

Culture d'une souche *Chlorella* en photolithotrophie : suivi de croissance, masse sèche des cellules, taille des cellules

1. Présentation, travail à réaliser

Les algues unicellulaires du genre *Chlorella* sont des algues de la lignée verte (présence des chlorophylles a et b dans des chloroplastes ayant pour origine l'endosymbiose plastique primaire, comme les plantes vertes classiques). Les *Chlorella* sont photolithotrophes autotrophes (photosynthèse végétale avec photolyse de l'eau et assimilation du CO_2) mais peuvent aussi cultiver en chimioorganotrophie avec carbone hétérotrophie.

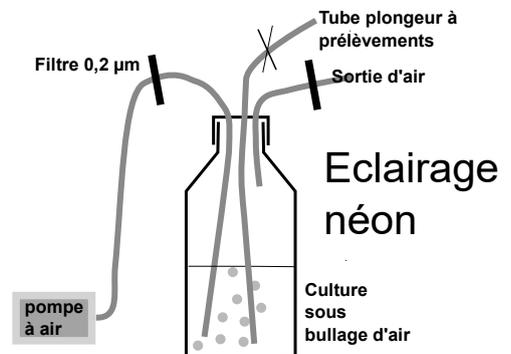
Chez de nombreuses espèces de chlorelles, la littérature scientifique décrit la reproduction asexuée suivante : En croissance chaque cellule, isolée, grandit (devient une « grosse cellule ») et réalise 2 mitoses successives qui conduisent à 4 cellules filles non séparées. Puis ces cellules nouvellement formées se séparent en « petites cellules » isolées (souvent appelées autospores) qui vont grandir en « grosses cellules » (le volume sera multiplié 4) puis entreront mitose¹ ...

Il s'agit de cultiver une souche de chlorelles en conditions de photolithotrophie pour :

- estimer le temps de génération de la micro-algue ;
- estimer les dimensions des cellules ;
- mesurer la masse moyenne sèche d'une cellule ;
- évaluer la relation atténuation (OD, optical density)/ biomasse sèche.

2. Souche disponible, mise en culture

- Souche *Chlorella vulgaris* utex 265 (origine : don de l'Algothèque, Unité Ecosystèmes et Interactions Toxiques, Muséum National d'Histoire Naturelle Paris). Cette souche a été localement rendue axénique par traitement aux antibiotiques et isolements successifs. La souche est disponible en culture sur milieu BG11 agarosé.
- Repiquer sur milieu neuf selon le schéma ci-dessous. Cultiver à 20-25°C, éclairage néon lumière du jour (24h/jour), bullage d'air à débit constant, maintien du niveau de milieu à l'eau distillée stérile.



3. Paramètres à mesurer

3.1 Temps de génération

Voir annexe 1. Mesurer la concentration en biomasse par atténuation (densité optique, OD) au spectrophotomètre à 570 nm toute les 48 à 72 heures. Limite de linéarité vers 0,6.

Choisir une période convenable pour évaluer le temps de génération.

3.2 Dimension des cellules

Par observation microscopique avec oculaire gradué disponible et étalonnage à l'aide d'une lame micrométrique.

3.3 Relation [biomasse sèche]/OD et masse sèche moyenne d'une cellule

Voir annexe 2.

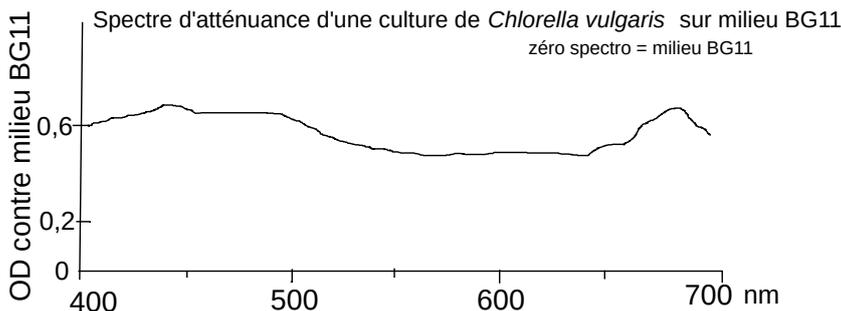
Récupérer les cellules d'un volume connu de culture de trouble connu (par exemple 90 mL avec une OD vers 0,2 à 0,6). Centrifuger et laver 2 fois à l'eau distillée puis peser après dessiccation à 105 °C jusqu'à masse constante (ne pas oublier de pré peser le récipient de séchage ...). Calculer la relation [cellules]=f(OD) grâce à la mesure d'atténuation à 570 nm et au comptage en chambre de numération (type Malassez, sur une dilution convenable).

4. Conseils pour le compte-rendu

- Analyse de composition du milieu de culture.
- Données expérimentales recueillies et analysées. Attention à bien relever le calendrier des mesures qui vont s'étaler sur plus de 2 semaines.
- Justification du choix de 570 nm comme longueur d'onde pour les mesures de biomasse par « densité optique ».
- Choix de la période pour le calcul du temps de génération.

1 Wikipedia, article chlorella, mentionne 2 à 3 mitoses et donc 2 à 8 autospores libérées par la cellule parentale.

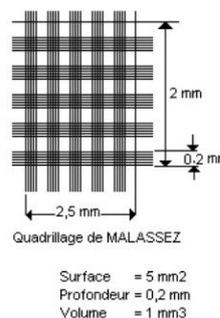
Annexe 1



Des mesures à 570 nm sur des dilutions (diluant = BG11) de la culture ont montré que l'atténuation (OD) était proportionnelle au facteur de dilution. Pour la culture de départ OD₅₇₀ est à 0,5 environ.

Annexe 2 : cellule de Malassez pour numération

La lamelle étant correctement positionnée, prélever un petit volume de suspension à dénombrer avec une pipette adaptée, remplir par capillarité (toucher soigneusement le côté de la lamelle couvre-objet avec la pointe de la pipette et laisser la chambre se remplir par capillarité) ou grâce à la pointe très fine de la pipette utilisée. Ne pas sur-remplir ou sous-remplir.



Composition du milieu BG11 :

Pour croissance photolithotrophe

9 solutions stocks (autoclavage 121°C)		Masse (g) pour 1 L
1	NaNO ₃	15.0
2	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4.0
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.60
5	Acide Citrique	0.60
6	Ammonium Ferric Citrate	0.60
7	EDTA (Na ₂ , Mg ²⁺)	0.10
8	Na ₂ CO ₃	2.0
9	Trace metal solution :	
	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
	Zn SO ₄ ·7H ₂ O	0.22
	Na ₂ MOO ₄ ·2H ₂ O	0.39
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
	CO(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.05

Pour Préparer 1 litre de BG11

N° sol.stock	Volume (mL) pour 1L
1	100
2	10
3	10
4	10
5	10
6	10
7	10
8	10
9	1

Qsp 1L, ajuster à pH 7,1 , autoclaver 121 °C

Note : la charge en acide citrique/citrate qui permet la solubilisation par complexation de métaux est très très faible (<10 mg/L) et ne peut pas permettre une croissance chimiorganotrophe détectable.

Bibliographie / Remerciements

Souche aimablement fournie M. Yéprémian du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris. Merci pour les conseils pratiques.