

Sélection de souches bactériennes d'intérêt pour la culture de microalgues

Le Chevanton^{*1} M., Bougaran¹ G., Garnier¹ M., Schreiber¹ N., Bérard¹ J-B., Kaas, R., Saint Jean¹ B., Fouilland² E., Cadoret¹ J-P.

¹Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues, IFREMER, rue de l'Île d'Yeu BP21105 44311 Nantes cedex 3.
²ECOLAG, Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, Université de Montpellier II, 34095 Montpellier cedex 5.

Introduction

Le projet **Symbiose** se propose d'étudier et d'optimiser le recyclage biologique de dioxyde de carbone en méthane valorisable en énergie. Une des originalités réside en l'utilisation d'une culture mixte microalgues-bactéries aérobies pour améliorer le rendement de conversion du dioxyde de carbone en méthane. En effet, des études ont déjà décrit une amélioration des taux de croissance ou des effets sur la production de réserves carbonées chez des microalgues mises en présence d'une flore bactérienne particulière. Cependant, la nature des interactions entre ces deux types de microorganismes étant espèce dépendante, le choix des espèces bactériennes est une étape déterminante de l'étude.



Objectifs

Il faut pouvoir tester le potentiel d'associations microalgues-bactéries aérobies à l'aide d'un outil permettant de:

- *réaliser un maximum de cultures mixtes simultanément.
- *suivre la croissance de la population algale.



Collection bactérienne du laboratoire PBA

Les souches bactériennes cultivables référencées dans la collection proviennent principalement de différentes cultures de microalgues présentes dans la souchothèque du laboratoire PBA. Quelques spécimens ont pu être isolés à partir d'échantillons d'écosystèmes naturels des microalgues étudiées pour le projet **Symbiose**.

Une analyse phylogénétique de l'ADNr16S a permis de montrer une diversité microbienne spécifique des microalgues (Figure 1). Les espèces appartiennent aux groupes des Gram +, α et γ Protéobactéries et Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides.

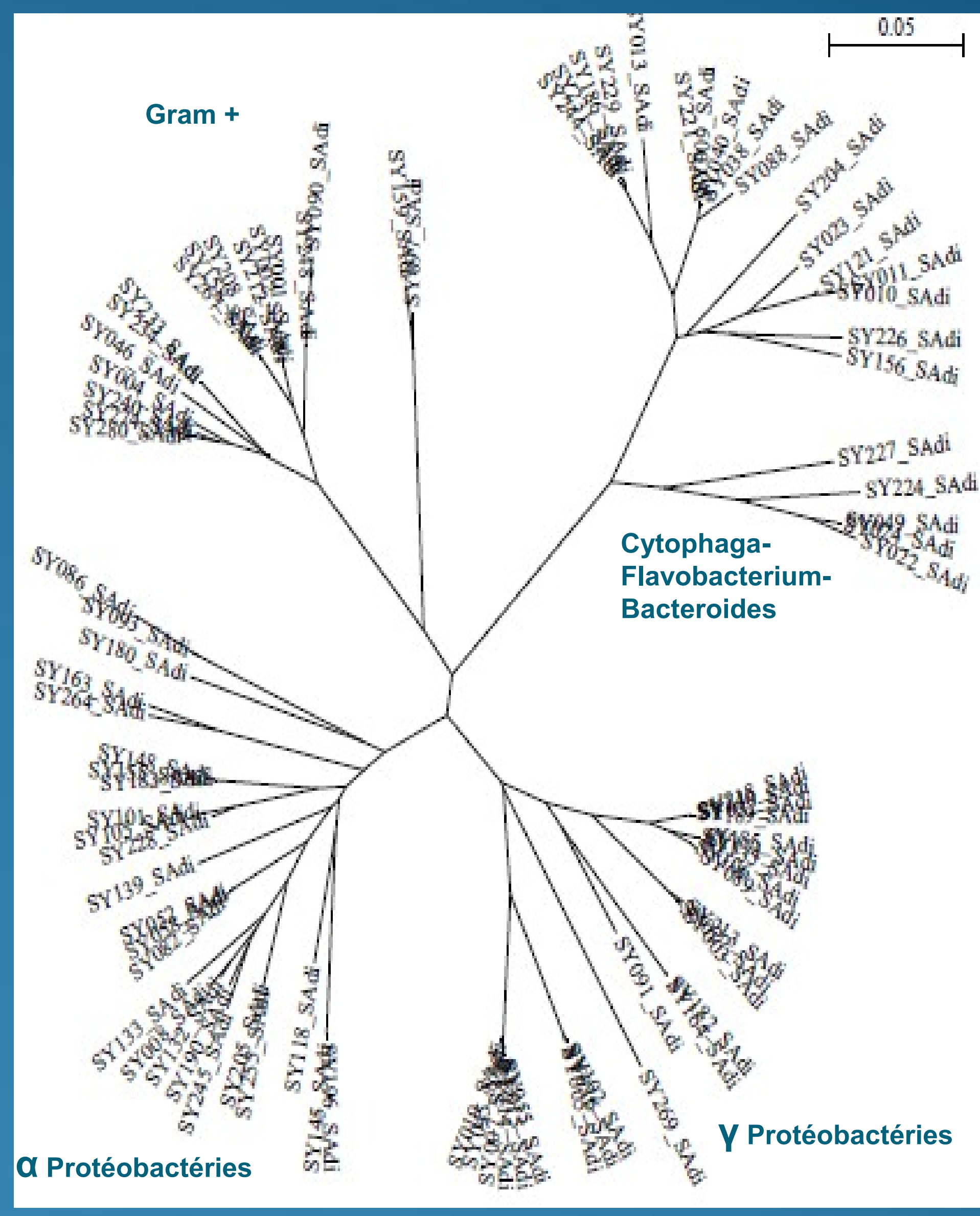


Figure 1 : Arbre phylogénétique de l'ADNr16s de la collection bactérienne du laboratoire PBA.

Outil de sélection

Le système proposé repose sur des cultures en microplaques 96 puits noires avec un fond transparent permettant l'éclairage de la culture.

Il permet de réaliser 96 cultures différentes en une seule et même expérience.

Les différentes associations sont réparties au hasard au sein de chaque microplaque. Un film condamne chaque puits et protège des contaminations pendant l'expérience.

Le dispositif est conçu pour accueillir 3 réplicats afin de pouvoir analyser statistiquement les résultats (Figure 4).

Un effort particulier a été fourni afin d'obtenir une lumière homogène pour l'ensemble des puits et entre les réplicats de microplaques.

Le système tel qu'il est conçu propose les conditions expérimentales suivantes :

T = 20,1 °C ± 0,5
 I = 58,9 μmolm⁻²s⁻¹ ± 1,9

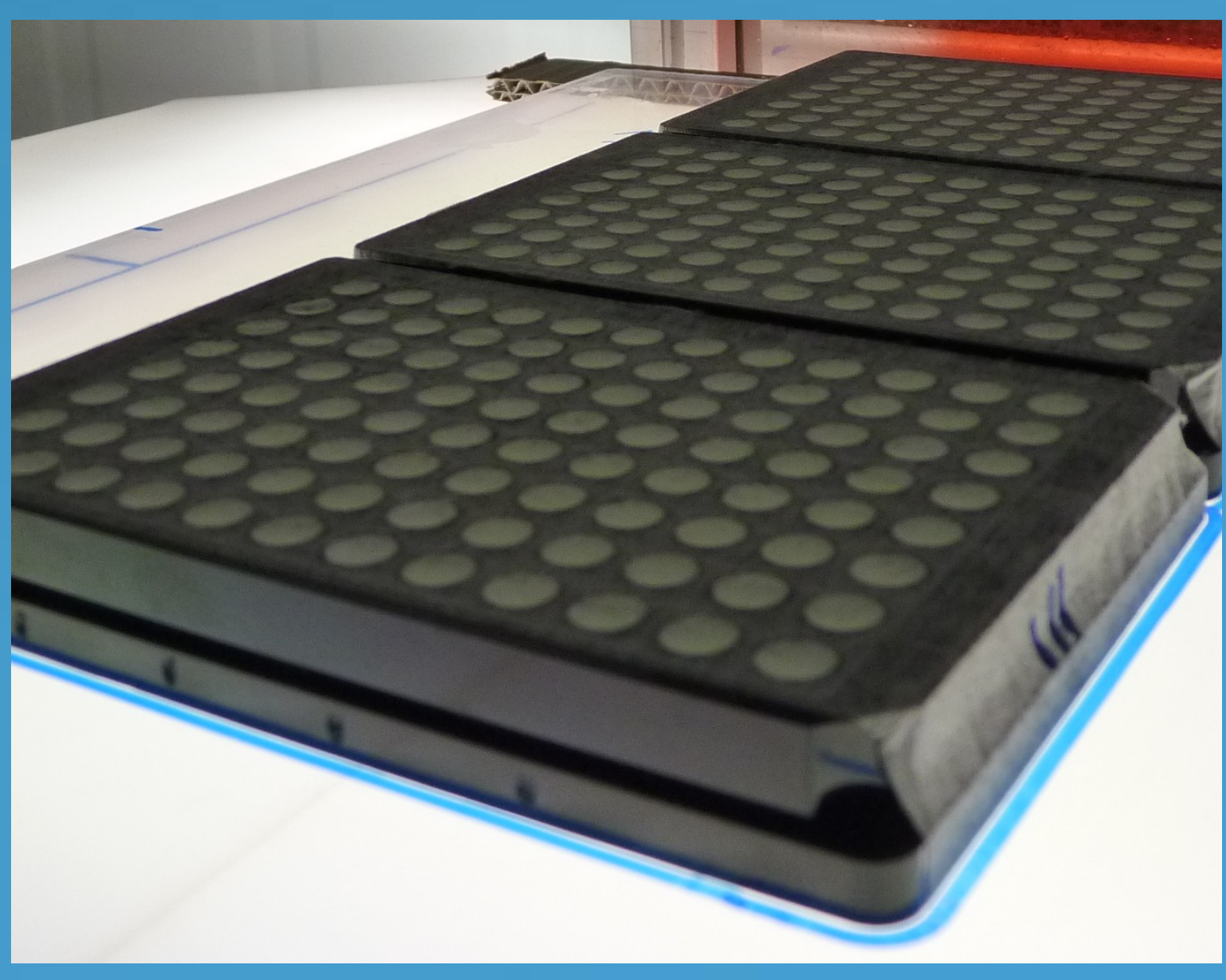


Figure 4 : Photographie des microplaques placées sur le dispositif de culture.

Méthodes de suivi de la croissance algale

Le dispositif de croissance en microplaques de 96 puits, impose l'utilisation de mesures indirectes pour le suivi de la croissance microalgale. Les prélèvements permettant des dénombrements cellulaires sont effet impossibles compte tenu du faible volume de culture. Une approche en plan factoriel complet composite a permis de confronter deux types de mesures indirectes :

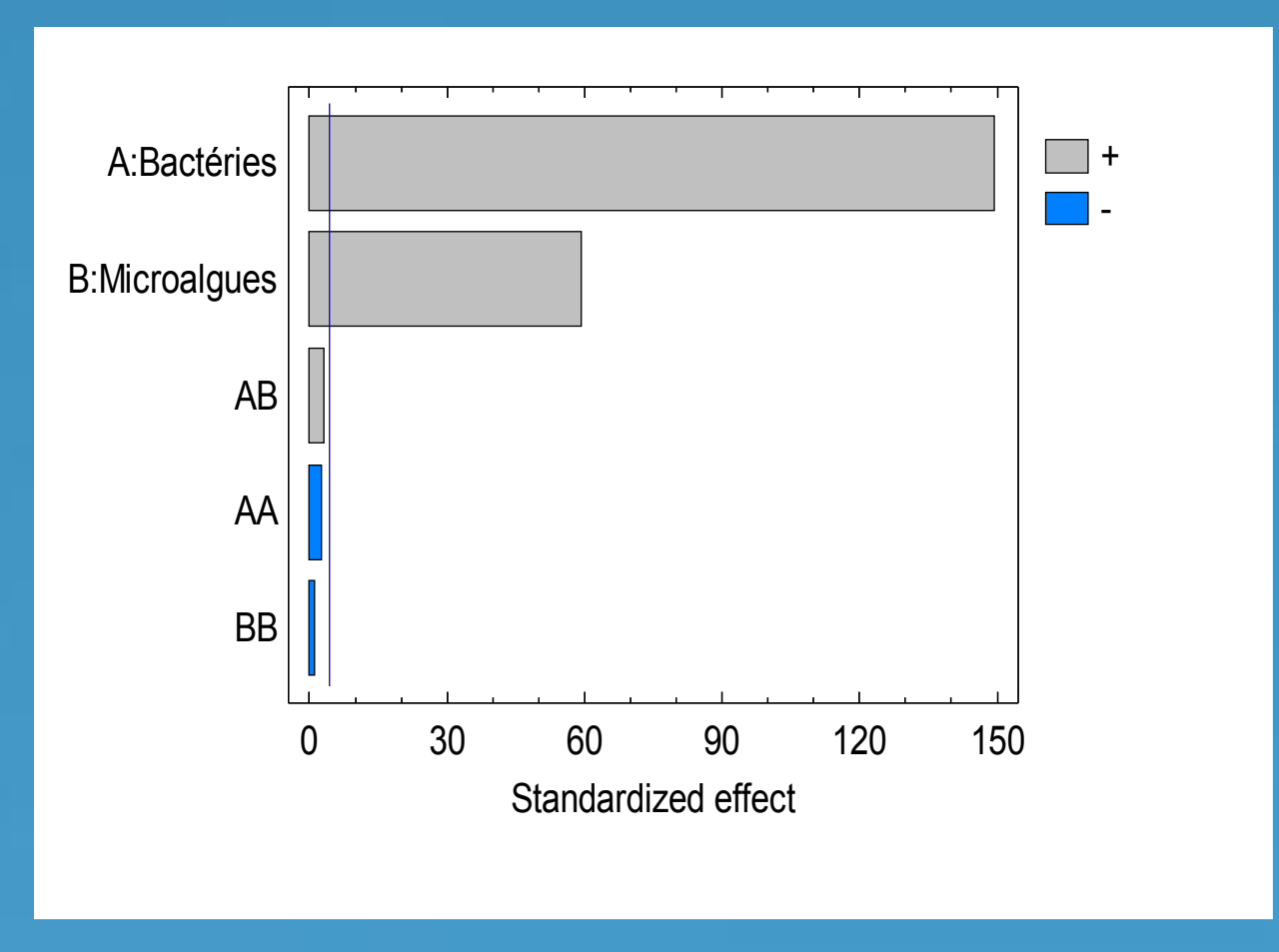


Figure 2 : Diagramme de Pareto α=5%.

*Absorbance

La mesure de l'absorbance de la chlorophylle a à 680 nm d'une culture algale est une méthode classiquement utilisée pour le suivi de populations au cours du temps.

Cependant, la flore bactérienne interfère fortement et significativement avec cette mesure (Figure 2, P = 0,000).

De plus, le film de scellage, faisant physiquement barrage à la mesure, peut être le lieu de condensation du milieu de culture perturbant ainsi à son tour les mesures d'absorbance.

*Fluorescence

L'autofluorescence de la chlorophylle a permis de s'affranchir de ces deux inconvénients.

L'effet de la flore bactérienne sur la mesure de la fluorescence est bien moindre par rapport à l'absorbance (Figure 3). En effet, en augmentant la concentration bactérienne de 10⁶ cellules/mL à une concentration importante de plus de 10⁸ cellules/mL, le signal de fluorescence des microalgues sera diminué de 7 %. Dans les même conditions, le signal d'absorbance, quant à lui, augmentera de près de 200%.

Enfin, la mesure possible par le fond de la microplaque évite de cette façon les interférences du film de scellage.

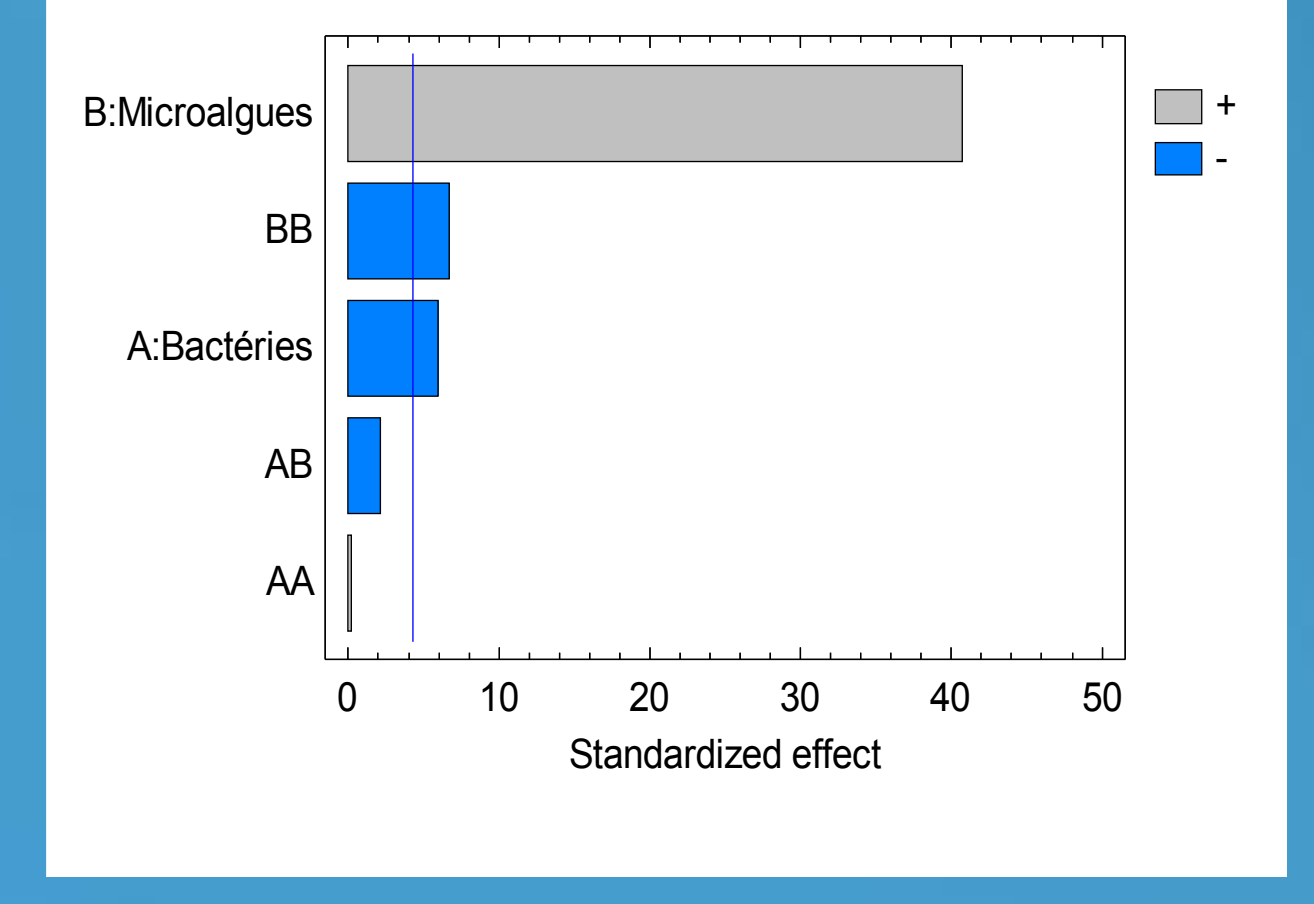


Figure 3 : Diagramme de Pareto α=5%.

Conclusion

Une collection de bactéries spécifiques des microalgues a été créée au laboratoire PBA, sur la base de laquelle, une méthode de criblage en une seule et même expérience est proposée. La sélection des couples s'effectuera sur la base des taux de croissance des microalgues calculés à partir des mesure de fluorescence de la chlorophylle a.

Cette étape de culture en faible volume permettra une pré-sélection des associations microalgues-bactéries les plus performantes. Les consortiums présélectionnés feront ensuite l'objet d'une sélection finale dans des dispositifs de culture classiquement utilisés dont les volumes permettront des suivis de populations par des méthodes directes ainsi que des analyses biochimiques