliminate remaining free bacteria and a second 7-day treatment was conducted. Absence of bacteria was verified by epifluorescence microscopy using SYBRGreen® I Stain (Lonza, USA) and by plating on Marine Agar (BD Difco™ 212185, Becton Dickinson and Company, USA). Plates were incubated for 10 days at 20 °C before observation.

### 2.2. Bacterial collection from microalgae culture: isolation and 16S rRNA analysis

Bacteria were isolated from 19 marine monospecific microalgae cultures maintained in the laboratory. Microalgae were cultivated in sterilized seawater enriched with Walne's medium at 20 °C under continuous light (50 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and isolation was performed at the early stationary phase to select bacteria that grow well together with microalgae. Free living bacteria were isolated by plating xenic microalgae culture on Marine Agar (BD Difco™ 212185, Becton Dickinson and Company, USA) at 20 °C. Isolates were cultured in liquid Marine Broth (BD Difco™ 279110, Becton Dickinson and Company, USA) and stored at –80 °C after addition of 5% Dimethyl sulfoxide (D 8779, Sigma-Aldrich, USA).

For each strain, nucleic acids were extracted by phenol/chloroform extraction followed by isopropanol precipitation [28]. Amplification of the bacterial 16S rRNA gene was performed using universal primers SAdir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') and S17 Rev (5'-GTTACC TTGTTACGACTT-3') [29]. The PCR mixture (25 μL) was composed of 100 ng DNA, 50 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1 × of GoTaq™ Buffer (GoTaq™ kit, Promega, USA) and 1.25 U of Taq Polymerase (GoTaq™ kit, Promega, USA). Amplification was carried out on a thermocycler (MyCycler, BIO-RAD) according to the following procedure: 5 min at 94 °C, then 35 cycles including 35 s at 94 °C, 1 min at 54 °C and 1 min 30 s at 72 °C, and a final step of 7 min at 72 °C. PCR products were checked on a 0.8% agarose electrophoresis gel.

The amplified lengths of DNA were then sequenced at 'Plateforme Biogenouest' (Roscoff, France, <http://www.sb-roscoff.fr/plateformes-techniques/genomique-sbr.html>) on an ABI Prism™ 3100 GA, using BigDye® Terminator v3.1 chemistry (Applied Biosystems) and the SAdir primer. Taxonomic classification was performed online with Ribosomal Database Project Classifier Version 2.5 software, hierarchical taxa assignment being based on RDP naïve Bayesian rRNA Classifier and 95% confidence threshold was selected [30]. BLAST analysis was performed on public nr database (Expect threshold 10; word size 28; Match/Mismatch Scores 1,-2) and culturable species that gave the closest sequence was used for specie identification.

### 2.3. High-throughput experiment (experiment 1)

#### 2.3.1. Optical measurement for microalgae population

Bacterial effects on *Dunaliella* sp. SAG 19.3 growth were assessed by a screening experiment (experiment 1) using microplate cultures. Because direct measurement for carbon biomass was not available in microplate wells, we first tested *in vivo* Chl *a* fluorescence (450 nm–685 nm) and OD<sub>680</sub> in order to assess microalgal biomass. The experiment aimed at defining whether either optical measurement gave reliable estimation for microalgae population in mixed culture, regardless of bacterial population. Accordingly, we mixed microalgal to bacterial suspensions in order to obtain different microalgal: bacterial concentration ratios meeting 2<sup>2\*</sup> central composite design requirement and we further measured *in vivo* Chl *a* fluorescence and OD<sub>680</sub>. Five levels were used for the respective factors (*i.e.* microalgal and bacterial concentrations) by adding so-called star-points to the simple (square) 2-level factorial design points in order to assess quadratic component (Fig. 1). Three center point replicates were added to evaluate experimental variance. The distance between center points and star-points was calculated using the axial distance  $\alpha = 1.414$ . Finally, 11 experiments were needed to incorporate this 2<sup>2\*</sup> central composite design. The general quadratic model fitted to the data is given in Eq. (1).

$$R = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \varepsilon \quad (1)$$

where  $\beta_0$ ,  $\beta_{ij}$ , and  $\beta_{ii}$  are model coefficients,  $X_i$  the main effect for the factor  $i$ ,  $X_{ij}$  the interaction between the factors  $i$  and  $j$ ,  $X_i^2$  the quadratic effect of the factor  $i$ ,  $\varepsilon$  the residual error and  $R$  the response (either *in vivo* Chl *a* fluorescence or OD<sub>680</sub>). Here,  $X_1$  was chosen for microalgal concentration and  $X_2$  for bacterial concentration.

An axenic culture of *Dunaliella* sp. was grown on enriched ASW. Bacteria (strain SY183) were grown on Marine Broth for 48 h at 20 °C, then centrifuged (10,000g, 5 min, 20 °C) to remove growth medium and resuspended in ASW. By mixing the axenic microalgal culture to the bacterial suspension, we were able to achieve different microalgae and bacterial concentration in 96-wells microplate, as shown in Fig. 1. *In vivo* Chl *a* fluorescence (wavelength: excitation = 450 nm, emission = 685 nm) and OD<sub>680</sub> were measured in mixed cultures with a TECAN (Mannedorf Switzerland) spectrofluorometer.

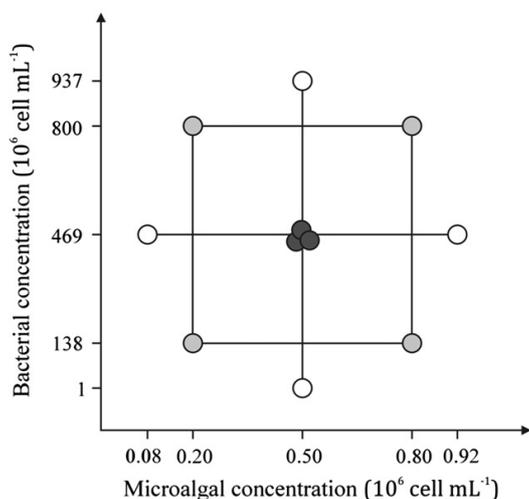


Fig. 1. Microalgal and bacterial concentrations tested in mixed suspensions during the central composite experiments. Light gray dots represent experiments for the 2-level factorial design. Dark gray dots represent experiments at the center of the experimental domain, used to compute experimental variance. Distance between star-points (white dots) and the center of the experimental domain was calculated using the axial distance  $\alpha = 1.414$ . Measurements for  $DO_{680}$  and *in-vivo* Chl *a* fluorescence were made for the 11 experiments.

### 2.3.2. Experimental culture

A specific high-throughput experimental set-up was devised to allow the use of three microplates to perform mixed cultures with replicates under homogenous conditions of irradiance and temperature. The device consists of an illuminating plate with 10 fluorescent tubes (OSRAM L13W/954). A PMMA diffusion plate is placed on the illuminating plate. The three clear-bottom microplates are then placed above. We tested a diversity of microplate and, ultimately, special 96 well black microplates (Costar® 3615, Corning®, USA) were chosen with clear bottoms made of 60% thinner polystyrene than standard, resulting in lower background fluorescence readings. To prevent contamination, wells were sealed with adhesive film (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems®, USA) selected for its additional protection against evaporation, which can reach as much as 85% in 11 days when using some other tissue culture films. Irradiance and temperature were measured using a Li-Cor LI193 quantum scalar meter and a LM 35DZ sensor, respectively. The small size of the two sensors allowed measuring parameters inside the wells filled with ASW. This set-up provided a mean irradiance of  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and irradiance field homogeneity with a 5.3% coefficient of variation ( $n = 117$ ). Temperature was set at  $19.4^\circ\text{C}$ , while temperature variation between wells, estimated by the coefficient of variation, was 2.3% ( $n = 38$ ). Cultures were performed statically. Prior to readings with Tecan, cultures were homogenized by automatic shaking.

To start the experiment, bacterial strains were precultured in Marine Broth for 48 h at  $20^\circ\text{C}$ . Bacterial cells were then harvested by centrifugation at  $3000g$  for 5 min at  $20^\circ\text{C}$ . Associations with the axenic culture of *Dunaliella* sp. were made-up at the initial ratio of around 10 bacterial cells per microalgal cell, with a concentration of *Dunaliella* sp. cells of  $2 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$  in both the axenic and mixed cultures. The culture medium consisted of ASW enriched with Walne's medium without vitamins and modified for nitrogen. To test bacteria for their ability to remineralize nitrogen, cultures were grown under nitrogen limitation, with the addition of ammonium to obtain a nitrogen concentration of  $547.8 \mu\text{M}$ , resulting in a molar nitrogen:phosphorus ratio of 3.3:1. Since the adhesive film was not permeable to gas, carbon limitation was prevented by adding 10 mM of  $\text{NaHCO}_3$ .

Growth of microalgae was monitored by *in vivo* Chl *a* fluorescence (wavelength: excitation = 450 nm, emission = 685 nm, TECAN Mannedorf Switzerland). Three measurements per day were performed during the first 17 days and one or two measurements per day until day 20. Testing for bacterial contamination was done on Marine Agar plates at the end of the experiment.

### 2.4. Flask cultures (experiment 2)

#### 2.4.1. Bacterial quotas

Preliminary microscopic observations revealed that bacterial size and shape were different for the three bacterial strains SY003, SY007 and SY244. We recorded that more than 95% of bacteria cells in mixed cultures were retained on precombusted GF/C filters. In order to evaluate the contribution of bacteria to total particulate C and N recovered on GF/C filters, we assessed carbon ( $Q_C$ ) and nitrogen ( $Q_N$ ) quotas for the three bacterial strains tested: bacterial cultures were incubated in Marine Broth medium for 48 h at  $20^\circ\text{C}$  and 300 rpm. After centrifugation ( $10,000g$ , 5 min,  $20^\circ\text{C}$ ), cells were resuspended in fresh ASW and cell concentration was assessed by cytometer (BD Accuri Cytometer). Bacterial particulates N and C were estimated: a given volume of cell suspension was filtered in triplicate on precombusted 25 mm GF/C filters (Whatman,  $1.2 \mu\text{m}$ ). Filters were then dried for 24 h at  $70^\circ\text{C}$  and further analyzed using a CN Elemental Analyzer (Flash 2000, ThermoScientific). Since all bacterial strains in the xenic culture could not be cultivable in Marine Broth medium, we estimated mean quotas from cell volume (as assessed from microscopic observations). Indeed, these bacteria demonstrated size and shape very similar to that observed for SY003. We therefore considered same quotas for SY003 and bacteria in the xenic culture.

#### 2.4.2. Experimental culture

Following the screening in experiment 1, three microalgae-bacteria associations and the initial xenic and axenic cultures were selected for further comparative investigation (experiment 2). The axenic culture was considered as the control. Algae-bacteria associations were maintained for several months at  $20^\circ\text{C}$  before experiment 2, with successive batch cultures on enriched ASW under a continuous irradiance of  $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cells were harvested to eliminate residual nutrients, and then transferred into flasks. Triplicate cultures were conducted in sterile 1 L-glass flasks with a supply of  $0.22 \mu\text{m}$  filtered air (Midisart, Sartorius). We specifically paid attention to reproduce culture conditions as close as possible to that in experiment 1 in order to readily compare results. The medium used was similar to that for experiment 1 (N source, N:P ratio,  $\text{NaHCO}_3$  enrichment, no vitamins added). Temperature was set at  $20^\circ\text{C}$  and irradiance was set to a higher level ( $250 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) than in experiment 1 to compensate for the higher optical path length in flasks.

Cultures were sampled daily for microalgae cell density and cell size, as measured with a HIAC cell counter (Hach Ultra, USA). Cell biovolume was computed from mean cell diameter under the assumption of a spherical shape for *Dunaliella* sp. Total particulates C and N were also estimated as previously described for bacteria (see 2.4.1). Microalgal N and C recovered on GF/C filters were then calculated as the difference between total particulate and bacterial N and C. Finally, N incorporation was computed as the percentage of initial  $\text{N-NH}_4$  enrichment ( $547.8 \mu\text{M}$ ) incorporated in microalgae cells at stationary phase.

In order to validate N starvation at the end of the experiments, cultures were re-enriched with  $547.8 \mu\text{mol}$  of ammonium, and the biomass increase was verified over the following days.

The density of bacterial cells was measured by cytometric analysis at the beginning of the experiment, during the growth phase and at the stationary phase. The bacterial population was identified by cytometer (BD Accuri Cytometer) after coloration with SYBRGreen.

Bacteria to microalgae ratio (B:A, cell:cell) was calculated from cytometric data for bacteria and from HIAC data for algae.

Absence of bacterial contamination at the end of the experiment was assessed by RAPD analysis on randomly selected strains after isolation on Marine Agar plates. Extraction and PCR reactions were performed using the same mixture as described above. Analyses were applied twice with Amersham® RAPD Analysis Primer 1 (5'-GGTGCGGAA-3') and 4 (5'-AAGAGCCCGT-3'). The cycling program was as follows: 5 min at 94 °C, 45 cycles including 1 min at 94 °C, 1 min at 36 °C and 2 min at 72 °C. PCR products were separated on 2% TAE agarose gels and the profiles obtained were compared to the original bacterial reference strain from the collection. RAPD analyses were produced with the Bionumerics software (V6.01) by using a band-based similarity index.

### 2.5. Estimation of growth and statistics

Maximal growth rate,  $\mu_{\max}$  ( $\text{d}^{-1}$ ) of *Dunaliella* sp. was computed according to Eq. (1) from the linear part of the ln-transformed growth curve:

$$\mu_{\max} = \frac{\Delta \ln X}{\Delta t} \quad (2)$$

where  $X$  is either Chl  $a$  fluorescence (experiment 1) or particulate carbon (experiment 2) during the exponential growth phase and  $t$  is time in days. Since bacterial carbon contributed to a low level to total particulate carbon recovered on GF/C filters, microalgae  $\mu_{\max}$  could be computed from total particulate carbon data in experiment 2.

Maximal biomass increase  $\Delta X_{\max}$  of *Dunaliella* sp. was computed at stationary phase according to Eq. (2):

$$\Delta X_{\max} = X_f - X_i \quad (3)$$

where  $X_f$  and  $X_i$  are either Chl  $a$  fluorescence (experiment 1) or particulate carbon (experiment 2), respectively at the stationary phase and at the beginning of the culture.

Since  $\Delta X_{\max}$  was computed from fluorescence readings in experiment 1 and from particulate carbon in experiment 2, comparison for  $\Delta X_{\max}$  between the two experiments was performed after normalization according to Eq. (3):

$$\Delta X_{\max}^{\text{norm}} = \frac{\Delta X_{\max} - \overline{\Delta X}_{\max}}{\sigma} \quad (4)$$

where  $\overline{\Delta X}_{\max}$  is mean maximal biomass increase and  $\sigma$  is standard deviation in experiment.

Statistical analyses were performed with Statgraphics® software for the factorial design approach and R software (GNU project) elsewhere. Since experiments 1 and 2 involved only triplicate cultures, results are expressed hereafter as median and interquartile range (IQR) rather than mean and standard error. In experiment 2, effects of bacteria on microalgal parameters were tested using the Kruskal–Wallis test ( $\alpha = 5\%$ ). The comparison of growth parameters computed from the two experiments was carried out using Spearman's rank correlation coefficient ( $\alpha = 5\%$ ).

## 3. Results

### 3.1. Purification of *Dunaliella* sp. SAG 19.3 culture

An axenic culture of *Dunaliella* sp. strain SAG 19.3 was obtained successively to the repeated antibiotic treatment. No cultivable bacteria were observed on the Marine Agar plates inoculated with samples of this algal culture. In addition, before the use of this *Dunaliella* sp. culture for experiments, absence of uncultivable strains was systematically verified by epifluorescence microscopy after SYBRGreen staining.

### 3.2. Bacterial collection

Forty-eight strains of bacteria were isolated from 19 microalgae species, of which 71% were acquired from diatoms. In the collection, analysis for partial 16S rRNA revealed that 37 strains were gram-negative, of which 8 belong to *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) including 2 sphingobacteria and 6 flavobacteria, 17 to *Alphaproteobacteria* and 12 to *Gammaproteobacteria*. Eleven strains were gram-positive including 10 *Actinobacteria* and one *Bacilli* (Table 1).

### 3.3. High-throughput selection (experiment 1)

#### 3.3.1. Optical measurement for microalgae population

The factorial approach used to compare OD<sub>680</sub> to fluorescence as proxies for microalgae population resulted in both models explaining more than 99% of the variability observed on data. Both OD<sub>680</sub> and fluorescence were significantly ( $\alpha = 0.01$ ) and positively related to microalgal concentration (Table 2). For  $\alpha = 0.01$ , neither quadratic effects nor interaction between microalgae and bacterial concentration were found significant for both measurements. However, as shown in Table 2, OD<sub>680</sub> readings increased with bacterial concentration, while fluorescence was not significantly affected.

#### 3.3.2. Effect of bacteria on maximal growth rate

High-throughput experiment was carried out for 20 days, until all cultures have reached stationary phase. Bacterial isolation on Marine Agar plates confirmed that no contamination occurred at the beginning or the end of the experiment in mixed or axenic cultures. Maximal growth rate ( $\mu_{\max}$ ) of *Dunaliella* sp. ranged from 0.23  $\text{d}^{-1}$  to 0.36  $\text{d}^{-1}$  depending on bacterial association, with 0.36  $\text{d}^{-1}$  (0.01) for the axenic control (Fig. 2). Addition of bacteria to *Dunaliella* sp. cultures mostly resulted in slight negative effects on  $\mu_{\max}$ , although some other bacterial strains did not alter microalgae  $\mu_{\max}$ . No bacterial enhancement of growth rate was observed in this experiment. The growth-inhibiting bacteria were broadly distributed across taxonomic groups (Fig. 2; Table 1). The strongest negative effect (−36%) was obtained for the xenic *Dunaliella* sp. culture. Interestingly, 3 bacterial strains isolated from this xenic culture (*Rhodococcus fascians* SY001, SY002 and *Dietzia* sp. SY250) resulted in negative effects (−18%, −11% and −22%, respectively) when tested individually. *Muricauda* sp. strain SY244 isolated from *Thalassiosira* sp., resulted in a 22% decrease in *Dunaliella* sp. growth rate. Another *Muricauda* strain (SY186) also had an inhibitory effect on  $\mu_{\max}$  (−18%). The addition of certain strains resulted in lesser reductions in  $\mu_{\max}$ , such as with *Halomonas* sp. SY003 (−12%) and *Alteromonas* sp. SY007 (−7%).

Fourteen strains exhibited  $\mu_{\max}$  close to the control, such as the strains affiliated to *Arthrobacter* sp. SY004 and to *Bacillus foraminis* SY097, for example (Fig. 2).

#### 3.3.3. Effect of bacteria on maximal biomass increase

Maximal biomass increase ( $\Delta X_{\max}$ ) measured at stationary phase was more strongly altered by bacterial addition than  $\mu_{\max}$  (Fig. 2). Effects ranged from −57% to +26% and were mainly negative. The strongest negative effect (−57%) was observed for the xenic *Dunaliella* sp. culture. Strains SY001 and SY002 isolated from the xenic culture and affiliated with *R. fascians* also decreased  $\Delta X_{\max}$  with strong effects (−42% and −44%).

Twenty-one bacterial strains resulted in  $\Delta X_{\max}$  close to that of the axenic control (Fig. 3). However,  $\Delta X_{\max}$  was enhanced by 22% and 26% when *Dunaliella* sp. was associated with bacteria SY007 and SY244 affiliated to *Alteromonas* sp. and *Muricauda* sp., respectively. These bacteria were isolated from diatom cultures: *Thalassiosira* sp. for the *Alteromonas* sp. SY007, and *Phaeodactylum tricornutum* for the *Muricauda* sp. SY244.

**Table 1**  
Bacterial collection isolated from microalgae cultures.

Strain	Origin	Partial 16S rRNA sequence ID	Class	Family	Blast results
SY022	<i>Sketetonema costatum</i>	HE589500	Sphingobacteria	Cyclobacteriaceae	<i>Cytophaga</i> sp.
SY049	<i>Rhodella violacea</i>	HE589505		Cyclobacteriaceae	<i>Cytophaga</i> sp.
SY010	<i>Odontella aurita</i>	HE589497	Flavobacteria	Flavobacteriaceae	<i>Flexithrix</i> sp.
SY121	<i>Odontella aurita</i>	HE589507		Flavobacteriaceae	<i>Flexithrix</i> sp.
SY088	<i>Emiliana huxleyi</i>	HE589506		Flavobacteriaceae	<i>Maribacter</i> sp.
SY221	<i>Chaetoceros</i> sp.	HE589511		Flavobacteriaceae	<i>Maribacter</i> sp.
SY186	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589509		Flavobacteriaceae	<i>Muricauda</i> sp.
SY244	<i>Thalassiosira</i> sp.	HE589517		Flavobacteriaceae	<i>Muricauda</i> sp.
SY097	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	HE995401	Bacilli	Bacillaceae 1	<i>Bacillus foraminis</i>
SY233	<i>Thalassiosira pseudomona</i>	HE589528	Actinobacteria	Intrasporangiaceae	<i>Janibacter limosus</i>
SY234	<i>Thalassiosira pseudomona</i>	HE589529		Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i> sp.
SY004	<i>Isochrysis galbana</i>	HE589520		Micrococcineae	<i>Arthrobacter</i> sp.
SY240	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	HE589530		Micrococcineae	<i>Micrococcus</i> sp.
SY241	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	HE589531		Micrococcineae	<i>Micrococcus</i> sp.
SY208	<i>Chaetoceros gracilis</i>	HE589525		Nocardiaceae	<i>Actinobacter</i> sp.
SY001	<i>Dunaliella</i> sp.	HE589518		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus fascians</i>
SY002	<i>Dunaliella</i> sp.	HE589519		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus fascians</i>
SY090	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589522		Dietziaceae	<i>Dietzia mari</i>
SY250	<i>Dunaliella</i> sp.	HE589534		Dietziaceae	<i>Dietzia</i> sp.
SY086	<i>Rhodomonas salina</i>	HE589541	Alphaproteobacteria	Rhodospirillaceae	<i>Thalassospira</i> sp.
SY093	<i>Rhodomonas salina</i>	HE589542		Rhodospirillaceae	<i>Thalassospira xianheensis</i>
SY180	<i>Skeletonema marinoi</i>	HE589555		Rhodospirillaceae	<i>Nisaea</i> sp.
SY127	<i>Nannochloris</i> sp.	HE995403		Erythrobacteraceae	<i>Citromicrobium</i> sp.
SY183	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589556		Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i> sp.
SY148	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589550		Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i> sp.
SY191	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589558		Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea</i> sp.
SY228	<i>Chaetoceros reptans</i>	HE589562		Rhodobacteraceae	<i>Stappia</i> sp.
SY052	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589538		Rhodobacteraceae	<i>Haematobacter massiliensis</i>
SY133	<i>Skeletonema marinoi</i>	HE589545		Rhodobacteraceae	<i>Roseobacter</i> sp.
SY029	<i>Odontella aurita</i>	HE589537		Rhodobacteraceae	<i>Thalassococcus</i> sp.
SY245	<i>Chaetoceros gracilis</i>	HE589563		Rhodobacteraceae	<i>Sulfobacter</i> sp.
SY143	<i>Emiliana huxleyi</i>	HE589548		Rhodobacteraceae	<i>Roseobacteraceae</i>
SY255	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	HE589564		Rhodobacteraceae	<i>Roseobacteraceae</i>
SY118	<i>Nannochloris</i> sp.	HE995402		Hyphomonadaceae	<i>Hyphomonas</i> sp.
SY145	<i>Chaetoceros</i> sp.	HE589549		Hyphomonadaceae	<i>Algimonas</i> sp.
SY196	<i>Chaetoceros</i> sp.	HE589559		Hyphomonadaceae	<i>Algimonas</i> sp.
SY007	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	HE589567	Gammaproteobacteria	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i> sp.
SY102	<i>Odontella aurita</i>	HE589577		Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.
SY182	<i>Nannochloris</i> sp.	HE995404		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
SY003	<i>Odontella aurita</i>	HE589565		Halomonadaceae	<i>Halomonas</i> sp.
SY213	<i>Emiliana huxleyi</i>	HE589587		Halomonadaceae	<i>Halomonas</i> sp.
SY135	<i>Chaetoceros minus</i>	HE589581		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>
SY171	<i>Chaetoceros minus</i>	HE589584		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>
SY185	<i>Chaetoceros minus</i>	HE589585		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>
SY032	<i>Odontella aurita</i>	HE589572		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter</i> sp.
SY089	<i>Skeletonema marinoi</i>	HE589576		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter</i> sp.
SY106	<i>Chaetoceros pumilum</i>	HE589578		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter</i> sp.
SY260	<i>Thalassiosira</i> sp.	HE589591		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter</i> sp.

### 3.4. Flask cultures (experiment 2)

Following experiment 1, three bacterial strains were selected for the different alteration pattern they brought about in *Dunaliella* sp. *Alteromonas* sp. SY007 and *Muricauda* sp. SY244 were selected for their enhancing effect on *Dunaliella* sp. maximal biomass increase ( $\Delta X_{\max}$ ) at the stationary phase (Fig. 3). *Halomonas* sp. SY003 was also selected as an example of a  $\Delta X_{\max}$ -inhibiting bacteria. These three mixed cultures were compared to the control axenic strain and to the original xenic strain SAG19.3.

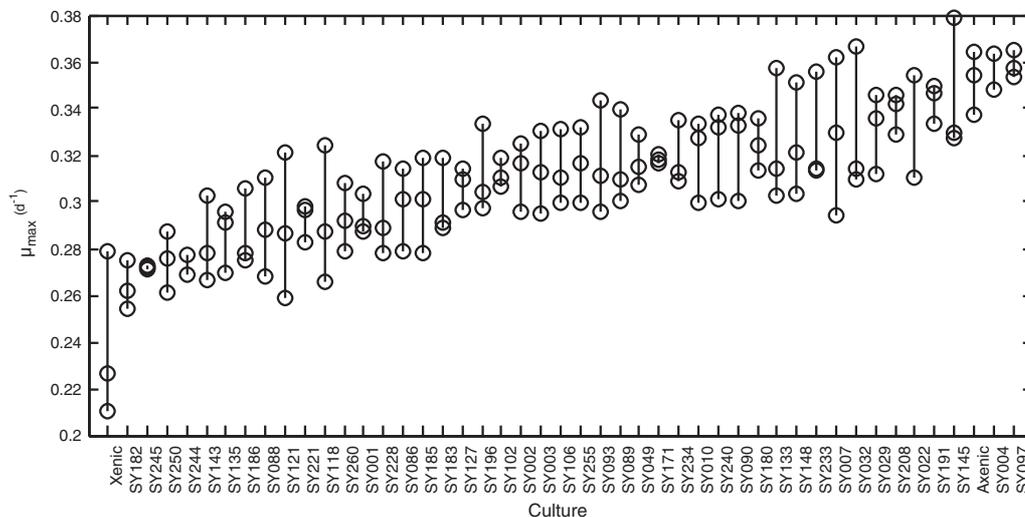
#### 3.4.1. Bacterial populations

First of all, no bacterial contamination was observed on Marine Agar plates along the course of experiment. Cytometry analysis confirmed these results since we observed no events corresponding to bacteria in the axenic cultures, and only one uniform bacterial population on cytograms for mixed cultures. RAPD profile analyses of bacteria isolated at the end of the experiment 2 showed 100% similarity with the corresponding reference bacterial strain (Fig. 4), regardless of the primer used (RAPD1 or RAPD4). Similarity was lower (90%) only for *Halomonas* SY003 C1 strain isolated from flask F1, when

**Table 2**

ANOVA table resulting from the factorial design approach used for comparison of OD<sub>680</sub> to fluorescence as proxy for microalgal population in mixed culture. Significant P values ( $\alpha = 0.01$ ) are given in bold. (+) and (–) symbols depict positive or negative effects for the corresponding factor. A stands for microalgae concentration, B for bacterial concentration, AA and BB for the corresponding quadratic effects and AB for interaction.

	A	B	AA	BB	AB	R <sup>2</sup> (%)
OD <sub>680</sub>	<b>0.0003</b> (+)	<b>0.0000</b> (+)	0.4271 (–)	0.1432 (–)	0.0985 (+)	99.88
Fluorescence	<b>0.0006</b> (+)	0.0277 (–)	0.0223 (–)	0.9183 (–)	0.1790 (–)	99.62



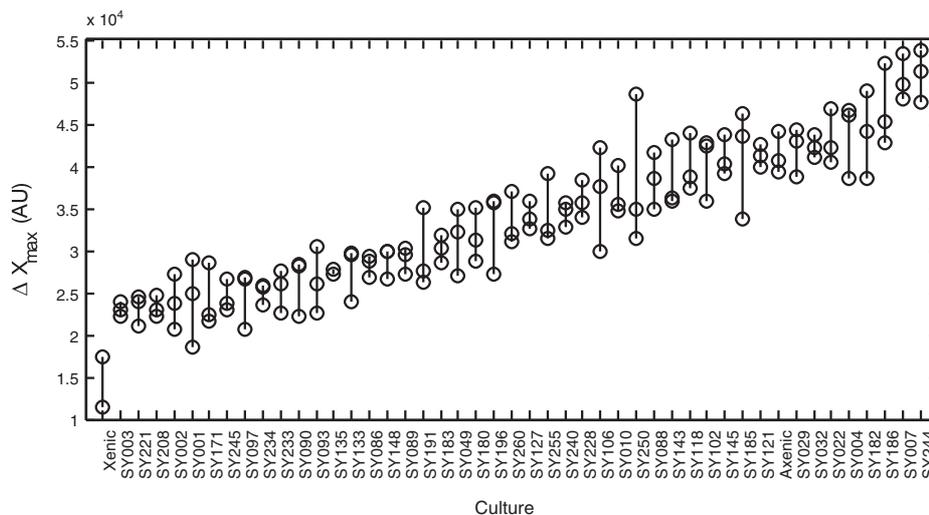
**Fig. 2.** Maximal growth rate ( $\mu_{max}$ ) for *Dunaliella* sp. SAG 19.3, calculated in the high-throughput experiment (experiment 1) for axenic, xenic or mixed cultures with different bacterial strains assayed individually. For each culture, raw data for the three replicates are connected by a vertical line to facilitate reading. Reference numbers in the collection are given on the X-axis.

RAPD1 was used, but was 100% with RAPD4. Considering the high sensitivity of the technique, we concluded that bacterial strains at the end of experiment 2 were similar to that inoculated.

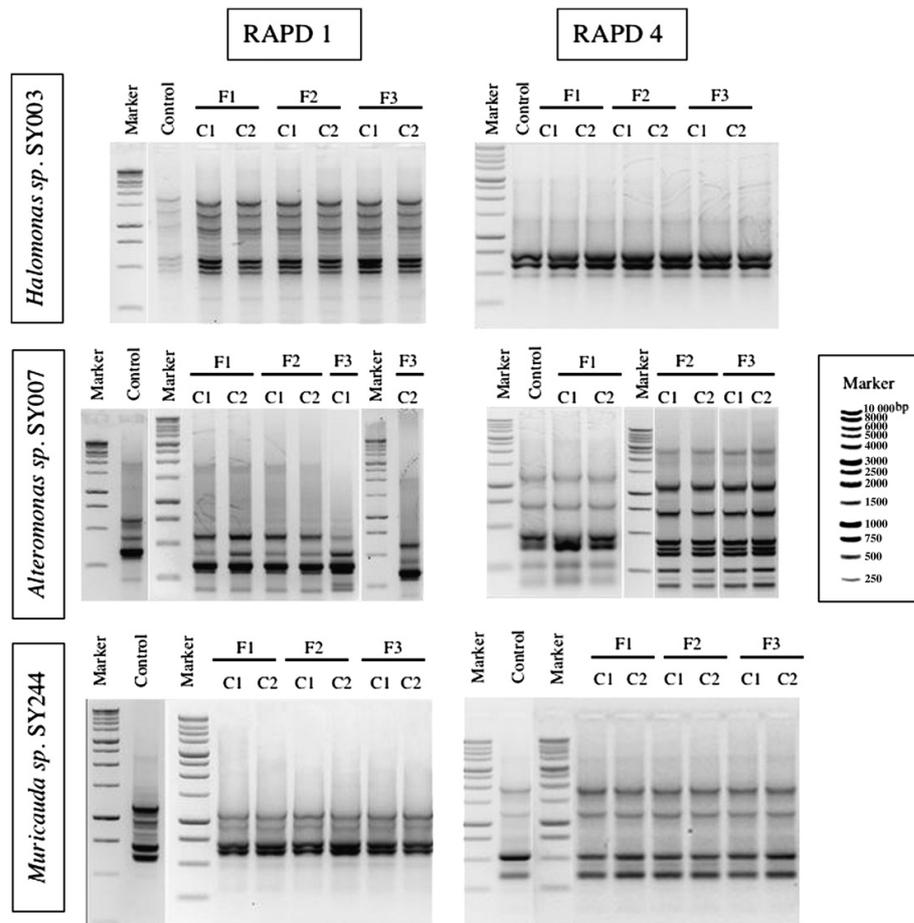
The bacterial population, estimated at  $t_0$ ,  $t_5$  and  $t_{10}$  by cytometry analysis, developed in all mixed cultures (Fig. 5B). The highest bacterial cell density was recorded in the mixed culture SY003. At the stationary phase, the bacteria to microalgae ratio (B:A, cell:cell) in this culture was also particularly high: 777 bacteria cells per algae. Differences were observed at the stationary phase in B:A for strains SY007 and SY244, being 39 for SY007 and only 8 for SY244. Finally, the lowest bacteria increase and B:A level, 2 bacteria per algae, was recorded in the xenic cultures of *Dunaliella* sp. Epifluorescence microscopy

observations after SYBRGreen dyeing revealed that, for all mixed cultures, bacteria cells were free in the medium and not attached to the surface of living algal cells.

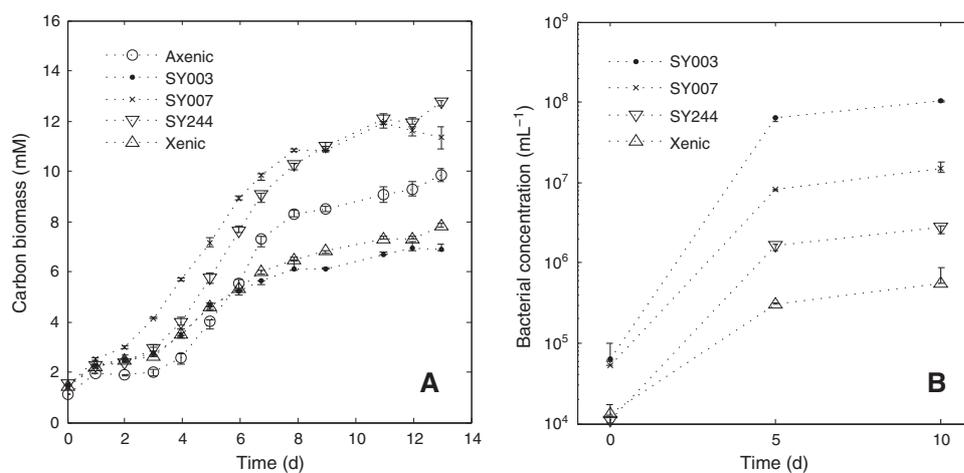
Nitrogen ( $Q_N$ ) and carbon ( $Q_C$ ) cell quotas measured for the three bacterial strains are presented in Table 3. From quotas and bacterial cell population data, we could compute bacterial contribution to total particulate N and C recovered on GF/C filters. It followed that bacterial carbon represented less than 4% of total particulate carbon in all mixed cultures, except for SY003 where it was 10% of total particulate carbon. Bacteria contributed to higher level of total particulate N, bacterial N being as high as 34% for SY003 and 15% for SY007 (Table 3).



**Fig. 3.** Maximal biomass increase ( $\Delta X_{max}$ ) for *Dunaliella* sp. SAG 19.3 estimated in the high-throughput experiment (experiment 1) for axenic, xenic or mixed cultures with different bacterial strains assayed individually. For each culture, raw data for the three replicates are connected by a vertical line to facilitate reading. Reference numbers in the collection are given on the X-axis.



**Fig. 4.** RAPD-PCR profiles for isolates from flask mixed cultures SY003, SY007 and SY244 (experiment 2) compared with the relevant SY003, SY007 and SY244 controls from the collection. Results were obtained with the two primers RAPD 1 and RAPD 4. Two bacteria colonies (C1 and C2) were analyzed for the three replicated flasks (F1, F2 and F3).



**Fig. 5.** A) Particulate carbon growth curves in flask cultures (experiment 2) for axenic, xenic strains and mixed cultures (SY003, SY007 and SY244). B) Bacterial concentration in mixed cultures at the beginning of the experiment and after 5 and 10 days of culture.

### 3.4.2. Microalgae growth

As already mentioned above, contribution of bacteria to total particulate carbon was low in mixed cultures. Therefore we assumed that total particulate carbon recovered on GF/C filters was a suitable proxy for microalgal carbon and in the following, we further compare microalgae growth computed from total particulate carbon data.

Growth of *Dunaliella* sp. in flasks was very sensitive to the bacterial strain added in the culture, as illustrated in Fig. 5A by the different growth curves recorded during experiment 2. Microalgae  $\mu_{\max}$  computed on a per-carbon basis in experiment 2 (Table 4) were very similar to those computed from *in vivo* Chl *a* fluorescence in experiment 1. Indeed, a positive correlation ( $\rho = 0.91$ ; P value = 0.042; slope = 1.0) was found for  $\mu_{\max}$  recorded in the two experiments. As previously observed in the high-throughput experiment, the addition of bacteria to the cultures did not result in an enhancing effect for  $\mu_{\max}$  when compared with the axenic cultures of *Dunaliella* sp. (Table 4). The lowest  $\mu_{\max}$  was observed in xenic cultures and when *Halomonas* sp. SY003 and *Muricauda* sp. SY244 were added to cultures. Interestingly, no significant difference with the axenic control was obtained when *Dunaliella* sp. was associated to *Alteromonas* sp. SY007.

At the stationary phase in experiment 2, bacterial addition resulted in altered  $\Delta X_{\max}$  for *Dunaliella* sp. Again, results recorded in experiment 2 were similar to those of experiment 1 and a positive correlation ( $\rho = 0.95$ ; P value = 0.042; slope = 1.0) was obtained for normalized  $\Delta X_{\max}$  between the two experiments. The lowest  $\Delta X_{\max}$  was observed in experiment 2 for xenic cultures (–25%) and when *Halomonas* sp. SY003 (–33%) was associated with *Dunaliella* sp. (Table 4). In addition, similar enhancing effects were observed in mixed cultures SY007 (+31%) and SY244 (+35%). These two bacteria significantly increased carbon accumulation in microalgae cultures compared with the axenic control and, more strongly, when compared to the original SAG 19.3 xenic strain.

Microalgae cell size was also significantly affected by bacterial addition. We were able to compute biovolume of microalgae cells (Table 4) on the basis of Hiac data, assuming a spherical shape for *Dunaliella* sp. We found a positive correlation ( $\rho = 0.98$ ; P value = 0.003) between biovolume and carbon quota in microalgae. We recorded high microalgal biovolume for SY244 and the axenic cultures, while cells in the xenic cultures were significantly smaller.

### 3.4.3. Nitrogen incorporation

In order to estimate nitrogen incorporation in microalgae, we corrected total particulate N for bacterial N. Indeed, we found that bacterial N could contribute to high level to total particulate N recovered on GF/C filters (up to 34% at stationary phase for SY003). From data of bacterial N quota and bacterial population we could subtract bacterial N to total particulate N and estimate N incorporation for microalgae. At the stationary phase, the resulting microalgal C:N (Table 4) was high (22.8 to 29.6) for the different cultures, compared to the C:N ratio recorded at  $\mu_{\max}$  (C:N = 6, data not shown).

**Table 3**

Shape, quotas and contribution for bacteria to particulate C and N recovered on GF/C filters. For each column, the values presented are median and interquartile range (IQR) in brackets.

Shape	Xenic	SY003	SY007	SY244
	Cocci	Cocci	Bacilli	Bacilli
Q <sub>C</sub> (fmol C.cell <sup>-1</sup> )	6.4* (0.3)	6.4 (0.3)	27.7 (4.7)	18.3 (0.3)
Q <sub>N</sub> (fmol N.cell <sup>-1</sup> )	1.3* (0.1)	1.3 (0.1)	5.1 (0.9)	3.6 (0.1)
% of particulate C	0.05 (0.05)	9.6 (0.2)	3.6 (1.2)	0.41 (0.2)
% of particulate N	0.2 (0.2)	33.8 (0.9)	14.6 (5.1)	2.1 (0.81)

\* On the basis of microscopic observation, same quotas were considered for bacteria in the xenic cultures and for SY003.

It followed that bacterial addition significantly altered N incorporation for *Dunaliella* sp. (Table 4). The lowest N incorporation in microalgae was obtained in SY003 cultures (19%) while axenic (26%) and xenic (34%) demonstrated intermediate N incorporation. In mixed cultures with *Muricauda* sp. SY244 and *Alteromonas* sp. SY007, N incorporation was significantly enhanced up to 56% of the initial N enrichment.

## 4. Discussion

### 4.1. Microalgae culture-based bacterial collection

Isolation of bacteria from a diversity of monospecific microalgal cultures provided a bacterial collection of 48 strains. Since these bacteria strains developed in microalgae cultures without organic carbon supplementation, we suspected that they were able to grow on the organic carbon released by microalgae. This suggested interactions between bacteria and *Dunaliella* sp. A high bacterial diversity with low redundancy was recorded. Indeed, bacterial strains isolated from different microalgal cultures were mostly different, with the strains well distributed among four phylogenetic clusters:  $\alpha$ - and  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* and gram-positive mainly affiliated to *Actinobacteria*. This study aimed at providing a bacterial collection for further interaction studies and did not encompass an ecological scope since only dominant and cultivable bacteria were recovered from microalgal cultures. However, it should be noted that we isolated and identified bacterial groups that were previously observed elsewhere, following isolation of bacteria from microalgae cultures in hatcheries [31] and in bacterioplankton communities [32–34]. No members of the  $\beta$ -*Proteobacteria* were recovered from this collection, although this cluster has been recorded in several ecological studies [35,36]. Again, this absence could result from the experimental set-up, as only dominant cultivable bacteria were considered here. In addition, the marine origin of this bacterial cluster has been debated in previous studies [37,38].

### 4.2. Methodological aspects

#### 4.2.1. High-throughput selection of growth-promoting bacteria

Most of the previous studies conducted on interactions between microalgae and bacteria have been carried out in Erlenmeyer or larger flasks [12,39]. However, these culture volumes are not suitable for the screening of a large number of species at once. Therefore, we developed a specific experimental device based on microplates. Similar tools have been previously used to assess growth for microalgae [40]. However, in this study, we had to face specific constraints, including the presence of bacteria that can affect optical measurements for microalgae concentration and bacterial cross-contamination between wells. With the use of the impermeable film together with NaHCO<sub>3</sub> addition in culture medium we were able to prevent cross-contaminations between wells and carbon limitation in the absence of gas exchange. The novelty of this setup consists in the possibility to screen microalgal and bacterial mixed cultures and to evaluate associated yields thanks to the selection of adapted materials, controlled environmental parameters (temperature, light, contamination, evaporation) and the use of fluorescence to monitor microalgae growth without bacteria population disturbance.

Unlike OD<sub>680</sub> measurement, fluorescence (450 nm–685 nm) was insensitive to bacteria concentration (Table 2) and could be seen as a reliable proxy for microalgae population assessment in microplate. Additionally, comparison between microplate and flask experiments revealed similar trends for both growth parameters, as illustrated by the Spearman's rank correlation coefficients found here. These results confirmed that indirect measurements for microalgae growth using *in-vivo* fluorescence gave consistent results with direct measurements for microalgal particulate carbon.

**Table 4**

Physiological results for *Dunaliella* sp. in experiment 2, including growth parameters ( $\mu_{\max}$  and  $\Delta X_{\max}$ ) computed on a per carbon basis, cell biovolume, carbon quota, computed C:N ratio, and nitrogen incorporation. *Dunaliella* sp. was cultivated in different conditions: xenic and axenic strains and associated with the selected bacteria SY003, SY007 and SY244. For each column, the values presented are median and interquartile range (IQR) in brackets. Values with the same superscript letters are not statistically different (Kruskal–Wallis test;  $\alpha = 5\%$ ).

	Axenic	SY003	SY007	SY244	Xenic	P value
$\mu_{\max}$ ( $d^{-1}$ )	0.36 <sup>a</sup> (0.05)	0.26 <sup>b</sup> (0.05)	0.33 <sup>a</sup> (0.01)	0.27 <sup>b</sup> (0.01)	0.22 <sup>b</sup> (0.01)	0.018 (n = 3)
$\Delta X_{\max}$ (mM)	8.0 <sup>a</sup> (0.5)	5.4 <sup>b</sup> (0.5)	10.5 <sup>c</sup> (0.3)	10.8 <sup>c</sup> (0.5)	6.0 <sup>d</sup> (0.3)	2.2 $10^{-5}$ (n = 6)
Cell biovolume ( $\mu m^3$ )	384 <sup>a</sup> (15)	350 <sup>b</sup> (15)	337 <sup>c</sup> (8)	411 <sup>d</sup> (21)	285 <sup>e</sup> (16)	3.8 $10^{-7}$ (n = 9)
Q <sub>C</sub> (pmol C.cell <sup>-1</sup> )	20.6 <sup>a</sup> (0.6)	19.6 <sup>b</sup> (0.6)	17.2 <sup>c</sup> (0.9)	22.4 <sup>d</sup> (1.0)	14.7 <sup>e</sup> (0.9)	3.6 $10^{-8}$ (n = 9)
C:N	29.6 <sup>a</sup> (1.4)	24.4 <sup>b</sup> (1.3)	24.1 <sup>bc</sup> (2.4)	25.6 <sup>d</sup> (0.5)	22.8 <sup>e</sup> (1.7)	8.9 $10^{-7}$ (n = 9)
N incorporation (%)	26 <sup>a</sup> (9)	19 <sup>b</sup> (2)	56 <sup>c</sup> (3)	56 <sup>c</sup> (4)	34 <sup>d</sup> (5)	6.91 $10^{-7}$ (n = 9)

The high correlation coefficient mentioned above for both growth parameters in the two experiments also suggested that the low culture volume (300  $\mu L$ ) in microplate, combined with the use of impermeable adhesive film, is a reliable culture system for *Dunaliella* sp. By paying particular attention to light and temperature variability between plates and wells, we managed to reduce the coefficient of variation (CV) to 5.3% and 2.3%, respectively. As a consequence, we recorded only low variability between culture replicates, particularly for growth rate. Finally, the high throughput technique confirmed to be a time-saving approach since set-up of experiment can be achieved within hours easily and fluorescence reading is fast enough to allow several readings per day. Together, these benefits may afford the use of a higher number of replicates to even increase system reliability. As such, the proposed high-throughput device proved to be an efficient tool to qualitatively assay the effect of a high number of bacterial strains on microalgal growth.

#### 4.2.2. Assessment of compartmentation between microalgae and bacteria

In experiment 2, the use of GF/C filters did not allow to separate microalgae from bacteria. Hence, in order to estimate N and C incorporation in microalgae, we first measured bacterial N and C quotas with pure bacterial cultures, as already reported elsewhere [41]. We did not have evidence for growth capacity on Marine Broth of all bacteria strains found in the xenic culture. Hence, we could not reliably measure quotas for these bacteria. However, bacteria strains in the xenic culture and SY003 exhibited similar shape and size and we considered C and N quotas similar to that for SY003 (Table 3). We point out that since bacterial population remained low in the xenic culture (see Fig. 5B), bacteria contributed to a very low level to N and C recovered on GF/C filters (Table 4), irrespective of the assumption for quotas. We then subtracted the bacterial compartment from total particular matter recovered on filters to compute microalgae N and C. This approach resulted in high C:N for microalgae at stationary phase in mixed and axenic cultures, a result in accordance with the Droop quota theory [42] that N-limited microalgae cells stop growth at a given maximum C:N. By the way, this result and the good correlation found between microalgae biovolume and Q<sub>C</sub>, also supported our approach for microalgae N and C computation. Finally, the high C:N recorded here was in accordance with N limitation for microalgae at stationary phase as assessed by N re-supplementation at the end of the experiment.

#### 4.3. Effect of bacteria on growth of *Dunaliella* sp.

The high-throughput experiment (experiment 1) was designed so as to rapidly focus on microalgae–bacteria associations altering growth performance for *Dunaliella* sp., that could be further characterized in the successive flask experiment. The experiment resulted in a number of inhibition and/or promotion effects (Figs. 2 and 3) on *Dunaliella* sp.  $\mu_{\max}$  and  $\Delta X_{\max}$ . Most of the 48 bacterial strains tested in experiment 1 negatively affected microalgal  $\Delta X_{\max}$  and  $\mu_{\max}$ . However, effect on microalgal growth rate was only slight compared to the wide range we recorded for  $\Delta X_{\max}$ . Since cultures were grown without

vitamin supplementation, we expected that some associations could result in increased microalgae  $\mu_{\max}$ . Yet, we did not record any microalgal  $\mu_{\max}$  improvement, demonstrating that synthesis of growth-promoting compounds [11–13] by bacteria did not occur or was not efficient. Finally, we were unable to find connection between bacterial taxonomic position and effect on *Dunaliella* sp. growth. However, as pointed out by Mayali and Azam [43] for algicidal bacteria, the question of metabolic properties common to broad bacterial taxa remains largely unanswered.

In experiment 2, we focused on three bacterial strains that produced various effects on microalgae  $\mu_{\max}$ , while altering  $\Delta X_{\max}$ : *Alteromonas* sp. SY007, *Muricauda* sp. SY244 and *Halomonas* sp. SY003; effects that were recorded with the bacterial strains in experiment 1 were confirmed in the flask experiment for both  $\mu_{\max}$  and  $\Delta X_{\max}$ . Assumptions for the underlying mechanisms are discussed in the following.

It is well known that bacteria can modify microalgal growth by affecting either growth rate or biomass accumulation. Maximal growth rate of microalgae is likely to be affected by bacterial population, possibly with an enhancing effect, as previously observed in the literature [39,44], but not in this study. Several authors have demonstrated that the negative effects of bacteria on  $\mu_{\max}$  are the result of the excretion of toxic bacterial compounds; this issue has been frequently addressed in studies dealing with the impact of algicidal bacteria on algal blooms [43,45,46]. Several bacterial genera (*Cytophaga*, *Dietzia*, *Janibacter*, *Micrococcus*, *Pseudoalteromonas*) referenced in our collection that led to decreased  $\mu_{\max}$  for *Dunaliella* sp. in culture, have been precisely described as algicidal bacteria in the literature [47,48].

Bacterial effects on biomass accumulation at the stationary phase have also been previously reported in the literature [49,50]. Mouget et al. observed a strong increase (+50%) in maximal cell density for *Scenedesmus bicellularis* associated with a *Brevundimonas diminuta* strain [51]. Tai et al. suggested the occurrence of *Vibrio* species in ammonium production, supporting *Synechococcus* sp. growth [14]. Besides, it is well known that nitrogen excretion occurs during microalgae batch culture [52]. Since nitrogen-limited conditions were used in this study, it was assumed that nitrogen remineralization of organic nitrogen released by microalgae occurred in cultures where *Alteromonas* sp. SY007 and *Muricauda* sp. SY244 were added. Bacterial remineralization of extracellular organic matter, originating from algal cells death and/or algal organic excretion, could provide ammonium and delay nitrogen starvation for *Dunaliella* sp. Indeed mineralization of microalgal organic N is well documented in the presence of bacteria [53–55]. Brussaard et al. [56] demonstrated that bacteria reduced death rates of N-starved *Ditylum brightwellii* and the authors assumed that mineralized ammonium was probably partly utilized by microalgal cells. Furthermore, they pointed out that, under N-limited conditions, both bacteria and microalgae could benefit from each other. Our hypothesis is strengthened by the higher N incorporation in *Dunaliella* sp. cells when mixed with one of the two bacterial strains, as compared with the axenic control. With the same nitrogen supply in the medium at the beginning of the experiment for all cultures, a higher amount of mineral nitrogen is available for microalgae growth thanks to algal organic matter recycling

by bacteria. We consequently obtained a higher algal biomass reached at the stationary phase, compared to the axenic control. From these results, bacteria SY007 and SY244 could be considered as helpers for N assimilation for *Dunaliella* sp. cells. However, there is a need for further experiments with measurements for dissolved inorganic and organic nitrogen and microalgal particulate nitrogen to test this assumption.

Bacterial strains can also decrease  $\Delta X_{\max}$  of microalgae by competing for a limiting nutrient. Such an effect has been previously reported by Meseck et al. for nitrogen, and by Rhee and Danger et al. for phosphorus [7,50,57]. Alternatively, release of toxic compounds by bacteria could also be involved in the inhibitory effect observed at the stationary phase [49,58]. We assumed that the low microalgal biomass accumulation recorded for SY003 cultures could result from competition between bacteria and microalgae for the limited nitrogen. Indeed, the latter hypothesis was supported, since high bacterial concentration occurred at stationary phase in SY003 cultures, with 24% of the supplemented N incorporated in bacterial cells, while N incorporation in microalgae (19%) was lower than that recorded in axenic cultures (26%).

Xenic cultures exhibited significantly lower  $\mu_{\max}$  and  $\Delta X_{\max}$  than axenic cultures in both experiments. *R. fascians* (SY001 and SY002) and *Dietzia* sp. (SY250) isolated from the xenic culture of *Dunaliella* sp. SAG 19.3 and assayed individually also depressed microalgal growth performance. Interestingly, we identified *R. fascians* strains in the xenic culture that had been previously described by Simón-Mateo et al. as a phytopathogenic bacteria involved in gall formation [59]. In addition, *Dietzia* bacteria are also known as algicidal bacteria [48]. This result highlights the usefulness of testing bacterial populations in microalgal cultures. Indeed, at the industrial scale where axenic conditions can hardly be attainable, especially in open culture systems, sustainable association of microalgae with selected bacteria could improve performance for microalgal culture.

Interactions between bacteria and microalgae are complex mechanisms and may result in different pattern depending on conditions and protagonists involved in. Indeed, our results highlighted that interactions between microalgae and bacteria are highly species specific. This was already pointed out by Brussaard et al. who suggested that “species-specific differences in the response of nutrient deficient phytoplankton to the presence of bacteria do exist” [56]. Culture conditions can also substantially affect the outcome of interactions in mixed cultures, since they may affect composition and rates of algal exudation. Hence, it is suspected that the outcome of mixed cultures under N-limited conditions would differ depending on batch or continuous culture mode as well as microalgal growth rate. Additionally, environmental factors such as temperature can affect microalgal organic N remineralization rates [53,54]. Finally, we also suspect that initial microalgae:bacteria ratio is another central issue in mixed culture and may turn symbiosis into competition for the mineral N resource: high ratios would favor competition for the mineral N resource, while low ratios could result in higher N availability for microalgae, as reported here for SY244 and SY007.

## 5. Conclusion

A specific microplate-based experimental design was developed to screen bacteria–*Dunaliella* sp. associations and to select microalgal growth-promoting bacteria. From the comparison of results in a flask experiment, it was concluded that the experimental device was a powerful tool for high-throughput examination of the bacterial effect on microalgal growth. Two bacteria strains affiliated to *Alteromonas* sp. and *Muricauda* sp. particularly enhanced biomass accumulation for *Dunaliella* sp. A strong increase was also recorded in N incorporation, which suggested that N availability for microalgae was affected by these bacteria. Further research is needed for a precise assessment of the underlying mechanisms of these interactions. Nevertheless, the results of the present study suggest that culture performance can be

substantially modified by bacteria, resulting in increased culture productivity, which is of particular interest for industrial production.

## Acknowledgements

This publication presents research results supported by the ANR BIOE 2008 Symbiose Project (<http://anr-symbiose.org/?q=en/node/83>). We would like to thank the Bureau de Traduction de l'Université de l'UBO, Brest, France, for improving the English.

## References

- [1] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert, Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2006) 87–96.
- [2] E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F. Acien Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnology Advances* 20 (2003) 491–515.
- [3] J. Park, H.-F. Jin, B.-R. Lim, K.-Y. Park, K. Lee, Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101 (2010) 8649–8657.
- [4] S.R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu, Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential, *Biotechnology Advances* 29 (2011) 896–907.
- [5] E. Fouilland, Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11 (2012) 1–4.
- [6] I. Joint, P. Henriksen, G.A. Fonnes, D. Bourne, T.F. Thingstad, B. Riemann, Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms, *Aquatic Microbial Ecology* 29 (2002) 145–159.
- [7] G.-Y. Rhee, Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate, *Limnology and Oceanography* 17 (1972) 505–514.
- [8] X. Mayali, G.J. Doucette, Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis* (Dinophyceae), *Harmful Algae* 1 (2002) 277–293.
- [9] L. Verschuere, G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete, Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (2000) 655–671.
- [10] R.E. Avendaño, C.E. Riquelme, Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae, *Aquaculture Research* 30 (2001) 893–900.
- [11] J.J. Cole, Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystem, *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 13 (1982) 291–314.
- [12] Y. Park, K.-W. Je, K. Lee, S.-E. Jung, T.-J. Choi, Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga, *Hydrobiologia* 598 (2008) 219–228.
- [13] M.T. Croft, A.D. Lawrence, E. Raux-Deery, M.J. Warren, A.G. Smith, Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria, *Nature* 438 (2005) 90–93.
- [14] V. Tai, I.T. Paulsen, K. Phillipy, D.A. Johnson, B. Palenik, Whole-genome microarray analyses of *Synechococcus–Vibrio* interactions, *Environmental Microbiology* 11 (2009) 2698–2709.
- [15] J. Liu, A.J. Lewitus, P. Brown, S.B. Wilde, Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton, *Harmful Algae* 7 (2008) 1–10.
- [16] L.E. De-Bashan, Y. Bashan, M. Moreno, V.K. Lebsky, J.J. Bustillos, Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*, *Canadian Journal of Microbiology* 48 (2002) 514–521.
- [17] G.J. Doucette, Interactions between bacteria and harmful algae: a review, *Natural Toxins* 3 (1995) 65–74.
- [18] H.P. Grossart, M. Simon, Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics, *Aquatic Microbial Ecology* 47 (2007) 163–176.
- [19] A. Gardes, M.H. Iversen, H.-P. Grossart, U. Passow, M.S. Ullrich, Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*, *ISME Journal* 5 (2011) 436–445.
- [20] B. Sialve, N. Bernet, O. Bernard, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, *Biotechnology Advances* 27 (2009) 409–416.
- [21] M. Giordano, Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO<sub>2</sub> and high N concentrations, *Journal of Plant Physiology* 158 (2001) 577–581.
- [22] C.S. Weldy, M.H. Huesemann, Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity, *Journal of Undergraduate Research VII* (2007) 115–122. (Medium: X).
- [23] J.H. Mussnug, V. Klassen, A. Schlüter, O. Kruse, Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, *Journal of Biotechnology* 150 (2010) 51–56.
- [24] A. Ben-Amotz, J.E.W. Polle, D.V.S. Rao, The Alga *Dunaliella*: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology, Science Publishers, U.S., 2009.
- [25] J. Lyman, R.H. Fleming, Composition of seawater, *Journal of Marine Research* 3 (1940) 134–146.
- [26] P.R. Walne, Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Investigations, Series II* 25 (1966).

- [27] J.-Y. Cho, J.-S. Choi, I.-S. Kong, S.-I. Park, R.G. Kerr, Y.-K. Hong, A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures, *Journal of Applied Phycology* 14 (2002) 385–390.
- [28] M. Garnier, Y. Labreuche, J.-L. Nicolas, Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuvarius* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*, *Systematic and Applied Microbiology* 31 (2008) 358–365.
- [29] J. Brosius, M.L. Palmer, P.J. Kennedy, H.F. Noller, Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, *PNAS* 75 (1978) 4801–4805.
- [30] Q. Wang, G.M. Garrity, J.M. Tiedje, J.R. Cole, Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007) 5261–5267.
- [31] J.-L. Nicolas, S. Corre, J.-C. Cochard, Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery, *Microbial Ecology* 48 (2004) 400–413.
- [32] B.C. Crump, E.V. Armbrust, J.A. Baross, Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 3192–3204.
- [33] D.H. Green, L.E. Llewellyn, A.P. Negri, S.I. Blackburn, C.J.S. Bolch, Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, *FEMS Microbiology Ecology* 47 (2004) 345–357.
- [34] M. Sapp, A. Wichels, K.H. Wiltshire, G. Gerdt, Bacterial community dynamics during the winter–spring transition in the North Sea, *FEMS Microbiology Ecology* 59 (2007) 622–637.
- [35] J. Pinhasi, U. Zweifel, A. Hagstrom, Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997) 3359–3366.
- [36] N. Bano, J.T. Hollibaugh, Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class proteobacteria in the Arctic ocean, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 1960–1969.
- [37] H. Schäfer, B. Abbas, H. Witte, G. Muyzer, Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms, *FEMS Microbiology Ecology* 42 (2002) 25–35.
- [38] D.L. Kirchman, The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments, *FEMS Microbiology Ecology* 39 (2002) 91–100.
- [39] K. Watanabe, N. Takihana, H. Aoyagi, S. Hanada, Y. Watanabe, N. Ohmura, H. Saiki, H. Tanaka, Symbiotic association in *Chlorella* culture, *FEMS Microbiology Ecology* 51 (2005) 187–196.
- [40] B. Skjelbred, B. Edvardsen, T. Andersen, A high-throughput method for measuring growth and loss rates in microalgal cultures, *Journal of Applied Phycology* 24 (2012) 1589–1599.
- [41] K. Kogure, I. Koike, Particle counter determination of bacterial biomass in seawater, *Applied and Environmental Microbiology* 53 (1987) 274–277.
- [42] M.R. Droop, Vitamin B12 and marine ecology IV the kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*, *Journal of Marine Biology* 48 (1968) 689–733.
- [43] X. Mayali, F. Azam, Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms 1, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51 (2004) 139–144.
- [44] Hirayama Suminto, Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae, *Hydrobiologia* 358 (1997) 223–230.
- [45] P.S. Salomon, I. Imai, Pathogens of harmful microalgae, in: E. Granéli, J.T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*, Springer, Berlin Heidelberg, 2006, pp. 271–282.
- [46] A.M. Amaro, M.S. Fuentes, S.R. Ogalde, J.A. Venegas, B.A. Suarez-Isa, Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (2005) 191–200.
- [47] I. Imai, D. Fujimaru, T. Nishigaki, M. Kurosaki, H. Sugita, Algicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan, *African Journal of Marine Science* 28 (2006) 319–323.
- [48] M.-J. Kim, S.-Y. Jeong, S.-J. Lee, Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*, *Journal of Applied Phycology* 20 (2008) 1069–1078.
- [49] K. Fukami, T. Nishijima, Y. Ishida, Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae, *Hydrobiologia* 358 (1997) 185–191.
- [50] M. Danger, J. Leflaive, C. Oumarou, L. Ten-Hage, G. Lacroix, Control of phytoplankton-bacteria interactions by stoichiometric constraints, *Oikos* 116 (2007) 1079–1086.
- [51] J. Mouget, A. Dakhama, M.C. Lavoie, J. Noûe, Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiology Ecology* 18 (1995) 35–43.
- [52] M. Pujo-Pay, P. Raimbault, Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters, *Marine Ecology-Progress Series* 105 (1994) 203–207.
- [53] A. Kamatani, Regeneration of inorganic nutrients from diatom decomposition, *Journal of the Oceanographical Society of Japan* 25 (1969) 63–74.
- [54] J.H. Garber, Laboratory study of nitrogen and phosphorus remineralization during the decomposition of coastal plankton and seston, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 18 (1984) 685–702.
- [55] Y. Tezuka, Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates, *Microbial Ecology* 19 (1990) 227–238.
- [56] C.P.D. Brussaard, R. Brookes, A.A.M. Noordeloos, R. Riegman, Recovery of nitrogen-starved cultures of the diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae) upon nitrogen resupply, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 227 (1998) 237–250.
- [57] S.L. Meseck, B.C. Smith, G.H. Wikfors, J.H. Alix, D. Kapareiko, Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes, *Journal of Applied Phycology* 19 (2007) 229–237.
- [58] A. Mitsutani, I. Yamasaki, H. Kitaguchi, J. Kato, S. Ueno, Y. Ishida, Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis, *Phycologia* 40 (2001) 286–291.
- [59] C. Simón-Mateo, S. Depuydt, C.L. De Oliveira Manes, F. Cnudde, M. Holsters, K. Goethals, D. Vereecke, The phytopathogen *Rhodococcus fascians* breaks apical dominance and activates axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism, *Molecular Plant Pathology* 7 (2006) 103–112.

## RÉSUMÉ

Interactions microalgues-bactéries en système expérimental bispécifique : effets sur la croissance de *Dunaliella sp.*

L'utilisation de cultures mixtes algues-bactéries a été suggérée pour améliorer les performances des cultures industrielles de microalgues. La présente étude s'attache à étudier l'impact de bactéries sélectionnées sur la croissance de la microalgue *Dunaliella sp.* A cette fin, 97 souches de bactéries ont été isolées à partir de cultures de microalgues marines. La diversité des souches fait apparaître des représentants des  $\alpha$ -et  $\gamma$ -protéobactéries, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* et gram-positives. Une approche en deux phases a ensuite été mise en oeuvre pour sélectionner des bactéries favorisant la croissance de *Dunaliella sp.*, à l'aide d'un dispositif original de crible à haut débit. Bien qu'une majorité de bactéries induise une réduction des performances de *Dunaliella sp.*, certaines conduisent à des améliorations sensibles. En batch limité par l'azote, la bactérie *Alteromonas sp.* possède un effet promoteur sur la biomasse algale et le rendement d'azote. L'hypothèse d'une reminéralisation par la bactérie, de l'azote organique relargué par *Dunaliella sp.* est émise pour expliquer ces meilleurs rendements. Au contraire, en culture continue, le comportement observé laisse supposer une compétition de la bactérie pour l'azote limitant. L'apparente contradiction entre les expériences peut être associée aux variations d'équilibre entre les deux populations et les nutriments disponibles. Ces résultats révèlent le potentiel des cultures mixtes pour améliorer les productions de *Dunaliella sp.* Ils soulignent également la complexité des phénomènes sous-jacents et la nécessité de travaux complémentaires avant d'envisager un transfert vers les productions industrielles.

Mots clés : Interactions, microalgues, bactéries, *Dunaliella*, Axénie

## ABSTRACT

Microalgae-bacteria interactions in bi-specific experimental system : effects on *Dunaliella sp.* growth

The use of algae-bacteria mixed culture has been suggested to improve performance of industrial microalgae culture. The present study aims to investigate impact of selected bacteria on *Dunaliella sp.* growth. 97 bacteria strains were isolated from a variety of marine microalgae cultures. The diversity of strains revealed members of  $\alpha$ -and  $\gamma$ -proteobacteria, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* and gram-positive. A two-phase approach was then implemented to select bacteria that improve *Dunaliella sp.* growth, using an original high-throughput experimental device. Although a majority of bacteria induced performance reduction for *Dunaliella sp.*, some resulted in significant improvements. In nitrogen-limited batch culture, the *Alteromonas sp.* bacteria demonstrated a promoting effect on algal biomass accumulation and nitrogen yield. We assumed that higher culture yields were related to remineralization by *Alteromonas sp.* of organic nitrogen released by *Dunaliella sp.* Conversely, in continuous culture, results suggested competition of bacteria for the limiting nitrogen. The apparent conflicting results between experiments may be related to balance between microalgae and bacteria populations and remaining nutrients. These results point out the potential of mixed cultures to improve *Dunaliella sp.* production. They also highlight complexity of underlying phenomena and the need for further work before considering application to industrial *Dunaliella sp.* production.

Keywords : Interactions, microalgae, bacteria, *Dunaliella*, Axenic