



HAL
open science

CROISSANCE DES DIATOMÉES EN LABORATOIRE ET MÉTHODOLOGIES (TABLE RONDE) Laboratory culture methods for growth of diatoms (round table)

P Marsot

► **To cite this version:**

P Marsot. CROISSANCE DES DIATOMÉES EN LABORATOIRE ET MÉTHODOLOGIES (TABLE RONDE) Laboratory culture methods for growth of diatoms (round table). Vie et Milieu / Life & Environment, 1995, pp.321-325. hal-03052774

HAL Id: hal-03052774

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03052774v1>

Submitted on 10 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CROISSANCE DES DIATOMÉES EN LABORATOIRE ET MÉTHODOLOGIES (TABLE RONDE)

Laboratory culture methods for growth of diatoms (round table)

P. MARSOT

Institut National de la Recherche Scientifique, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

CULTURES CONTINUES
CONFINÉES
DIALYSE
DIATOMÉES
TECHNIQUES

RÉSUMÉ – Cette synthèse de table ronde décrit brièvement les principaux modes de culture utilisés en laboratoire pour la croissance de Diatomées planctoniques. La discussion porte d'abord sur la production en grand volume de Diatomées (20 à 400 L) en vue d'applications en aquaculture et en recherches biotechnologiques sur la valorisation des composés bioactifs. Les méthodes de culture destinées aux études physiologiques et écophysiologiques (cultures confinées, continues et à dialyse) sont également décrites et on y discute de leur fonctionnement et de leur limite d'utilisation.

DIATOMS
CULTURE
TECHNIQUES
CONTINUOUS CULTURES
BATCH CULTURES
DIALYSIS CULTURES

ABSTRACT – This synthesis briefly describes usual culture techniques for growth of planktonic diatoms in laboratory. This discussion deals firstly with mass cultivation of diatoms (20 to 400 L) and its applications in aquaculture and for biotechnological researches concerning the identification of high-value bioactive compounds. The use and experimental limits of several culture systems for physiological and ecological studies of diatoms (batch, continuous and dialysis cultures) are also discussed.

Le développement et l'amélioration des méthodes de culture de Diatomées en laboratoire visent deux objectifs principaux :

1. la production d'une biomasse algale destinée à des recherches sur l'identification de composés bioactifs (produits à haute valeur ajoutée) et à certains élevages aquicoles,
2. les études physiologiques et écophysiologiques des Diatomées.

1. PRODUCTION D'UNE BIOMASSE ALGALE (CULTURES INTENSIVES EN LABORATOIRE)

La valorisation industrielle de produits d'origine algale fait l'objet de plusieurs recherches (Burlaw, 1953; Shelef et Soeder, 1980; Borowitzka et Borowitzka, 1988). Les microalgues, y compris les Diatomées, sont considérées comme une nouvelle source de composés chimiques fins

ou biologiquement actifs. Les chances de découvrir de nouveaux composés chez ces micro-organismes, encore peu connus, sont élevées (Patterson *et al.*, 1991). Certains de ces produits peuvent connaître des applications intéressantes en industries pharmaceutique, agro-alimentaire et chimique, par exemple : les antibiotiques, les vitamines (B 12), les enzymes, les molécules marquées, les acides aminés, les acides gras. Dans ce secteur de recherche, les Chlorophycées et les Cyanophycées ont reçu beaucoup plus d'attention que les Diatomées. Toutefois, certains composés bioactifs, potentiellement applicables à l'industrie, ont été identifiés chez les Diatomées. Ainsi, des activités antibactériennes d'extraits lipidiques de *Chaetoceros lauderi*, *Skeletonema costatum*, *Asterionella japonica* ont été mises en évidence (Duff *et al.*, 1966; Pesando, 1972; Aubert *et al.*, 1979). Par ailleurs, Cooper et coll. (1983) ont isolé à partir d'extraits hydrophiliques de *Phaeodactylum tricorutum* et *Skeletonema costatum*, des antibiotiques efficaces contre certaines bactéries marines et terrigènes gram-négatif.

L'enzyme chlorophyllase des Diatomées, beaucoup plus active que celle des plantes terrestres (Barrett et Jeffrey, 1964), pourrait être utilisée en industrie agro-alimentaire comme agent décolorant d'huiles végétales contaminées par la chlorophylle exogène (Khamessan *et al.*, 1993).

Aspect économique

Malgré ces perspectives intéressantes, la valorisation biotechnologique des métabolites algaux a connu très peu d'applications industrielles. On attribue ce retard à deux principales causes : premièrement, au coût de production élevé de la biomasse algale relié à des problèmes techniques touchant l'efficacité des méthodes de culture et de récolte des microalgues. Le coût de production varie selon les espèces et les techniques entre 0,4 US\$/kg (en étang) et 25 à 68 US\$/kg (en raceways et réservoir). La faible prolificité des micro-organismes photosynthétiques, en comparaison avec les bactéries, contribue également à l'augmentation des coûts de production ; deuxièmement, à la recherche déficiente due au manque de soutien financier pour cet aspect de l'algologie.

Discussions sur les perspectives de recherche et l'approche expérimentale

Considérant les contraintes économiques et biologiques d'une production à grande échelle, l'effort de recherche devrait d'abord porter vers l'identification et la purification de nouveaux composés spécifiques aux microalgues afin de créer des points d'intérêt. Ce groupe de micro-organismes a très peu fait l'objet d'investigations. En fait, les études ont porté sur moins de 1% de toutes les espèces de microalgues connues. Dans ce contexte, les étapes proposées sont les suivantes :

- isolement de souches candidates. Répertoire les Diatomées provenant de différents milieux, les identifier et préparer des cultures de routine. Cette démarche expérimentale a été faite chez les Cyanophycées et, parmi plus de 1000 espèces répertoriées, l'on a découvert de nouveaux antibiotiques dont plusieurs agents anticancérigènes (Patterson *et al.*, 1991).

- développer pour l'espèce cible des cultures semi-volumineuses intensives (20 à 400 L), de façon à obtenir suffisamment de biomasse pour procéder à l'extraction et à la purification du produit. Le rendement des cultures semi-volumineuses de Diatomées en laboratoire peut être accru en améliorant les conditions d'éclairage (surface et fréquence d'éclairage) et par un enrichissement continu et croissant en nutriments majeurs (Khamessan *et al.*, 1993).

- étudier la biosynthèse du métabolite en relation avec la phase de croissance de l'algue. Par exemple, certains antibiotiques algaux sont synthétisés exclusivement en phase exponentielle, d'autres en phase stationnaire (Cooper *et al.*, 1983).

- récolte des microalgues. Elle peut être accomplie par les techniques de centrifugation continue ou par flocculation (de la Noüe, 1993). La technique de filtration tangentielle s'est avérée efficace et relativement peu coûteuse pour des cultures de Diatomées de 200 L et plus (résultats personnels).

- production industrielle du produit bioactif. Les progrès récents du génie génétique nous suggèrent que la production à grande échelle du métabolite algal pourrait être confiée à des cultures de micro-organismes plus prolifiques (ex : les bactéries hétérotrophes). Le clonage du gène responsable de la biosynthèse d'un métabolite et son expression sur des cellules prokaryotes peut en effet s'avérer une alternative à la production coûteuse des algues à grande échelle. Le transfert de certains gènes entre cellules eukaryotes (forme haploïde) et prokaryotes est maintenant envisagé (Craig *et al.*, 1988).

Biomasse algale en aquaculture

Plusieurs espèces de Diatomées entrent dans la composition de la diète algale d'invertébrés marins élevés en « nurserie », notamment les Mollusques Bivalves, durant leur stade larvaire (De Pauw et Persoone, 1988) et lors de leur maturation sexuelle (Fournier et Marsot, 1995). La majorité des Diatomées cultivées à cette fin sont marines, exemples : *S. costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Chaetoceros gracilis* ou *calcitrans*. Pour les besoins d'une « éclosion-nurserie » de Mollusque ou d'élevage de larves de Crevette, la culture peut s'effectuer en laboratoire (greenhouse), dans des récipients de plusieurs dizaines de litres de capacité. La production phytoplanktonique constitue néanmoins une étape laborieuse exigeant beaucoup de temps. La culture monospécifique en laboratoire coûte entre 160 et 200 US\$/kg de matière sèche. Pour réduire le travail relié au nettoyage des bassins et au repiquage des cultures, certains auteurs suggèrent d'automatiser, c'est-à-dire d'opérer en cultures continues (Droop, 1975) ou semi-continues de forte densité cellulaire (observations personnelles). Les cultures populeuses en croissance, semblent offrir une meilleure compétition aux Bactéries, Ciliés ou d'autres types de contaminations qui sont difficiles à éviter en cultures volumineuses. Certaines espèces de Diatomées se prêtent mieux que d'autres à la culture continue ou semi-continue. Par exemple, on peut produire *P. tricornerutum* en bassin de 250 L, plus de deux

mois en semi-continu à une concentration de biomasse de $9 \text{ à } 12 \times 10^9 \text{ cellules.L}^{-1}$ ($0,20 \text{ à } 0,26 \text{ g. matière sèche.L}^{-1}$). D'autres recherches sont nécessaires dans le but d'isoler de nouvelles souches de Diatomées à la fois nutritives et résistantes aux contaminations microbiennes.

2. ÉTUDES PHYSIOLOGIQUES ET ÉCO-PHYSIOLOGIQUES DES DIATOMÉES

Ces études exigent des méthodes de culture permettant un bon contrôle de la croissance de l'algue. Ces méthodes servent à confirmer certaines hypothèses écologiques et à évaluer en laboratoire l'influence de facteurs environnementaux (nutriments, lumière, photopériode, température, polluant, broutage, etc.) sur la croissance des microalgues et la production primaire. La discussion porte sur la description, le fonctionnement et les limites d'utilisation des principales techniques de culture.

Culture confinée

La culture confinée (batch culture), du fait de sa simplicité, est probablement la méthode la plus employée. Le confinement de son milieu détermine une croissance discontinue et un taux de croissance variable comprenant les phases de latente, exponentielle, stationnaire et sénescence. La culture confinée convient mal aux études purement écologiques parce qu'elle impose aux cellules des conditions anormales que l'on ne retrouve pas *in situ*, par exemple :

- milieu environnant limité,
- accumulation extracellulaire (intracellulaire ?) de métabolites,
- emploi de fortes concentrations de nutriments en début de croissance,
- croissance de l'algue limitée par le niveau de concentration des nutriments et non pas par un taux d'approvisionnement des nutriments, comme c'est le cas dans le milieu naturel.

Les études en culture confinée peuvent être abordées de deux façons :

- durant la croissance exponentielle : une période durant laquelle la plupart des algues demeurent dans un état physiologique plus ou moins constant, ainsi que les conditions du milieu,
- en comparant avec des cultures témoins le taux de croissance (μ_e) ou le temps requis pour atteindre le maximum de biomasse. Le taux de croissance est calculé par l'équation : $\mu_e = \ln(X_2/X_1)/t_2-t_1$, X_2 et X_1 représentent la densité cellulaire de la culture aux temps t_2 et t_1 .

Cultures continues

La culture continue (chemostat) est un système ouvert. Le milieu de culture est constamment renouvelé grâce à une arrivée de milieu nutritif neuf (input) et une sortie de culture (récolte = output) s'effectuant aux mêmes débits. En principe, cette méthode nous rapproche davantage des conditions naturelles, dans la mesure où elle nous permet d'obtenir un équilibre dynamique entre l'apport de nutriments et la croissance de l'Algue. L'état d'équilibre d'une culture continue (steady state) est caractérisé par une densité cellulaire stable ($\ln(X_2/X_1) = 0$) et par un taux de croissance néperien (μ_e) égal au taux de dilution (D), d'où l'équation : $\mu_e = \ln(X_2/X_1)/t_2-t_1 + D$. Le taux de dilution D est calculé en divisant le débit journalier du milieu nourricier par le volume de la culture.

Le montage d'un «chemostat» est relativement simple. Il comporte une nourrice reliée à une chambre de croissance et un récipient de récolte accumulant le surplus de la culture. Une pompe péristaltique de précision installée entre la nourrice et la chambre de croissance, permet de fixer le taux de dilution. Dans une culture en «chemostat», le taux de croissance et la densité cellulaire sont prédéterminés par l'ajustement du taux de dilution et de la concentration du nutriment limitant, respectivement. Après quelques générations, lorsqu'un des facteurs de croissance devient limitant, la culture atteint elle-même son équilibre ; la densité cellulaire cesse alors de s'accroître et se stabilise ($\ln X_2/X_1 = 0$).

Le «turbidostat» est une culture continue dont le taux de dilution s'ajuste en fonction de la densité cellulaire de la culture, c'est-à-dire de sa turbidité (Fenaux *et al.*, 1985 ; Hill *et al.*, 1985). La densité cellulaire est donc prédéterminée grâce à un turbidimètre contrôlant la pompe péristaltique, autrement dit le taux de dilution. La cinétique de croissance des algues en «turbidostat» se compare à celle observée en «chemostat» et s'applique à la même théorie. La théorie des cultures continues est traitée en détail dans les ouvrages de Rhee (1980), Droop (1975), Tempest (1969).

Applications de la culture continue

L'influence des facteurs environnementaux est étudiée lorsque la culture atteint son équilibre. Une condition favorable aura l'effet d'accroître la densité cellulaire, la productivité et le taux de croissance (Marsot et Mouhri, 1995), alors qu'une condition défavorable (polluant) provoquera l'effet inverse (Marsot *et al.*, 1995). L'influence des facteurs externes sur le taux d'absorption des nutriments peut également être évaluée en connaissant la concentration des nutriments du milieu nourricier et du milieu de culture.

Cultures à dialyse

La culture à dialyse est également un système ouvert grâce à l'enveloppe dialysante composant en tout (culture en sac à dialyse) ou en partie (culture avec dialyseur autonome) les parois de l'enceinte de croissance. Les échanges des nutriments et des métabolites s'effectuent par diffusion entre le milieu de culture et le milieu externe. Les cultures à dialyse pour microalgues opèrent selon deux modes :

- « continuous reservoir-batch culture »,
- « continuous reservoir-continuous culture ».

Continuous reservoir-batch culture,

tel que défini pour les cultures de bactéries par Schultz et Gerhardt (1969), à cause des réserves illimitées du milieu nutritif (continuous reservoir = milieu naturel) et la croissance discontinue des algues (batch culture). La culture parcourt les phases de croissance latente, exponentielle, linéaire (croissance prolongée typique; Marsot *et al.*, 1992) et stationnaire. Contrairement à la culture confinée, la sénescence des algues n'est pas observée en culture à dialyse à cause d'un apport continu des nutriments et de l'élimination constante des métabolites auto-inhibiteurs (Marsot *et al.*, 1991).

Applications de la culture à dialyse discontinue «continuous reservoir-batch culture»

Ce mode de culture s'applique aux cultures en sacs à dialyse réalisées *in situ* (Berland *et al.*, 1976) ou en laboratoire (Sakshaug et Jensen, 1978) dans le but d'évaluer le potentiel productif (production primaire) d'un milieu naturel, tout en éliminant le facteur broutage par le zooplancton.

Par ailleurs, l'accroissement de la surface de dialyse, par l'emploi d'unités dialysantes à fibres creuses, nous a révélé le fort potentiel productif des Diatomées en milieu naturel (Marsot *et al.*, 1981). Cette forte productivité est attribuée au fait que les algues obtiennent leurs nutriments non seulement de leur propre milieu de culture (concentrations initiales), mais du milieu externe via la dialyse. C'est ainsi qu'au cours de son cycle vital, la culture à dialyse peut bénéficier d'une quantité beaucoup plus grande de nutriments qu'une culture confinée (même enrichie).

«Continuous reservoir-continuous culture»

L'utilisation de dialyseurs autonomes à fibres creuses non biodégradables, installés sur la chambre de croissance nous permet non seulement d'augmenter le rapport surface/volume, mais de réaliser une croissance continue (continuous

culture). Le système opère tel un « turbidostat », en prédéterminant la concentration cellulaire (Marsot *et al.*, 1991). La dilution de la culture s'effectue par ultrafiltration tangentielle du milieu au travers des surfaces dialysantes et le surplus est acheminé vers un récipient de récolte. La culture continue à dialyse reçoit ses nutriments via la dilution et la diffusion. L'apport par diffusion est de loin supérieur à celui obtenu par dilution, ce qui détermine une cinétique de productivité différente des cultures continues en « chemostat » (Marsot et Mouhri, 1995).

Application de la culture à dialyse continue, «continuous reservoir-continuous culture»

La culture à dialyse continue est particulièrement bien appropriée pour des observations à long terme des processus physiologique et morphologique de Diatomées croissant sur un milieu naturel (Marsot et Mouhri, 1995). En exerçant un fort taux de dilution (0,8 à 1,2 d⁻¹), par abaissement de la densité cellulaire, il est possible de maintenir dans la chambre de croissance des conditions trophiques comparables à celles du milieu environnant (Marsot *et al.*, 1991).

CONCLUSIONS

Cette description des principales techniques de culture et leur fonctionnement montre jusqu'à quel point les conditions de croissance des microalgues peuvent différer d'une méthode à l'autre. Ces conditions peuvent déterminer chez une même espèce des comportements physiologiques tout à fait différents et, pour cette raison, nous devons être conscients des particularités et des limites expérimentales des méthodes utilisées avant d'émettre certains principes écologiques. Il convient ici de citer quelques exemples de comportements distincts exprimés par les microalgues en cultures :

- on observe avec l'âge d'une culture confinée une diminution des acides aminés libres intracellulaires (ex : glutamine). En culture dialysante on assiste, au contraire, à un rétablissement des concentrations de ces métabolites responsables de l'assimilation de l'azote (Marsot *et al.*, 1992).

- l'évolution de la morphogenèse de *Phaeodactylum tricorutum* en culture à dialyse continue et en « chemostat » est différente (Marsot et Mouhri, 1995).

- les microalgues montrent une meilleure tolérance aux polluants organiques tels les organoéthers, en milieu ouvert (chemostat) qu'en culture confinée (Saint-Louis *et al.*, 1994).

BIBLIOGRAPHIE

- AUBERT M., M. GAUTHIER, J. AUBERT and P. BERNARD, 1981. Les systèmes d'information des micro-organismes marins. Leur rôle dans l'équilibre biologique océanique. *Rev. Int. Océan. Méd.* 231 p.
- BARRETT J. and S.W. JEFFREY, 1964. Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae. *Plant. Physiol.* 39 : 44-47.
- BERLAND B.R., D.J. BONIN and S.Y. MAESTRINI, 1976. De l'emploi concomitant d'enceintes dialysantes et de tests biologiques pour la détermination des facteurs nutritionnels limitant la production primaire des eaux marines. *Ann. Inst. Océanogr.* Paris 52 : 45-55.
- BOROWITZKA M.A. and L.J. BOROWITZKA, 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, 477 p.
- BURLEW J.S., 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington. Pub. 600, Washington, D.C. 357 p.
- COOPER S., A. BATTAT, P. MARSOT and M. SYLVESTRE, 1983. Production of antibacterial activities by two *Bacillariophyceae* grown in dialysis culture. *Can. J. Microbiol.* 29 : 338-341.
- CRAIG R., B.Y. REICHELT and J.L. REICHELT, 1988. Genetic engineering of micro-algae. In Micro-algal biotechnology. Edited by M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka. Cambridge University Press, Cambridge : 415-455.
- DE LA NOUE J. and D. PROULX, 1993. Algal biomass harvest. In Microalgae : from the laboratory to the field. Edited by Joël de la Noüe and G. Laliberté, Workshop, Oct. 17-18, 1993, Départ. Sci. Tech. Aliments, Université Laval, Québec, 33-40.
- DE PAUW N. and G. PERSOONE, 1988. Microalgae for aquaculture. In Micro-algal biotechnology. Edited by M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka, Cambridge University Press, Cambridge : 197-221.
- DROOP M.R., 1975. The chemostat in mariculture. In 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, 1 : 71-93.
- DUFF D.C.B., D.L. BRUCE and N.J. ANTIA, 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Can. J. Microbiol.* 12 : 877-884.
- FENAUX R., G. MALARA and H. CLAUSTRE, 1985. A turbidostat driven and controlled by microcomputer. *Aquaculture* 48 : 91-95.
- FOURNIER R. and P. MARSOT, 1995. Reproduction hors-saison du pétoncle géant *Placopecten magellanicus*. Rapport technique. Recherche en partenariat, INRS-MAPAQ, Minist. Agriculture Pêcheries et Alimentation du Québec, 46 p.
- HILL S.H., M.R. ABBOTT and K.L. DENMAN, 1985. A computer-controlled turbidostat for the culture of planktonic algae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42 : 744-753.
- KHAMESSAN A., S. KERMASHA and P. MARSOT, 1993. Production and biotechnological applications of chlorophyllase from algal origin. In Microalgae : from the laboratory to the field. Edited by Joël de la Noüe and G. Laliberté. Workshop, Oct. 17-18, 1993. Départ. Sci. Tech. Aliments, Université Laval, Québec : 125-136.
- MARSOT P., A. CEMBELLA and J.C. COLOMBO, 1991. Intracellular and extracellular amino acid pools of the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* (*Bacillariophyceae*) grown on unenriched seawater in high-cell-density dialysis culture. *J. Phycol.* 27 : 478-491.
- MARSOT P., A.D. CEMBELLA and K. MOUHRI, 1992. Croissance de la biomasse azotée de *Phaeodactylum tricoratum* (*Bacillariophyceae*) en cultures discontinues dialysante et non dialysante. *Can. J. Microbiol.* 38 : 945-952.
- MARSOT P., R. FOURNIER and C. BLAIS, 1981. Culture à dialyse : emploi de fibres creuses dialysantes pour la culture massive de phytoplancton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38 : 905-911.
- MARSOT P. and K. MOUHRI, 1995. Morphogenèse et croissance de la Diatomée marine *Phaeodactylum tricoratum* en cultures continues dialysante et non dialysante. *Vie Milieu* 45 (3) : 199-205.
- MARSOT P., E. PELLETIER and R. SAINT-LOUIS, 1995. Effects of triphenyltin chloride on growth of the marine microalga *Pavlova lutheri* in continuous culture. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 54 : 389-395.
- PATTERSON G.M.L., C.L. BALDWIN, C.M. BOLIS, F.R. CAPLAN, H. KARUSO, L.K. LARSEN, I.A. LEVINE, R.E. MOORE, C.S. NELSON, K.D. TSCHAPPAT, G.D. TUANG, 1991. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (*Cyanophyta*). *J. Phycol.* 27 : 530-536.
- PESANDO D., 1972. Etude chimique et structurale d'une substance lipidique antibiotique produite par une diatomée marine *Asterionella japonica* (Cleve). *Rev. Int. Océanogr. Méd.* 25 : 49-70.
- RHEE G.Y., 1980. Continuous culture in phytoplankton ecology. In Advances in aquatic microbiology, Edited by M.R. Droop and H.W. Jannasch, Academic Press, London, 2 : 151-203.
- SAINT-LOUIS R., E. PELLETIER, P. MARSOT and R. FOURNIER, 1994. Distribution and effects of tributyltin chloride and its degradation products on the growth of the marine alga *Pavlova lutheri* in continuous culture. *Water Research* 28 : 2533-2544.
- SAKSHAUG R. and A. JENSEN, 1978. The use of cage cultures in studies of the biochemistry and ecology of marine phytoplankton. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 16 : 81-106.
- SCHULTZ J.S. and P. GERHARDT, 1969. Dialysis culture of micro-organisms : design, theory and results. *Bacteriol. Rev.* 33 : 1-47.
- SHELEF G. and C.J. SOEDER, 1980. Algae biomass. Production and use. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 852 p.
- TEMPEST D.W., 1969. The continuous cultivation of micro-organisms. I. Theory of the chemostat. In Methods in Microbiology, Edited by J.R. Norris and D.W. Ribbons, Academic Press, N.Y., 2 (VII) : 259-276.

Reçu le 2 décembre 1994; received December 2, 1994
 Accepté le 24 janvier 1995; accepted January 24, 1995