

## 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 (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  $CO_2$ ) mais peuvent aussi cultiver en chimioorganotrophie (et carbone hétérotrophie).

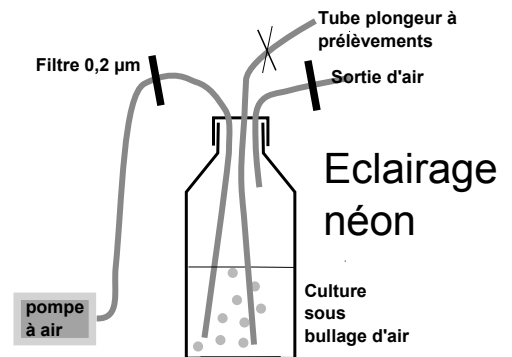
En croissance chaque cellule, isolée, grandit et réalise 2 mitoses successives qui conduisent à 4 cellules groupées dont le volume global est celui de la « grosse » cellule d'origine avant les 2 mitoses. Puis les 4 cellules se séparent en 4 « petites cellules » isolées qui vont grandir (le volume sera multiplié par 4) puis entreront en double mitose ...

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 trouble-DO / biomasse sèche.

### 2. Souche disponible, mise en culture

- Souche *Chlorella vulgaris* utex 265 (origine : Algothèque, Unité Ecosystèmes et Interactions Toxiques, Muséum National d'Histoire Naturelle Paris). Cette souche a été localement rendue axénique par traitement aux antibiotiques et isollements successifs. La souche est disponible en culture sur milieu liquide BG11, 20-25°C, éclairage néon lumière du jour (24h/jour), bullage d'air ou 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, 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 densité optique (DO) 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 lame micrométrique et oculaire gradué disponibles.

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

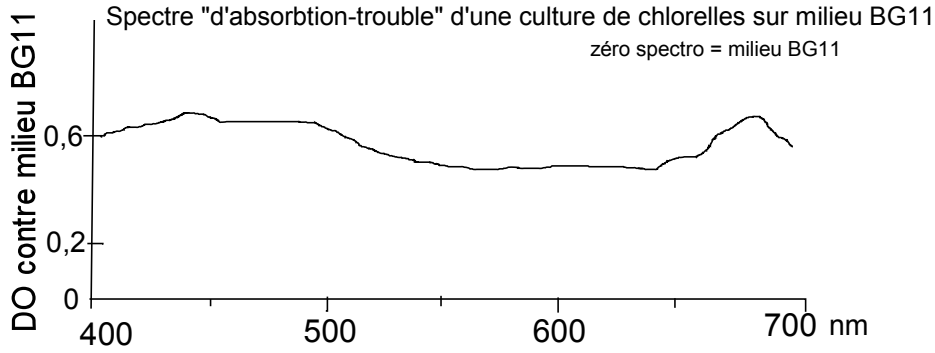
Voir annexe 2.

Récupérer les cellules d'un volume connu de culture de trouble connu (par exemple 100 mL). 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 absorbance/[cellules] par mesure de DO à 570 nm et comptage en chambre de numération (type Malassez) sur une dilution.

### 4. Compte-rendu

- Données expérimentales recueillies et analysées
- 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

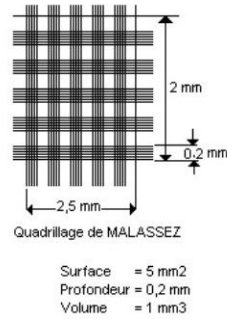
**Annexe 1**



Des mesures à 570 nm sur des dilutions (diluant = BG11) de la culture ont montré que la DO était proportionnelle au facteur de dilution.

**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 :**

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

**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**

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