

Chlorella, photolithotrophie et chimioorganotrophie

Travail en ateliers « tournants » de 3 étudiants. Les compte-rendu sont évidemment individuels.

1. Préalable

Les algues unicellulaires du genre *Chlorella* sont des algues de la lignée verte (chlorophylle a et b avec 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 CO₂) mais peuvent aussi cultiver en chimioorganotrophie (et carbone hétérotrophie).

Certains auteurs décrivent ainsi le comportement photohétérotrophe ou mixotrophe de certaines *Chlorelles*. Rechercher une définition de ses deux termes (une discussion aura lieu avec l'ensemble du groupe).

2. Souches disponibles

- Souches *Chlorella vulgaris utex 265*, *Chl. Vulg. alcp212c*, *Chl. Vulg. ccap211/11b*, *Chlorella protothecoides alcp213* (origine : Algothèque, Unité Ecosystèmes et Interactions Toxiques, Muséum National d'Histoire Naturelle Paris). Ces souches ne sont pas réputées être fournies axéniques, c'est à dire qu'elles peuvent héberger des bactéries à leur contact étroit !
- Ces souches sont disponibles en culture dense de surface sur milieu BG11 + agar 10g/L, 20-25°C, éclairage néon lumière du jour (18h/jour), repiquage de 6 jours.

3. Milieux disponibles et à réaliser

A disposition, des flacons de 50 mL de milieu liquide BG11 stérile et de 40 mL de BG11-agar en surfusion (BG11-agar = Milieu BG11 + agar 10g/L) ainsi que des flacons de 50 mL de milieu liquide LB stérile et de 40 mL de LB-agar en surfusion (LB-agar = Milieu LB + agar 10g/L).

A disposition glucose stérile à 30 % (m/m) et urée (poudre).

→ A réaliser : une solution d'urée stérile à 50 g/L. Stériliser par filtration à travers un filtre 0,2 µm pour stérilisation.

→ A réaliser (couler en boîtes de Pétri) :

BG11-g-agar = BG11-agar + glucose 10 g/L (soit + 1,3 mL de glucose 30% dans 40 mL de BG11-agar en surfusion)	BG11-ab-agar = BG11-agar + mélange d'antibiotiques (400 µL de mélange d'antibio. pour 40 mL de BG11-agar en surfusion)	BG11-g-ab-agar = BG11-agar + glucose 10 g/L + mélange d'antibiotiques
LB-gu-agar = LB-agar + glucose 2 g/L + urée 1 g/L (soit + 270 µL de de glucose 30% et + 0,8 mL d'urée 50 g/L dans 40 mL de LB-agar en surfusion)		LB-gu-ab-agar = LB-agar + glucose 2 g/L + urée 1 g/L + mélange d'antibiotiques

→ A réaliser (pour les ErlenMeyer de culture) :

LB-gu-ab = LB glucose 2 g/L + urée 1 g/L + mélange d'antibiotiques (+ 330 µL de de glucose 30% et + 1 mL d'urée 50 g/L + 500 µL de mélange d'antibio. dans 50 mL de LB).

Remarques : La composition des milieux LB et BG11 est fournie en annexe. La composition du mélange d'antibiotiques est la suivante (100x) : pénicilline G 2500 U/mL + streptomycine sulfate 2500 µg/mL + chloramphenicol 5000 µg/mL + kanamycine 2500 µg/mL

4. Travail à réaliser

4.1 Photolithotrophie, chimioorganotrophie, axénie des souches

A partir d'une des souches disponibles, un certain nombre d'isolements sont demandés. Les conditions d'aseptie devront être rigoureuses. Il s'agit de travailler sous PSM selon une pratique permettant un travail aseptique rigoureux : lavages des mains, passage à l'éthanol 40% des parois flacons ...

Milieu d'isolement	BG11-agar	BG11-g-agar	LB-gu-agar	BG11-ab-agar	BG11-g-ab-agar	LB-gu-ab-agar
Technique d'isolement	Isolement à l'anse calibrée de 1 μ L à partir d'un petit prélèvement de surface de la culture					
Conditions d'incubation	30°C, Lumière 24h/24					
Lectures	Chaque 24 h					

Milieu d'isolement	BG11-agar	BG11-g-agar	LB-gu-agar	BG11-ab-agar	BG11-g-ab-agar	LB-gu-ab-agar
Technique d'isolement	Isolement à l'anse calibrée de 1 μ L à partir d'un petit prélèvement de surface de la culture					
Conditions d'incubation	30°C, obscurité 24h/24					
Lectures	Chaque 24 h					

Compte-rendu : résultats obtenus et interprétation.

4.2 Relation concentration en cellules - trouble d'absorbance à 620 nm

A partir de la souche retenue, réaliser une suspension trouble vers 0,2 d'absorbance à 620 nm. Déterminer les dimensions des Chlorelles. Evaluer la correspondance concentration en cellules - trouble d'absorbance à 620 nm. Utiliser pour cela un comptage en chambre de numération (Malassez par exemple).

Compte-rendu des résultats obtenus.

4.3 Cultures en milieu liquide

A partir de la souche choisie, deux cultures sont demandées. Les conditions d'asepsie devront être rigoureuses. Il s'agit d'inoculer sous PSM selon une pratique permettant un travail aseptique rigoureux : lavages des mains, passage à l'éthanol 40% des parois flacons ...

Milieu ensemencer	à 50 mL de BG11 en Erlen équipé d'un tube plongeur + filtre à air	50 mL de LB-gu-ab en Erlen équipé d'un tube plongeur + filtre à air	50 mL de LB-gu-ab en Erlen
Inoculum	Suspension trouble en NaCl 9g/L entre 0,8 et 1,6 d'absorbance à 620 nm (à réaliser sous PSM à partir de la culture sur boîte BG11 de la souche fournie, cela signifie qu'une dilution au 1/10 de la suspension qui servira d'inoculum doit avoir une absorbance entre 0,08 et 0,16 et qu'il faut en avoir préparé stérilement 10 mL par exemple pour pouvoir vérifier et inoculer ...). Inoculum à 4 % v/v (soit 2mL pour 50 mL). Après inoculation, prélever 1 mL du contenu de chaque Erlen et mesurer l'absorbance exacte à 620 nm.		
Conditions d'incubation	25°C Lumière 24h/24, bullage d'air stérile (assure aussi l'agitation)	25°C Lumière 24h/24, bullage d'air stérile (assure aussi l'agitation).	Vérifier que l'Erlen permet les échanges gazeux stériles (coton cardé ou capsule de fermeture adéquate). Mettre l'Erlen à l'obscurité totale à l'aide de papier aluminium. Incuber sous agitation à 25 °C
Observations	Observation visuelle chaque 24 heures. Observations microscopiques entre 46 et 52 heures. Mesure de concentration en biomasse entre 46 et 52 heures par absorbance de trouble à 620 nm.		

Compte-rendu : compte-rendu très précis du travail réalisé (notamment de la partie inoculum) et des observations. En supposant que la croissance est exponentielle dans chaque Erlen de culture, évaluer la vitesse spécifique de croissance lorsque cela vous paraît judicieux.

Document annexe : composition des milieux BG11 et LB

Composition du milieu LB : tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.

Composition du milieu BG11 :

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 MnCl ₂ ·4H ₂ O Zn SO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ MOO ₄ ·2H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O CO(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	2.86 1.81 0.22 0.39 0.08 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	

Bibliographie :

- K. Choznacka, FC. Marquez-Rocha, Kinetic and Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae, *Biotechnology*, 3(1):21-34,2004
- Chun- Bo Qu, Zheng-Yun Wu, Xian-Ming Shi, Phosphate assimilation by *Chlorella* and adjustment of phosphateconcentration in basal medium for its cultivation, *Biotechnol. Lett.* (2008) 30:1735-1740