HAL
open science

Caractérisation et modélisation des interactions au sein d'un assemblage de cyanobactéries diazotrophes et de microalgues

Margaux Caia

To cite this version:

Margaux Caia. Caractérisation et modélisation des interactions au sein d'un assemblage de cyanobactéries diazotrophes et de microalgues. Biotechnologie. Montpellier SupAgro, 2018. Français. NNT : 2018NSAM0059 . tel-02871571

HAL Id: tel-02871571

https://theses.hal.science/tel-02871571v1

Submitted on 17 Jun 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En biotechnologie et microbiologie

GAIA – Biodiversité, Agriculture, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA)

Caractérisation et modélisation des interactions au sein d'un assemblage de cyanobactéries diazotrophes et de microalgues

Présentée par Margaux CAIA

Le 13 décembre 2018

Sous la direction de Jean-Philippe STEYER

et Olivier BERNARD

Devant le jury composé de

Dr. Sophie BONNET, IRD MIO, Marseille/Nouméa	Rapportrice
Dr. Francis MAIRET, IFREMER, Nantes	Rapporteur
Dr. Filipa LOPES, CentraleSupélec, Gif-sur-Yvettes	Examinatrice
Dr. Antoine SCIANDRA, LOV, Villefranche-sur-Mer	Président du jury
Dr. Jean-Philippe STEYER, LBE-INRA, Narbonne	Directeur
Dr. Olivier BERNARD, INRIA, Sophia Antipolis	Co-directeur
Dr. Eric FOUILLAND, CNRS Marbec, Sète	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Montpellier SupAgro

A ma défunte grand-mère Denise,
modèle de force, amour et indépendance

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Sophie Bonnet et Francis Mairet d'avoir rapporté cette thèse avec pertinence et bienveillance. Je remercie également Filipa Lopes et Antoine Sciandra d'avoir fait partie des membres du jury tout comme Eric Fouilland en tant que membre invité. Merci pour nos échanges si intéressants sur ces recherches.

Je remercie le département MIA pour la bourse INRA/INRIA sans laquelle ces travaux n'auraient pas pu voir le jour.

Je tiens à remercier ceux qui m'ont accueillie dans leur équipe et établissement pour la réalisation de cette thèse triangulaire : Nicolas Bernet, directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Jean-Luc Gouzé, directeur de l'équipe BIOCORE de l'INRIA Sophia Antipolis, et Antoine Sciandra, ancien directeur du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche.

Sans mes encadrants Olivier Bernard et Jean-Philippe Steyer, je n'aurais jamais pu aller au bout de cette aventure. Jean-Philippe, je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussée à aller au fond des choses à chaque fois. Tu m'as appris à prendre du recul et à être plus rigoureuse, ce qui m'a permis d'améliorer mes recherches. Grâce à toi, j'ai pu prendre confiance en moi et m'affirmer ! Olivier, je te remercie énormément, et surtout pour ta patience. Tu as toujours su m'aiguiller et me rassurer. Nos discussions, tes conseils avisés et tes nombreuses relectures m'ont également permis de savoir tirer mon travail vers le haut et de ne jamais abandonner. Grâce à toi, j'ai énormément gagné en maturité scientifique, en positivité et en autonomie !

Un grand merci à Isabelle, Anne, Linda, Corinne, Marie-Line, Alexandra, Nadine et Sylvie, responsables administratives et gestionnaires indispensables au bon déroulement de la thèse au sein de ces 3 organismes différents, ce qui a parfois soulevé quelques casse-têtes.

Je tiens à remercier Meng Zhang qui a réalisé son stage de Master 1 avec moi au LOV. Ta motivation et ton implication ont été précieuses et ont permis d'approfondir certains point clés de cette thèse. Merci également aux personnes du LOV qui m'ont toujours conseillée et aidée quand j'en avais besoin : Amélie Talec la magicienne qui répare toutes les machines rien qu'en

passant la porte du laboratoire, Hubert Bonnefond avec ses idées ingénieuses et ses blagues vaseuses, Eric Pruvost et ses talents de MacGyver, Sophie Rabouille et sa passion des cyanobactéries, Freddy Guihéneuf et ses connaissances dans tous les domaines, et surtout Sophie Marro, double championne phytoplancton/bactéries mention cytométrie.

Je remercie également ceux et celles qui ont permis d'assurer la bonne humeur et de partager des bons moments au LOV ou en dehors, que ce soit de passage ou encore maintenant : Anne-Sophie, Géraldine, Kévin, Simon, Fabio, Laurent, Lolo, François, Maïa, Coco, Ambre … Entre le yoga, les sorties kayak ou randonnée, les goûters et les soirées barbecues, plage et jeux, merci de m'avoir permis de profiter pendant la thèse !

Merci également à mes amies sportives et aux apéros qui suivent nos séances : Alix, Margot, Mathilde et Emilie !

Bien sûr, un énorme merci à mes amis qui m'ont toujours soutenue et m'ont permis de réaliser qu'on pouvait sortir la tête de l'eau pendant la thèse. Tinhinène, tu es à mes côtés depuis le lycée malgré la distance et tu me permets d'avoir une folle ouverture d'esprit. Valentine, Sabrina, Camille et Caroline, vous avez toujours été là pour moi depuis la prépa, dans les meilleurs moments comme dans les pires, et notre amitié a encore de belles décennies devant elle (trop tard, ça fait plus de 7 ans !). Chacune de vous me fait réaliser à quel point je suis chanceuse d'avoir de telles amies en or. Merci de m'avoir reboostée (souvent) et pour les nombreux weekends Lyonnais, Marseillais ou Niçois à se baigner, parler, manger, chanter et rigoler ! Natacha et Mathilde, même si on ne s'aimait pas au début de l'ENSAT (hjerte), vous êtes maintenant indispensables à mes yeux. Merci d'être là et de m'accompagner depuis tout ce temps. Natacha, tu me permets de relativiser, de prendre conscience des bonnes choses et d'en découvrir de nouvelles : bonne chance avec les lamas ! Mathilde, tu es d'un soutien sans faille et j'adore nos conversations à cœur ouvert mais l'estomac plein : je te souhaite toute la réussite que tu mérites pendant ta thèse ! Merci au gang de l'Arty'show et aux amis Ensatiens (Camille, Axel, Marion, Guillaume, Charles, Adriano, Sarah, Lucie …) qui ont suivi de près ou de loin cette aventure sans jamais être absents. Les weekends de retrouvailles, que ce soit au ski ou au vert, seront toujours les bienvenus !

Merci également à ma belle-famille chalonnaise, Yannick, Agnès, Maxime et Romain, pour les weekends de bonne chair et de bons vins. Merci de m'avoir fait découvrir de nouvelles choses et de nouveaux endroits, et de m'avoir encouragée !

Mais je tiens surtout à remercier ceux qui m'ont donné la vie et l'envie de toujours me surpasser : mes parents, Charles et Sophie. Merci de me soutenir depuis toujours, que ce soit dans mes choix d'études ou dans mes choix personnels. Vous êtes des modèles pour moi et j'espère vous rendre aussi fiers que je ne le suis de vous. Merci à mon frère et à ma sœur d'avoir cru en moi et de m'avoir aidée à ne jamais baisser les bras. Merci Julien, tu m'as appris à être une battante et à être pragmatique. Merci également pour les bonnes bouteilles du vin et votre soutien sans faille avec Sophie. Je vous souhaite tout le bonheur du monde à vous et à Balto, futur premier du nom ! Merci Laure, pour ta douceur et ta présence nécessaires à mon bonheur. Je suis fière de la personne adulte que tu es devenue. Enfin la fin des études pour toi et le début d'une nouvelle vie avec Bertrand ! Bref, je vous aime tous tellement, bien plus que les microalgues.

Enfin, je ne peux pas terminer ces remerciements sans mentionner l'homme de ma vie, sans qui rien n'aurait été possible. Yves, merci de m'avoir toujours supportée et de me rendre meilleure chaque jour. J'espère que mille autres aventures nous attendent ensemble.

Sommaire

Remerciements **2**

Sommaire **5**

Liste des figures **8**

Liste des tableaux **13**

Glossaire **14**

Introduction générale et objectifs **16**

Chapitre 1 : Revue de la littérature **22**

1 Intérêt économique et valorisation industrielle des microalgues et cyanobactéries 22
1.1 Production de molécules d'intérêt 22
1.2 Systèmes de culture à grande échelle 23
1.3 Cultures en *batch* 25

2 Les interactions microalgues/bactéries 26
2.1. Des interactions directes et indirectes 26
2.2 Des interactions multiples et complexes 30
2.3 Potentiel des co-cultures à grande échelle 31

3 *Dunaliella salina*, une microalgue photosynthétique à fort intérêt économique 33
3.1 Origine et description 33
3.2 Physiologie et besoins nutritifs 34
3.3 Production de molécules d'intérêt 34

4 *Crocosphaera watsonii*, une cyanobactérie diazotrophe à fort impact dans le cycle de l'azote 35
4.1 Origine et description 35
4.2 Physiologie et besoin nutritifs 36
4.3 Rôle dans le cycle de l'azote 37

5 La modélisation mathématique et les interactions microalgues/bactéries 37
5.1 Un modèle mathématique, à quoi ça sert ? 37
5.2 Quelques modèles mathématiques pour la croissance du phytoplancton 38
5.3 Des modèles décrivant les interactions au sein de l'écosystème 40

6 Conclusions 41

Chapitre 2 : Matériel et méthodes général **43**

1 Microorganismes utilisés 43

2 Milieu de culture 43

3 Dispositifs expérimentaux de culture 45
3.1 Culture en erlenmeyer 45
3.2 Système de co-culture par séparation membranaire 46

4 Mesures expérimentales et analyses 47
4.1 Comptages cellulaires et calcul du taux de croissance 47
4.2 Concentration en nitrites et nitrates 51
4.3 Concentration en ammonium 52
4.4 Concentration en azote organique dissous et production 53
4.5 Mesure de l'intensité lumineuse 56
4.6 Dosage du carbone et de l'azote particulaires et rapport C/N 56
4.7 Caractérisation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux 58
4.8 Mesure de la concentration en O_2 61

4.9 Mesure du pH 61
4.10 Détermination de la concentration en CO_2 à partir de la mesure du pH 61

5 Conclusions 63

Chapitre 3 : Étude d'une co-culture artificielle de la cyanobactérie fixatrice de diazote atmosphérique *Crocosphaera watsonii* et de la microalgue *Dunaliella salina* 65

1 Introduction 65

2 Material and methods 67
2.1 Experimental settings 67
2.2 Measurements 69
2.3 Analyses 70

3 Results and discussion 71
3.1 A two-way interaction on cellular growths 71
3.2 Interactions regarding nitrogen 74
3.3 Light competition 77
3.4 Other potential interactions 79

4 Conclusions 80

5 Acknowledgements and contributions 81
5.1 Declaration of authors' contribution 81
5.2 Conflict of interest statement 81
5.3 Fundings 81

Chapitre 4 : Reminéralisation de l'azote dérivé de l'activité diazotrophe de *Crocosphaera watsonii* par des bactéries : approche par la modélisation. 83

1 Introduction 83

2 Material and methods 84
2.1 Experimental settings 84
2.2 Measurements 84

3 Model design 85
3.1 Light intensity along the reactor 85
3.2 Growth and substrate uptake 85
3.3 Model calibration 87

4 Simulation of the interactions between *D. salina* and *C. watsonii* 90

5 Simulating nitrogen recycling 93
5.1 Model adaptation 93
5.2 Biomass productivity of the coupled ecosystem 94

6 Conclusions 96

7 Acknowledgements 96

Chapitre 5 : Co-culture de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii* sans compétition pour la lumière 98

1 Introduction 98

2 Matériels et méthodes 99
2.1 Dispositif expérimental 99
2.2 Mesures expérimentales et analyses 101

3 Résultats et discussion 102
3.1 Le contact cellulaire favorise les interactions négatives au sein du consortium 102
3.2 L'assimilation d'azote organique dissous n'est pas favorisée par les co-cultures avec séparation membranaire poreuse 105
3.3 La co-culture induit une double interaction O_2/CO_2 110

4 Conclusions 117

5 Remerciements et contributions 117

Chapitre 6 : Analyse de la dynamique O_2/CO_2 induite par les interactions entre *D. salina* et *C. watsonii* 119

1 Introduction 119

2 Matériel et méthodes 121
2.1 Conditions expérimentales 121
2.2 Mesures expérimentales 121
2.3 Modèle mathématique 121

3 Résultats et discussion 130
3.1 Estimation des paramètres 130

4 Simulation des dynamiques au sein des cultures 133

5 Conclusions 145

Conclusions et perspectives 148

La compétition pour la lumière, l'interaction principale entre *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii* 148
Les bactéries, des microorganismes nécessaires à la croissance du phytoplancton 149
Même en supprimant la compétition pour la lumière, la biomasse de *Dunaliella salina* n'augmente pas. 150
Des dynamiques liées aux métabolismes différents au sein de l'assemblage 152
Un modèle mathématique, outil indispensable pour guider les travaux de recherche 153
Conclusions et perspectives de cette thèse 154

Annexes 157

Annexe 1 – Chapitre 3 157

Annexe 2 – Chapitre 6 161

Annexe 3 – "Modelling an artificial microalgae-cyanobacteria ecosystem" 165

Annexe 4 – "Optimizing CO_2 transfer in algal open ponds" 171

Bibliographie 181

CARACTERISATION ET MODELISATION DES INTERACTIONS AU SEIN D'UN ASSEMBLAGE DE CYANOBACTERIES DIAZOTROPHES ET DE MICROALGUES 200

CHARACTERIZATION AND MODELLING OF THE INTERACTIONS WITHIN AN ASSEMBLAGE OF MICROALGAE AND DIAZOTROPHIC CYANOBACTERIA 200

Liste des figures

Figure 1 : Bassin ouvert de 2,61 m^2 de culture de *D. salina* à Villefranche-sur-Mer ; ferme de 20 hectares de *Nannochloropsis* sp. au Texas par Qualitas Health 24
Figure 2 : PBRs verticaux à la Fondation Cajamar par l'Université d'Almeria ; PBRs horizontaux à l'Université de Wageningen par AlgaePARC 25
Figure 3 : Exemple de croissance cellulaire de *D. salina* au cours du temps en batch avec les phases caractéristiques de latence (I), de croissance exponentielle (II) puis linéaire (III), stationnaire (IV) et de déclin (V). 26
Figure 4 : Les différents contacts entre bactéries et microalgues. A- Bactéries libres associées à la culture de *Dunaliella salina* ; B- Contact cellulaire entre *Chlorella sorokiniana* (Cs) et *Azospirillum brasilence* (Az) (d'après de-Bashan et al., 2016) ; C- Bactérie endophyte) à la diatomée *Pinnularia* cf. « *nobilis* » (d'après Schmid, 2003) 27
Figure 5 : Photographie d'une culture de *Dunaliella salina* en début de carence azotée où formes ovoïde et ronde se côtoient. 34
Figure 6 : Lac Hillier, lac hypersalin en Australie dont la couleur rose est due à la prédominance de la microalgue *D. salina* et de la bactérie *Halobacteria* 35
Figure 7 : Photographie d'une culture de *Crocosphaera watsonii*. 36
Figure 8 : Atténuation lumineuse au sein de la culture à cause de l'absorption et de la diffusion de la lumière par les microalgues (Pfaffinger et al., 2016). 39
Figure 9 : Configuration expérimentale de mono-cultures et de co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* en erlenmeyer dans l'incubateur. 46
Figure 10 : Système de co-culture par séparation membranaire. 46
Figure 11 : Configuration expérimentale de mono-cultures et de co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* avec et sans séparation membranaire. 47
Figure 12 : Exemple de comptage cellulaire d'une co-culture de *Crocosphaera watsonii* et de *Dunaliella salina* effectué à l'aide du Coulter Counter. 48
Figure 13 : Exemple de cytogramme où *D. salina* (pool vert) et *C. watsonii* (pool jaune) sont différenciées en fonction de leur granulosité (SSC) et de leur fluorescence naturelle en FL3 grâce à leur chlorophylle. 49
Figure 14 : Exemple de cytogramme où les bactéries (en bleu) et les billes de calibration (en rose) sont différenciées grâce à leur fluorescence en FL1 suite au marquage au SYBR-Green. 50
Figure 15 : Exemple de courbe de croissance cellulaire de *D. salina* (courbe verte) et de calcul du taux de croissance pendant la phase exponentielle de croissance (courbe noire). 51

Figure 16 : Exemple de gamme de dilution de l'urée (croix rouges) pour tester l'efficacité et la linéarité du protocole de mesure du DON. La régression linéaire (ligne noire) est effectuée pour les concentrations entre 0 et 45 µmol.L^{-1} 55
Figure 17 : Concentrations cellulaires de *D. salina* et de *C. watsonii* retenues sur les filtres GF/C (1,2 µm, Whatman) et GF/D (2,7 µm, Whatman) après filtration 57
Figure 18 : Ratios cellules mortes/cellules vivantes calculés pour différents ratios cellules mortes/cellules vivantes théoriques de *D. salina*. 59
Figure 19 : Exemple de cytogramme où le changement naturel de la fluorescence de *C. watsonii* permet de distinguer les cellules vivantes (pool « % alive ») des cellules mortes (pool « % dead »). 60
Figure 20 : Ratios cellules mortes/cellules vivantes calculés pour différents ratios cellules mortes/cellules vivantes théoriques de *C. watsonii*. 60
Figure 21: *C. watsonii* cell densities over time in mono-cultures and Low Density co-cultures (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 71
Figure 22: *D. salina* and *C. watsonii* growth rates in exponential phase and mortality rates in decline phase in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 72
Figure 23: *D. salina* cell densities over time in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 73
Figure 24: *D. salina* growth rates in exponential phase and mortality rates in decline phase in control, *C. watsonii* filtrate and co-culture with High *C. watsonii* Density (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviations between samples (n = 3). 74
Figure 25: NO_3^- concentration in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures over time (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 75
Figure 26: Dissolved organic nitrogen concentration in *D. salina* cultures in control, *C. watsonii* filtrate and co-cultures with High *C. watsonii* Density over time (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 77
Figure 27: Light intensity in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures over time (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 78
Figure 28: Light intensity in *D. salina* cultures in control, *C. watsonii* filtrate and co-cultures with High *C. watsonii* Density over time (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 79
Figure 29: *D. salina* in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data). 90
Figure 30: *C. watsonii* in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data). 91
Figure 31: Nitrates in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data). 92

Figure 32: Light in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data). 93
Figure 33: *D. salina* biomass nitrogen productivity ratios depending on the dilution rate and influent nitrate S_{in}. 95
Figure 34: *D. salina* and *C. watsonii* in mono-cultures and co-cultures for the best biomass nitrogen productivity scenario. 96
Figure 35 : Schéma du dispositif expérimental des différentes mono-cultures et co-cultures de *C. watsonii* et de *D. salina* étudiées au cours de cette expérience. 100
Figure 36 : Concentration cellulaire de *C. watsonii* au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-culture où n = 3). 102
Figure 37 : Concentration cellulaire de *D. salina* au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-culture où n = 3). 103
Figure 38 : Taux de croissance de *D. salina* et *C. watsonii*. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 104
Figure 39 : Concentration cellulaire en bactéries hétérotrophes au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 105
Figure 40 : Concentration en NO_3^- au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 106
Figure 41 : Quota intracellulaire carbone:azote au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 107
Figure 42 : Quota intracellulaire carbone:azote au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 108
Figure 43 : Concentration en azote organique dissous au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 109
Figure 44 : Concentration en dioxygène au cours du temps (n = 2 sauf pour les mono-cultures où n = 1). 111
Figure 45 : Exemple de la dynamique cyclique en dioxygène au cours d'une journée (n = 2 sauf pour les mono-cultures où n = 1). 113
Figure 46 : Évolution du pH au cours du temps (n = 1 sauf pour la co-culture où n = 2). 114
Figure 47 : Concentration en dioxyde de carbone au cours du temps (n = 1 sauf pour la co-culture où n = 2). 115
Figure 48 : Pourcentage de cellules vivantes de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3). 116
Figure 49 : Expérience pour caractériser le transfert de molécules et calculer la vitesse de diffusion à travers la membrane poreuse PVDF. Les photos ont été prises lors de l'ajout d'érythrosine d'un côté du système et 72 h après. 128

Figure 50 : Densité optique mesurée dans chaque compartiment après ajout de l'érythrosine pour caractériser la vitesse de transfert de molécule à travers la membrane PVDF (carrés : données expérimentales ; courbes : simulations des transferts par le modèle). 131
Figure 51 : Concentration cellulaire de *C. watsonii* au cours du temps. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. 133
Figure 52 : Concentration cellulaire de *D. salina* au cours du temps. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. 134
Figure 53 : Concentration en nitrates au cours du temps. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. 135
Figure 54 : Prévisions de l'intensité lumineuse au cours du temps dans les mono-cultures et les deux types de co-cultures de *D. salina* et *C. watsonii*. 136
Figure 55 : Concentration en dioxygène au cours du temps dans les mono-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les points représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. La ligne bleue représente la concentration en dioxygène de l'eau de mer sans microorganismes et en équilibre avec l'atmosphère. 137
Figure 56 : Concentration en dioxygène au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. La ligne bleue représente la concentration en dioxygène de l'eau de mer sans microorganismes et en équilibre avec l'atmosphère. 138
Figure 57 : Concentration en dioxygène au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* avec séparation membranaire (PVDF). Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. La ligne bleue représente la concentration en dioxygène de l'eau de mer sans microorganismes et en équilibre avec l'atmosphère. 138
Figure 58 : Évolution du pH au cours du temps dans les mono-cultures et co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. 139
Figure 59 : Évolution du pH au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. 140
Figure 60 : Évolution du pH au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* avec séparation membranaire (PVDF). Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. 141
Figure 61 : Contribution de *D. salina* à la modification de l'environnement dans les co-cultures et co-cultures avec séparation membranaire (PVDF) le dernier jour expérimental. 142
Figure 62 : Impact de la variation de l'intensité lumineuse sur *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution de *D. salina* à l'atténuation de la lumière au cours du temps en co-culture. 143

Figure 63 : Impact de la limitation pour le CO_2 de *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution de *D. salina* à la limitation pour le CO_2 au cours du temps en co-culture. 144
Figure 64 : Contribution de *D. salina* à la consommation d'O_2 au cours du temps en co-culture. 145
Figure 65 : Schéma bilan des interactions entre *D. salina* et *C. watsonii* 155
Figure 66: Experimental set-ups 157
Figure 67: *C. watsonii* cell densities over time in triplicates of mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A) 157
Figure 68: *D. salina* cell densities over time in triplicates of mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A) 158
Figure 69: Total nitrogen (particulate and dissolved) at the beginning and at the end of *D. salina*, *C. watsonii* mono-cultures and in Low *C. watsonii* density co-cultures (Experiment A). 158
Figure 70: *D. salina* cell densities over time in triplicates in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B) 159
Figure 71: *D. salina* cell densities over time in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3). 159
Figure 72: Nitrate over time in *D. salina* cultures in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B). 160
Figure 73: Total nitrogen (particulate and dissolved) at the beginning and at the end of *D. salina* cultures in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B). 160
Figure 74 : Expérience 1 de calibration : concentrations cellulaires de *C. watsonii* au cours du temps en mono-culture, co-culture et co-culture PVDF 161
Figure 75 : Expérience 1 de calibration : concentrations cellulaires de *D. salina* au cours du temps en mono-culture, co-culture et co-culture PVDF 162
Figure 76 : Expérience 1 de calibration : concentration en nitrates au cours du temps en mono-culture, co-culture et co-culture PVDF 162
Figure 77 : Expérience 2 de calibration : teneur en O_2 au cours du temps en mono-cultures 163
Figure 78 : Expérience 2 de calibration : pH au cours du temps en mono-cultures 163
Figure 79 : Impact de l'atténuation lumineuse sur *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture PVDF au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution φI de *D. salina* dans la limitation de cette ressource au cours du temps en co-culture PVDF. 164
Figure 80 : Impact de la compétition pour le CO_2 de *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture PVDF au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution φCI de *D. salina* dans cette compétition au cours du temps en co-culture PVDF. 164

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de productions mondiales annuelles des principales espèces de microalgues autotrophes commercialisées d'après 1- Spolaore et al., 2006 ; 2- Andrade et al., 2018 ; 3- Milledge, 2012 ; 4- Benemann et al., 2018 22
Tableau 2 : Composition du milieu F/2 44
Tableau 3 : Composition de la solution de métaux traces à ajouter au milieu F/2 44
Tableau 4 : Composition du mélange de vitamines à ajouter au milieu F/2 45
Table 5: Parameters list (obtained from (a): preliminary experiments; (b): bibliography; (c): fitting) . 89
Tableau 6 : Liste des paramètres (optimisation grâce à une expérience de calibration par (a) : calibration experte ; (b) : la méthode des moindres carrés) 132

Glossaire

ATP	Adénosine triphosphate
C. watsonii	*Crocosphaera watsonii*
C:N	Ratio molaire carbone/azote
CO_2	Dioxyde de carbone
D. salina	*Dunaliella salina*
DMSP	Diméthylsulfoniopropionate
DON	Azote organique dissous (« Dissolved Organic Nitrogen »)
CI	Carbone inorganique
EMQ	Eau milliQ
FDA	Di-acétate de fluorescéine
HCl	Acide chlorhydrique
NaCl	Chlorure de sodium
MI	Matière inorganique
MO	Matière organique
MS	Matière sèche
O_2	Dioxygène
NaOH	Hydroxyde de sodium (soude caustique)
N_2	Diazote
NH_4^+	Ammonium
NO_2^-	Nitrites
NO_3^-	Nitrates
PAR	Radiations photosynthétiquement actives (« Photosynthetically Active Radiation »)
PBR	Photobioréacteur
pH	Potentiel hydrogène
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
Rpm	Rotation par minute

Introduction générale et objectifs

Les microalgues et les cyanobactéries sont des microorganismes photoautotrophes, respectivement eucaryotes et procaryotes, qui peuvent être uni ou pluricellulaires. Elles constituent la majorité du phytoplancton du milieu marin et contribuent à la moitié de la production primaire globale de carbone (Field et al., 1998). Grâce à leur activité photosynthétique, qui consiste en la fixation du dioxyde de carbone (CO_2) avec l'utilisation de la lumière comme source énergétique, ces microorganismes représentent la source biologique principale de carbone dans les écosystèmes marins (Falkowski et al., 1998). A la base des réseaux trophiques, le phytoplancton permet alors à toutes les formes de vie des écosystèmes marins de bénéficier de cette source de carbone inorganique fixée grâce à la lumière. Une large partie de cette production primaire se retrouve cependant sous forme organique dissoute à cause de l'excrétion directe du phytoplancton et indirecte du zooplancton l'ayant consommé. Les bactéries hétérotrophes sont les consommateurs majoritaires de ce carbone organique qui se retrouve alors de nouveau dans le réseau trophique lorsqu'elles-mêmes sont consommées par du nanoplancton (Azam and Malfatti, 2007). Cette voie de réassimilation du carbone par la boucle bactérienne constitue une voie de production secondaire représentant jusqu'à 30 % de la production primaire (Ducklow and Carlson, 1992).

Il existe de nombreuses microalgues et cyanobactéries et le nombre d'espèces a été estimé entre 1 et 10 millions. Les cyanobactéries et les microalgues peuvent mesurer de 0,5 à 10^4 microns (Finkel et al., 2010) et sont de formes et de couleurs très variées grâce aux différents pigments les composant. De par leur grande diversité, ces microorganismes colonisent des habitats très variés, aussi bien aquatiques (eaux marines, douces et saumâtres) que terrestres (Metting, 1996). Ils résistent à de forts changements de salinité, de température, de nutriments et d'ensoleillement (Mobin and Alam, 2017). Les microalgues et les cyanobactéries vivent donc dans des habitats naturels complexes et ont su s'adapter aux conditions les plus extrêmes. On les retrouve ainsi dans les sols désertiques (Perera et al., 2018), aux alentours des geysers (Jones et al., 2003) ou dans la banquise (Morgan-Kiss et al., 2006).

Cette large variété d'espèces et de propriétés permet la production de multiples molécules à haute valeur ajoutée comme les vitamines, les antioxydants, les sucres, les protéines et les lipides (Mata et al., 2010). Les microalgues et les cyanobactéries représentent ainsi un réservoir de composés chimiques d'intérêt économique fort qui explique le développement de leur

culture dans de nombreux domaines comme l'agronomie, la nutrition humaine et animale, la pharmaceutique, et la production de biocarburants.

Comme pour l'agriculture intensive et productiviste, la mono-culture de microalgue est actuellement le paradigme dominant pour la production à grande échelle alors que les contaminations par des bactéries et d'autres microalgues compétitrices, voire de microorganismes brouteurs, sont inévitables en culture ouverte. Ces contaminations déciment parfois totalement la culture en quelques jours. Or, maintenir la culture sélectionnée monospécifique et éviter les contaminations extérieures augmentent fortement les coûts de production (Lian et al., 2018). En effet, différentes stratégies sont appliquées pour éliminer les contaminations comme la filtration de la culture et l'ajout d'agents chimiques pour la stériliser. De la même manière, les espèces extrêmophiles sont cultivées car elles supportent des alcalinités et/ou des salinités élevées et dominent ainsi leurs compétiteurs (Wang et al., 2013).

L'association de microalgues et de bactéries spécifiques permet pourtant d'améliorer la résistance aux changement de température, de pH et de milieu (Olguín, 2012). Un écosystème mixotrophe microalgues-bactéries permet effectivement d'assimiler à la fois les ressources en matières organique (MO) et inorganique (MI) présentes dans le milieu grâce à leurs voies métaboliques différentes et ainsi d'augmenter la productivité de biomasse. En effet, les microalgues et les cyanobactéries fournissent du dioxygène (O_2) et du carbone organique aux bactéries grâce à la photosynthèse tandis que les bactéries leur apportent du CO_2, de l'azote inorganique et des vitamines nécessaires à leur croissance (Fouilland, 2012). Comme pour la permaculture où les systèmes agricoles sont développés en synergie et constituent un écosystème durable et productif, les co-cultures de microalgues et de bactéries sont nécessaires et permettent d'assurer une résilience et une productivité pérenne de la culture à grande échelle (Newby et al., 2016). Un changement de paradigme s'impose alors dans lequel les cultures monospécifiques doivent devenir des polycultures domestiquées et inspirées des écosystèmes naturels pour adopter une stratégie de développement durable à l'échelle industrielle.

De plus, l'apport d'engrais chimiques azotés représente jusqu'à 10% des coûts de production de culture de microalgues à grande échelle (Chen et al., 2018), une charge lourde autant d'un point de vue économique qu'environnemental (Lardon et al., 2009). En effet, la production d'un kilo d'engrais azoté demande l'énergie d'un kilo d'essence (Skowrońska and Filipek, 2014). En agriculture raisonnée, une alternative à l'utilisation de ces engrais est d'associer notamment la culture de légumineuses à des bactéries diazotrophes. Ces bactéries utilisent principalement

le diazote atmosphérique (N_2) comme source azotée et enrichissent le sol en azote alors assimilable par les légumineuses (Hocher et al., 2009). Inspirées de ces symbioses naturelles, les co-cultures de microalgues et de cyanobactéries ont été identifiées comme un moyen prometteur pour subvenir aux besoins en nutriment azoté des microalgues (Do Nascimento et al., 2015). Aucun microorganisme eucaryote n'a en effet été décrit comme capable d'assimiler le N_2 alors qu'il s'agit de la source principale d'azote de ces cyanobactéries diazotrophes grâce à leur enzyme nitrogénase (Thompson et al., 2012). Ces cyanobactéries fixatrices de N_2 sont par ailleurs connues pour relarguer jusqu'à 50% de l'azote fixé par cette voie métabolique dans le milieu, alors assimilable pour d'autres microorganismes procaryotes ou eucaryotes (Bonnet et al., 2016). Un tel consortium permet donc de limiter l'apport en azote inorganique et de réduire les coûts associés à la culture. Ce type de co-culture est ainsi doublement bénéfique pour assurer le développement et la pérennité du procédé, autant d'un point de vue économique qu'environnemental.

Cependant, les interactions au sein de consortium naturels et artificiels sont mal connues et peu d'études ont été réalisées sur la sélection et l'optimisation de co-cultures à vocation industrielle (Kouzuma and Watanabe, 2015; Lian et al., 2018). Les interactions au sein d'un écosystème sont en effet complexes et peuvent résulter d'un ensemble d'interactions positives (échanges d'azote, de vitamines, d'O_2 et de CO_2), négatives (compétition pour les nutriments, production de molécules allélopathiques comme des antibiotiques ou des toxines) ou neutres (Kazamia et al., 2012; Ternon et al., 2018). Ces interactions dépendent des paramètres environnementaux tels que la disponibilité en nutriments, la température, la lumière et le pH et sont donc multivariables (Le Chevanton et al., 2016; Seymour et al., 2017). Une meilleure compréhension des interactions au sein de ces écosystèmes est primordiale pour exploiter tout le potentiel de ces consortiums. L'étude et l'optimisation de co-cultures doivent donc être réalisées à l'échelle du laboratoire avant d'être déployées à l'échelle industrielle.

Les objectifs de cette thèse ont été de caractériser et de comprendre les interactions au sein d'un écosystème simplifié de microalgues d'intérêt économique et de cyanobactéries diazotrophes grâce à une approche à la fois expérimentale et de modélisation. La physiologie de ces microorganismes a été caractérisée en mono-culture et en co-culture dans différents dispositifs expérimentaux pour comprendre l'impact de la co-culture sur les espèces. Le modèle mathématique a permis d'interpréter et de quantifier les interactions au sein de l'assemblage. Cette étude avait également pour objectif d'optimiser les échanges azotés et d'augmenter la production de biomasse au sein du consortium artificiel dans le but d'une application

industrielle. Enfin, cette thèse avait pour objectif de créer un outil mathématique relativement générique de compréhension et de prédiction des interactions au sein d'un écosystème artificiel.

Ce manuscrit est composé de six chapitres. Tout d'abord, le chapitre 1 introduit l'intérêt de cultiver des assemblages microalgues-bactéries à grande échelle et résume les connaissances et recherches actuelles sur le sujet. Ce chapitre traite également du bénéfice d'allier expérimentation et modélisation mathématique. Grâce à cette revue de la littérature, un assemblage artificiel de la microalgue d'intérêt économique *Dunaliella salina* et de la cyanobactérie diazotrophe *Crocosphaera watsonii* a été sélectionné. Le chapitre 2 décrit les différents dispositifs et mesures expérimentales effectuées au cours de cette thèse. L'hypothèse de départ était de favoriser la production de biomasse de *D. salina* grâce à l'apport azoté dérivé de la fixation d'azote de *C. watsonii*. La croissance de ces deux microorganismes a ainsi été caractérisée expérimentalement lors de mono-cultures et de co-cultures dans le chapitre 3. Un modèle mathématique a ensuite été construit pour comprendre les interactions au sein de ce consortium et est présenté dans le chapitre 4. L'ajout de bactéries sélectionnées pour reminéraliser l'azote excrété par *C. watsonii* et optimiser l'assimilation par *D. salina* a également été étudié dans ce chapitre grâce à cette approche mathématique. Des expériences de co-cultures par séparation membranaire ont ensuite été réalisées dans le chapitre 5 pour favoriser les interactions bénéfiques à la croissance de l'assemblage tout en s'affranchissant de la compétition pour la lumière. La caractérisation des différentes interactions entre *C. watsonii* et *D. salina* a ainsi permis de créer le modèle mathématique décrit dans le chapitre 6, réel outil de compréhension et de prédiction des interactions directes et indirectes au sein de cet écosystème simplifié. Enfin, les principaux résultats obtenus sont synthétisés et discutés dans une dernière partie qui conclut également ce travail et ouvre des perspectives, autant d'un point de vue fondamental qu'appliqué.

Les résultats de ce doctorat ont été valorisés dans les publications suivantes :

- Caia M., Bernard O., Steyer J.-P., 2018. Modelling an artificial microalgae-cyanobacteria ecosystem, publié dans IFAC PapersOnLine, 51-2: 655–660.
- Caia M., Bernard O., Béchet Q., 2018. Optimizing CO_2 transfer in algal open ponds, publié dans Algal Research, 35: 530-538.
- Caia M., Zhang M., Steyer J.-P., Bernard O., Assessing the potential of co-culturing *Dunaliella salina* with N_2-fixing *Crocosphaera watsonii*, prochainement soumis au Journal of Applied Phycology.

Les résultats découlant de ce travail de recherche ont également été présentés lors des conférences internationales suivantes :

- Caia M., Bernard O., Steyer J.-P., Characterization and modelling of interactions within an ecosystem of microalgae and cyanobacteria, EUAlgae training school, Microalgae processes: from fundamentals to industrial scale, 2017 – Almería, Espagne (poster)
- Caia M., Bernard O., Steyer J.-P., Modelling an artificial microalgae-cyanobacteria ecosystem, MATHMOD, 9th International Conference on Mathematical Modelling, 2018 – Vienne, Autriche (présentation orale)
- Caia M., Bernard O., Steyer J.-P., Assembling microalgae and N_2-fixing cyanobacteria to reduce inorganic nitrogen supply, Young Algaeneers Symposium, 2018 – Oban, Ecosse (présentation orale)

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1 Intérêt économique et valorisation industrielle des microalgues et cyanobactéries

1.1 Production de molécules d'intérêt

Les deux espèces majoritairement cultivées à l'échelle industrielle sont *Chlorella* sp. et *Spirulina* sp., qui représentent 90% des 20 000 tonnes de biomasse sèche produites mondialement (Tableau 1; (Benemann et al., 2018). *Dunaliella salina* et *Haematococcus pluvialis* sont deux autres espèces majoritairement cultivées pour leur croissance rapide et leur forte teneur en ß-carotène et en asthaxantine (Mobin and Alam, 2017). Leur production annuelle représente environ 1 500 tonnes de matière sèche (MS) par an mais leur teneur en molécules à haute valeur ajoutée leur confère un intérêt économique de l'ordre de la centaine de millions de dollars américains (Benemann et al., 2018).

Tableau 1 : Exemples de productions mondiales annuelles des principales espèces de microalgues autotrophes commercialisées d'après 1- Spolaore et al., 2006 ; 2- Andrade et al., 2018 ; 3- Milledge, 2012 ; 4- Benemann et al., 2018

Espèce	Production	Molécules d'intérêt	Application	Références
Spirulina sp.	15 500 t/an MS	Protéines, vitamines, phycocyanine	Agroalimentaire, santé	1, 2
Chlorella sp.	2 500 t/an MS	Protéines, vitamines, lipides	Agroalimentaire, biocarburants	1, 2
Dunaliella salina	1 200 t/an MS	Caroténoïdes, lutéine, lipides	Agroalimentaire, santé, biocarburants	1, 3
Haematococcus pluvialis	300 t/an MS	Caroténoïdes, asthaxantine	Santé, agroalimentaire	1, 4

Ces microorganismes permettent la production industrielle de différents composés chimiques à haute valeur ajoutée comme les vitamines, les antioxydants, les polysaccharides, les protéines

et les lipides qui peuvent représenter jusqu'à 70% de leur poids sec (Mata et al., 2010). Cette diversité de molécules produites explique le déploiement de la culture de microalgues dans de nombreux domaines comme l'agroalimentaire, la pharmaceutique, la production de biocarburants. Les pigments et autres molécules naturelles à haute valeur ajoutée extraits des microalgues sont les mieux valorisés d'un point de vue économique comme additifs alimentaires ou dans les cosmétiques et les médicaments avec un revenu jusqu'à 30 €.kg^{-1} (Ruiz et al., 2016). Lorsque les microalgues sont vendues telles quelles pour la production de biocarburant, produits chimiques et nourriture, elles représentent un revenu de 10 à 100 fois inférieur (Ruiz et al., 2016).

Les coûts de production et de transformation restent cependant élevés et de nombreux verrous restent à lever pour diminuer les coûts de culture. Même à grande échelle, la culture de microalgues a un coût élevé (environ 5 €.kg^{-1}, Christenson and Sims, 2011) car celle-ci requiert le pompage d'eau, l'apport de fertilisants azotés et phosphatés, la récolte de ces organismes microscopiques et leur raffinerie (Mehrabadi et al., 2015). L'utilisation d'eaux usées permet de réduire les apports en eau et en fertilisants chimiques et minéraux (Bhatnagar et al., 2011). Ces eaux usées riches en nutriments permettent de fournir à la culture les apports nécessaires à sa croissance cellulaire. Elles sont alors dépolluées par les microalgues qui consomment une grande partie de l'azote et du phosphore inorganiques. Elles peuvent ensuite être recyclées dans le système de culture ou rejetées dans l'environnement si elles respectent les normes environnementales. L'utilisation d'eaux usées pour la culture des microalgues permet donc de réduire les coûts d'apport en eau et en engrais tout en réduisant l'empreinte environnementale du système (Olguín, 2012).

1.2 Systèmes de culture à grande échelle

Les microalgues sont majoritairement cultivées dans deux types de systèmes : les systèmes fermés appelés photobioréacteurs (PBRs) et les systèmes ouverts qui sont des bassins à haut rendement algal.

Les bassins ouverts sont étudiés depuis les années 1960. Ils peuvent être de formes variées mais le plus commun est le « raceway », où l'homogénéisation au sein de cette boucle fermée de faible profondeur (10 à 50 cm) résulte de l'action d'une roue à aubes (Figure 1). Ces bassins représentent des coûts de production faibles mais conduisent à des productivités limitées pour des densités cellulaires modestes (jusqu'à 1 kg.m^{-3} ; Christenson and Sims, 2011). Cette faible

production de biomasse s'explique par le fait que le milieu est ouvert, ce qui favorise notamment les pertes de CO_2 (Benemann et al., 2018; Putt et al., 2011), l'évaporation de l'eau (Béchet et al., 2016) et la contamination par des espèces concurrentes ou des prédateurs (Apel and Weuster-Botz, 2015; Lam et al., 2018). L'homogénéisation est inégale au sein de la culture et des zones d'ombre persistent alors, ne permettant pas la pénétration totale de la lumière au sein de la colonne d'eau (Benemann et al., 2018). Ces bassins sont de plus soumis aux variations journalières et saisonnières de température. Les difficultés pour maintenir à long terme une mono-culture à grande échelle expliquent pourquoi la majorité des espèces produites sont extrêmophiles. Elles peuvent tolérer de fortes alcalinités (*Spirulina*) ou des salinités très élevées (*Dunaliella salina*) et ainsi dominer leurs compétiteurs (Abomohra et al., 2016).

Figure 1 : Bassin ouvert de 2,61 m^2 de culture de *D. salina* à Villefranche-sur-Mer ; ferme de 20 hectares de *Nannochloropsis* sp. au Texas par Qualitas Health

Les PBRs ont été souvent privilégiés au moins pour la R&D, car ils ont l'avantage de limiter les contaminations extérieures et de maintenir plus longtemps une culture monospécifique. De géométries variées, les PBRs tubulaires et plans, horizontaux ou verticaux, sont les plus communs dans la littérature (Carvalho et al., 2006 ; Figure 2). Grâce à leur faible épaisseur, les PBRs permettent à la lumière naturelle d'être distribuée de manière plus homogène au sein de la culture. L'ensemble de la culture est donc illuminé. L'avantage d'être fermés est aussi de réduire les pertes de CO_2 vers l'atmosphère. La composition et l'homogénéisation du milieu (donc l'apport en nutriments, la température et le pH) sont ainsi mieux contrôlées qu'en bassin ouvert et permettent d'optimiser leur productivité, avec des densités plus élevées (27 kg.m^{-3} ; Masojídek et al., 2015).

Figure 2 : PBRs verticaux à la Fondation Cajamar par l'Université d'Almeria ; PBRs horizontaux à l'Université de Wageningen par AlgaePARC

Cependant, ces systèmes fermés coûtent nettement plus chers que les bassins ouverts, de par le matériel et les infrastructures mobilisées. Un équilibre économique doit donc être atteint entre une forte productivité de biomasse et de faibles coûts de production et de maintenance.

1.3 Cultures en *batch*

Les cultures en *batch* consistent en l'ajout de nutriments lors de l'inoculation des microorganismes. Les nutriments sont consommés et la lumière s'atténue progressivement alors que la biomasse s'accumule dans le milieu. Les métabolites produits par les microorganismes se concentrent également au cours de l'expérience.

Quatre phases de croissance cellulaire se succèdent lors d'une culture en *batch* (Figure 3). Tout d'abord, une phase de latence cellulaire d'adaptation (I) est observée. S'ensuit une phase de croissance exponentielle (II) pendant laquelle les cellules se divisent à un taux maximal. Cette phase optimale de croissance cellulaire ralentit et devient alors linéaire (III) car les éléments nutritifs et la lumière deviennent progressivement limitants à cause de la consommation de ceux-ci et de l'auto-ombrage dû à l'accumulation de biomasse. Lorsque l'élément limitant a été totalement consommé, la croissance cellulaire ralentit fortement pour cesser, les cellules puisant dans leurs réserves. C'est la phase stationnaire (IV). Survient enfin la phase de déclin lorsque la mortalité cellulaire prédomine au sein de la culture (V).

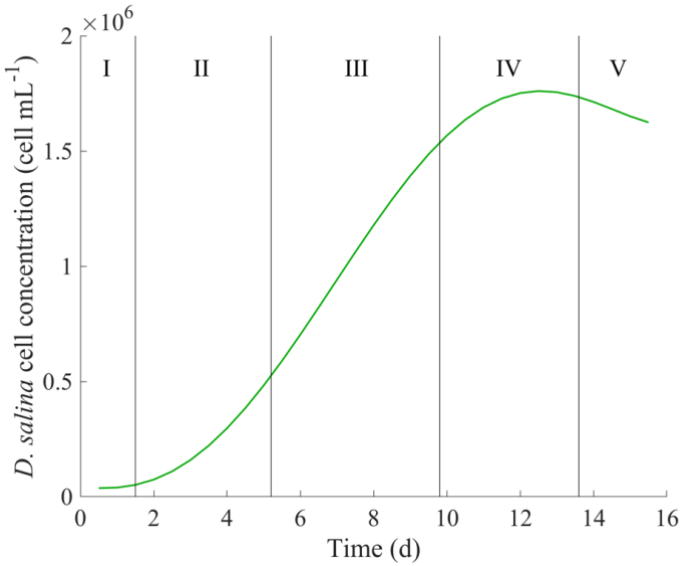

Figure 3 : Exemple de croissance cellulaire de *D. salina* au cours du temps en batch avec les phases caractéristiques de latence (I), de croissance exponentielle (II) puis linéaire (III), stationnaire (IV) et de déclin (V).

2 Les interactions microalgues/bactéries

Les algues vivent majoritairement avec de nombreux microorganismes comme les virus et les bactéries (Lian et al., 2018). Les interactions entre les microalgues et les bactéries, nombreuses et complexes, ont suscité de nombreux travaux, mais les mécanismes mis en jeu sont souvent difficiles à isoler et à comprendre. Les interactions peuvent être positives (Kazamia et al., 2012; Xue et al., 2018), neutres (Fulbright et al., 2018) ou négatives (Le Chevanton et al., 2016; Ramanan et al., 2016; Ternon et al., 2018) ou bien une combinaison complexe de plusieurs interactions peut exister.

2.1. Des interactions directes et indirectes

2.1.1 La phycosphère, lieu d'échange privilégié

La phycosphère chez les microalgues et cyanobactéries est l'équivalent de la rhizosphère chez les plantes. Les échanges entre ces microorganismes et les bactéries sont donc favorisés à la microéchelle de cet environnement (Sapp et al., 2007). Les contacts entre les bactéries et le phytoplancton peuvent avoir lieu de trois manières différentes.

Les bactéries et le phytoplancton peuvent se rencontrer de façon aléatoire grâce à la turbulence du milieu, mais un déplacement actif, par chimiotactisme, peut aussi conduire à un rapprochement. Ce chimiotactisme implique la production de molécules spécifiques comme des acides aminés ou le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) (Seymour et al., 2010). Ces deux modes d'échanges fugaces et aléatoires peuvent être prolongés si les bactéries s'attachent à la surface cellulaire du phytoplancton ou à leur possible matrice de substances polymériques extracellulaires (Seymour et al., 2017).

En l'absence de motilité ou de chimiotactisme, les échanges sont favorisés lorsque les bactéries sont attachées sur la surface cellulaire du phytoplancton ou lorsqu'elles sont endophytes et se développent au sein de la cellule (Vu et al., 2018).

Van Tol et al. (2017) ont montré que la bactérie *Croceibacter atlanticus* se fixait à la surface de la diatomée *Thalassiosira pseudonana* et inhibait sa division cellulaire tout en induisant une augmentation de sa taille et de son accumulation de chlorophylle. Ces changements permettaient d'augmenter la surface de colonisation, et donc d'échange, tout en favorisant la production de métabolites par une activité cellulaire accrue de la diatomée.

Récemment, des technologies émergentes comme l'imagerie isotopique NanoSIMS et FISH ont permis d'étudier les contacts cellulaires au sein de co-cultures. C'est le cas de de-Bashan et al. (2016) qui ont forcé une association artificielle *Chlorella sorokiniana* - *Azospirillum brasilence* et ont montré que deux microorganismes restaient attachés entre eux par la suite (Figure 4). La microalgue fournissait alors des composés carbonés à la bactérie qui favorisait en retour sa croissance cellulaire.

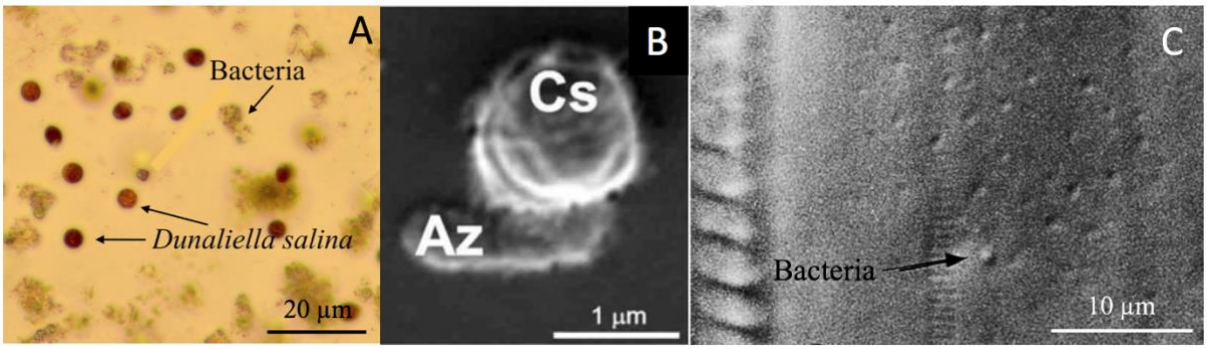

Figure 4 : Les différents contacts entre bactéries et microalgues. A- Bactéries libres associées à la culture de *Dunaliella salina* ; B- Contact cellulaire entre *Chlorella sorokiniana* (Cs) et *Azospirillum brasilence* (Az) (d'après de-Bashan et al., 2016) ; C- Bactérie endophyte) à la diatomée *Pinnularia* cf. « *nobilis* » (d'après Schmid, 2003)

2.1.2 Le mutualisme, une interaction profitable aux deux microorganismes

Deux microorganismes se développent ensemble avec un effet bénéfique pour l'un ou les deux. Il s'agit de commensalisme lorsqu'un seul des microorganismes profite de l'interaction et de mutualisme lorsque le bénéfice est mutuel. La symbiose est une interaction mutualiste spécifique où deux microorganismes se développent strictement l'un avec l'autre en affectant positivement leurs métabolismes et fonctions cellulaires respectifs (Kazamia et al., 2016).

Les microalgues et leurs bactéries associées ont ainsi généralement une relation mutualiste voire symbiotique. En effet, les algues fournissent de l'O_2 aux bactéries grâce à la photosynthèse tandis que les bactéries produisent du CO_2, des nitrites et des vitamines tout en assimilant le carbone organique exsudé par les microalgues (Fouilland, 2012). Certaines bactéries fournissent aussi des molécules spécifiques aux microalgues comme la vitamine B_{12} (Croft et al., 2005) ou du fer chélaté nécessaire à la photosynthèse (Amin et al., 2009). Il est donc souvent difficile de cultiver des microalgues sans leur microbiote car cela réduit leur croissance cellulaire voire la rend impossible (Lian et al., 2018; Lutzu and Turgut, 2018). Biondi et al. (2018) ont en effet montré que huit bactéries spécifiquement associées à *Tetraselmis suecica*, cultivées une à une avec celle-ci favorisaient sa production de biomasse une fois les nutriments du milieu épuisés. Ils ont ainsi mis en évidence l'importance du recyclage de nutriments par les bactéries qui permet alors un gain de biomasse en co-culture par rapport à une culture axénique.

2.1.3 L'allélopathie, une interaction indirecte induite par une molécule intermédiaire

L'allélopathie est l'interaction négative ou positive entre deux microorganismes résultant de la production de métabolites par l'un ou l'autre. Les microorganismes interagissent alors entre eux par l'intermédiaire de ces substances allélochimiques. Cette production de molécules allélopathiques, notamment sous la forme de toxines, est connue chez les cyanobactéries et les microalgues (Ternon et al., 2018).

Ces composés allélochimiques permettent tout d'abord de structurer la communauté et d'induire des relations mutualistes. C'est le cas d'*Anabaena*, une cyanobactérie qui attire la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* par chimiotactisme pour créer une relation mutualiste au

cours de laquelle ces microorganismes partagent l'azote fixé disponible (Kaebernick and Neilan, 2001).

La production de telles molécules confère également un avantage contre les microorganismes compétiteurs (Jonsson et al., 2009). Bittencourt-Oliveira et al. (2015) ont notamment montré que la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* augmentait sa production de microcystine en présence de microalgues vertes compétitrices et réduisait leur croissance cellulaire.

La production de telles molécules allélochimiques mobilise l'énergie cellulaire et une forte concentration est souvent requise pour impacter les autres organismes. Plusieurs études ont ainsi comparé des co-cultures directes et par séparation membranaire ainsi que des mono-cultures sur des filtrats d'autres cultures (Dias et al., 2017; Dunker et al., 2017; Ternon et al., 2018) pour étudier les interactions allélopathiques. Ces fortes concentrations en molécules allélochimiques sont atteintes soit aux abords de la cellule par rejet direct ou dans le milieu en cas de haute densité cellulaire (Babica et al., 2007).

2.1.4 La compétition, une interaction directe à l'échelle de l'écosystème

Les nutriments et la lumière sont les ressources majeures pour la croissance du phytoplancton (Tilman, 1982). Des compétitions pour les nutriments peuvent donc exister au sein des co-cultures, notamment lors d'une limitation par l'azote ou le phosphore. L'affinité pour l'azote est plus grande pour les bactéries que pour le phytoplancton, ce qui leur permet une assimilation plus rapide et importante (Meseck et al., 2007). Danger et al. (2007) ont montré que la microalgue *Scenedesmus* est en compétition avec sa communauté de bactéries associée dès que le milieu est limité en éléments phosphorés.

Burson et al. (2018) ont montré que la compétition pour la lumière devient l'interaction principale lorsque que les nutriments sont en excès dans le milieu. En effet, de fortes biodisponibilités en nutriments permettent une biomasse phytoplanctonique importante, augmentant alors l'auto-ombrage. La lumière limitée est ainsi moins disponible au sein de l'écosystème. Les organismes ayant la plus grande affinité pour la lumière prennent alors le pas sur les autres (Huisman et al., 1999). C'est le cas des cyanobactéries filamenteuses qui prédominent sur leur communauté phytoplanctonique lors d'une atténuation lumineuse forte causée par un *bloom* (Scheffer et al., 1997).

Burson et al. (2018) ont cependant montré que des coexistences peuvent exister en cas de limitation par la lumière malgré des affinités différentes. Les différentes espèces au sein d'un écosystème n'absorbent en effet pas les mêmes spectres lumineux ou n'ont pas la même affinité pour les nutriments, et ont donc des taux de croissance différents.

Cependant, les études des effets concomitants d'une limitation en nutriments et en intensité lumineuse au sein d'écosystèmes naturels ou artificiels sont encore rares. Les liens entre les changements environnementaux, la structure et les interactions au sein même de l'assemblage sont donc encore méconnus (Bengtsson et al., 2018).

2.2 Des interactions multiples et complexes

Les études sur le rôle des bactéries présentes dans la phycosphère et au sein d'écosystèmes naturels et artificiels attestent de la complexité de ces interactions et témoignent de l'intérêt d'atteindre des symbioses. Ces interactions peuvent évoluer car elles dépendent également de différents paramètres environnementaux comme le pH, le CO_2, la biodisponibilité des nutriments et de la lumière (Huisman et al., 1999; Seymour et al., 2017; Ying, 2014).

Certaines bactéries naturellement présentes dans la phycosphère stimulent la croissance des microalgues ou favorisent la production de molécules d'intérêt (Cho et al., 2015; Gonçalves et al., 2016). Par exemple, Le Chevanton et al. (2016, 2013) ont isolé la bactérie marine *Alteromonas* sp. dans la phycosphère de *Phaeodactylum tricornutum*. Cette bactérie favorisait la croissance cellulaire d'une souche de *Dunaliella salina* en conditions non-limitées mais devenait sa compétitrice dès que le milieu était limité en azote, passant donc d'une interaction mutualiste à une interaction négative. Beliaev et al. (2014) ont montré que des échanges de métabolites spécifiques avaient lieu entre la bactérie hétérotrophe *Shewanella putrefaciens* et la cyanobactérie *Synechococcus* sp. tandis que cette dernière permettait de limiter le stress oxydatif en co-culture. Christie-Oleza et al. (2015) ont identifié des bactéries hétérotrophes *Roseobacter* capables de dégrader les biopolymères produits par la cyanobactérie *Synechococcus* et de les rendre ainsi biodisponibles.

Des co-cultures ont été récemment effectuées entre des cyanobactéries diazotrophes et des microalgues. Adam et al. (2015) ont notamment montré que la cyanobactérie *Aphanizomenon* transférait l'azote fixé par son activité diazotrophe sous forme d'ammonium à la communauté phytoplanctonique associée. Berthelot et al. (2016, 2015) ont également montré que les

diazotrophes *Trichodesmium erytraeum* et *Crocosphaera watsonii* favorisaient la croissance des bactéries et du phytoplancton hétérotrophes, et dans une moindre mesure, du phytoplancton autotrophe.

Toutes ces études attestent de la diversité des interactions au sein des assemblages, qu'ils soient naturels ou synthétiques.

2.3 Potentiel des co-cultures à grande échelle

La culture d'un écosystème mixotrophe algues/bactéries plutôt qu'une culture monospécifique autotrophe permet d'utiliser à la fois les ressources en matières organique (MO) et inorganique (MI) présentes dans le milieu et cela permet d'augmenter la productivité et donc la biomasse (Bhatnagar et al., 2011).

Associer différentes espèces d'algues et de bactéries entre elles permet également d'occuper les niches écologiques du système. Ces écosystèmes absorbent alors en plus grande quantité les éléments nutritifs car les organismes présents ont des voies métaboliques différentes. Cette diversité de métabolisme au sein d'un écosystème naturel ou artificiel lui permet de mieux s'adapter à un changement de composition du milieu (Fouilland, 2012). En effet, un stress entraîne des changements dans les écosystèmes en milieu naturel. Il est important de cultiver un écosystème dont les espèces répondent différemment à ce genre de stress pour survivre et ainsi éviter une perte parfois totale de la culture (Bhatnagar et al., 2011).

Comme pour l'agriculture intensive, la monoculture est le paradigme dominant pour la production de microalgues. Comme déjà souligné, le coût pour rester monospécifique et éviter les contaminations biologiques est cependant très important. En effet, la contamination par des bactéries et d'autres microalgues compétitrices ainsi que par des microorganismes brouteurs comme les ciliés réduit fortement la productivité (Mehrabadi et al., 2015).

Dans l'idée du développement d'une forme de « micro-permaculture », l'association de microalgues et de bactéries spécifiques permettrait d'augmenter la productivité de biomasse (Olguín, 2012). Les communautés artificielles en symbiose permettraient également d'améliorer la résistance aux changements de température, de pH et de milieu auxquels sont soumis les cultures à grande échelle (Bhatnagar et al., 2011; Fouilland, 2012; Fuentes et al., 2016).

La majorité des études sur les associations naturelles de microalgues et de bactéries ont été menées dans des bassins de traitement d'eaux usées (Yang et al., 2018). Peu d'études ont été effectuées sur l'identification des bactéries naturellement présentes dans des bassins de culture à grande échelle (Lian et al., 2018) et l'optimisation de co-cultures à vocation industrielle car c'est un domaine relativement nouveau (Kouzuma and Watanabe, 2015). Ces associations microalgues-bactéries ne sont toutefois pas comparables car les eaux usées sont riches en matière inorganique et organique tandis que les systèmes de production de microalgues limitent l'apport de nutriments inorganiques.

Les assemblages microalgues-bactéries pourraient permettre d'augmenter la production de biomasse algale et de molécules à haute valeur ajoutée comme les lipides. Cependant, les interactions au sein du consortium peuvent être complexes et moduler les gains en production de biomasse et de molécules d'intérêts. Xue et al. (2018) ont ainsi montré que la culture de bactéries une à une avec une souche axénique de *Chlorella vulgaris* permettait d'augmenter sa teneur en lipides jusqu'à 33,84%. Cependant, la biomasse cellulaire de la microalgue était au contraire limitée après l'ajout d'un consortium bactérien supposé bénéfique. Ces bactéries entraient en effet en compétition entre elles pour le carbone excrété par *C. vulgaris* et ne profitaient plus à la microalgue.

Les co-cultures permettent de diminuer les coûts de production à grande échelle. En effet, le CO_2 est souvent limitant dans les systèmes de production et il doit être injecté pendant la journée. Co-cultiver les microalgues avec des bactéries permet de favoriser les échanges de carbone. C'est le cas de *Chlorella* sp. dont la biomasse a été multipliée par 4,8 lorsque des bactéries issues de bassins de traitement d'eaux usées ont été ajoutées et ont permis la reminéralisation des composés carbonés excrétés par les microalgues (Bai et al., 2015).

De plus, la co-culture de bactéries avec des microalgues réduit l'ajout de nutriments. Des bactéries spécifiquement sélectionnées peuvent en effet rendre biodisponible plus d'éléments ferreux, azotés et phosphorés grâce à leurs différentes voies métaboliques qui permettent d'assimiler différents molécules (Fulbright et al., 2018). La co-culture de microorganismes diazotrophes avec des microalgues permet de limiter l'apport en fertilisants azotés grâce à la fixation du diazote atmosphérique tout en favorisant la production de biomasse (Do Nascimento et al., 2015; Newby et al., 2016).

De plus, il a été montré que certaines bactéries algicides produisaient des protéines et métabolites secondaires prometteurs pour la récolte de biomasse et le broyage cellulaire, ce qui

est intéressant pour des cultures à grande échelle (Lenneman et al., 2014). D'autres bactéries stimulent l'agrégation cellulaire, favorisant la récolte des microalgues (Agbakpe et al., 2014; Wang et al., 2012).

Une meilleure compréhension des interactions au sein de ces écosystèmes est donc primordiale pour la culture de microalgues à grande échelle. Les bactéries stimulant la croissance cellulaire, la production de molécules, ou la résilience du système doivent être identifiées. Des co-cultures doivent être étudiées au laboratoire et optimisées, dans le but d'être déployées à l'échelle industrielle.

3 *Dunaliella salina*, une microalgue photosynthétique à fort intérêt économique

3.1 Origine et description

Dunaliella salina est une espèce de microalgue unicellulaire verte Chlorophycée appartenant à l'ordre des *Chlamydomonales* et à la famille des *Dunaliellaceae*. De forme ovoïde et mobile grâce à ses deux flagelles, elle mesure 12 µm de long pour 7 µm de large. Cette microalgue photosynthétique ne possède pas de paroi cellulosique mais une fine enveloppe glycoprotéique la recouvre (Jin and Melis, 2003). Cette enveloppe souple a la particularité de permettre à la cellule de changer de forme et de volume lorsque les conditions de culture deviennent défavorables (Figure 5). La cellule synthétise notamment du glycérol pour favoriser l'osmorégulation lors d'un stress osmotique causé par un changement de concentration en solutés du milieu, ce qui la fait devenir ronde (Besson and Guiraud, 2013; Borowitzka, 2018; García et al., 2007).

D. salina est une espèce halophile, pouvant supporter des salinités jusqu'à 292 $g.L^{-1}$ (Fisher et al., 1996), ce qui correspond à la saturation de l'eau en NaCl. Elle est ainsi souvent l'espèce dominante dans les salins car sa résistance à une telle gamme de salinité lui confère un avantage sur ses compétiteurs et prédateurs (Apel and Weuster-Botz, 2015).

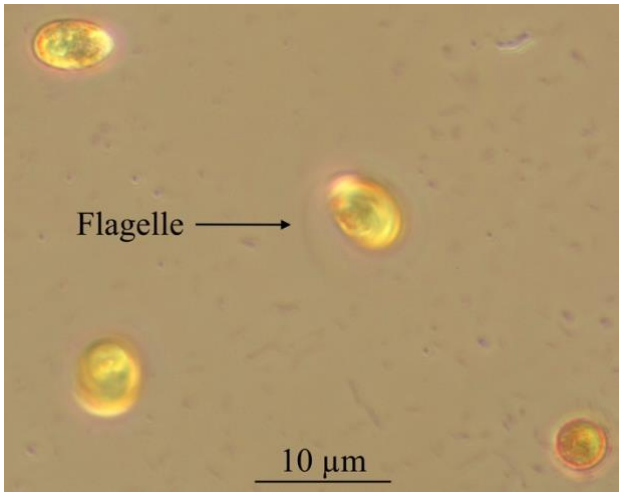

Figure 5 : Photographie d'une culture de *Dunaliella salina* en début de carence azotée où formes ovoïde et ronde se côtoient.

3.2 Physiologie et besoins nutritifs

D. salina est une microalgue autotrophe. Sa culture nécessite un apport suffisant en lumière et en macronutriments (carbone, azote et phosphore) pour permettre sa croissance photosynthétique. La présence de microéléments traces métalliques est également nécessaire pour assurer la biosynthèse de protéines et le bon fonctionnement de la photosynthèse (Wang et al., 2008). *D. salina* fait cependant partie des espèces de microalgues vitamines-indépendantes identifiées par Croft et al. (2005). Cela signifie que l'ajout de vitamines vitales à la croissance d'autres microalgues comme la cobalamine (B_{12}), la thiamine (B_1) et la biotine (B_7) n'est pas nécessaire pour sa croissance. *D. salina* met alors en place des systèmes enzymatiques spécifiques (Croft et al., 2005).

3.3 Production de molécules d'intérêt

D. salina est l'une des espèces de microalgues cultivée pour sa production de ß-carotène qui peut représenter jusqu'à 13,8 % de son poids sec (Oren, 2005). Ce caroténoïde aux propriétés anti-oxydantes et photoprotectantes s'accumule dans des gouttelettes lipidiques lors d'un stress thermique, osmotique, lumineux ou nutritif (Prieto et al., 2011). Sa production de ß-carotènes augmente avec la salinité, ce qui indique le rôle protecteur de ce pigment, en particulier lors du stress hyper salin (Figure 6 ; (Borowitzka et al., 1990; Gomez et al., 2003). Les ß-carotènes

sont par ailleurs des pigments à haute valeur ajoutée principalement utilisés dans le domaine de la nutrition et de la santé, principalement comme colorant et/ou vitamine (Oren, 2005).

Figure 6 : Lac Hillier, lac hypersalin en Australie dont la couleur rose est due à la prédominance de la microalgue *D. salina* et de la bactérie *Halobacteria*.

Cette espèce produit également des triglycérides pour assurer sa croissance qui peuvent représenter jusqu'à 10% de son poids sec. Cette forte teneur en triglycérides peut être valorisée dans le domaine des biocarburants (Bonnefond et al., 2017, 2016).

4 *Crocosphaera watsonii*, une cyanobactérie diazotrophe à fort impact dans le cycle de l'azote

4.1 Origine et description

C. watsonii est une cyanobactérie diazotrophe unicellulaire de l'ordre des *Chroococcales* appartenant à la famille des *Aphanothecaceae*. De forme sphérique, son diamètre varie de 2 à 5 µm (Figure 7). Elle a été isolée pour la première fois dans les années 1980 dans les eaux oligotrophes au large du Brésil et on la retrouve majoritairement dans les eaux tropicales (Webb et al., 2009).

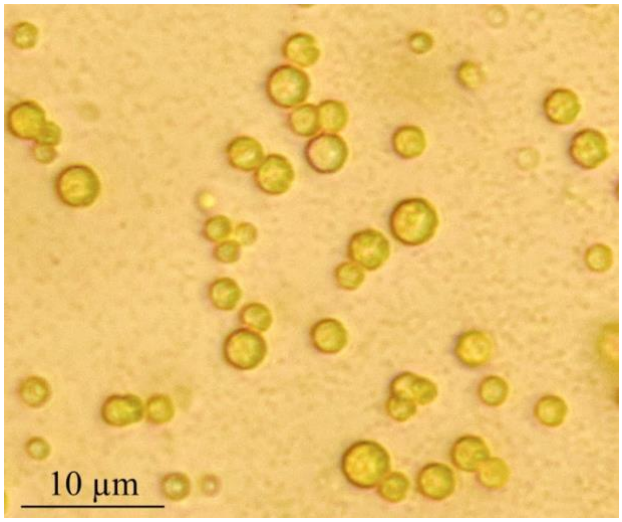

Figure 7 : Photographie d'une culture de *Crocosphaera watsonii*.

4.2 Physiologie et besoin nutritifs

C. watsonii est une cyanobactérie diazotrophe photosynthétique. De par son unicellularité, elle doit séparer de manière temporelle ses activités diazotrophe et photosynthétique. En effet, la nitrogénase, enzyme qui lui permet de fixer le diazote, est inhibée par le dioxygène (Compaoré and Stal, 2010). *C. watsonii* réalise ainsi la photosynthèse pendant la phase lumineuse, ce qui lui permet d'accumuler des réserves de carbone organique (sous forme de glycogène) nécessaires à sa croissance et à sa division cellulaire (Dron et al., 2012). La nuit, grâce à l'énergie emmagasinée la journée, son activité diazotrophe lui permet d'accumuler de l'azote pour la croissance cellulaire.

La croissance de *C. watsonii* nécessite donc quelques conditions particulières. Une alternance jour/nuit est tout d'abord essentielle pour permettre le bon fonctionnement de son rythme circadien et assurer les métabolismes cycliques du carbone et de l'azote (Dron et al., 2012). Les cycles jour/nuit 12h:12h sont particulièrement adaptés à cette physiologie particulière (Webb et al. 2009). Webb et al. (2009) ont montré que sa niche thermique était très restreinte, et comprise entre 26 et 31°C, avec une température idéale de 27°C.

Le besoin azoté de *C. watsonii* est assuré majoritairement par son activité diazotrophe. Celle-ci peut être affectée par la présence de nitrates dans le milieu (Großkopf and LaRoche, 2012; Knapp et al., 2012). Comme pour les microalgues, la culture de *C. watsonii* nécessite l'apport en éléments carbonés et phosphorés. Des métaux traces et des vitamines sont requis pour la

croissance photosynthétique et la fixation de diazote de cette cyanobactérie, contrairement à *D. salina* qui croit sans l'ajout de ces nutriments.

4.3 Rôle dans le cycle de l'azote

C. watsonii est l'une des cyanobactéries diazotrophes dominantes dans les eaux oligotrophes. Les diazotrophes jouent un rôle important dans ces zones limitées en nutriments car leur activité de fixation du diazote atmosphérique est responsable de 50% de l'apport en azote biodisponible (Capone et al., 2005).

La quantité d'azote stockée en excès par *C. watsonii* peut être trois fois plus élevée que son besoin effectif pour la croissance cellulaire (Dron et al., 2012). *C. watsonii* fixe l'azote en excès la nuit mais en excrète une grande quantité la journée (Berthelot et al., 2016). Cette excrétion d'azote organique dissous dérivé de la diazotrophie peut représenter jusqu'à 10% de l'azote fixé (Berthelot et al., 2015). Berthelot et al. (2016) ont montré que cet azote excrété était assimilable par certaines bactéries ou d'autres espèces phytoplanctoniques et permettait d'augmenter leur croissance. Comme ces cyanobactéries unicellulaires peuvent vivre en agrégat, il est probable que cet excès d'excrétion azotée soit également réutilisé par les autres cellules au sein de la colonie et favorise son développement (Thompson and Zehr, 2013).

5 La modélisation mathématique et les interactions microalgues/bactéries

5.1 Un modèle mathématique, à quoi ça sert ?

Un modèle mathématique est un ensemble de paramètres, de relations et de variables dans lequel les conditions environnementales et expérimentales du procédé sont mathématiquement liées aux produits de celui-ci comme la biomasse, le taux de croissance ou la consommation de nutriments (Darvehei et al., 2018).

Les modèles permettent de tester des hypothèses spécifiques comme la croissance en fonction d'un facteur environnemental (température, lumière, pH, salinité, concentration en nutriments) sans réaliser des tests expérimentaux pour chaque variation. Dans le cas de co-cultures, les échanges de nutriments et de molécules comme le CO_2 et l'O_2 peuvent être également

modélisés et leur importance testée (Grant et al., 2014). Le modèle développé par Grant et al. (2014) entre la microalgue vitamine B_{12}-dépendante *Lobomonas rostrata* et la bactérie *Mesorhizobium loti* leur a par exemple permis de mettre en évidence une relation mutualiste entre ces deux microorganismes plutôt qu'une simple excrétion de cobalamine dans le milieu lors de la lyse bactérienne. Grace à un modèle, ils ont pu déterminer que la régulation de la production de cobalamine par la bactérie se faisait selon les besoins de la microalgue en échange de carbone.

Étudier les interactions entre le phytoplancton et les bactéries dans les environnements naturels et synthétiques est cependant difficile à cause de la variabilité et de la complexité de ces écosystèmes. Les modèles permettent donc de répondre à des questions spécifiques à différentes échelles, et en intégrant les aspects dynamiques : évolution de la prédominance au sein du consortium, production de biomasse et de molécules à haute valeur ajoutée, évolution des conditions environnementales en relation avec le consortium, ... Jusqu'à présent, de nombreux modèles ont ainsi été développés pour décrire la croissance des microalgues en fonction de l'intensité lumineuse (Grimaud et al., 2014), de la concentration en nutriments comme l'azote (Mairet et al., 2011b) et de la température (Béchet et al., 2016).

Les modèles mathématiques permettent donc de décrire et de prédire. La modélisation est un atout pour prototyper efficacement des expériences et déterminer les conditions expérimentales idéales (DellaGreca et al., 2010). Les modèles développés pour des co-cultures permettent également d'identifier les associations les plus prometteuses (Zhang et al., 2018). Dans un contexte industriel à grande échelle, les modèles sont utilisés pour définir des stratégies de production optimales de biomasse ou de molécules à haute valeur ajoutée (Bernard et al., 2015; Mairet et al., 2011a). L'approche de modélisation peut également mettre en évidence certains points faibles des productions à grande échelle (par exemple un trop fort impact de la température) et suggérer des pistes d'amélioration.

5.2 Quelques modèles mathématiques pour la croissance du phytoplancton

La modélisation mathématique est un outil utile à la compréhension d'écosystème et les interactions en découlant. La majorité des modèles décrivent des cultures monospécifiques de microalgues dont la croissance dépend d'un seul facteur comme la lumière ou un nutriment en

particulier. La tendance actuelle est d'intégrer dans les modèles un grand nombre de facteurs environnementaux et de représenter l'effet de leur fluctuation dynamique sur le phytoplancton, notamment grâce aux lois de Monod ou de Droop (Solimeno and García, 2017).

Les modèles pour la croissance de microorganismes photosynthétiques intègrent généralement l'effet de l'intensité lumineuse. La loi de Monod (Monod, 1949), où la lumière est alors considérée comme un substrat, ou la loi de Haldane, qui prend en compte la photoinhibition, sont alors utilisées. La loi de Beer-Lambert permet de décrire le gradient de lumière en fonction de la biomasse et de la profondeur du système de culture (Figure 8; Bernard, 2011). Ainsi, la combinaison des deux permet de définir le taux de croissance en fonction de la lumière disponible à une profondeur donnée.

La consommation des nutriments est habituellement représentée par la loi de Monod (Monod, 1949) d'après une équation de Michaelis-Menten de type enzyme/substrat où la consommation dépend de la concentration en nutriments et de l'affinité des microorganismes. La théorie de Droop a raffiné l'approche en montrant que la croissance était mieux représentée en définissant un quota interne cellulaire en élément nutritif (Droop, 1968). La consommation en éléments nutritifs dépend alors également de la concentration assimilée dans la cellule.

Le modèle de Monod est souvent modifié pour les organismes photosynthétiques et combiné à l'effet de la lumière. Des modèles plus précis intègrent le quota en élément nutritif (Bernard 2011; Geider et al. 1998) et ainsi combinent l'effet de l'intensité lumineuse et des nutriments, voire de la température, tout en prenant en compte la distribution de lumière à l'aide d'une loi de Beer-Lambert (Figure 8).

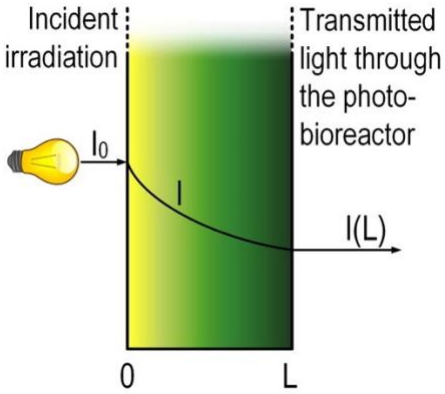

Figure 8 : Atténuation lumineuse au sein de la culture à cause de l'absorption et de la diffusion de la lumière par les microalgues (Pfaffinger et al., 2016).

A ce jour, la majorité des modèles d'interactions microalgues-bactéries prennent seulement en compte la compétition pour les nutriments et la lumière (Solimeno and García, 2017) comme celui développé par Zambrano et al. (2016). Les interactions négatives et positives directes et indirectes telles l'allélopathie et les mécanismes stimulant la croissance ou la lyse cellulaire sont peu représentés alors qu'ils sont omniprésents au sein d'écosystèmes. Pourtant, la modélisation de l'allélopathie a été proposée par Maynard-Smith en 1974 à partir du modèle proie-prédateur de Lotka-Volterra. Elle consiste en la production constante d'une molécule impactant le taux de croissance de l'autre microorganisme compétiteur (Solé et al., 2005).

5.3 Des modèles décrivant les interactions au sein de l'écosystème

Grâce à la modélisation dynamique prenant en compte les particularités de chaque microorganisme, les interactions au sein d'un consortium simulé dépendent majoritairement de leurs affinités respectives pour les différents paramètres environnementaux. Les modèles de co-culture phytoplancton-bactéries doivent prendre en compte toutes les interactions au sein de l'assemblage en plus de l'impact des différents facteurs environnementaux sur chaque microorganisme. Solé et al. (2005) ont ainsi montré grâce à leur modèle que l'interaction allélopathique observée expérimentalement entre les microalgues *Chrysocromulina polylepsis* et *Heterocapsa triquetra* avait un effet aussi important que leur compétition pour les nutriments à forte concentration cellulaire et pouvait même prévaloir. DellaGreca et al. (2010) ont mis en évidence, grâce à leur modèle, à la fois une compétition pour les nutriments et un effet toxique des molécules produites par *C. vulgaris*, entraînant l'exclusion de *Pseudokirchneriella subcapitata* observée lors d'expériences menées en co-culture limitée en phosphore.

Dans leur étude, Smriga et al. (2016) allient expérimentations et modélisation. Ils ont ainsi pu compartimenter différentes bactéries motiles et non motiles pour déterminer celles qui bénéficiaient le plus du chimiotactisme et donc de la MO produite par les diatomées *Chaetoceros affinis*. Le modèle se base sur les échanges de composés entre les bactéries de la phycosphère et les diatomées. Ils ont ainsi expliqué le changement de dominance au sein des bactéries lors du bloom de diatomées grâce à une compétition pour la MO. Ce modèle sensible ne dépend cependant pas de conditions environnementales comme le pH ou l'intensité lumineuse mais de l'abondance bactérienne et de la diffusion des composés de la matière

organique. De plus, celui-ci représente les interactions à microéchelle mais serait difficilement extrapolable à l'échelle d'un écosystème.

Les modèles actuels permettent donc de simuler et de prédire des scénarios incomplets où les interactions sont complexes et variables. La croissance et le comportement des microorganismes au sein de consortiums dépendent de l'ensemble des paramètres environnementaux alors que la majorité des modèles se limitent à un ou deux facteurs. Ces modèles nécessitent une validation expérimentale encore trop rare, en particulier à grande échelle et à long terme, que ce soit dans l'océan ou au sein de co-cultures industrielles (Darvehei et al., 2018).

6 Conclusions

Grâce à leur production de molécules d'intérêt et de biomasse et leur capacité d'adaptation, les microalgues et les cyanobactéries représentent un intérêt économique fort. Cependant, de nombreux verrous restent à lever pour optimiser les coûts de production à grande échelle, que ce soit en culture ouverte, semi-ouverte ou fermée. L'une des pistes d'amélioration est la polyculture de plusieurs espèces pour limiter les contaminations extérieures et augmenter la résilience de la culture. Les co-cultures de microalgues et de cyanobactéries diazotrophes permettent également de limiter l'apport en fertilisant azoté. Cependant, les interactions au sein d'écosystèmes artificiels et naturels sont encore mal connues et nécessitent davantage d'études en laboratoire avant le déploiement à l'échelle industrielle. Le modèle mathématique est un outil de compréhension et de prédiction complémentaire des approches expérimentales. Peu de modèles existent sur les polycultures et prennent en compte toutes les interactions au sein de l'écosystème et avec son environnement. La microalgue d'intérêt économique *Dunaliella salina* et la cyanobactérie diazotrophe *Crocosphaera watsonii*, productrice d'azote assimilable par le phytoplancton, ont été sélectionnées pour la suite de cette étude. Des modèles et des études existent sur chacune mais elles n'ont jamais été étudiées en co-culture, d'un point de vue expérimental ou de modélisation.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes général

1 Microorganismes utilisés

La souche WH8501 de la cyanobactérie diazotrophe *Crocosphaera watsonii* (Waterbury and Willey, 1988) a été isolée précédemment dans les eaux tropicales du Brésil par Frederica Valois (Webb et al., 2008). La souche CCAP 19/18 de *Dunaliella salina* est issue de la Culture Collection of Algae and Protozoa (SAMS University, UK). Ces deux microorganismes sont conservés en phase exponentielle de croissance par *fed-batch* en milieu F/2 dans des erlenmeyers de 500 mL. Ces erlenmeyers ont été au préalable nettoyés à l'HCl 10%, rincés à l'eau milliQ fraichement préparée puis autoclavés 20 min à 121°C. Ces cultures mères sont conservées dans un incubateur (SANYO MLR-351, Japon) à une température de 27°C, idéale pour la culture de *C. watsonii* (Webb et al., 2008) et de *D. salina* (García et al., 2007). Les cultures sont éclairées à une intensité de 220 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} et un cycle jour/nuit de 12h:12h pour permettre à *C. watsonii* d'effectuer la photosynthèse pendant la phase lumineuse et d'assurer son activité diazotrophe pendant la phase nuit (Dron et al., 2012; Mohr et al., 2010).

De l'air filtré sur 0,2 µm est constamment bullé dans les cultures pour favoriser leur croissance cellulaire. Celles-ci sont également agitées magnétiquement à une vitesse constante de 150 rotations par minute (rpm) pour assurer une réception cellulaire homogène de la lumière et des nutriments. L'agitation magnétique et le bullage permettent également d'éviter la sédimentation cellulaire et de dégazer l'O_2 accumulé, toxique à une concentration élevée.

2 Milieu de culture

L'eau de mer (EDM) est prélevée au Point B à Villefranche-sur-Mer (43°41'10''N - 7°18'94''E). Elle est ensuite préfiltrée par un système de filtration sur 1 µm pour éliminer les particules les plus grosses. Puis elle est vieillie dans le noir pendant un mois pour que les éléments nutritifs naturellement présents soient entièrement consommés par les bactéries. L'eau de mer est ensuite filtrée par un système de filtration à pompe sur 0,1 µm pour éliminer toutes

les particules et les organismes présents. Finalement, elle est autoclavée à 121°C pendant 30 min pour la stériliser.

Tous les nutriments nécessaires à la croissance artificielle de microorganismes (phosphates, vitamines et métaux traces) sont ensuite ajoutés de manière stérile grâce à un filtre-seringue avec des pores de 0,2 µm de diamètre pour faire du milieu F/2 avec un rapport N/P de 24,4 (Guillard, 1975). Les nitrates sont également ajoutés même s'ils ne sont pas consommés par *C. watsonii* (Großkopf and LaRoche, 2012) car ils sont nécessaires à la croissance de *D. salina*. La silice n'est pas ajoutée car elle est seulement requise dans le cas de culture de diatomées (Guillard and Ryther, 1962).

Les concentrations dans le milieu stock, et la concentration finale du milieu F/2 sont indiquées dans les Tableaux 2, 3 et 4.

Tableau 2 : Composition du milieu F/2

Composant	Solution stock ($g.L^{-1}$ dH_2O)	Quantité ajoutée ($mL.L^{-1}$ EDM)	Concentration finale ($mol.L^{-1}$)
$NaNO_3$	150	0,5	$8,82.10^{-4}$
NaH_2PO_4	5	1	$3,62.10^{-5}$
Mélange de vitamines	Voir Tableau 4	0,5	/
Solution de métaux traces	Voir Tableau 3	1	/

Tableau 3 : Composition de la solution de métaux traces à ajouter au milieu F/2

Composant	Solution stock ($g.L^{-1}$ H_2O)	Quantité utilisée pour la solution de métaux traces	Concentration dans le milieu F/2 ($mol.L^{-1}$)
$FeCl_3$, $6H_2O$	/	3,15 g	$1,17.10^{-5}$
Na_2EDTA, $2H_2O$	/	4,36 g	$1,17.10^{-5}$

$MnCl_2$, $4H_2O$	180	1 mL	$9{,}10.10^{-7}$
$ZnSO_4$, $7H_2O$	22	1 mL	$7{,}65.10^{-8}$
$CoCl_2$, $6H_2O$	10	1 mL	$4{,}20.10^{-8}$
$CuSO_4$, $5H_2O$	9,8	1 mL	$3{,}93.10^{-8}$
Na_2MoO_4, $2H_2O$	6,3	1 mL	$2{,}60.10^{-8}$

Tableau 4 : Composition du mélange de vitamines à ajouter au milieu F/2

Composant	Solution stock ($g.L^{-1}$ dH_2O)	Quantité utilisée pour le mélange de vitamines	Concentration dans le milieu F/2 ($mol.L^{-1}$)
Vitamine B_1	/	200 mg	$2{,}97.10^{-7}$
Vitamine H	1,0	1 mL	$2{,}05.10^{-9}$
Vitamine B_{12}	1,0	1 mL	$3{,}69.10^{-10}$

3 Dispositifs expérimentaux de culture

3.1 Culture en erlenmeyer

Les cultures ont consisté en des *batch* de milieu F/2. Les erlenmeyers de 250 mL ont été au préalable nettoyés à l'HCl 10%, rincés à l'eau milliQ fraichement préparée puis autoclavés 20 min à 121°C. Après inoculation, les cultures sont placées dans l'incubateur (Figure 9) avec les cultures mères pour assurer les mêmes conditions de croissance : température de 27°C, intensité lumineuse de 220 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$ et cycle jour/nuit de 12h:12h. Les cultures sont constamment bullées avec de l'air filtré sur 0,2 µm et agitées magnétiquement à une vitesse de 150 rpm. Les prélèvements et le bullage sont effectués par le même port.

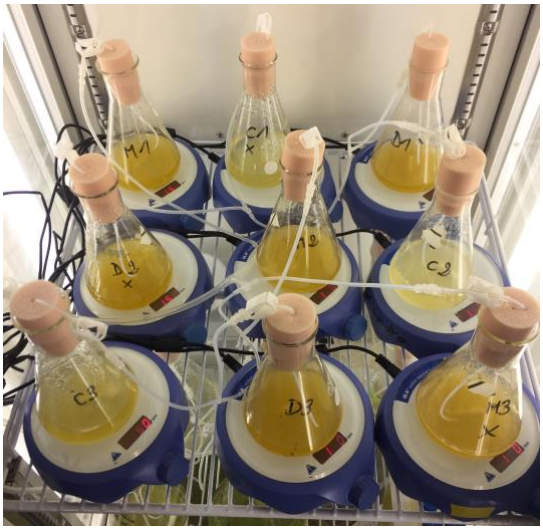

Figure 9 : Configuration expérimentale de mono-cultures et de co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* en erlenmeyer dans l'incubateur.

3.2 Système de co-culture par séparation membranaire

Les cultures ont également consisté en des *batch* de milieu F/2. Les systèmes de co-culture consistent en deux bouteilles en verre reliées par un tunnel de séparation clampé (Figure 10 ; (Ternon et al., 2018). Dans le cas d'une co-culture par séparation membranaire, les enceintes de cultures sont séparées par une membrane hydrophile poreuse en polyfluorure de vinylidène (PVDF) avec des pores de 0,22 µm de diamètre (GVWP14250, Durapore Millipore). Des monocultures sans interactions ont également été réalisées dans les mêmes conditions en remplaçant la membrane PVDF par une membrane imperméable en polytétrafluoroéthylène (PTFE : bande PTFE vierge ép. 0,10 mm, Hightechflon France).

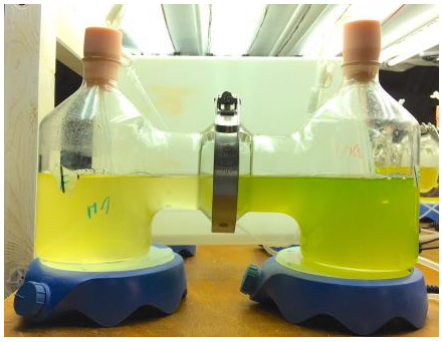

Figure 10 : Système de co-culture par séparation membranaire.

Les systèmes de co-culture ont été au préalable nettoyés à l'HCl 10%, rincés à l'eau milliQ fraichement préparée puis autoclavés 20 min à 121°C. Après inoculation, les cultures sont placées dans une enceinte ouverte (Figure 11). La température homogène de 27°C est assurée par la climatisation de la salle. Les cultures sont éclairées par le haut en cycle jour/nuit de 12h:12h grâce à 6 tubes fluorescents (L 58W 965 Lumilux De Luxe, Osram) à une intensité lumineuse de 320 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Les cultures sont constamment bullées avec de l'air filtré sur 0,2 µm et agitées par un barreau magnétique à une vitesse de 200 rpm. Les prélèvements et le bullage sont effectués par deux ports différents.

Figure 11 : Configuration expérimentale de mono-cultures et de co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* avec et sans séparation membranaire.

4 Mesures expérimentales et analyses

4.1 Comptages cellulaires et calcul du taux de croissance

4.1.1 Dénombrement des algues et cyanobactéries au Coulter Counter

Les cultures sont prélevées tous les matins à 9h afin d'éviter la phase de division cellulaire qui a lieu au cours de la dernière moitié de la phase lumineuse. Les comptages cellulaires sont réalisés à l'aide d'un Coulter Counter (Multisizer III ; Beckman-Coulter) pour suivre et

caractériser la croissance cellulaire. *D. salina* et *C. watsonii* sont facilement discriminées grâce à leur taille différente (diamètres respectivement 7-15 µm et 2-4 µm ; Figure 12).

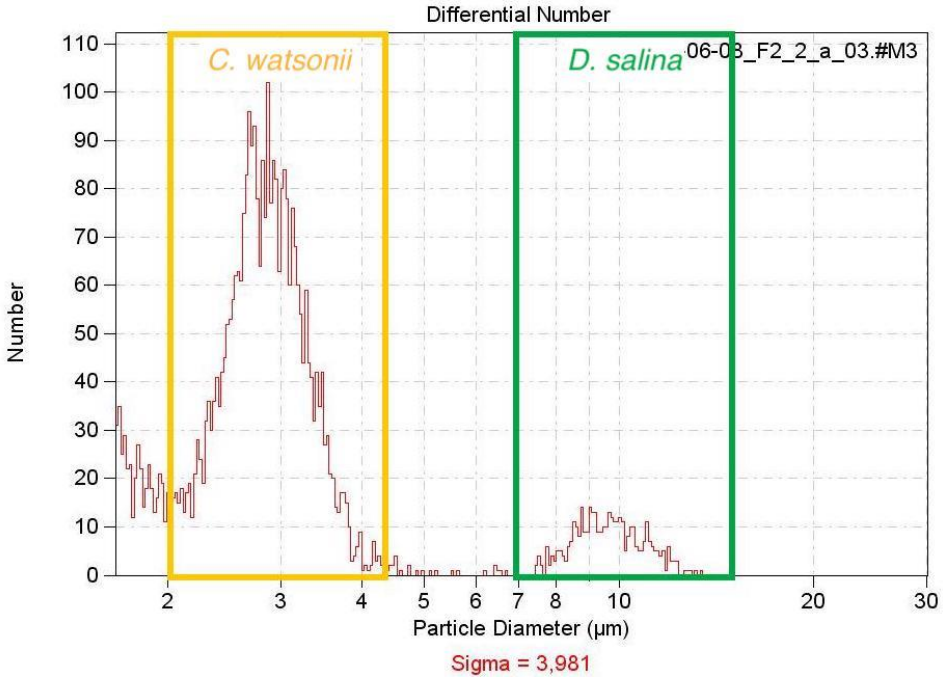

Figure 12 : Exemple de comptage cellulaire d'une co-culture de *Crocosphaera watsonii* et de *Dunaliella salina* effectué à l'aide du Coulter Counter.

4.1.2 Dénombrement des bactéries par cytométrie en flux

Les analyses par cytométrie en flux ont été effectuées en collaboration avec Sophie Marro, ingénieure d'études et responsable de la cytométrie en flux dans l'équipe Biodiversité et Biogéochimie au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer (LOV, Sorbonne Université et CNRS).

Préparation et stockage des échantillons :

1,5 mL de culture sont prélevés de manière stérile en duplicat tous les jours et stockés dans des cryotubes stériles (1,8 mL Cryogenic Vial, NEST). 20 µL de glutaraldéhyde à 25% sont ajoutés à chaque échantillon sous la hotte chimique pour fixer les microorganismes. Les cryotubes sont ensuite homogénéisés délicatement à la main puis mis à 4°C dans le noir pendant au moins 40

minutes. Les échantillons fixés sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à analyse par cytométrie en flux.

Analyse par cytométrie en flux :

La cytométrie en flux est un outil puissant qui permet de distinguer les bactéries, les particules et les microalgues grâce à la combinaison de l'autofluorescence de la chlorophylle, de la taille et de la granulosité des cellules et de marquages fluorescents.

Le cytomètre (FACSCalibur, Becton Dickinson) est calibré chaque matin : les vitesses des flux sont mesurées et des billes de calibration fluorescentes (Polyscience Inc., Europe) en FL1 (Lumière verte ; Excitation : 488 nm ; Emission : 530 nm) et FL3 (Lumière rouge ; Excitation : 488 nm ; Émission : 670 nm) sont dénombrées. Les échantillons sont dilués avec de l'eau de mer filtrée sur 0,2 µm à une vitesse de flux maximale de 80 $\mu L.min^{-1}$ et les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo (LLC).

La chlorophylle fluoresce naturellement en FL3. Les cellules autotrophes peuvent donc être facilement distinguées grâce à leur taille et leur teneur en chlorophylle différentes (Figure 13).

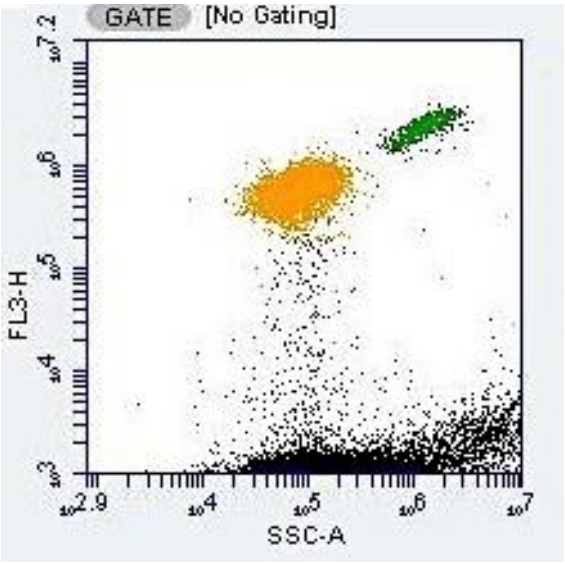

Figure 13 : Exemple de cytogramme où *D. salina* (pool vert) et *C. watsonii* (pool jaune) sont différenciées en fonction de leur granulosité (SSC) et de leur fluorescence naturelle en FL3 grâce à leur chlorophylle.

Les bactéries hétérotrophes sont quant à elles discriminées grâce à un marquage effectué au SYBR Green I (Invitrogen) comme décrit par Marie et al. (1997). Ce fluorochrome pénètre dans les cellules et rend celles-ci fluorescentes en FL1 (Figure 14).

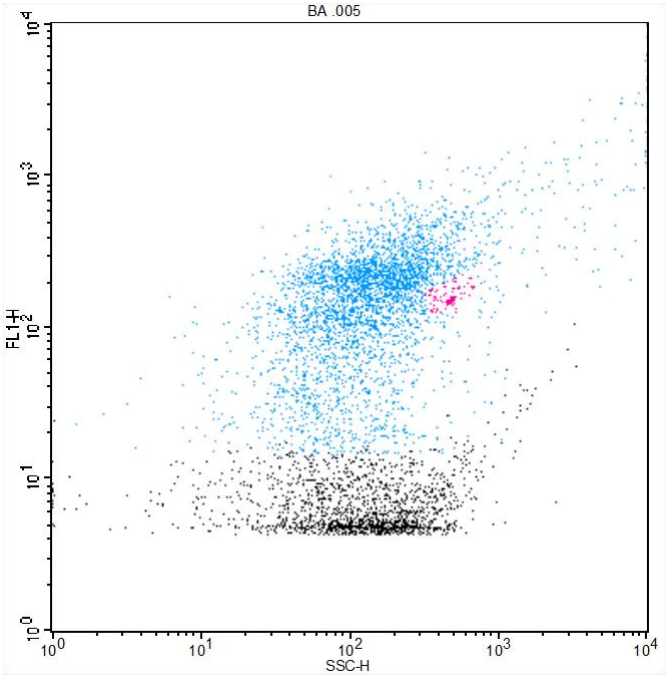

Figure 14 : Exemple de cytogramme où les bactéries (en bleu) et les billes de calibration (en rose) sont différenciées grâce à leur fluorescence en FL1 suite au marquage au SYBR-Green.

4.1.3 Calcul du taux de croissance

Le taux de croissance est calculé durant la phase exponentielle de croissance. Le logarithme népérien de chaque comptage cellulaire est calculé. Une régression linéaire est alors effectuée sur ces logarithmes népériens pour chaque culture. Le taux de croissance correspond alors à la pente de la régression linéaire. Un exemple est illustré en Figure 15.

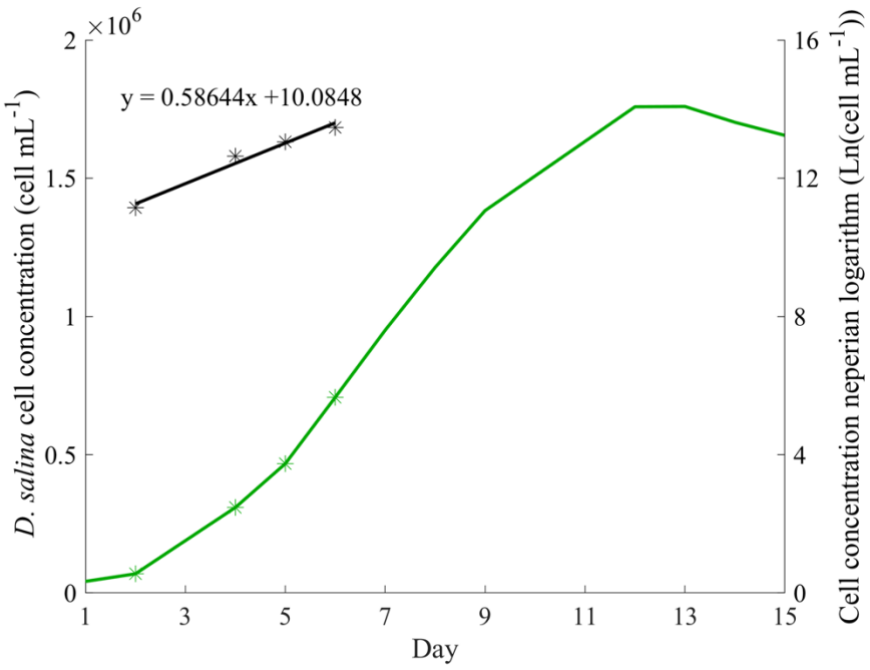

Figure 15 : Exemple de courbe de croissance cellulaire de *D. salina* (courbe verte) et de calcul du taux de croissance pendant la phase exponentielle de croissance (courbe noire).

4.2 Concentration en nitrites et nitrates

4.2.1 Technicon Autoanalyseur II

Le Technicon Autoanalyseur II permet de mesurer la concentration en nitrates et nitrites d'une solution par dosage colorimétrique des nitrites. Les nitrates sont préalablement réduits en nitrites lors de leur passage sur la colonne de réduction composée de cuivre et de cadmium (Wood et al., 1967) en présence d'une solution de chlorure d'ammonium tamponnée à un pH de 8,5.

Grâce à une solution de sulfanilamide, les nitrites sont diazotés par l'addition de deux atomes d'azote. La molécule diazoïque ainsi formée est alors complexée avec le N-(Naphtyl-1)-éthylènediamine dihydrochlorure (NED ; Benschneider and Robinson, 1952). Le complexe formé est rose avec une absorption maximale à 543 nm, ce qui permet de déterminer la concentration en nitrites et donc, en nitrates, de la solution analysée.

$$NO_3^- + 2e^- + 2H^+ \rightarrow NO_2^- + H_2O$$

$$NO_2 + \text{Sulfanilamide} \rightarrow \text{Diazoïque}$$

$$\text{Diazoïque} + \text{NED} \rightarrow \text{Complexe rose}$$

L'appareil est calibré chaque jour avant d'analyser les échantillons de cultures. Pour ce faire, deux solutions étalon de nitrates et de nitrites (100 µmol.L^{-1}) sont fraîchement préparées. Ces solutions sont analysées deux fois chacune et permettent de vérifier que l'appareil réduit efficacement les nitrates en nitrites. Une solution saline à 38 g.L^{-1} (mélange d'EMQ et de NaCl en poudre) est utilisée dans le système de dilution et dans la préparation des solutions standards car la salinité influence les mesures et l'efficacité de réduction.

4.2.2 Prélèvement des échantillons et mesure

La concentration en nitrates est mesurée pour suivre la consommation par les microorganismes et déterminer le jour où ce nutriment devient limitant pour la croissance cellulaire de *D. salina*. L'échantillon de culture prélevé de manière stérile est ensuite filtré sur 0,2 µm grâce à un filtre-seringue pour éliminer toute la biomasse cellulaire. Les échantillons filtrés sont stockés à 4°C dans des tubes Eppendorfs de 1,5 mL (Safe-Lock tubes ; Eppendorf AG) en attendant d'être analysés. En l'absence de microorganismes, la concentration en nutriments inorganiques n'est pas altérée lorsque l'échantillon est conservé au frais.

Les échantillons de culture filtrée sont dilués au 10ème avec la solution saline à 38 g.L^{-1} avant analyse pour ne pas saturer le Technicon qui peut analyser des solutions contenant jusqu'à 100 µmol.L^{-1} de nitrates et de nitrites. Deux échantillons de cette solution saline sont également analysés pour faire un blanc.

4.3 Concentration en ammonium

4.3.1 Principe du Futura

Le Futura (Alliance-Instruments) permet de doser l'ammonium par fluorimétrie. En effet, l'ammonium réagit avec l'orthophtaldialdéhyde (OPA) en présence de sulfites en milieu tamponné par du borate à 75°C. La molécule a une absorption maximale à 370 nm et est détectée par une lampe à fluorescence noire.

Chaque jour, les solutions standards sont diluées avec une solution saline à 38 g.L^{-1} dépourvue d'ammonium. Une gamme étalon de 0 à 5 µmol.L^{-1} d'ammonium est préparée avec du chlorure d'ammonium (NH_4Cl).

4.3.2 Prélèvement des échantillons et mesure

Acidification préalable :

Tous les tubes et les fioles utilisés pour la calibration et le prélèvement d'échantillon sont au préalable stockés dans un bain de HCl à 10% pour éliminer toute trace d'ammonium puis rincés plusieurs fois à l'eau milliQ fraîchement produite juste avant utilisation. L'ammonium est en effet une molécule naturellement présente dans l'environnement et facilement contaminante.

Traitement des échantillons :

Les cultures prélevées de manière stérile sont filtrées sur 0,2 µm grâce à un filtre-seringue pour obtenir la fraction dissoute. Les échantillons filtrés sont stockés à -80°C dans des Eppendorfs de 1,5 mL (Safe-Lock tubes ; Eppendorf AG) préalablement acidifiés en attendant d'être analysés. Les échantillons de culture filtrée sont ensuite dilués avec la solution saline à 38 $g.L^{-1}$ avant analyse selon l'efficacité de mesure du Futura à l'issue de la calibration.

4.4 Concentration en azote organique dissous et production

4.4.1 Principe de l'oxydation chimique par voie humide

La concentration en azote organique dissous (DON) est mesurée grâce à l'oxydation chimique par voie humide. Le protocole a été développé par Pujo-Pay et Raimbault (1994) et modifié par Bougaran (2014). Il consiste en l'oxydation de l'azote organique en nitrates par digestion chimique à haute température. Les échantillons digérés sont ensuite analysés au Technicon Autoanalyseur II.

4.4.2 Prélèvement des échantillons

Les cultures prélevées sont filtrées sur 0,2 µm grâce à un filtre-seringue pour éliminer toute la matière organique. Les échantillons filtrés sont stockés à -80°C dans des Eppendorfs BIOPUR stériles de 2 mL en attendant d'être analysés.

4.4.3 Protocole de quantification de la concentration en azote organique dissous

Acidification préalable :

La verrerie est stockée dans un bain de HCl à 10% pour éliminer toute trace d'azote organique puis rincée plusieurs fois à l'eau milliQ fraîchement produite juste avant utilisation.

Préparation de la solution de soude :

Une solution de soude NaOH à 1,5 mol.L^{-1} est préparée au préalable en dissolvant 6 g de NaOH dans 100 mL d'eau milliQ fraîchement produite. Cette solution peut être stockée plusieurs mois à 4°C dans une bouteille Schott.

Préparation du réactif oxydant :

Dans une fiole jaugée de 50 mL acidifiée fraîchement rincée et agrémentée d'un barreau magnétique, 3 g de péroxodisulfate de potassium $K_2S_2O_8$ sont dissous puis 1,5 g d'acide borique H_3BO_3 dans 14 mL de la solution de soude NaOH à 1,5 mol.L^{-1} préalablement préparée. Quelques mL d'eau milliQ fraîchement produite sont ajoutés, la solution est agitée et chauffée à 45°C à l'aide de l'agitateur magnétique chauffant pour faciliter la dissolution. De l'eau milliQ fraîchement produite permet de compléter ensuite à 50 mL, le mélange est alors transvasé dans une bouteille Schott en verre colorée. Le réactif peut continuer d'être chauffé et agité magnétiquement pendant la préparation des échantillons pour éviter une quelconque cristallisation. Le réactif oxydant doit être préparé chaque jour d'analyse et gardé à l'abri de la lumière.

Préparation des échantillons :

Des tests préliminaires ont été effectués avec de la vitamine B12, thiamine (vitamine B_1), adénosine 5-monophosphate (AMP) et de l'urée (Figure 16), 4 molécules azotées organiques de taille et de complexité différentes. Il a été montré que ce protocole permettait de convertir 100 ±14,2% d'azote organique dissous en azote inorganique pour des concentrations en azote organique comprises entre 0 et 45 µmol.L^{-1}.

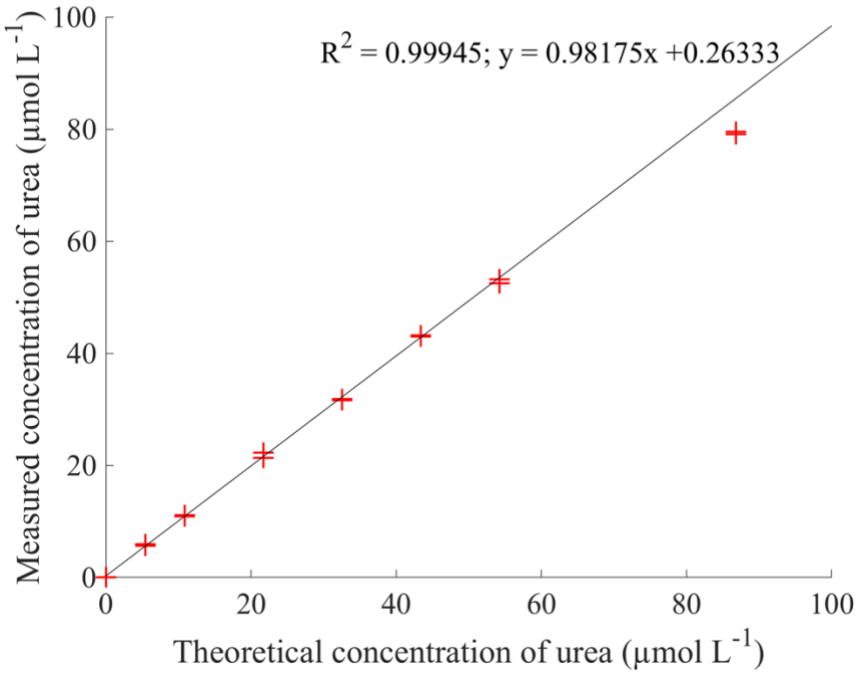

Figure 16 : Exemple de gamme de dilution de l'urée (croix rouges) pour tester l'efficacité et la linéarité du protocole de mesure du DON. La régression linéaire (ligne noire) est effectuée pour les concentrations entre 0 et 45 µmol.L^{-1}

Dans les bouteilles Schott de 25 mL préalablement rincées plusieurs fois à l'eau milliQ, les échantillons filtrés sont ainsi dilués avec une solution saline à 38 g.L^{-1} pour que la concentration totale en azote organique et inorganique dissous soit dans cette gamme de concentration. 2,5 mL du réactif oxydant sont ensuite ajoutés aux échantillons filtrés et dilués pour atteindre un volume total de 22,5 mL. Deux blancs sont préparés avec 20 mL de la solution saline et 2,5 mL du réactif oxydant. Les bouteilles sont ensuite placées, bouchons fermés, à l'autoclave pour un cycle de 30 min à 121°C. Une fois refroidis, les échantillons peuvent être analysés au Technicon préalablement calibré avec des solutions standard fraîchement préparées.

4.4.4 Calcul de la production d'azote organique dissous

Pour calculer la concentration réelle d'un échantillon en DON, il faut lui soustraire la concentration en nitrates préalablement quantifiée du même échantillon ainsi que la valeur moyenne des blancs.

4.5 Mesure de l'intensité lumineuse

L'intensité lumineuse est mesurée au centre des cultures à l'aide d'une sonde PAR (PAR Sensor QSL-2100, Biospherical Instruments et micro-capteur PAR US-SQS/L, Bionef) pour caractériser l'atténuation lumineuse au cours du temps. La sonde est nettoyée avec de l'éthanol 70% avant et entre chaque mesure pour éviter des contaminations bactériennes ou entre les cultures. Cependant, la lumière est mesurée dans seulement deux des triplicats pour pouvoir contrôler une éventuelle contamination bactérienne.

Suite à des mesures préalables, l'intensité lumineuse dans les cultures varie de ±15% par rapport à la valeur moyenne mesurée selon la distance entre l'Erlenmeyer et les néons situés dans l'incubateur. Pour les systèmes de culture par séparation membranaire, les cultures sont éclairées par le haut.

4.6 Dosage du carbone et de l'azote particulaires et rapport C/N

4.6.1 Principe du CHN

Le dosage du carbone et de l'azote particulaires est effectué grâce à un analyseur élémentaire CHN (2400 Series II CHNS/O - Perkin Elmer). Le principe de l'instrument repose sur la combustion totale de l'échantillon et son oxydoréduction. Les gaz alors dégagés sont ensuite séparés par chromatographie sur colonne puis détectés par conductivité thermique ou rayonnement infrarouge dans le catharomètre.

4.6.2 Préparation et prélèvement des échantillons

Des tests préliminaires ont été réalisés pour récolter *D. salina* et *C. watsonii* sur des filtres de deux tailles différentes pour mieux quantifier le rapport C/N de chacun de ces microorganismes dans le cas de co-cultures. Quatre co-cultures aux concentrations différentes de *D. salina* et de *C. watsonii* ont alors été filtrées en triplicats sur des filtres GF/C (1,2 µm, Whatman), utilisés habituellement pour le protocole de mesure du CHN, et des filtres GF/D (2,7 µm, Whatman), qui ont la plus grosse maille existant sur le marché. Les concentrations cellulaires des co-cultures et des filtrats ont été analysées au Coulter Counter. Les filtres GF/C permettaient ainsi de retenir respectivement 99,7 ±0,2 % et 99,0 ±0,7 % de la biomasse cellulaire de *D. salina* et de *C. watsonii* tandis que les filtres GF/D retenaient respectivement 99,6 ±0,4% et 82,3 ±6,36%

de celles-ci (Figure 17). Il n'est donc pas possible de séparer *D. salina* et *C. watsonii* par filtration avec les filtres GF/D. Les filtres GF/C ont alors été utilisés par la suite dans le protocole de mesure du CHN car ils permettent de retenir la quasi-totalité de la biomasse cellulaire des deux microorganismes.

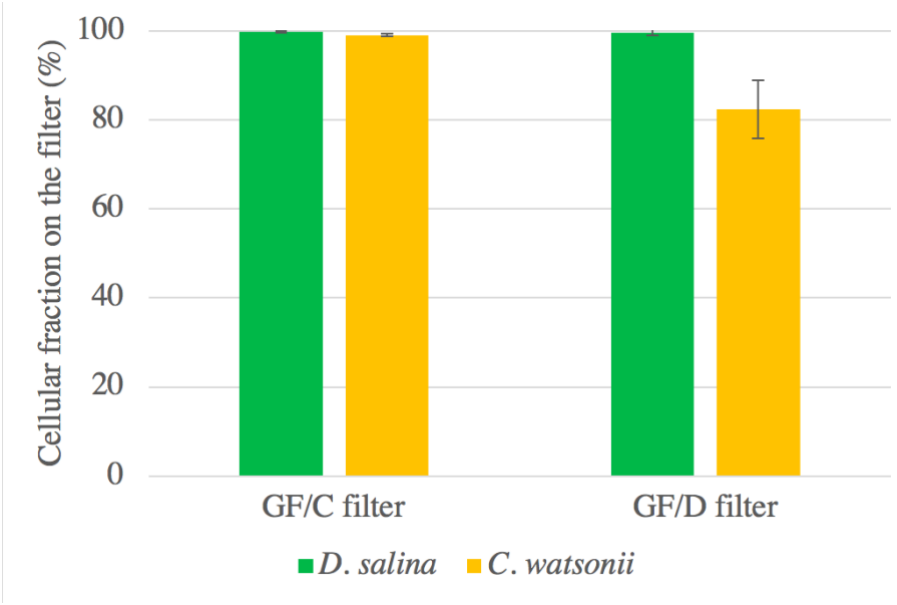

Figure 17 : Concentrations cellulaires de *D. salina* et de *C. watsonii* retenues sur les filtres GF/C (1,2 µm, Whatman) et GF/D (2,7 µm, Whatman) après filtration

Suite aux prélèvements, les échantillons de 3 mL de culture sont filtrés sur les filtres GF/C (1,2 µm, Whatman) pré-calcinés (pendant 4h à 450°C) à l'aide d'une rampe de filtration. Les échantillons filtrés sont ensuite conservés dans une étuve à 75°C pour assurer leur déshydratation. L'analyse du carbone et de l'azote particulaires est alors effectuée grâce à l'analyseur CHN. Des blancs machine sont également réalisés avec des filtres GF/C calcinés sans biomasse.

4.6.3 Calcul du rapport C:N

L'azote et le carbone cellulaires (µmol.cell^{-1}) sont estimés grâce à la concentration cellulaire mesurée pendant l'échantillonnage. Le rapport C:N est le rapport molaire du carbone cellulaire sur l'azote cellulaire.

4.7 Caractérisation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux

4.7.1 Principe de la technique

Deux marqueurs fluorescents sont utilisés pour attester de la viabilité cellulaire : l'érythrosine et le di-acétate de fluorescéine (FDA). L'érythrosine colore les cellules dont la membrane est poreuse et qui sont donc mortes. Le FDA colore les cellules vivantes. En effet, il pénètre dans les cellules, est coupé par les estérases et devient alors fluorescent.

4.7.2 Préparation des échantillons et des marqueurs fluorescents

Une solution d'érythrosine à une concentration d'1 g par litre de solution saline à 38 $g.L^{-1}$ est au préalable préparée et filtrée sur 0,2 µm dans un tube Falcon de 15 mL (Eppendorf AG). Cette solution est conservée plusieurs mois à 4°C dans le noir. Une solution de FDA à 10 mg par mL d'acétone est également préparée au préalable sous la hotte Sorbonne dans un pilulier en verre coloré et entouré de papier aluminium. La solution de FDA est conservée au frais à 4°C et dans le noir et est préparée chaque jour.

La densité cellulaire des échantillons prélevés est au préalable déterminée par cytométrie en flux (BD Accuri C6 Plus). Les échantillons sont ensuite dilués avec de l'EDM filtrée sur 0,2 µm pour atteindre une concentration cellulaire d'environ 1,5 10^4 $cell.mL^{-1}$ définie comme optimale pour des mesures de viabilité cellulaire par Béchet et al. (2017).

1 mL de chaque échantillon dilué est alors placé en quatre réplicats dans des Eppendorfs de 1,5 mL (Safe-Lock tubes ; Eppendorf AG). 20 µL de la solution d'érythrosine est ajouté à la moitié des réplicats et 3 µL de la solution de FDA est ajouté dans l'autre moitié des échantillons. Les échantillons marqués à l'érythrosine et au FDA sont incubés à température ambiante pendant respectivement au moins 60 min dans le noir et 20 min à la lumière ambiante.

4.7.3 Caractérisation de la viabilité cellulaire pour *D. salina*

Le protocole a été validé sur la souche de *D. salina* utilisée dans cette thèse grâce à différents ratios cellules vivantes/cellules mortes (Figure 18) avec l'aide de Amélie Talec, ingénieure

d'études dans l'équipe Processus des Écosystèmes Pélagiques au LOV, comme décrit par Béchet et al. (2017). Les cellules ont néanmoins été tuées par bain-marie à 90°C pendant 2 minutes ou en étant placées dans un congélateur à -80°C pendant 15 minutes. Ceci assurait une mortalité de 100% au sein de l'échantillon de *D. salina*.

Les cellules de *D. salina* mortes marquées par l'érythrosine deviennent plus fluorescentes en FL2 (Lumière orange ; Excitation : 488 nm ; Émission : 585 nm) tandis que les cellules vivantes marquées par le FDA deviennent plus fluorescentes en FL1. La fraction des cellules mortes et vivantes est ensuite exprimée en pourcentage pour chaque marquage et pour chaque échantillon (Figure 18). Les deux marquages différents permettent de vérifier que les ratios calculés pour *D. salina* sont cohérents comme montré par Béchet et al. (2017).

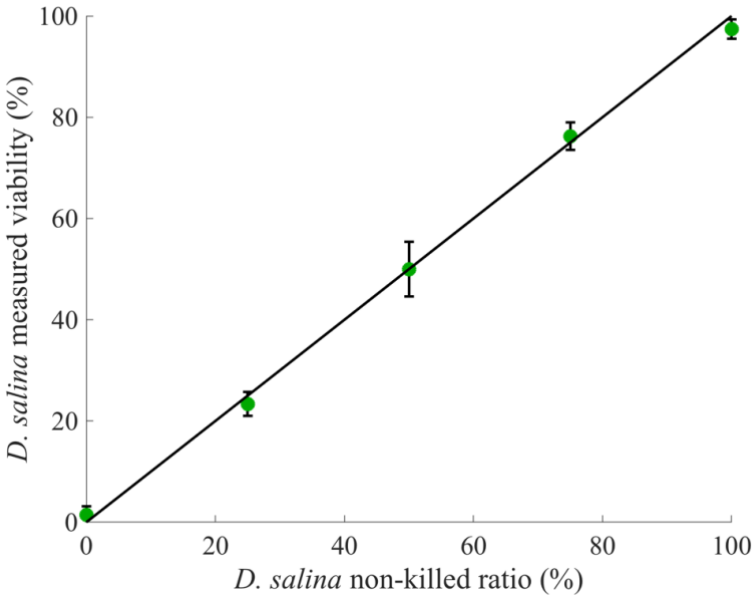

Figure 18 : Ratios cellules mortes/cellules vivantes calculés pour différents ratios cellules mortes/cellules vivantes théoriques de *D. salina*.

4.7.4 Caractérisation de la viabilité cellulaire pour *C. watsonii*

Le protocole de viabilité précédent n'a pas pu être validé sur la souche de *C. watsonii* car aucun des 2 marqueurs n'impactait la fluorescence de la cyanobactérie. Cependant, un changement naturel significatif de la fluorescence en FL1 (Excitation : 488 nm ; Émission : 530 nm) et FL3 a été observé. Cette augmentation significative et naturelle de la fluorescence permet de différencier les cellules mortes des vivantes (Figure 19).

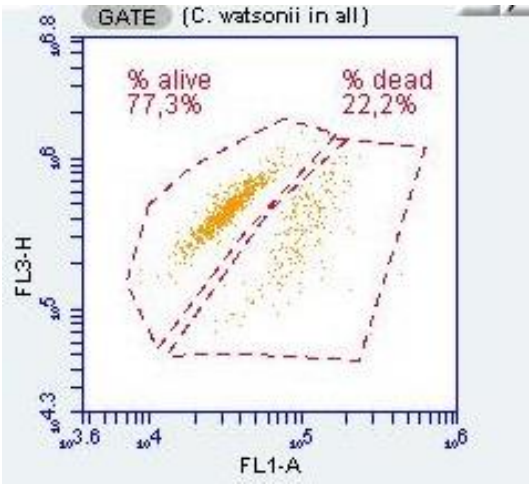

Figure 19 : Exemple de cytogramme où le changement naturel de la fluorescence de *C. watsonii* permet de distinguer les cellules vivantes (« % alive ») des mortes (« % dead »).

Comme pour *D. salina*, le ratio cellules mortes/cellules vivantes peut ainsi être calculé pour chaque échantillon comme le montre la Figure 20.

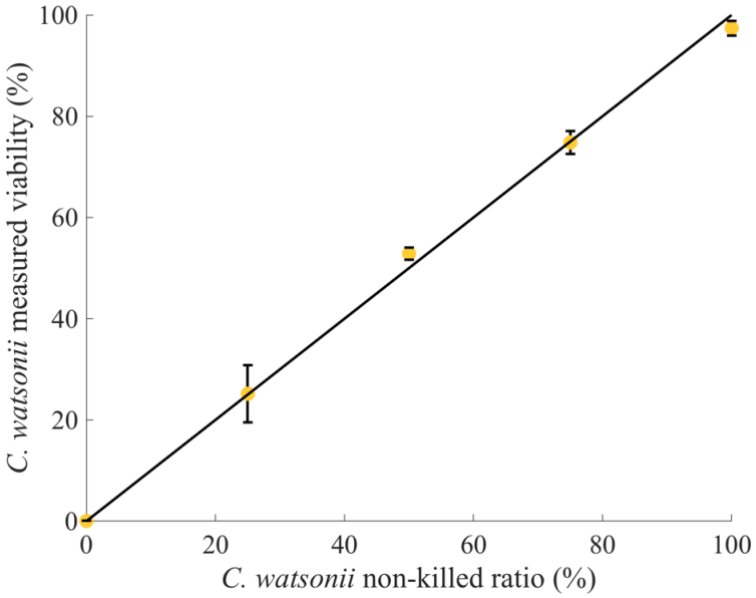

Figure 20 : Ratios cellules mortes/cellules vivantes calculés pour différents ratios cellules mortes/cellules vivantes théoriques de *C. watsonii.*

4.8 Mesure de la concentration en O_2

Les sondes à oxygène (Oxygen Dipping Probe, PreSens) sont calibrées avec 2 solutions d'eau de mer à 38 $g.L^{-1}$. La première est mise en agitation pendant 3 heures et est ainsi saturée en oxygène. La deuxième est anoxique grâce à l'ajout de sulfite de sodium (Na_2SO_3) à hauteur d'une concentration de 5 $g.L^{-1}$. Les sondes sont ensuite connectées à un boîtier d'acquisition Oxy-4 (PreSens) relié à un ordinateur pour enregistrer les mesures automatiquement tous les quarts d'heure au cours de l'expérience.

4.9 Mesure du pH

Les sondes pH (Mettler Toledo) sont étalonnées grâce à deux solutions standard au pH connu. Ces sondes sont reliées à un boîtier d'acquisition à deux canaux (Transmetteur M300, Mettler Toledo) connecté à un ordinateur. Le logiciel ODIN®, développé par l'équipe BIOCORE à l'Institut National de la Recherche en Informatique et en Automatique (INRIA), permet d'enregistrer les mesures de manière automatisée en temps réel. Les sondes pH sont ensuite stérilisées à l'HCl 10% avant utilisation. Le pH est ensuite mesuré toutes les 15 minutes au cours de l'expérience.

4.10 Détermination de la concentration en CO_2 à partir de la mesure du pH

4.10.1 Chimie de l'eau de mer

Il est possible de connaître la concentration en CO_2 à partir du pH. Les quatre équations acido-basiques suivantes définissent la chimie de l'eau de mer (Copin-Montégut, 1996; Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001):

$$[H^+] = \frac{10^{-14}}{[OH^-]} \qquad K_\omega = \frac{[OH^-]}{[H^+]} \qquad (1)$$

$$H_2O + CO_2 \rightleftarrows HCO_3^- + H^+ \qquad K_1 = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]} \qquad (2)$$

$$HCO_3^- \rightleftarrows CO_3^{2-} + H^+ \qquad K_2 = \frac{[CO_3^{2-}][H^+]}{[HCO_3^-]} \qquad (3)$$

$$H_2O + B(OH)_3 \rightleftarrows B(OH)_4^- + H^+ \qquad K_B = \frac{[B(OH)_4^-][H^+]}{[B(OH)_3]} \tag{4}$$

où K_ω, K_1, K_2 et K_B sont les constantes d'équilibre des couples acide/base dépendantes de la température (µmol.L^{-1}.Pa^{-1}) (Copin-Montégut, 1996). Le système des carbonates et les ions boratés ont été décrits comme les espèces chimiques majoritairement impactant le pH de l'eau de mer (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). L'électroneutralité des ions de l'eau de mer donne l'équation suivante :

$$[OH^-]+[HCO_3^-]+2[CO_3^{2-}]+[B(OH)_4^-] - [H^+] - [AT] = 0 \tag{5}$$

où AT est l'alcalinité totale de l'eau de mer (µmol L^{-1}). La concentration en CO_2 est ainsi calculée comme suit d'après les Équations (1) à (5) :

$$[CO_2] = \frac{[H^+] + [TA] - [B(OH)_4^-] - [OH^-]}{K_1/[H^+] + 2(K_1K_2)/[H^+]^2} \tag{6}$$

Zeebe et Wolf-Gladrow (2001) ont montré que l'AT de l'eau de mer variait légèrement selon la saison et l'endroit à cause de changements de salinité et des concentrations en carbonate et en azote inorganique dissous. L'AT de l'eau de mer a ainsi été préalablement déterminée *in situ* grâce à la mesure du pH de l'eau de mer à l'équilibre avec du CO_2 pur. Pour le pH mesuré, l'AT a ainsi été calculée combinant l'Équation (6) et la loi de Henry comme suit :

$$[AT] = \frac{K_1KP_{CO_2}}{10^{-pH}} + 2\frac{K_1K_2KP_{CO_2}}{(10^{-pH})^2} + [B(OH)_4^-] + \frac{K_\omega}{10^{-pH}} - 10^{-pH} \tag{7}$$

où P_{CO_2} est la pression partielle en CO_2 de l'eau de mer à l'équilibre avec du CO_2 pur (Pa).

4.10.2 Impact du milieu F/2 sur la chimie de l'eau de mer

Lors de l'enrichissement en nutriments de l'eau de mer pour faire du milieu F/2, de nouveaux équilibres chimiques sont impliqués :

$$H_3PO_4 \rightleftarrows H_2PO_4^- + H^+ \qquad K_{P1} = \frac{[H_2PO_4^-][H^+]}{[H_3PO_4]} \tag{8}$$

$$H_2PO_4^- \rightleftarrows HPO_4^{2-} + H^+ \qquad K_{P2} = \frac{[HPO_4^{2-}][H^+]}{[H_2PO_4^-]} \tag{9}$$

$$HPO_4^{2-} \rightleftarrows PO_4^{3-} + H^+ \qquad K_{P3} = \frac{[PO_4^{3-}][H^+]}{[HPO_4^{2-}]} \qquad (10)$$

où K_{P1}, K_{P2} et K_{P3} sont les constantes d'équilibre des couples acide/base dépendantes de la température (µmol.L^{-1}.Pa^{-1}). Les ions sodium apportés par l'ajout de $H_2PO_4^-$ interviennent également dans l'électroneutralité du milieu F/2 comme suit :

$$[OH^-]+[HCO_3^-]+2[CO_3^{2-}]+[B(OH)_4^-]+[H_2PO_4^-]+2[HPO_4^{2-}]+3[PO_4^{3-}]-[H^+]-[AT]-[Na_P^+] = 0 \quad (11)$$

L'équation suivante permet alors de déterminer la concentration en CO_2 à partir de la mesure du pH en milieu F/2 :

$$[CO_2]=\frac{[H^+] + [TA] + [Na_P^+] - [B(OH)_4^-] - [OH^-] - [H_2PO_4^-] - 2[HPO_4^{2-}] - 3[PO_4^{3-}]}{K_1/[H^+] + 2(K_1K_2)/[H^+]^2} \qquad (12)$$

5 Conclusions

Grâce aux propriétés différentes de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii*, plusieurs mesures ont été facilitées, comme les comptages cellulaires, aussi bien au Coulter Counter qu'au cytomètre en flux, et le CHN, malgré le fait que les deux microorganismes n'aient pas pu être récoltés séparément sur deux filtres de tailles différentes. Différentes mises au point de protocole ont cependant été nécessaires. La mesure de la viabilité cellulaire n'avait en effet pas été testée sur *Crocosphaera watsonii* et celle-ci n'a pas nécessité l'ajout de marqueurs fluorescents. La mesure de l'azote organique dissous a également nécessité divers ajustements car les cultures contenaient de grandes quantités d'azote (inorganique et organique) et de petits volumes de cultures devaient être prélevés. Ces analyses variées et complémentaires ont permis de caractériser la physiologie des microalgues et des cyanobactéries dans différents systèmes de culture, aussi bien en mono-culture qu'en co-culture, et de déterminer par la suite les interactions au sein de cet écosystème avec précision.

Chapitre 3 : Étude d'une co-culture artificielle de la cyanobactérie fixatrice de diazote atmosphérique *Crocosphaera watsonii* et de la microalgue *Dunaliella salina*

Dans ce chapitre, la physiologie de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii* ont tout d'abord été caractérisée en mono-cultures et en co-culture en *batch* pour étudier les interactions au sein de l'assemblage. Deux densités différentes de *C. watsonii* ont été testées dans les co-cultures. *D. salina* a également été cultivée dans du filtrat d'une culture dense de *C. watsonii* pour étudier un potentiel effet allélopathique de la cyanobactérie sur la microalgue. Les résultats de ce chapitre vont être prochainement soumis dans Journal of Applied Phycology sous le titre « Assessing the potential of co-culturing *Dunaliella salina* with N_2-fixing *Crocosphaera watsonii* ».

1 Introduction

Microalgae are cultivated in high rate photobioreactors or algal ponds to produce high added-value compounds such as proteins, antioxidants or pigments for the cosmetics, pharmaceutical and food industries (Barra et al., 2014). Some species are also very promising for biofuel production as more than 30% of their biomass is composed of lipids which can be turned into biodiesel (Mata et al., 2010). The vast majority of the processes aiming at high added value production grow monospecific microalgae cultures, with costly efforts to avoid biological contaminations by other bacteria, competitive species of microalgae or grazers which have often been reported to reduce productivity (Mehrabadi et al., 2015). In some cases associations of algae and bacteria have been shown to reach higher nutrient conversion rates (Le Chevanton et al., 2016, 2013) and improved biomass productivity (Olguín, 2012). Co-cultures of microalgae and bacteria are also known to better resist to external contaminations and provide higher tolerance to environmental changes such as pH, temperature and medium composition (Bhatnagar et al., 2011; Fouilland, 2012; Fuentes et al., 2016).

Interactions between microalgae and bacteria can be complex and are far from being well understood. Interactions can result from a combination of positive (Kazamia et al., 2012; Xue et al., 2018), neutral (Fulbright et al., 2018) or negative (Ramanan et al., 2016; Ternon et al., 2018) elementary interactions (Le Chevanton et al., 2016). This network interaction may have different outcomes depending on environmental parameters such as pH, CO_2, nutrient source and concentration (Huisman et al., 1999; Seymour et al., 2017; Ying, 2014). Studies of co-cultures attest for the complexity of these interaction networks and also highlight the interest of reaching symbioses. For instance, Le Chevanton et al. (2016, 2013) studied the interactions between the marine bacteria *Alteromonas* sp. which enhanced *Dunaliella salina* growth in non-limited conditions but became the competitor when nitrogen was limiting. Beliaev et al. (2014) showed that specific exchanges of metabolites occurred between cyanobacteria *Synechococcus* sp. and heterotrophic bacteria *Shewanella putrefaciens* while the cyanobacteria induced a protective action against oxidative stress in co-culture.

In particular, growing simultaneously microalgae with nitrogen fixing cyanobacteria has been described as a promising way at large-scale to support the nitrogen need of microalgae which are a burden on both the economic and environmental points of view (Lardon et al., 2009). Nitrogen fertilizers represent 10% of the economical production cost (Chen et al., 2018). Considering the energy balance (which also drives the CO_2 emissions), the production of one kg of nitrogen fertilizers requires an energy equivalent to one kg of petrol (Skowrońska and Filipek, 2014). Reducing the need for fertilizer will therefore be very beneficial for the process sustainability.

Contrary to cyanobacteria, no microalgae have been reported for their ability to uptake atmospheric nitrogen (Do Nascimento et al., 2015; Thompson et al., 2012). Adam et al. (2015) showed that diazotrophic cyanobacteria *Aphanizomenon* transferred the fixed dinitrogen released as ammonium towards its associated plankton community. Berthelot et al. (2016, 2015) showed that diazotrophic bacteria *Trichodesmium erytraeum* and *Crocosphaera watsonii* enhanced the growth of heterotrophic microorganisms and, to a lesser extent, autotrophic phytoplankton. As a matter of fact, ammonium (NH_4^+) is the easiest nitrogen source to uptake for phytoplankton as it diffuses through the cell. On the contrary, NO_3^- and NO_2^- are uptaken by primary active transport as it requires a reduction in order to be used by the cell (Capone et al., 2008). As dissolved organic nitrogen (DON) consists in various labile molecules such as amino acids, it requires either a secondary active transport or diffusion. DON was therefore shown to contribute to autotrophic microorganisms (Bronk et al., 2007).

In this study, the unicellular cyanobacterium *C. watsonii*, known for its diazotrophic activity, has been assembled with *D. salina*, a microalgae of commercial interest for its high beta-carotene content (Lamers et al., 2008). The N_2 uptaken and partially released in the form of organic dissolved nitrogen is expected to be used as a nitrogen substrate by *D. salina*. But a competition for light is also suspected as both *D. salina* and *C. watsonii* are photosynthetic microorganisms. The objective of this study was therefore to assess the main interactions within the artificial ecosystem of *D. salina* and *C. watsonii,* also keeping in mind that both organisms also thrive with their own bacterial communities. Beyond this objective, the idea is to clarify the implication of the co-culture on the microalgal biomass productivity.

2 Material and methods

2.1 Experimental settings

2.1.1 Medium

Seawater was collected at Point B in Villefranche-sur-Mer (France) and stored in tanks in the dark for one month. The aged seawater was then filtered on 0.1 µm to eliminate particles and autoclaved 30 min at 121°C. All the necessary nutrients were then added (except silicate) to prepare a F/2 medium (Guillard, 1975). The medium was then sterilized by filtration with a Top Filter Corning (0.2 µm pore diameter).

2.1.2 Pre-cultivation conditions

Two mono-cultures of *C. watsonii* WH8501(Waterbury and Willey, 1988) and *D. salina* CCAP 19/18 (CCAP culture collection, United Kingdom) were maintained in exponential growth phase in fed-batch mode in F/2 medium in 500 mL Erlenmeyers. These pre-cultures were in an incubator (SANYO MLR-351, Japan) at a temperature of 27°C, reported to be the ideal temperature for *C. watsonii* (Webb et al., 2009). Light was supplied at 220 µmol photons$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ with a day/night cycle of 12h:12h to trigger a coherent rhythm for carbon and nitrogen metabolism in *C. watsonii* (Dron et al., 2012; Mohr et al., 2010). Cultures were continuously agitated at a rotation speed of 150 rpm to prevent cells sedimentation and were bubbled with 0.2 µm filtered air.

Even though the strains were not axenic, bacterial contamination was controlled by flow cytometry and limited as bacteria represented less than 0.5% of total biovolume.

2.1.3 Experiment A: Mono-cultures and co-cultures with low *C. watsonii* density

Mono-cultures of *C. watsonii* and *D. salina* were grown in triplicates in batch. Co-culture with low *C. watsonii* density (LCD) were simultaneously grown in triplicates in the same setup. 130 ml of F/2 medium (Guillard, 1975) were added in nine previously sterilized 250 mL Erlenmeyers (see Supplementary material 1). *C. watsonii* and *D. salina* pre-cultures were then inoculated in order to obtain a cellular concentration of respectively 1.10^6 and 4.10^4 cell·mL^{-1}. These densities correspond to a ratio of 25:1 (*C. watsonii*:*D. salina*) which is consistent with the 25 times smaller biovolume of *C. watsonii* compared to *D. salina*. The culturing devices were kept in the same incubator than the inoculum to maintain the same conditions of temperature, light intensity and day/night cycle.

2.1.4 Experiment B: Culturing *D. salina* with high *C. watsonii* density and in its cell-free filtrate

A mono-culture of *C. watsonii* was grown until it reached 10.10^6 cell·mL^{-1} during exponential growth phase in F/2 medium with 700 µmol·L^{-1} of NO_3^-. This *C. watsonii* culture was enriched with sterile filtered F/2 medium. NO_3^- was not added since *C. watsonii* did not uptake it and it remained in the medium. Half of this enriched *C. watsonii* culture was filtered with a Top Filter Corning (0.2 µm) to retain *C. watsonii* cells and collect the cell-free filtrate. Three types of *D. salina* cultures were then carried out in triplicates with 120 ml of medium added in previously sterilized 250 mL Erlenmeyers. The medium for control (called "control medium" in the following) consisted of F/2 with 700 µmol·L^{-1} of NO_3^-. The medium for enriched *C. watsonii* culture was composed of living *C. watsonii* cells and their medium (called "High *C. watsonii* density (HCD) co-culture" in the following) where the cyanobacteria at inoculation time was 10 times denser than in LCD co-culture. Finally, the last medium (called "*C. watsonii* filtrate" in the following) consisted in cell-free filtrate of *C. watsonii* culture. *D. salina* pre-culture was then inoculated in the nine Erlenmeyers at a concentration of 4.10^4 cell·mL^{-1} (see Supplementary material 1). In this experiment, and for both inoculum used, light intensity during the day period was set to 300 µmol photons·m^{-2}·s^{-1}. The light intensity was increased

compared to Experiment A to minimize self-shading due to the high *C. watsonii* density when grown with *D. salina*.

2.2 Measurements

2.2.1 Cell counts and growth/mortality rates calculations

Cultures were sampled every morning and each cell count was performed in triplicates using a Coulter Counter (Multi- sizer III; Beckman-Coulter) with a 50 µm aperture tube. Less than 3% variation was observed between triplicate counts of each sample. Both cyanobacteria and microalgae were separately counted since *C. watsonii* and *D. salina* differ in size, with diameters of respectively 2-3.5 µm and 7-15 µm.

The growth and mortality rates were calculated during the exponential and decline growth phases of both microorganisms, respectively. Each cell count was transformed into its neperian logarithm and linear regressions were carried out over the exponential and stationary growth phases. The slope of the line determined either the growth or mortality rate.

2.2.2 Nitrate and nitrite concentration

Samples were filtered with 0.2 µm pore diameters syringe-filters to eliminate the cells. Filtered samples were then analyzed with an Auto-analyzer II Technicon to determine nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) concentrations. Filtered samples that could not be analyzed straight after the filtration were kept at 4°C in safe-lock Eppendorf tubes until further analyses.

2.2.3 Dissolved organic nitrogen concentration

Culture samples were filtered with 0.2 µm pore diameters syringe-filters to eliminate particular organic matter. Dissolved organic nitrogen (DON) concentration was measured by Wet Chemical Oxidation (WCO) (Pujo-Pay and Raimbault, 1994). The filtered samples were diluted in 25 mL Schott bottles to ensure a total amount of nitrogen lower than 40 $\mu mol \cdot L^{-1}$. After the addition of 2.5 mL of the oxidant reactive, the bottles were tightly closed with a cap and autoclaved for 30 minutes at 121°C. DON was therefore converted into NO_3^- and quantified with an Auto-analyzer II Technicon. Filtered samples that could not be analyzed straight after

the filtration were kept at -80°C in sterile safe-lock Eppendorf tubes until further analyses so DON would not be degraded.

2.2.4 Light intensity

The light intensity received by the cultures varied within ± 15% of the mean value for all measurements depending on their proximity to the lightbulbs in the incubator. The light distribution per cell within a culture was homogeneous since the Erlenmeyers were constantly agitated. The photosynthetically active radiation (PAR) was daily measured in the cultures at the same time (10 am) with a dipping probe (PAR Sensor QSL-2100, Biospherical Instruments) to characterize the light attenuation over time. The light intensity was only measured in two of the triplicates because the Erlenmeyer cap needed to be removed for the measurement. One of the triplicates was therefore maintained aseptic in order to control any external contamination. The PAR sensor was cleaned with 70% ethanol before and between each measurement to avoid any external and/or crossover contaminations between cultures.

2.3 Analyses

2.3.1 Curve fitting

The parameters measured over time (cellular growth, NO_3^- and DON concentrations, light intensity) were fitted with the Polyfit and Polyval functions using MATLAB Software. The Polyfit function uses the least-squares approximation to calculate the polynomial coefficients that fit best the data. The Polyval function provides a finer fit of the polynomial determined by Polyfit and enables to trace this function.

2.3.2 Statistical analysis

Growth and mortality rates were compared two by two. The normal distribution of data was first verified with a Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances was then proved. The statistical significance of growth and mortality rates variation depending on culture conditions was then assessed using a two-samples Student T-test (Fay and Proschan, 2010) using MATLAB Software. The statistical significance of cell concentrations variation between

culture conditions was determined with a non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) test (Fay and Proschan, 2010).

3 Results and discussion

3.1 A two-way interaction on cellular growths

C. watsonii exponential growth phase did not show any inflexion in mono-cultures (Figure 21) since no nutrient turned out to become limiting and nitrogen was continuously fixed by diazotrophic activity (Dron et al., 2012).

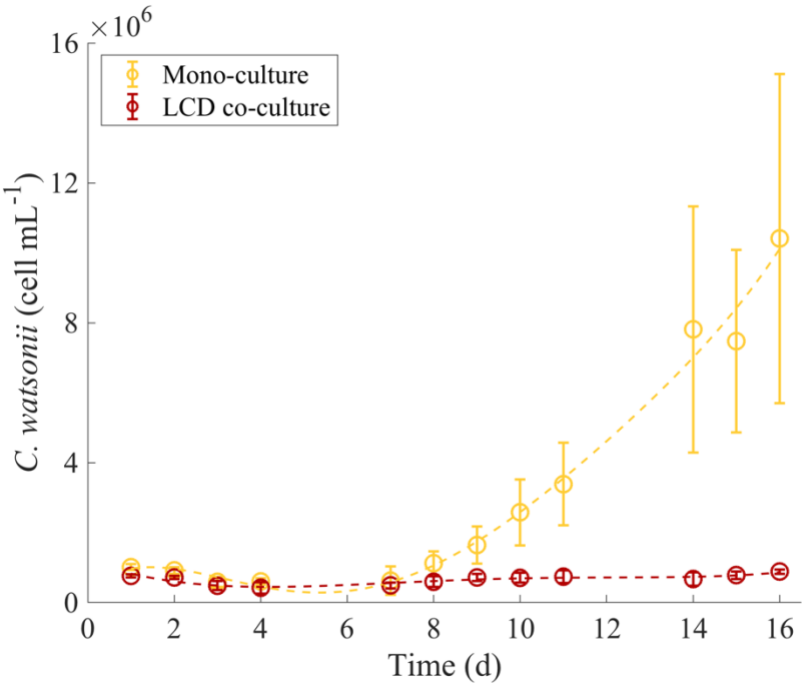

Figure 21: *C. watsonii* cell densities over time in mono-cultures and Low Density co-cultures (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

On the contrary, *C. watsonii* cellular growth was significantly impacted when co-cultured with *D. salina* (Figures 21, 22); see Supplementary material 1 for additional details). *C. watsonii* growth inhibition in presence of *D. salina* may indicate a competition between the two microorganisms and/or a negative impact of the microalgae. However, reduction in

cyanobacteria growth did not result from a competition for nutrients as *C. watsonii* still grew at the same reduced rate at the end of the experiment (Figures 21, 22, 23). *C. watsonii* high latency also disfavored the cyanobacteria in the co-cultures as *D. salina* grew without delay (Fig. 21, 23).

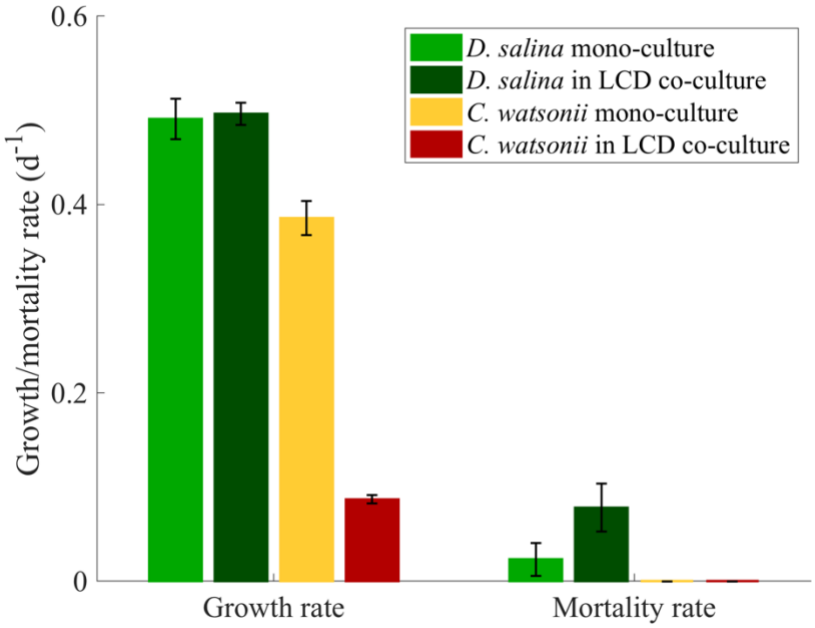

Figure 22: *D. salina* and *C. watsonii* growth rates in exponential phase and mortality rates in decline phase in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

The growth dynamics were different for *D. salina*, as growth rate turned out to mainly depend on nitrogen availability. Maximal cell concentration reached in mono-cultures was not significantly different when co-cultured with *C. watsonii* (Figure 23). There was therefore no *D. salina* biomass gain in LCD co-cultures. Moreover, *D. salina* growth rates were not significantly different in mono-cultures and LCD co-cultures (Figure 22), highlighting the marginal impact of *C. watsonii* on the microalgae growth at a cell density of 10^6 cell·mL^{-1}.

However, *D. salina* post-growth phase was significantly impacted by the cyanobacteria as the microalgae cell declined (Figure 23). The mortality rate of *D. salina* mono-cultures in decline phase was 0.023 ±0.018 d^{-1} and was 3.4 times higher when *D. salina* was co-cultured with low *C. watsonii* density (0.078 ±0.025 d^{-1}; Figure 22) from day 10 to 16.

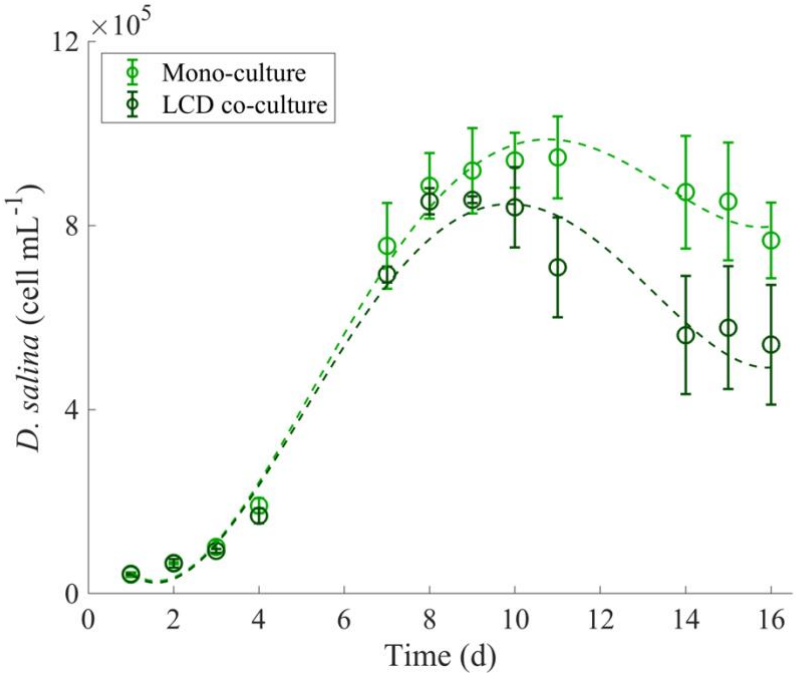

Figure 23: *D. salina* cell densities over time in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

Moreover, *D. salina* maximal cell density was lowered by 25% when grown in highly dense *C. watsonii* culture compared to the cultures in its filtrate or control (see Supplementary material 1). Note that the maximal biomass of *D. salina* was lower than in Experiment A (Figure 23) as less NO_3^- was available in Experiment B (see Supplementary material 1). *D. salina* growth rate was also significantly reduced in HCD co-cultures (Figure 24). *D. salina* increased growth rates in control and filtrate compared to Experiment A (Figure 22) were due to the higher light intensity in Experiment B. A higher mortality rate in decline phase was also observed (0.083 ±0.018 d^{-1}) when *D. salina* was grown in HCD co-cultures. There was no significant difference between *D. salina* mortality rates observed in absence of *C. watsonii* cells (filtrate and control media, respectively 0.033 ±0.006 and 0.022 ±0.020 d^{-1}; Figure 24) which were not significantly different from *D. salina* mono-cultures (Figure 22). The increased *D. salina* mortality rates when nitrogen-limited were similar regardless of *C. watsonii* density (LCD or HCD ; Figures 22, 24) and were therefore induced by the presence of *C. watsonii*.

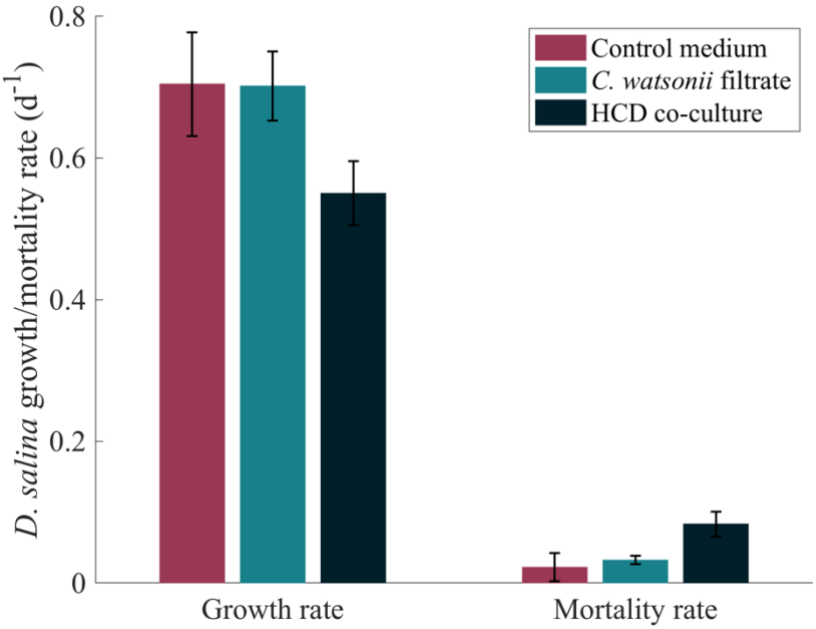

Figure 24: *D. salina* growth rates in exponential phase and mortality rates in decline phase in control, *C. watsonii* filtrate and co-culture with High *C. watsonii* Density (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviations between samples (n = 3).

This observation reveals that the interaction first observed in co-culture when each organism is inoculated at low density is likely to change once *C. watsonii* has reached a much higher density. It can therefore strongly reduce the development of *D. salina* population by decreasing its growth rate and maximal biomass density while increasing its mortality rate. At such a high *C. watsonii* density, its negative impact impairs *D. salina* and the cyanobacteria will eventually win the competition.

3.2 Interactions regarding nitrogen

D. salina growth was mainly driven by NO_3^- availability. As a matter of fact, *D. salina* growth stopped short after NO_3^- concentration was under the detection threshold (Figures 23, 35). The same observation holds when *D. salina* was co-cultured with low *C. watsonii* density.

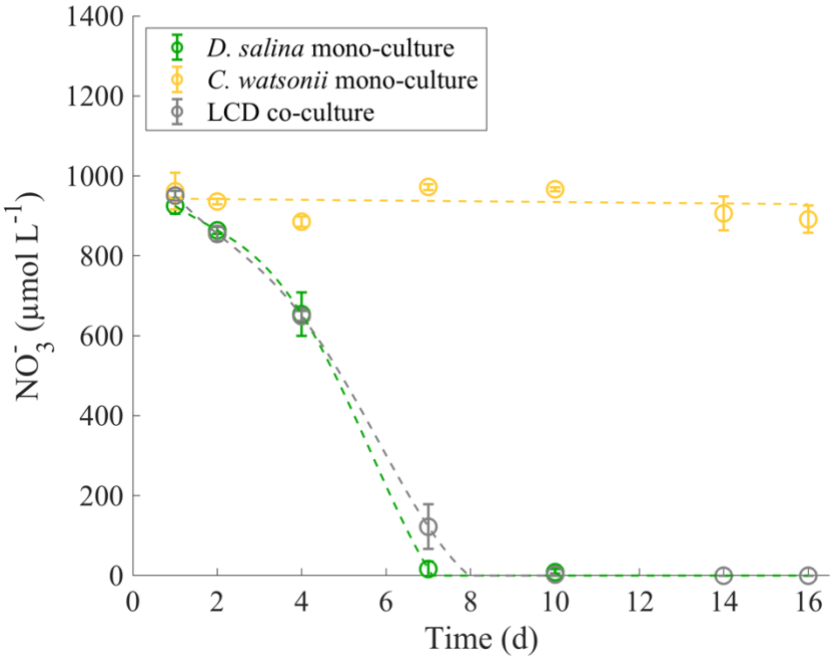

Figure 25: NO_3^- concentration in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures over time (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

In *C. watsonii* mono-cultures, NO_3^- concentration remained constant over time proving that it was not uptaken by the cyanobacteria (Figure 25). However, *C. watsonii* has the potential to produce nitrate reductase (Hewson et al., 2009). *C. watsonii* can indeed totally consume NO_3^- at low micromolar NO_3^- concentrations down to 5 µmol·L^{-1} (Dekaezemacker and Bonnet, 2011). According to Dekaezemacker and Bonnet (2011), *C. watsonii* NO_3^- uptake kinetic was however saturated for a slightly higher NO_3^- concentration of 10 µmol·L^{-1} while still fixing N_2 at the same rate. However, *C. watsonii* diazotrophic activity is known to be inhibited up to 89% at NO_3^- concentrations up to 16 µmol·L^{-1} but this inhibition seems to depend on exposition recurrence and N:P ratio (Knapp et al., 2012). In another study, *C. watsonii* diazotroph activity and growth rate were shown to be constant regardless NO_3^- concentrations up to 800 µmol·L^{-1} (Großkopf and LaRoche, 2012). In our study, *C. watsonii* biomass gain could not depend on NO_3^- availability as NO_3^- uptake was not detectable. Moreover, a slight inhibition by NO_3^- cannot be excluded because the diazotroph activity was not directly measured. These studies are in agreement with our conclusion where atmospheric dinitrogen was therefore massively used as nitrogen source as no other sources were used.

On the other hand, *C. watsonii* is known to produce large amounts of diazotroph derived-nitrogen in the form of DON and to release it into the medium (Masuda et al., 2013). Part of the DON produced by *C. watsonii* has been shown to be bioavailable for other microorganisms (Berthelot et al., 2016). Total DON at the end of our experiment in *C. watsonii* mono-cultures was 106 ±32 $\mu mol \cdot L^{-1}$. Moreover, total nitrogen (dissolved and particulate) was increased by 1.96 ±0.45 for *C. watsonii* mono-cultures between the beginning and the end of the experiment due to its diazotrophic activity (see Supplementary material 1). DON can also be assimilated by the cyanobacteria itself and therefore contribute to its growth. When *C. watsonii* was co-cultured at low density with *D. salina*, the amount of DON was three times higher (346 ±11 $\mu mol \cdot L^{-1}$). Surprisingly, this higher DON probably resulted from *D. salina*, since it exactly coincided with the DON excreted by *D. salina* when grown alone (346 ±38 $\mu mol \cdot L^{-1}$) which represented 28.6 ±1.4% of total nitrogen. Moreover, total nitrogen was found to be constant at the beginning and at the end of Experiment A and was equal to 1109 ±135 $\mu mol \cdot L^{-1}$ for *D. salina* mono-cultures and to 1076 ±98 $\mu mol \cdot L^{-1}$ for LCD co-cultures (see Supplementary material 1). *C. watsonii* therefore did not produce significant amounts of DON as its growth was strongly reduced in LCD co-cultures, hence its diazotrophic activity. Microalgae concentration was declining at the end of mono-cultures and LCD co-cultures because of cell death (Figures 22, 23). These high DON concentrations may result from *D. salina* excretion of extracellular polymeric substances (Mishra et al., 2011). Lysed *D. salina* cell fragments in the medium might also contribute to this DON pool (Hulatt and Thomas, 2010).

Less DON was measured in Experiment B (Figure 26) as less *D. salina* biomass was achieved than in Experiment A (Figure 23). When grown with high *C. watsonii* densities, *D. salina* reached a 25% lower maximal biomass level than in the other Experiment B conditions once all nitrates have been consumed. *D. salina* was probably still not able to uptake the DON produced by *C. watsonii* although there was a large pool of DON along Experiment B (Figure 26).

On the other hand, DON increased with *D. salina* cell density and decreased when cells were declining (Figure 26). This decrease in DON concentration might result from some consumption by bacteria associated with both *D. salina.* The observed linear DON concentration when *D. salina* is grown with HCD co-culture is therefore explained by a balance between DON production by *C. watsonii* and consumption by bacteria associated with both *D. salina* and *C. watsonii* (Figure 26). This balance is confirmed by the fact that total nitrogen was found to be constant at the beginning and at the end of Experiment B and was equal to 1903

±177 µmol·L^{-1} for HCD co-cultures (see Supplementary material 1). DON produced by *C. watsonii* in HCD co-cultures was hence labile and directly assimilated.

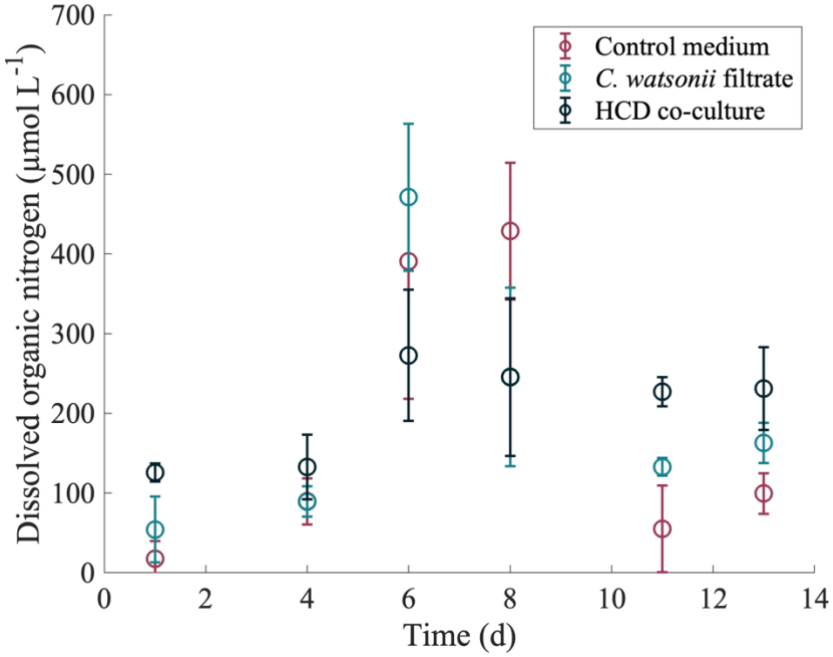

Figure 26: Dissolved organic nitrogen concentration in *D. salina* cultures in control, *C. watsonii* filtrate and co-cultures with High *C. watsonii* Density over time (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

3.3 Light competition

Light decrease (Figure 27) results from progressive attenuation due to biomass accumulation. Light attenuation is more significant for *D. salina* than for *C. watsonii* mono-cultures (Figure 27), both because of *D. salina* has a higher growth rate, resulting in higher (carbon) biomass at the end of the cultivation, and because of its larger size (four times larger than *C. watsonii*), inducing lower light scattering (Price et al., 1978). In LCD co-cultures, the strong light attenuation was mainly due to *D. salina* (a similar attenuation was observed in *D. salina* mono-cultures and LCD co-cultures) (Figure 27). The decrease in *D. salina* biomass explains the slight increase in light availability at the end of the experiment in both mono-cultures and co-cultures in Experiment A (Figures 22, 25, 27). As a result, *D. salina* shadowed the cyanobacteria and limited its growth in co-cultures (Figures 21, 22, 27). The microalgae and cyanobacteria were therefore competing for light. The energetically needs of *D. salina* are

probably much lower than for *C. watsonii* which has to store energy (mainly under the form of glycogen) to support high nitrogen fixation cost. The reduction in light seems to be highly detrimental to its ability to fix N_2 (Agawin et al., 2007) which could explain the limited DON production by *C. watsonii* in LCD co-cultures (Figure 27).

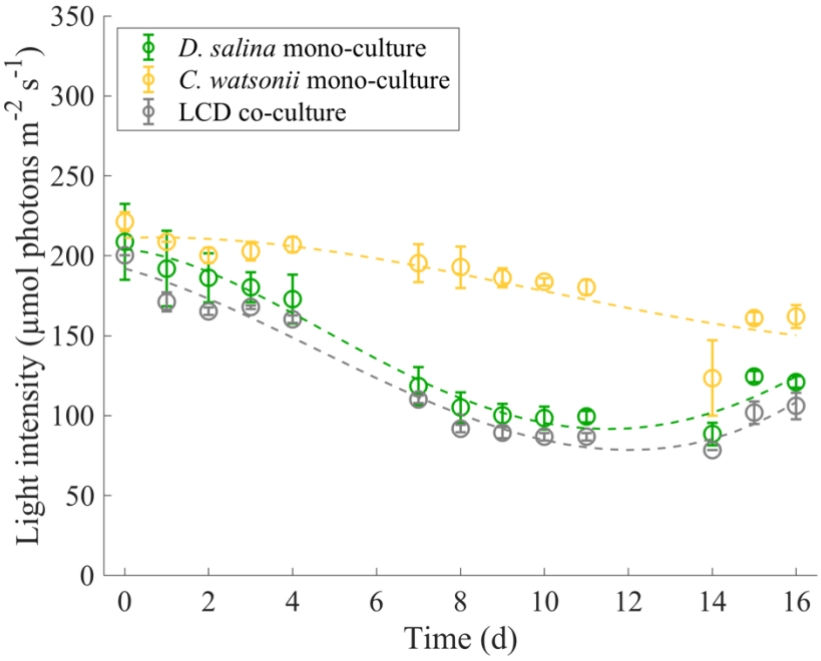

Figure 27: Light intensity in mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures over time (Experiment A). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

C. watsonii grew at a reduced rate in LCD co-cultures in spite of the low light availability, which means that its critical light intensity had not been reached (Figures 21, 27 ; Huisman et al., 1999). This ability to grow at lower light intensities is commonly observed in non-heterocistous cyanobacteria (Aguilera et al., 2017). This way, diazotrophic cyanobacteria can still grow and keep its dinitrogen activity in natural assemblages despite shading caused by other species (Paerl and Otten, 2016; Scheffer et al., 1997).

3.4 Other potential interactions

D. salina increased mortality in co-cultures (Figures 22, 24) was not due to *C. watsonii* shade as the light intensities were not significantly different from mono-cultures (Figures 27, 28).

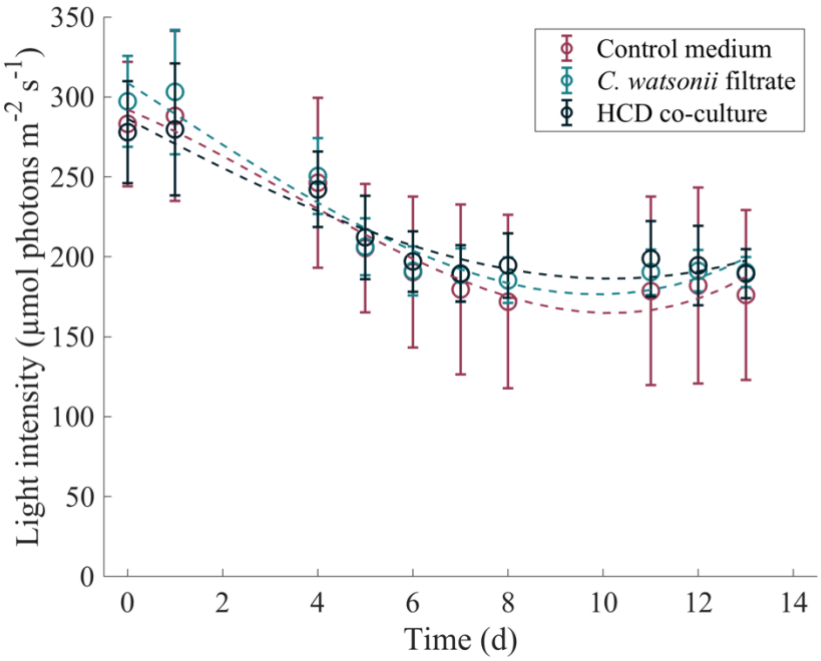

Figure 28: Light intensity in *D. salina* cultures in control, *C. watsonii* filtrate and co-cultures with High *C. watsonii* Density over time (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

C. watsonii is known to have an enhanced respiration rate during night periods to remove oxygen intra and extracellularly so as to favor O_2-inhibited nitrogenase enzyme activity (Compaoré and Stal, 2010). Reducing oxygen level could limit *D. salina* respiration and therefore its ability to fuel cellular activity, especially cell division (Bonnefond et al., 2016) during night periods. These cyanobacteria are also photosynthetic during day periods which could induce CO_2 competition between *C. watsonii* and *D. salina* by reducing carbon storage during the day (Ghoshal and Goyal, 2001). According to Peng et al. (2017), oxygen limitation during night periods coupled to CO_2 limitation during day periods might have therefore a significant deleterious impact on *D. salina* in LCD co-cultures when the cells were nitrogen-limited (Figures 22, 23, 25). This negative impact is confirmed by the fact that *D. salina* growth rate was also significantly reduced when grown in HCD co-cultures, compared to Experiment

B control, where *C. watsonii* density was 10 times denser than in LCD co-cultures (Figures 22, 24), therefore impacting *D. salina* from the beginning of the experiment (see Supplementary material 1).

C. watsonii negative impact on *D. salina* might also result from the production of allelopathic molecules, such as cyanotoxins, which have been observed for other cyanobacteria (Dias et al., 2017; Zanchett and Oliveira-Filho, 2013). The roles and triggers of such metabolites are still poorly understood and only few of them are identified. Allelochemicals can either be produced in presence of a competitor as a defense mechanism or continuously to allow soluble compounds exchanges within the cyanobacteria colony (Liu et al., 2018; Ternon et al., 2018). No allelopathy in *C. watsonii* has been reported in literature so far. However, *D. salina* mortality rate was increased by three in both LCD and HCD co-cultures and biomass production was decreased by 25% when grown in HCD co-cultures compared to Experiment B control. No such significant differences were observed when *D. salina* was grown on *C. watsonii* filtrate. Moreover, *D. salina* cellular growth was negatively impacted by *C. watsonii* from the beginning of the co-culture as the cyanobacteria was 10 times denser in Experiment B compared to Experiment A. *C. watsonii* would therefore potentially produce allelopathic molecules in presence of a competitor with a cell-to-cell contact induction as it requires a high amount of energy (Dunker et al., 2017). High concentrations of allelochemicals are also required to inhibit the development of other species. Impacting concentrations can be achieved close to the cell from direct release and in the medium by high cyanobacteria densities (Babica et al., 2007). In our experiments, constant mixing has therefore facilitated molecules exchanges and enhanced *C. watsonii* impact on *D. salina* growth when the cyanobacteria were 10 times denser in HCD co-culture (Figures 22, 24).

4 Conclusions

Several interactions appeared when co-culturing *D. salina* and *C. watsonii.* The most obvious one was the competition for light. The assemblage behavior was mainly driven by this interaction which strongly limited the LCD cyanobacteria cellular growth, hence DON production. The high DON produced by a 10 times denser *C. watsonii* culture was however not uptaken by *D. salina*.

Furthermore, *C. watsonii* had a significant negative impact on *D. salina* suspected to be by cell-to-cell contact due by enhanced with *C. watsonii* density.

Following set-ups of Ternon et al. (2018), it could be interesting to co-cultivate these two microorganisms in membrane-separated reactors to further study the interactions. *C. watsonii* could therefore produce high amount of DON as no light competition would inhibit its growth. Cell-to-cell interaction would also be overcome and *D. salina* growth would not be limited by *C. watsonii* contact. Moreover, adding recycling bacteria able to remineralize DON would optimize nitrogen molecules exchanges in this co-culture, hence *D. salina* growth. At last, using nitrogen isotopic labelling would allow to refine nitrogen gross balance at laboratory scale in this type of co-culture device.

5 Acknowledgements and contributions

5.1 Declaration of authors' contribution

Margaux Caia, Olivier Bernard and Jean-Philippe Steyer conceived the study. Margaux Caia and Meng Zhang performed the experiments and the data were analyzed by all authors. Margaux Caia wrote the manuscript which was revised by Olivier Bernard and Jean-Philippe Steyer. The final version of the manuscript was read and approved by all authors.

5.2 Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts, informed consent, human or animal rights applicable.

5.3 Fundings

This work was supported by the ANR Phycover (ANR-14-CE04-0011) and the Inria Project Lab Algae in silico. M. Caia benefited from an INRA funding for her salary.

Chapitre 4 : Reminéralisation de l'azote dérivé de l'activité diazotrophe de *Crocosphaera watsonii* par des bactéries : approche par la modélisation.

Dans ce chapitre, un modèle mathématique a tout d'abord été créé pour décrire les interactions entre *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii* observées expérimentalement en co-cultures en *batch*. Puis, le modèle est modifié pour simuler l'ajout de bactéries capables de reminéraliser une partie de la production azotée de *C. watsonii*. Cet azote reminéralisé serait alors biodisponible pour *D. salina* et permettrait de favoriser sa production de biomasse. L'effet combiné de l'ajout de nitrates et du taux de dilution est alors étudié pour trouver le meilleur scénario permettant d'augmenter significativement la biomasse de *D. salina* en co-culture avec *C. watsonii* et des bactéries reminéralisatrices dans des cultures en continu. Les résultats de ce chapitre ont été publié dans IFAC PapersOnLine sous le titre « Modelling an artificial microalgae-cyanobacteria ecosystem » (2018, vol. 1-2, p. 655-660) placé en Annexe 3.

1 Introduction

As discussed in Chapter 1, interactions between microalgae, cyanobacteria and bacteria are still poorly understood. Thus, few studies focused on growing simultaneously bacteria with microalgae to enhance biomass production while providing more resilience to external changes and eventually limit external contaminations. In particular, growing simultaneously microalgae with nitrogen fixing cyanobacteria was shown to enhance microalgae growth but none of these few studies investigated the industrial feasibility with a selected artificial ecosystem.

The photosynthetic marine ecosystem composed of the microalgae *Dunaliella salina* and the nitrogen fixing cyanobacteria *Crocosphaera watsonii* was therefore studied. A mathematical model was built to represent the competition for light and the interactions with nitrogen between these two microorganisms previously characterized (Chapter 3). An allelopathic effect was also experimentally noticed in Chapter 3: a toxin production by *C. watsonii* was assumed and included in the model.

The mathematical model was therefore built to support the hypotheses on the interactions and quantify their impacts on overall productivity. Nitrogen recycling bacteria were also modeled to enhance nitrogen exchanges towards *D. salina* and promote a better biomass growth.

The ecosystem model is first presented and calibrated in this Chapter. Simulations are then analyzed to assess the potential of this ecosystem.

2 Material and methods

2.1 Experimental settings

D. salina and *C. watsonii* mono-cultures and co-cultures experimental set-ups were described in Chapter 3 (Experiment A). Each condition was conducted in *batch* in triplicate and F/2 medium was prepared accordingly to Chapter 2.

2.2 Measurements

2.2.1 Cell counts and growth rates

Cultures were sampled accordingly to Chapter 3. Growth rates measurement are described in Chapter 2.

2.2.2 Nitrogen measurements

Nitrate and dissolved organic nitrogen (DON) were sampled and measured accordingly to Chapter 3.

2.2.3 Light intensity

Light intensity was measured accordingly to Chapter 3.

3 Model design

3.1 Light intensity along the reactor

Cultures were lightened on their external sides with a light intensity I_0. The light intensity I_0 was constant from 8 am until 8 pm and was equal to 220 µmol photons m^{-2} s^{-1}. The rest of the day was a night period, and light intensity I_0 was 0 µmol photons m^{-2} s^{-1}. The self-shading by the microalgae and cyanobacteria was considered, assuming that both species contribute to attenuate light. Light is attenuated due to absorption and scattering, depending on cell concentrations, size and pigment content.

$$I = I_0 e^{-K(X)L} \tag{13}$$

where I is the light intensity at the center of the Erlenmeyer, assuming an optical path L between the external surface and the core of the Erlenmeyer (m). *K(X)* is the extinction coefficient ($m^2 \cdot cell^{-1}$), depending on X, the concentration vector of the two biomasses.

Light attenuation characteristics are specific to each species and are represented in *X* as the extinction coefficient K_{ext}. The overall attenuation coefficient *K(X)* is assumed to be the sum of the attenuations due to each species. *D* and *C* denote respectively *D. salina* and *C. watsonii* algal concentrations ($cell \cdot m^{-3}$). $K_{ext,d}$ and $K_{ext,c}$ are respectively *D. salina* and *C. watsonii* light extinction coefficients ($m^2 \cdot cell^{-1}$), so that $K(X) = K_{ext,d}D + K_{ext,c}C$ in co-cultures.

Average light intensity within the culture medium $\bar{I}$ was considered to drive photosynthesis.

$$\bar{I} = \frac{I_0}{L} \frac{1 - e^{-\left(K_{ext,d}D + K_{ext,c}C\right)L}}{K_{ext,d}D + K_{ext,c}C} \tag{14}$$

3.2 Growth and substrate uptake

C. watsonii growth rate is assumed to depend on the light intensity $\bar{I}$ with a simple Michaelis-Menten kinetics (Grimaud et al., 2014). The respiration rate was also considered. *C. watsonii* growth can therefore be represented by following dynamics:

$$\frac{dC}{dt} = \overline{\mu_C} \frac{\bar{I}}{\bar{I} + K_{I,c}} C - R_c C - \upsilon C \tag{15}$$

where $\overline{\mu_c}$ is the maximum growth rate (d^{-1}), $K_{I,c}$ is the half-saturation constant for light (µmol photons·m^{-2}·s^{-1}), and R_c is the respiration rate (d^{-1}). Finally, υ is the dilution rate of the reactor (d^{-1}).

Cyanobacteria are known to produce cyanotoxins in presence of a competitor (Dunker et al., 2017) but nothing is known about a potential production by *C. watsonii*. In order to fit experimental observations, we assume here that *C. watsonii* produces an inhibiting compound P (mol·L^{-1}), proportionally to the cyanobacteria cell concentration:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha C - \upsilon P \tag{16}$$

where α is the toxin production rate (mol·$cell^{-1}$·d^{-1}).

For the microalgae *D. salina*, we follow Droop's theory and we assume that growth depends on internal nitrogen quota and on light intensity (Bernard, 2011). We also consider that cell mortality is induced by the compound *P* produced by *C. watsonii*. Finally, the resulting dynamic is:

$$\frac{dD}{dt} = \overline{\mu_d}\left(1 - \frac{Q_0}{Q}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}D - R_d D - m\frac{P}{P+K_P}D - \upsilon D \tag{17}$$

where $\overline{\mu_d}$ is the growth rate at infinite nitrogen quota (d^{-1}), Q is the intracellular nitrogen quota and Q_0 is the minimum intracellular nitrogen quota (mol N·$cell^{-1}$), R_d is the respiration rate (d^{-1}), $K_{I,d}$ is the half-saturation constant for light (µmol photons·m^{-2}·s^{-1}), m is the maximum mortality rate (d^{-1}), and K_P is the half-saturation constant for *C. watsonii* potential toxins (mol P·L^{-1}).

The nitrogen concentration (mol N·L^{-1}), denoted S, results from the balance between nitrogen supply at concentration S_{in} and uptake by *D. salina* (*C. watsonii* does not consume any nitrate). We use the expression proposed by (Bougaran et al., 2010) to account for the downregulation of nitrogen uptake for high nitrogen quota. Finally, Equation (18) represents the inorganic nitrogen dynamics:

$$\frac{dS}{dt} = -\rho_m \frac{S}{S+K_s}\left(\frac{Q_L - Q}{Q_L - Q_0}\right)D + \upsilon S_{in} - \upsilon S \tag{18}$$

Where ρ_m is *D. salina* maximum rate of nitrogen acquisition (mol N·$cell^{-1}$·d^{-1}), K_s is the half-saturation constant for nitrogen (mol·L^{-1}), and Q_L is the intracellular nitrogen quota for which nitrogen uptake stops (mol N·$cell^{-1}$).

The dynamics of the nitrogen quota for *D. salina* result from nitrogen uptake and dilution by cell growth. The quota dynamics are therefore determined as follows:

$$\frac{dQ}{dt} = \rho_m \frac{S}{S+K_s}\left(\frac{Q_L-Q}{Q_L-Q_0}\right) + \overline{\mu_d}\left(1-\frac{Q_0}{Q}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}Q \tag{19}$$

3.3 Model calibration

3.3.1 *C. watsonii*

The net growth rate μ_{net} and half-saturation constant for light for *C. watsonii* were reported from (Goebel et al., 2008). The maximum growth rate and respiration rate were calculated from preliminary *C. watsonii* mono-culture experiments under various lights as follows:

$$\begin{cases} \overline{\mu_C} = \mu_{net} + R_c \\ R_c = \overline{\mu_C}\frac{I_{x,c}}{I_{x,c}+K_{I,c}} - \mu_{x,c} \end{cases} \tag{20}$$

where $\mu_{x,c}$ is the experimental growth rate (d^{-1}), and $I_{x,c}$ is the average experimental light intensity measured during the exponential growth phase (µmol photons·m^{-2}·s^{-1}).

3.3.2 *D. salina*

The respiration rate and half-saturation coefficient for nitrogen were reported from (Fachet et al., 2014) whereas the nitrogen acquisition rate was reported from (Bonnefond et al., 2016). The growth rate at infinite nitrogen quota and half-saturation constant for light of *D. salina* were determined from preliminary mono-culture experiments of *D. salina* where the growth rate was measured for various light intensities, as described in Section 2.2. The two parameters were thus computed to fit these experimental data, by considering the linear regression between $1/(\mu_{x,d} + R_d)$ and $1/\bar{I}$ to calculate *D. salina* maximum growth rate and half-saturation constant for light as follows:

$$\frac{1}{\mu_{x,d}+R_d} = \frac{K_{I,d}}{\overline{\mu_d}}\frac{Q_{max}}{Q_{max}-Q_{min}}\frac{1}{I_{x,d}} - \frac{1}{\overline{\mu_d}}\frac{Q_{max}}{Q_{max}-Q_{min}} \tag{21}$$

where $\mu_{x,d}$ is the experimental growth rate (d^{-1}), $I_{x,d}$ is the average experimental light intensity measured during the exponential growth phase (µmol photons·m^{-2}·s^{-1}), and Q_{max} and Q_{min} are respectively the maximum and minimum nitrogen cellular quota (mol N·$cell^{-1}$). The calculated

$\overline{\mu_d}$ was doubled in order to fit the day/night cycle and reach the appropriate average growth rate in 24h.

3.3.3 Other parameters estimations

The light extinction coefficients were estimated from preliminary *D. salina* and *C. watsonii* mono-cultures experiments to make the model fit the data. The minimal and maximal nitrogen intracellular quota were obtained from simulations of preliminary experiments. However, the toxin production rate by *C. watsonii*, the half-saturation constant for toxin and mortality rate for *D. salina* were estimated from the co-cultures experimental data since nothing is known about the toxin productivity and impact.

Table 5: Parameters list (obtained from (a): preliminary experiments; (b): bibliography; (c): fitting)

Symbol	Parameter	Value	Source
$\overline{\mu_c}$	Growth rate	0.58 d^{-1}	(a, b)
$K_{I,c}$	Half-saturation constant for I	57 µmol photons·m^{-2}·s^{-1}	(b)
R_c	Respiration rate	$9 \cdot 10^{-2}$ d^{-1}	(a, b)
α	Toxin production rate	$1 \cdot 10^{-4}$ mol·$cell^{-1}$	(c)
$K_{ext,c}$	Light extinction coefficient	$1 \cdot 10^{-10}$ m^2·$cell^{-1}$	(a)
$\overline{\mu_d}$	Growth rate	4.99 d^{-1}	(a)
$K_{I,d}$	Half-saturation constant for I	154 µmol photons. m^{-2} .s^{-1}	(a)
R_d	Respiration rate	0.16 mol·d^{-1}	(b)
$K_{ext,d}$	Light extinction coefficient	$2.3 \cdot 10^{-9}$ m^2·$cell^{-1}$	(a)
K_P	Half-saturation constant for toxins	$5 \cdot 10^{-2}$ mol P·m^{-3}	(c)
m	Mortality rate	$3.4 \cdot 10^{-2}$ d^{-1}	(c)
ρ_m	Nitrogen acquisition rate	$9.8 \cdot 10^{-7}$ mol N·$cell^{-1}$·d^{-1}	(b)
K_S	Half-saturation constant for N	$1.1 \cdot 10^{-2}$ mol N·m^{-3}	(b)
Q_{max}	Maximum N cellular quota	$1.3 \cdot 10^{-6}$ mol N·$cell^{-1}$	(a)
Q_{min}	Minimum N cellular quota	$5.4 \cdot 10^{-7}$ mol N·$cell^{-1}$	(a)

4 Simulation of the interactions between *D. salina* and *C. watsonii*

The model was validated with data not used for calibration and accurately represents both cellular growth and nitrogen consumption for the two microorganisms in mono-cultures.

D. salina exponential growth phase slows down when nitrate is consumed and eventually stops (Figures 29, 31). NO_3^- is therefore limiting growth.

The dynamics are very different for the diazotrophic cyanobacterium *C. watsonii* which only uses atmospheric N_2 as nitrogen source (Dron et al., 2012). *C. watsonii* growth never stops, but is progressively reduced by the lower light, while nitrate is never consumed (Figures 30, 31).

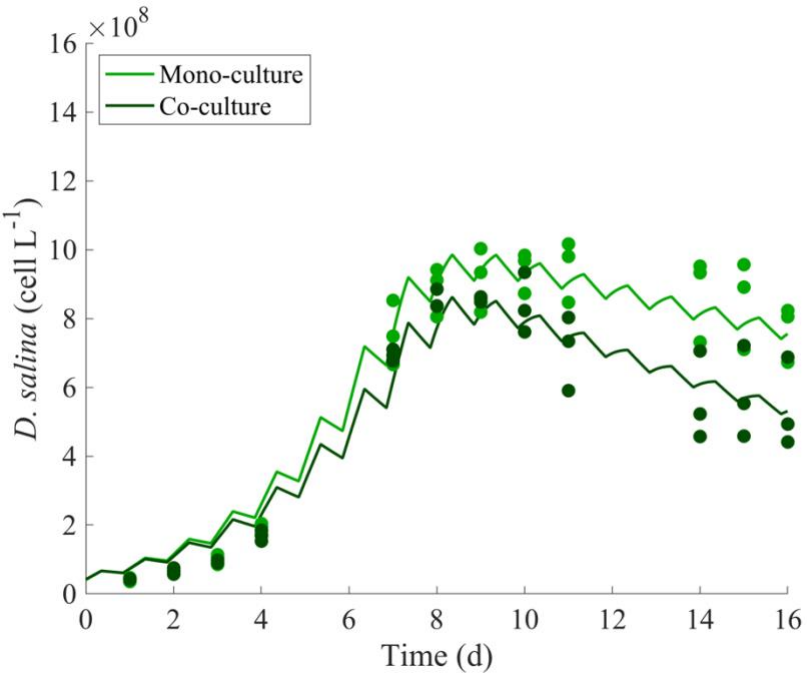

Figure 29: *D. salina* in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data).

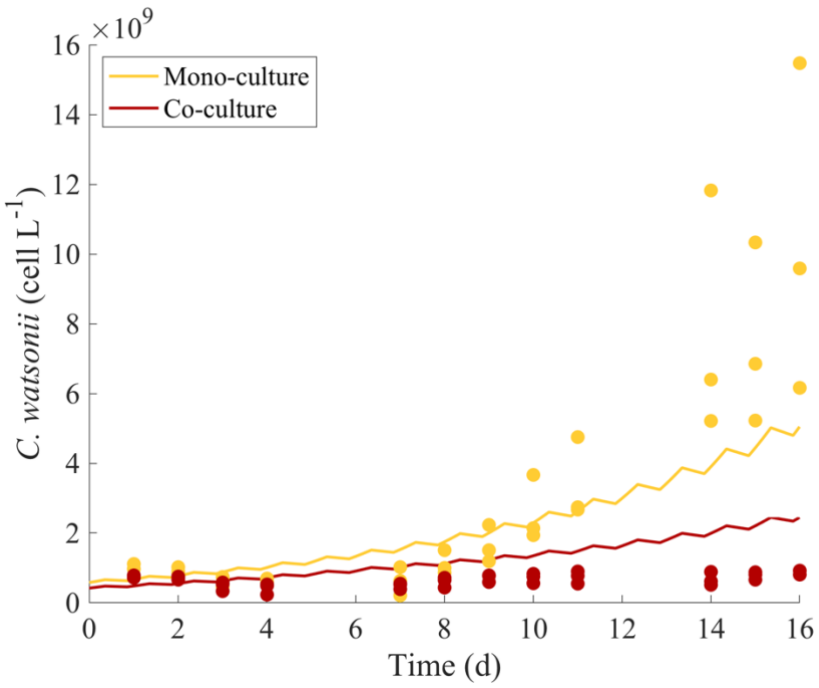

Figure 30: *C. watsonii* in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data).

An amount of 105 ±32 µmol·L^{1} of Dissolved Organic Nitrogen (DON) is measured into *C. watsonii* mono-cultures, as a by-product of diazotrophic fixation whereas 6.4 ±28 µmol·L^{1} DON are measured in the co-cultures. *D. salina* maximal cell concentration is not higher when co-cultivated and is eventually limited by NO_3^- as in the mono-cultures (Figures 29, 31). *D. salina* therefore do not consume the DON produced by *C. watsonii* in the co-cultures. The lower DON might result from the lower biomass (and diazotrophic activity) when *C. watsonii* is co-cultivated. This result is consistent with the pattern of the hypothesized compound *P*, which is 2.7 times lower in co-culture than in mono-culture. However, the difference between the model and the cultures could be explained by a DON consumption by bacteria since the cultures were not axenic.

C. watsonii growth is significantly reduced in the co-cultures whereas *D. salina* exponential growth phase is only marginally affected as shown in Figures 29 and 30. The microalgae and the cyanobacteria are not in competition for nutrients, and it results that *C. watsonii* still grows in co-cultures, at a reduced rate, at the end of the experiment (Figure 30).

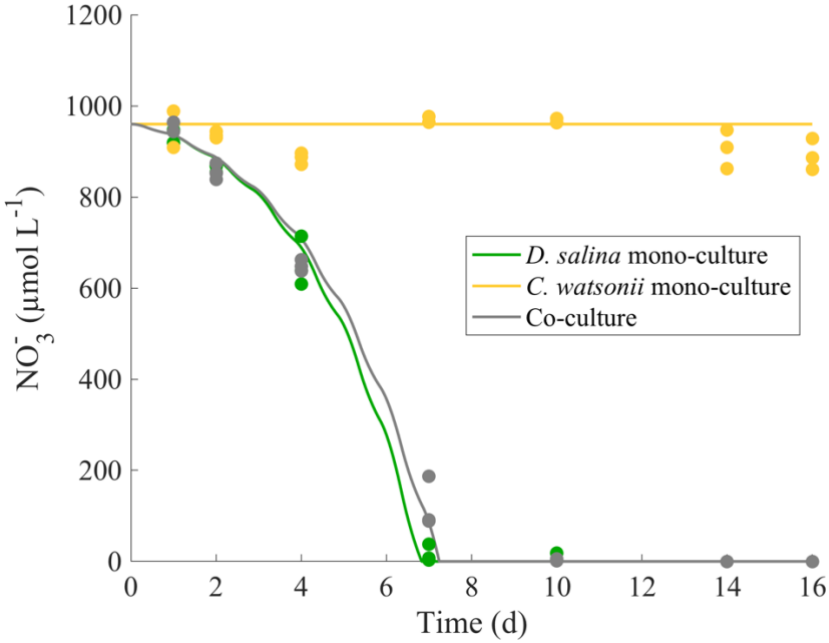

Figure 31: Nitrates in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data).

Light attenuation is mostly due to *D. salina* biomass accumulation (Figures 29, 31). This light attenuation rapidly shadows *C. watsonii* which requires light in order to support both growth during the day and nitrogen fixation activity during the night. There is therefore a competition for light between the microalgae and the cyanobacteria (Huisman et al., 1999) which favors *D. salina* (Figure 32). This light competition is correctly represented by the model which also accurately simulates the day/night cycle of 12h:12h, as shown in Figure 32.

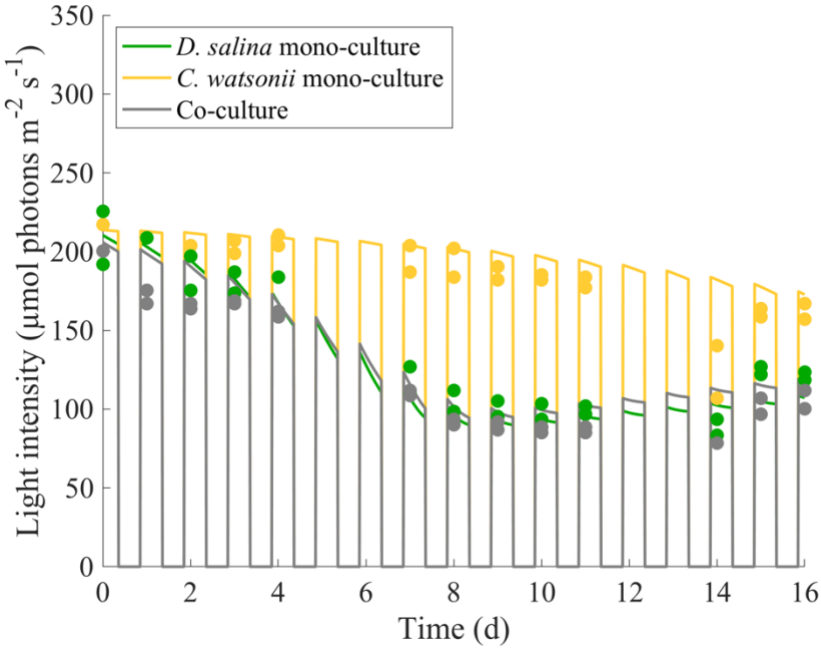

Figure 32: Light in mono-cultures and co-cultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data).

Moreover, the model represents the increase of *D. salina*'s mortality when co-cultivated with *C. watsonii* (Figure 29). Some cyanobacteria are known to produce cyanotoxins (Dunker et al., 2017; Zanchett and Oliveira-Filho, 2013) but nothing is known about a potential production of toxins by *C. watsonii*. The model thus supports the hypothesis that such toxin induces mortality. This allelopathic effect of *C. watsonii* on *D. salina* is well simulated by the model (Figure 29).

5 Simulating nitrogen recycling

5.1 Model adaptation

In this last section, we assume that a fraction of the diazotroph-derived compound *P* can be recycled by heterotrophic bacteria and eventually produce a source of nitrogen which can be uptaken by *D. salina*. The model was therefore modified to account for this potential (and desirable) recycling.

Equation (16) was modified to account for the consumption by bacteria. For sake of simplicity, bacteria were assumed to be at a high enough density, so that recycling rate is simply proportional to the concentration of P:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha C - \upsilon P - \gamma P \tag{22}$$

where γ is the diazotroph-derived product uptake rate (d^{-1}).

Only a fraction β of the consumed P by bacteria is assumed to be remineralized and available for *D. salina*. The dynamics of nitrogen substrate must then be modified accordingly, by integrating this new source of nitrogen as follows:

$$\frac{dS}{dt} = -\rho_m \frac{S}{S+K_s}\left(\frac{Q_L-Q}{Q_L-Q_0}\right) D + \upsilon S_{in} - \upsilon D + \beta\gamma P \tag{23}$$

5.2 Biomass productivity of the coupled ecosystem

The performance of this microalgae-cyanobacteria-bacteria ecosystem was simulated for various dilution rates and influent nitrate S_{in}. The objective was to determine the operational conditions which enhance the production of *D. salina*, in comparison to the mono-culture which does not benefit from diazotrophy.

The biomass nitrogen productivity δ was determined as the product of the dilution rate and *D. salina* cellular concentration per unit of nitrogen:

$$\delta = \frac{\nu D}{S_{in}} \tag{24}$$

A biomass nitrogen productivity ratio Δ was therefore calculated to determine the best case conditions for enhancing biomass nitrogen productivity from mono-culture to co-culture as shown in Figure 33: *D. salina* biomass nitrogen productivity ratios depending on the dilution rate and influent nitrate $S_{in.}$:

$$\Delta = \frac{\delta_{coculture}}{\delta_{monoculture}} \tag{25}$$

The nitrogen use efficiency η was determined as follows:

$$\eta = \frac{QD}{S_{in}} \tag{26}$$

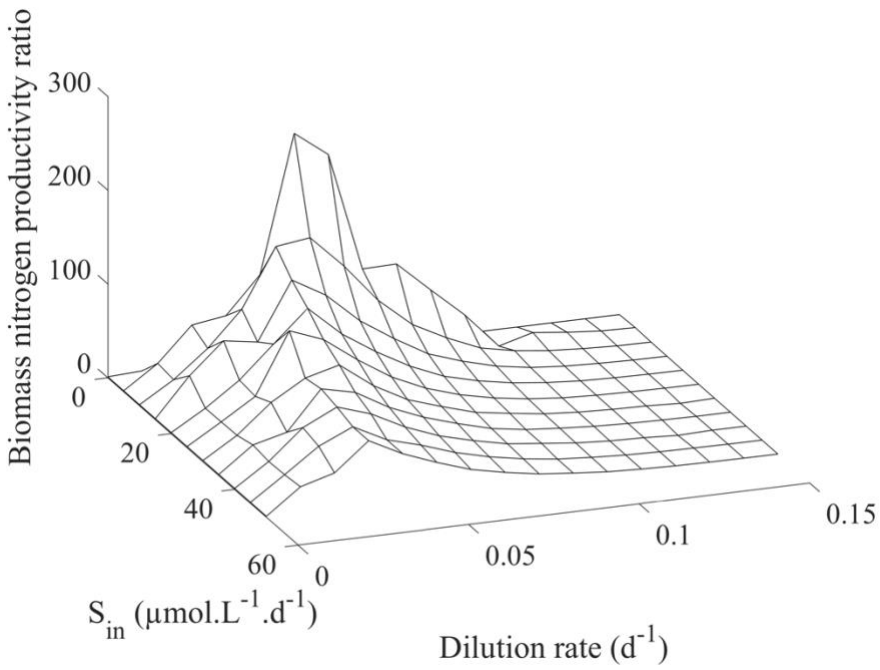

Figure 33: *D. salina* biomass nitrogen productivity ratios depending on the dilution rate and influent nitrate S_{in}.

In the simulated cases, biomass nitrogen productivity is better enhanced when dilution rate is 0.05 d^{-1} and influent nitrate is 5 $\mu mol \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (Figure 33: *D. salina* biomass nitrogen productivity ratios depending on the dilution rate and influent nitrate S_{in}.). As a result, biomass nitrogen productivity and nitrogen use efficiency are 253 and 357 higher, respectively. Cell growths over time were therefore simulated in this case as shown in Figure 34. Nitrate addition to the co-culture promotes *D. salina* growth. But then, the shading of *D. salina* strongly penalizes *C. watsonii*, which tends to disappear (Figure 34). Finally, efficient nitrogen recycling rates are only obtained for very low biomass productivities.

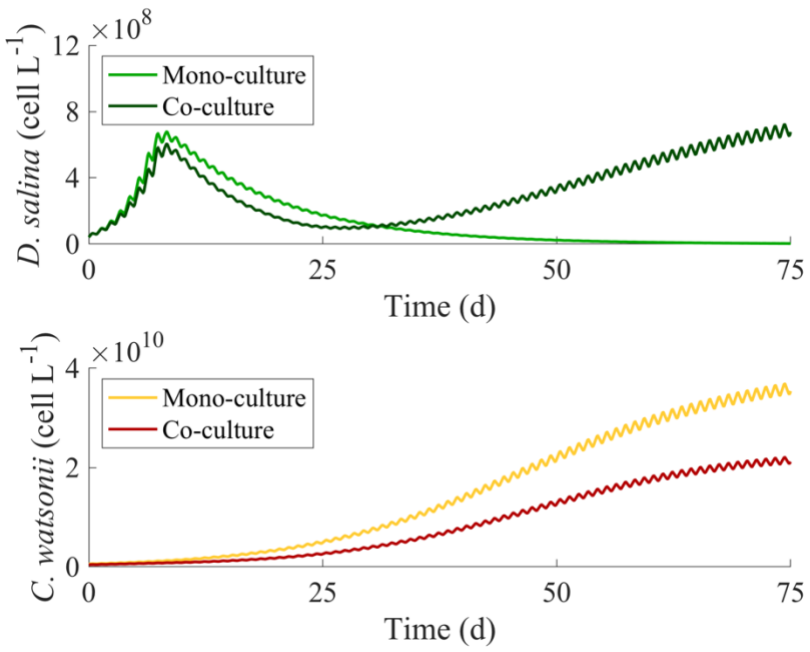

Figure 34: *D. salina* and *C. watsonii* in mono-cultures and co-cultures for the best biomass nitrogen productivity scenario.

6 Conclusions

This study shows that it is possible to enhance *D. salina*'s productivity when co-cultivated with *C. watsonii*. This strategy can work when some bacterial communities efficiently recycle nitrogen derived from diazotrophic activity. However, the shading of *D. salina* jeopardizes *C. watsonii* growth and eventually cancels the benefit of the co-culture. To bypass this negative interaction, the two species should be cultivated in membrane-separated reactors to avoid light competition but to allow molecular exchanges. In this case, both species will no more compete for light. More works remain to be done to explore this possibility.

7 Acknowledgements

The authors would like to thank Sophie Marro, Sophie Rabouille, Amélie Talec and Meng Zhang for their help and comments. This work was supported by the ANR Phycover (ANR-14-CE04-0011) and the Inria Project Lab Algae in silico. M. Caia benefited from an INRA funding.

Chapitre 5 : Co-culture de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii* sans compétition pour la lumière

Dans le Chapitre 3, la compétition pour la lumière entre *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii* a été mise en évidence. En plus de cette interaction très marquée, un effet allélopathique de la cyanobactérie sur la microalgue était suspecté. Pour s'affranchir de cette interaction majeure et favoriser les interactions positives au sein de l'écosystème, des co-cultures ont été réalisées dans des systèmes de culture avec séparation membranaire développés au LOV par Ternon et al. (2018). Ce dispositif a permis de mettre en avant de nouvelles interactions autour du carbone inorganique et de l'oxygène.

1 Introduction

D'après la revue de la littérature présentée dans le Chapitre 1, co-cultiver des microalgues d'intérêt économique avec des cyanobactéries permettrait de réduire l'apport en fertilisants azotés et donc les coûts économiques et environnementaux des cultures (Do Nascimento et al., 2015; Skowrońska and Filipek, 2014). Cependant, les interactions au sein de cocultures sont complexes et variées (Fouilland, 2012) comme le montrent les résultats obtenus dans le Chapitre 3. La compétition pour la lumière est l'interaction impactant le plus la co-culture de *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii.* Elle limite en effet la croissance de *C. watsonii* et ne permet donc pas la production d'azote dérivé de la diazotrophie par *C. watsonii.* Au final, la biomasse n'est pas augmentée par rapport à une mono-culture classique. D'autres mécanismes, de nature allélopathique, semblent par ailleurs également entrer en jeu.

Des co-cultures avec séparation membranaire ont donc été utilisées pour tester l'impact de contact cellulaire au sein de co-culture notamment dans le cas d'effet allélopathique induit par des toxines (Dunker et al., 2017; Paul et al., 2013). Co-cultiver *C. watsonii* et *D. salina* avec séparation membranaire permettrait en effet de favoriser la diffusion et l'échange de molécules azotées issues de la diazotrophie tout en s'affranchissant de la compétition pour la lumière observée dans le Chapitre 3. Cette co-culture spatialement séparée permettrait également de

mettre en évidence si l'effet allélopathique suspecté dans le Chapitre 3 est induit par contact cellulaire. De plus, une interaction pour le CO_2 et l'O_2 est suspectée à cause des besoins et physiologies différents de *D. salina* et de *C. watsonii*.

Cette expérience permet donc d'affiner la caractérisation des interactions entre *D. salina* et *C. watsonii* tout en stimulant les interactions positives pour favoriser la production de biomasse de la microalgue grâce à la cyanobactérie diazotrophe.

Dans un premier temps, le dispositif et les mesures expérimentales sont brièvement présentés. Les réponses de *D. salina* et de *C. watsonii* sont caractérisées en mono-cultures, co-cultures et co-cultures avec séparation membranaire. Les résultats sont également discutés et mis en parallèle avec les mesures environnementales effectuées pour mieux définir les différentes interactions au sein du consortium dans ce système de culture.

2 Matériels et méthodes

2.1 Dispositif expérimental

Les neuf systèmes de co-culture (soit 18 compartiments) ont été mis au point au LOV par Ternon et al. (2018). Pour plus de détails, voir le Chapitre Matériel et méthodes.

Une membrane imperméable en polytétrafluoroéthylène (PTFE, Teflon) sépare les compartiments de cinq des systèmes et empêche ainsi tout échange. Ces 10 compartiments constituent les quatre co-cultures et les triplicats des mono-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Une membrane hydrophile poreuse en polyfluorure de vinylidène (PVDF) permet les échanges moléculaires pour quatre autres systèmes (Figure 35). Le système séparé par une membrane poreuse est une co-culture par séparation membranaire appelée « co-culture PVDF » par la suite. Les neuf systèmes de co-culture ont été au préalable rincés et stérilisés par autoclavage pendant 30 min à 121°C. 800 mL de milieu F/2 (Guillard, 1975) ont été ajoutés dans chaque réacteur des cinq systèmes de co-culture. 800 mL de milieu F/2 (Guillard, 1975) avec une concentration deux fois moins importante de nitrates ont été ajoutés dans chaque réacteur des quatre systèmes de co-culture PVDF. En effet, les nitrates présents du côté de *C. watsonii*, qu'elle n'assimilera donc pas, diffusent à travers la membrane poreuse PVDF et sont

donc biodisponibles par *D. salina*. La même quantité totale de nitrates peut être alors assimilée par *D. salina* dans chacune des conditions de culture.

La souche de *C. watsonii* a été inoculée dans 11 des compartiments (d'un côté des trois systèmes de mono-cultures, de chaque côté des deux systèmes de co-cultures et d'un côté des quatre systèmes de co-cultures PVDF) pendant 4 jours pour lui laisser le temps d'atteindre une concentration cellulaire de 2.10^6 cell.mL^{-1}. La souche de *D. salina* a ensuite été inoculée à une concentration de 4.10^4 cell.mL^{-1} dans 11 des compartiments (de l'autre côté des trois systèmes de mono-cultures, de chaque côté des deux systèmes de co-cultures et de l'autre côté des quatre systèmes de co-cultures PVDF). Au final, des triplicats de mono-cultures de *C. watsonii* et de *D. salina* sont mis en culture et quatre réplicats de co-cultures avec et sans séparation membranaire poreuse (Figure 35). Le jour 1 correspond au jour de l'inoculation de *D. salina* marquant le premier jour de l'expérience.

Les cultures ont été éclairées à une intensité lumineuse de 320 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} avec un cycle jour/nuit de 12h :12h à une température de 27°C. Les cultures étaient homogénéisées par un agitateur magnétique à une vitesse de 200 rpm et bullées avec de l'air filtré sur 0,2 µm.

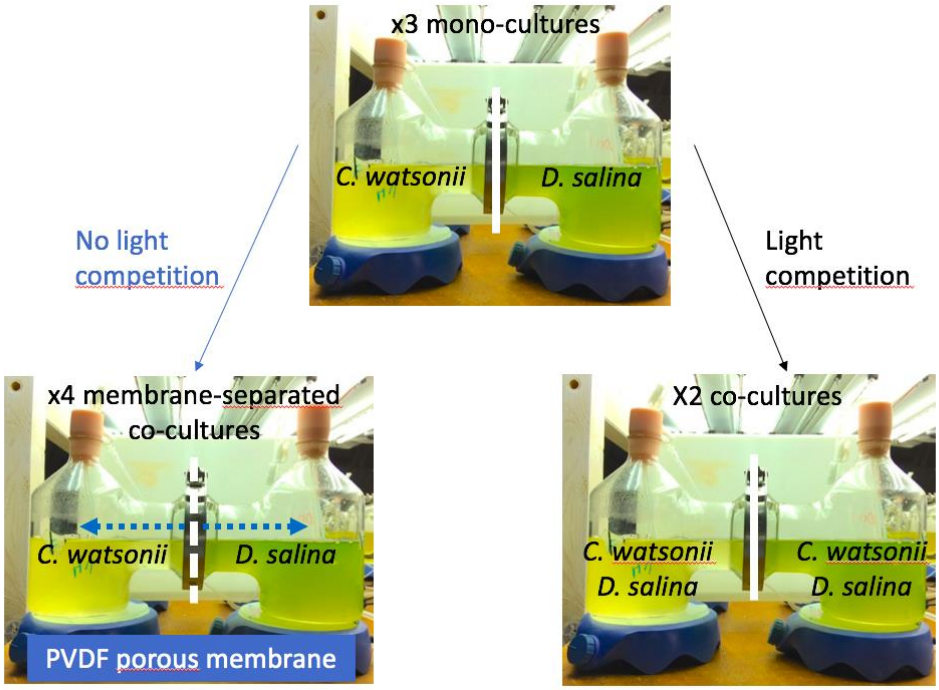

Figure 35 : Schéma du dispositif expérimental des différentes mono-cultures et co-cultures de *C. watsonii* et de *D. salina* étudiées au cours de cette expérience.

2.2 Mesures expérimentales et analyses

Les méthodes sont détaillées dans le Chapitre Matériel et méthodes, et rapidement résumées ici.

Les comptages cellulaires ont été réalisés au Coulter Counter tous les matins à 9h. Pour *D. salina*, les taux de croissance ont été calculés du jour 3 au jour 7 dans chacune des trois conditions de culture. Les taux de croissance de *C. watsonii* ont été calculés du jour 2 à 8 dans les mono-cultures et les co-cultures PVDF et du jour 2 à 5 dans les co-cultures.

Les échantillons pour mesurer les nitrates et les nitrites ont été prélevés, filtrés et stockés tous les deux jours jusqu'à analyse au Technicon Autoanalyseur II. Les échantillons pour la mesure de l'azote organique dissous ont été prélevées et filtrés tous les deux jours puis stockés à -80°C jusqu'à analyse. L'oxydation chimique à haute température a ensuite été effectuée puis les échantillons digérés ont été analysés au Technicon Autoanalyseur II. 3 mL de culture sont prélevés tous les deux jours et immédiatement filtrés puis conservés dans une étuve à 75°C jusqu'à analyse à l'analyseur élémentaire CHN.

La viabilité cellulaire a été mesurée tous les deux jours puis tous les jours pendant respectivement la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance de *D. salina* et de *C. watsonii*. Suite aux études préalables décrites dans le Chapitre Matériel et méthodes, des marqueurs cellulaires ont été utilisés uniquement pour caractériser *D. salina*. L'érythrosine pénètre dans les cellules mortes dont la membrane est poreuse tandis que le di-acétate de fluorescéine (FDA) colore les cellules vivantes dont l'activité enzymatique est fonctionnelle.

Les bactéries hétérotrophes ont été prélevées tous les deux jours et immédiatement fixées puis conservées à -80°C jusqu'à analyse. Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux.

Les sondes à oxygène (Oxygen Dipping Probe, PreSens), préalablement calibrées et connectées, sont plongées dans les cultures et enregistrent les données toutes les 10 minutes.

Les sondes pH (Mettler Toledo), préalablement calibrées, mesurent le pH toutes les 15 minutes. Grâce au système des carbonates présentés dans le Chapitre Matériel et méthode général, la concentration en CO_2 est calculée à partir du pH mesuré à une température et une salinité données.

3 Résultats et discussion

3.1 Le contact cellulaire favorise les interactions négatives au sein du consortium

Comme observé dans le Chapitre 3, la croissance cellulaire de *Crocosphaera watsonii* est toujours exponentielle en mono-culture (Figures 36, 38) car les nutriments ne sont pas limitants et l'azote est fixé grâce à son activité diazotrophe (Dron et al., 2012). La croissance cellulaire de *C. watsonii* est légèrement impactée à partir du jour 9 en co-culture PVDF tandis que sa phase exponentielle de croissance cellulaire et sa biomasse maximale sont fortement limitées en co-culture dès le jour 6 (Figures 36, 38) dès lors que la croissance cellulaire de *D. salina* est limitée (Figure 37).

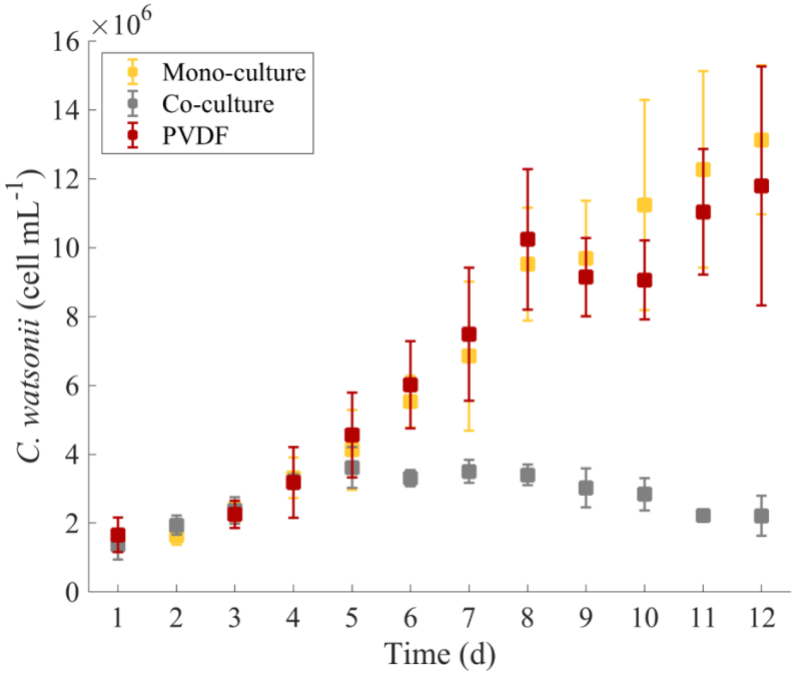

Figure 36 : Concentration cellulaire de *C. watsonii* au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-culture où n = 3).

Il a été montré dans le Chapitre 3 que la compétition pour la lumière était l'interaction la plus marquée en co-culture, mais d'autres effets semblent ici impacter les dynamiques de croissance de *C. watsonii*. Il apparaît en effet que *D. salina* a un effet négatif sur *C. watsonii* en co-culture dès lors que la microalgue atteint sa phase stationnaire de croissance cellulaire. Il est donc

probable que les exsudats de *D. salina* fortement relargués par lyse cellulaire (Figure 43 ; Hulatt and Thomas, 2010) ont un impact négatif sur la cyanobactérie mais ceux-ci ne traversent pas la membrane poreuse par diffusion. En effet, peu d'azote organique dissous, et donc d'exsudat, est détecté du côté de *C. watsonii* en co-culture PVDF (Figure 43).

Les dynamiques de croissance sont différentes pour *D. salina* et dépendent de la biodisponibilité en nitrates, comme montré dans le Chapitre 3. La croissance cellulaire de *D. salina* observée en mono-culture est semblable à celle observée en co-culture PVDF (Figures 37, 38). *D. salina* n'est pas impactée par la co-culture séparée par la membrane PVDF mais est limitée en co-culture (Figures 37, 38). En effet, le taux de croissance calculé du jour 3 à 7 et la biomasse maximale atteinte en co-culture sont statistiquement significativement réduits de 25% et 31%, respectivement. La compétition pour la lumière est l'interaction dominante mais celle-ci n'explique pas l'arrêt de croissance soudain de *D. salina* ainsi que la décroissance cellulaire observée en co-culture (Figure 37). Cet arrêt de croissance soudain n'est pas non plus dû à une limitation par les nitrates car la croissance cellulaire de *D. salina* stoppe avant la consommation totale de ces nutriments (Figures 37, 40).

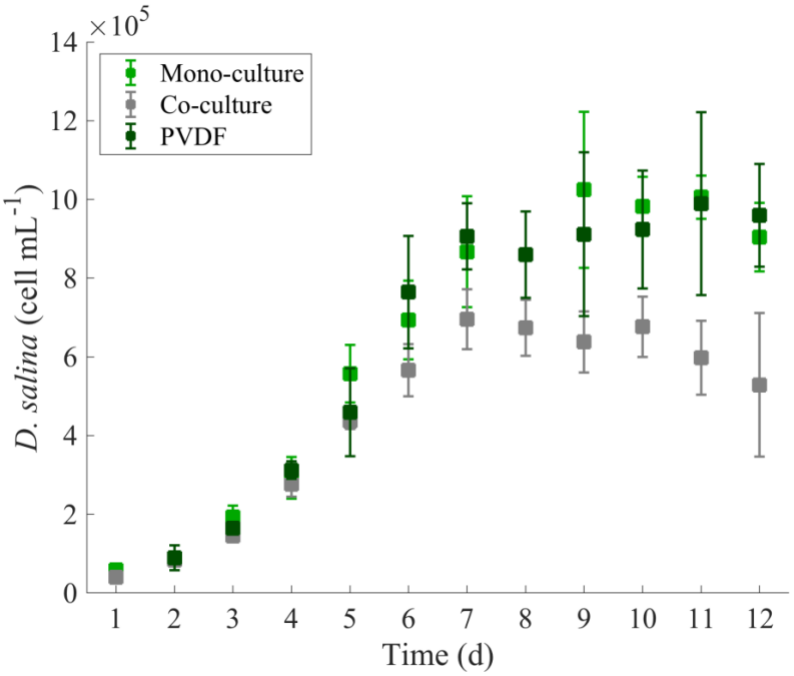

Figure 37 : Concentration cellulaire de *D. salina* au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-culture où n = 3).

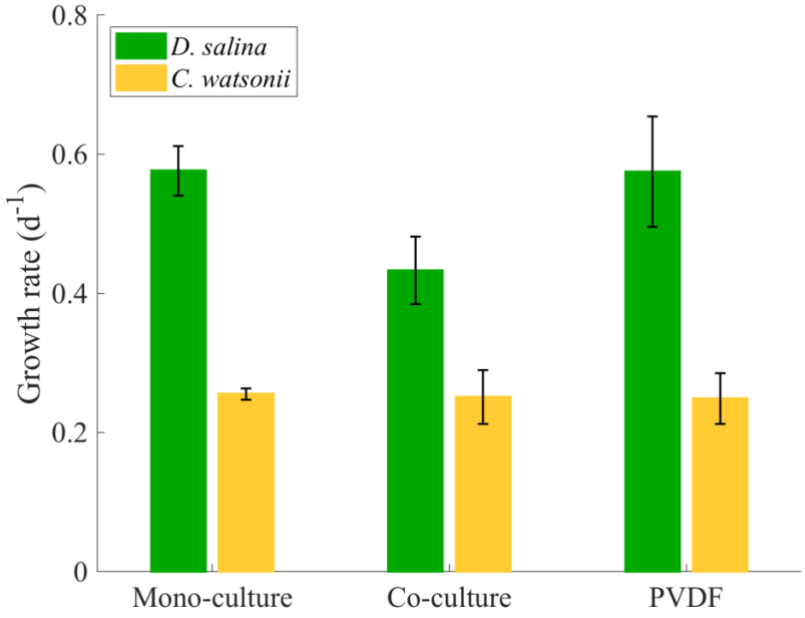

Figure 38 : Taux de croissance de *D. salina* et *C. watsonii*. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

Les dynamiques de croissance reflètent des effets inhibiteurs mutuels uniquement lorsque *D. salina* et *C. watsonii* sont co-cultivées dans le même réacteur. Ces interactions négatives n'apparaissent pas en co-culture PVDF. Elles sont probablement induites par le contact cellulaire entre deux microorganismes. Il est également possible que les molécules à l'origine de ces interactions ne traversent pas la membrane PVDF. Les interactions pourraient aussi être dues aux communautés bactériennes associées aux populations. En effet, les bactéries ne peuvent pas traverser la membrane poreuse PVDF et interagissent donc seulement dans le cas de co-culture. Cependant, les communautés bactériennes associées aux souches de *D. salina* et *C. watsonii* semblent n'avoir qu'un impact mineur sur les interactions au sein du consortium. Il semble effectivement que les consortia n'interagissent pas entre eux car leur croissance est indépendante des conditions de culture (Figure 39). Chaque consortium évolue en effet de la même manière en mono-culture et en co-culture PVDF. De plus, la somme des deux consortiums associés aux mono-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* est égale à la concentration totale en bactéries observées en co-culture (Figure 39). Il est donc très probable que ces bactéries hétérotrophes jouent un rôle mineur dans les interactions entre *D. salina* et *C. watsonii* car les dynamiques respectives des communautés bactériennes de chacune ne sont pas impactées par les conditions de culture.

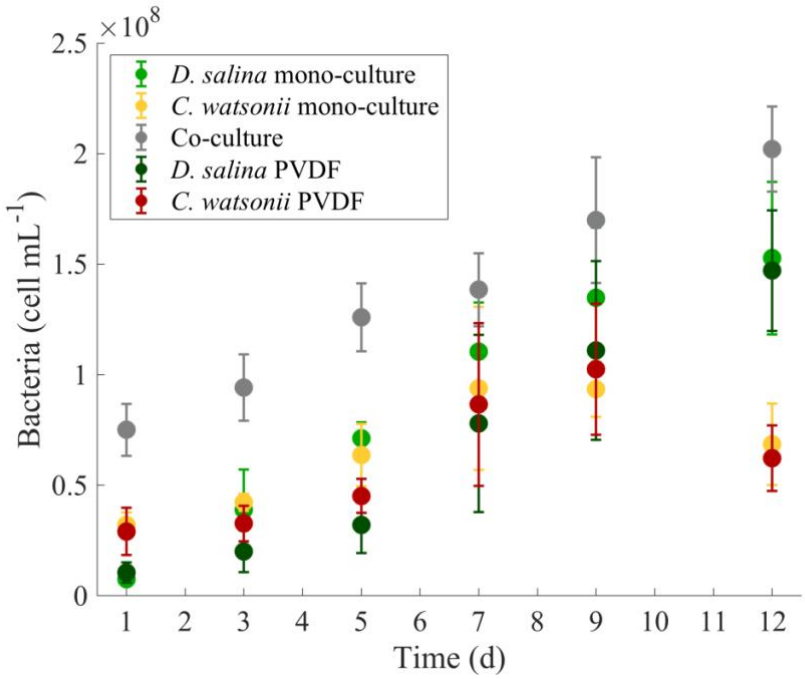

Figure 39 : Concentration cellulaire en bactéries hétérotrophes au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

3.2 L'assimilation d'azote organique dissous n'est pas favorisée par les co-cultures avec séparation membranaire poreuse

L'assimilation des nitrates par *C. watsonii* n'est pas détectable dans la mono-culture (Figure 40). Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus dans le Chapitre 3 où les mono-cultures et co-cultures étaient réalisées en erlenmeyers. Cette étude montre également que les bactéries associées à la culture de *C. watsonii ne* consomment pas de quantité significative de nitrates. En effet, la concentration en NO_3^- reste constante au cours du temps malgré la croissance bactérienne observée dans les mono-cultures de *C. watsonii* (Figures 39, 40).

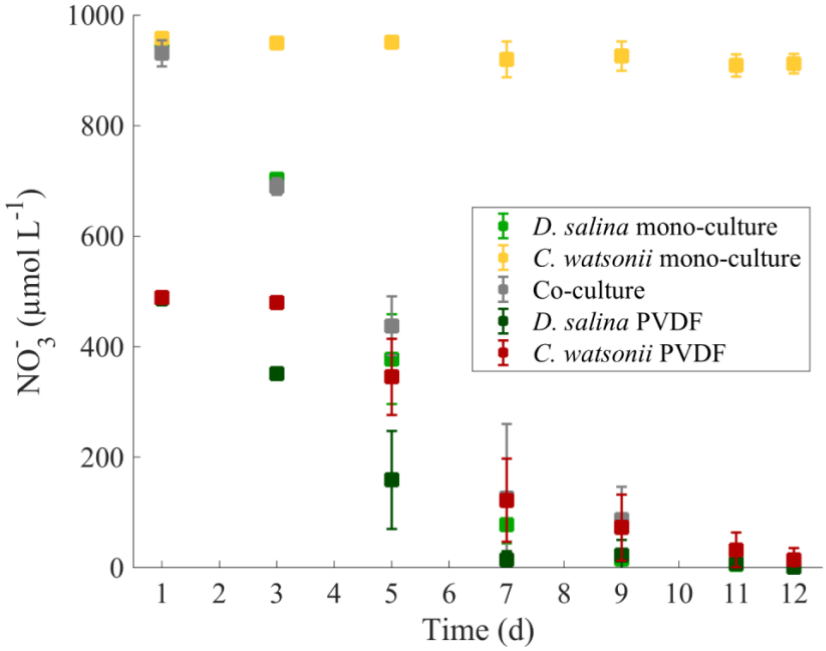

Figure 40 : Concentration en NO_3^- au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

La dynamique de croissance de *D. salina* s'avère dépendante de la biodisponibilité en NO_3^- (Figures 37, 40), comme montré dans le Chapitre 3. De plus, l'augmentation du quota C:N de *D. salina* confirme que la croissance de la microalgue est limitée par les nitrates (Figure 41). En co-culture cependant, l'arrêt de la croissance de *D. salina* intervient avant l'épuisement en nitrates (Figures 37, 40). Cela confirme que la croissance de *D. salina* est impactée par la présence de *C. watsonii*, vraisemblablement par un effet allélopathique comme observé dans le Chapitre 3. Dans les co-cultures PVDF, la compétition pour la lumière est supprimée et les deux microorganismes poussent de la même façon qu'en mono-culture (Figures 36, 37). Les nitrates présents du côté de *C. watsonii* diffusent vers le compartiment de *D. salina* à travers la membrane poreuse PVDF et favorisent l'augmentation de biomasse de la microalgue (Figures 37, 40). Cependant, *D. salina* est toujours limitée par l'azote dans cette configuration de co-culture sans compétition pour la lumière et il n'y a pas de gain de biomasse comparé à la mono-culture de *D. salina* (Figures 37, 40). Cela signifie que cette co-culture sans contact cellulaire ne conduit pas à l'absorption par la microalgue de l'azote dérivé de la diazotrophie produit par *C. watsonii*. Cet azote organique excrété par *C. watsonii* est pourtant assimilable pour le phytoplancton (Berthelot et al., 2015; Masuda et al., 2013).

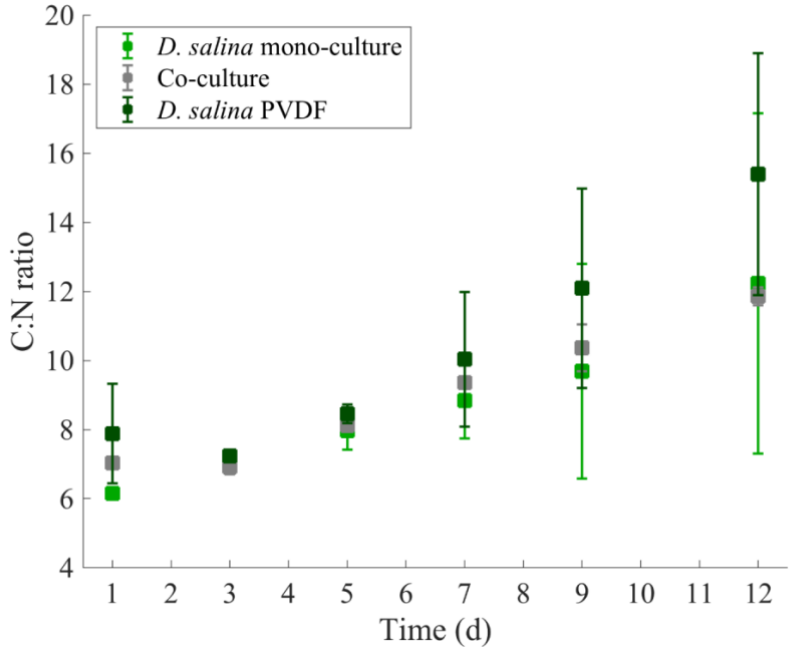

Figure 41 : Quota intracellulaire carbone:azote au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

Le quota intracellulaire carbone:azote (C:N) de *C. watsonii* est en effet constant au cours du temps, que ce soit en mono-culture ou en co-culture PVDF (Figure 42). Cette invariabilité du quota C:N est due au métabolisme cyclique de la cyanobactérie (Dron et al., 2012) qui réalise son activité diazotrophe la nuit et son activité photosynthétique le jour (Mohr et al., 2010). Le métabolisme de *C. watsonii* n'est donc pas impacté en co-culture PVDF, tout comme sa croissance cellulaire, ce qui montre qu'elle réalise alors son activité diazotrophe au même titre qu'en mono-culture (Figures 36, 42) dès lors qu'elle n'est pas limitée par la lumière (Agawin et al., 2007).

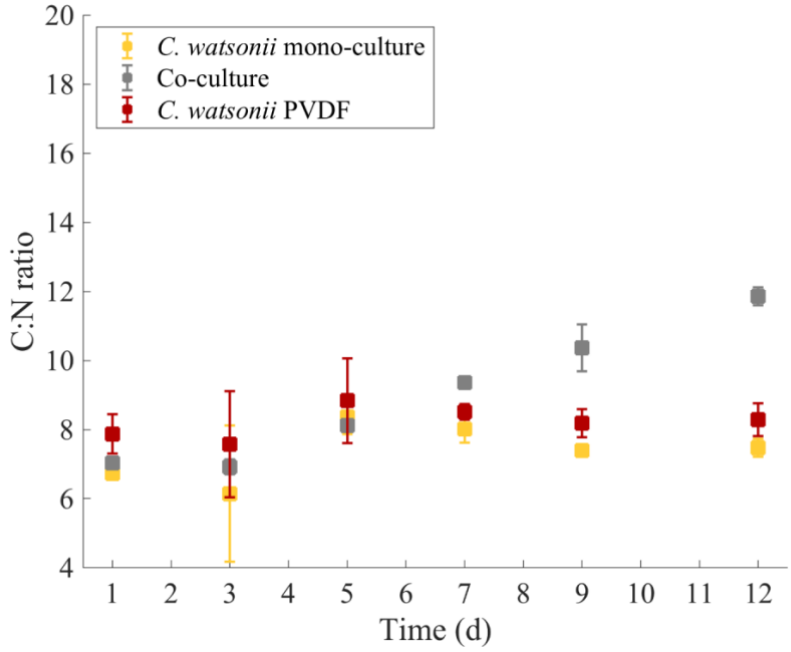

Figure 42 : Quota intracellulaire carbone:azote au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

La concentration en azote organique dissous (DON) est multipliée par 16 au cours du temps, tout comme la concentration cellulaire de *D. salina* en mono-culture et co-culture PVDF (Figures 37, 43). Cela confirme que *D. salina* excrète des substances polymériques extracellulaires (SPE ; Mishra et al., 2011) au cours de sa croissance cellulaire, comme supposé dans le Chapitre 3, en plus d'en libérer au cours de sa lyse cellulaire (Hulatt and Thomas, 2010).

Dans la mono-culture de *C. watsonii*, la concentration en DON est plus ou moins constante et égale à 136 ±63 µmol.L^{-1} alors que la concentration cellulaire est multipliée par neuf au cours du temps (Figure 36Figure 43). Cela peut signifier que la cyanobactérie régule l'excrétion de DON, et donc son activité diazotrophe, lorsqu'elle est très concentrée. En effet, l'échange direct de molécules par contact cellulaire est favorisé et la concentration libérée dans le milieu est réduite aux fortes concentrations cellulaires (Babica et al., 2007). Il n'est alors pas nécessaire d'augmenter une activité diazotrophe coûteuse en énergie pour structurer la communauté et favoriser les échanges de molécules chimiques (Dunker et al., 2017; Thompson and Zehr, 2013). Cette constance de la concentration en DON peut aussi s'expliquer par la présence des bactéries hétérotrophes associées à *C. watsonii*. Ces bactéries ont en effet besoin d'une source azotée pour se développer mais ne semblent pas consommer les nitrates présents (Figures 39, 40). Elles sont également connues pour facilement assimiler et reminéraliser le DON (Le

Chevanton et al., 2013). Le DON excrété par *C. watsonii* est alors une source d'azote biodisponible pour ses bactéries associées.

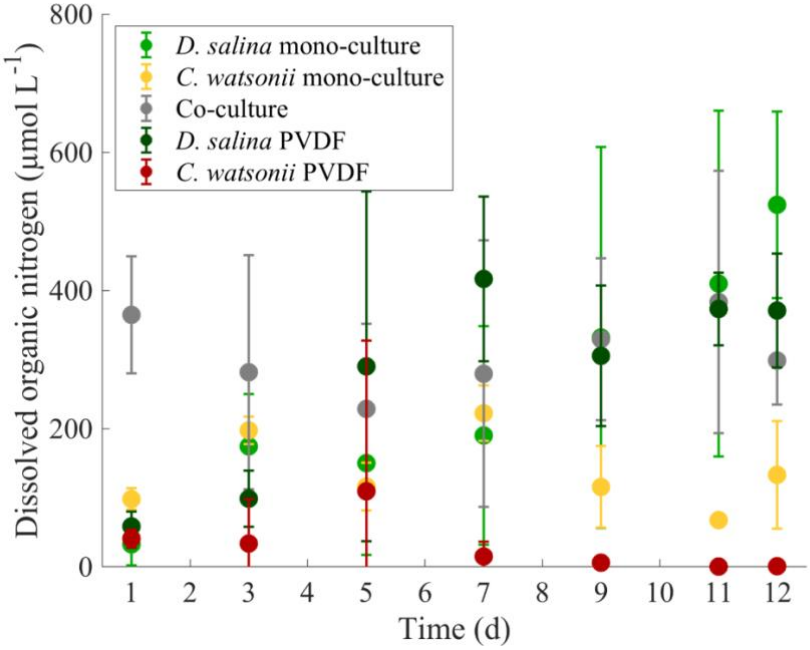

Figure 43 : Concentration en azote organique dissous au cours du temps. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

En co-culture PVDF, la concentration en azote organique dissous est négligeable dans la culture malgré la croissance cellulaire de *C. watsonii* similaire à celle en mono-culture (Figures 36, 43). Cela peut s'expliquer par le fait que le DON diffuse vers le compartiment de *D. salina* mais cela semble peu probable au vu de la concentration mesurée du côté de la microalgue (Figure 43). En effet, celle-ci est semblable à celle mesurée en mono-culture de *D. salina* et les croissances bactériennes ne sont pas supérieures en co-culture PVDF comparées aux mono-cultures (Figures 39, 43). Il n'y a donc pas eu de transfert vers *D. salina* ni d'assimilation par son consortium bactérien associé ou celui associé à *C. watsonii* en co-culture PVDF. La très faible teneur en DON dans le compartiment de *C. watsonii* peut être due à l'adsorption sur la membrane des molécules issues de son activité diazotrophe. Ne connaissant pas la nature de ces molécules produites, il est impossible de les isoler et de tester leur diffusion à travers cette membrane poreuse comme cela est effectué avec des toxines spécifiques dans le cas de co-culture avec séparation membranaire (Paul et al., 2013).

En co-culture, la concentration en DON diminue dès l'inoculation de *D. salina* jusqu'au jour 5 puis est similaire aux concentrations observées en mono-culture et co-culture PVDF de *D. salina*. Cette réaugmentation coïncide avec l'arrêt de la croissance de la cyanobactérie en co-culture (Figure 36). Cela peut signifier que l'activité diazotrophe de *C. watsonii* est limitée en co-culture dès l'ajout d'une microalgue compétitrice. Il est aussi possible que les deux consortiums bactériens assimilent le DON produit par la cyanobactérie, régulant alors sa concentration de manière plus importante qu'en mono-culture (Figure 43).

Dans toutes les conditions de culture, la concentration en ammonium est au-dessous du seuil de détection, ce qui prouve qu'il n'y a pas de production par *D. salina* et *C. watsonii* ou que l'assimilation par les différents microorganismes est trop rapide pour détecter des variations de concentration.

3.3 La co-culture induit une double interaction O_2/CO_2

3.3.1 Dynamiques autour de l'oxygène

La cyanobactérie unicellulaire *Crocosphaera watsonii* restreint son activité diazotrophe aux périodes de nuit car la nitrogénase est irréversiblement endommagée par de trop fortes quantités d'O_2 (Dron et al., 2012). Elle est ainsi capable de réguler l'O_2 de son environnement, pour pouvoir créer une anoxie intracellulaire requise pour l'activation de la nitrogénase et son activité diazotrophe (Compaoré et al., 2010).

La concentration en O_2 dans le milieu doit être suffisamment élevée pour permettre la respiration et ainsi fournir l'énergie nécessaire à la nitrogénase mais elle ne doit pas excéder une concentration critique pour ne pas l'inhiber. La respiration permet effectivement de diminuer le niveau d'O_2 intracellulaire tout en permettant la production d'adénosine triphosphate (ATP) qui sert alors de réducteur du N_2 (Flores et al., 2015). La dynamique de variation de la concentration en O_2 est cyclique pour la mono-culture de *C. watsonii* (Figures 44, 45). En effet, dès le début de la phase de nuit, le niveau d'O_2 baisse considérablement jusqu'à atteindre un niveau d'O_2 minimal moyen de 189 ±5 $\mu mol.L^{-1}$, inférieur à la concentration de 201 $\mu mol.L^{-1}$ à l'équilibre avec le bullage d'air. Ce minimum est atteint au milieu de la nuit lorsque l'activité de la nitrogénase est la plus forte (Dron et al., 2012; Mohr et al., 2010), ce qui indique une respiration intense (Figure 44). La tendance inverse est observée le jour, avec une brusque augmentation dès le début de l'éclairage et un maximum moyen de

223±3 µmol.L^{-1} au milieu du jour (Figure 44). Masuda et al. (2018) ont par ailleurs remarqué que l'activité photosynthétique de *C. watsonii* était la plus forte à ce moment du cycle jour/nuit, ce qui peut expliquer les pics d'O_2 observés chez la cyanobactérie dans notre étude. Cette tendance cyclique de la variation de l'O_2 (Figure 45) a déjà été observée chez les cyanobactéries diazotrophes *Cyanothece* sp. génétiquement proches de *C. watsonii* (Bandyopadhyay et al., 2013).

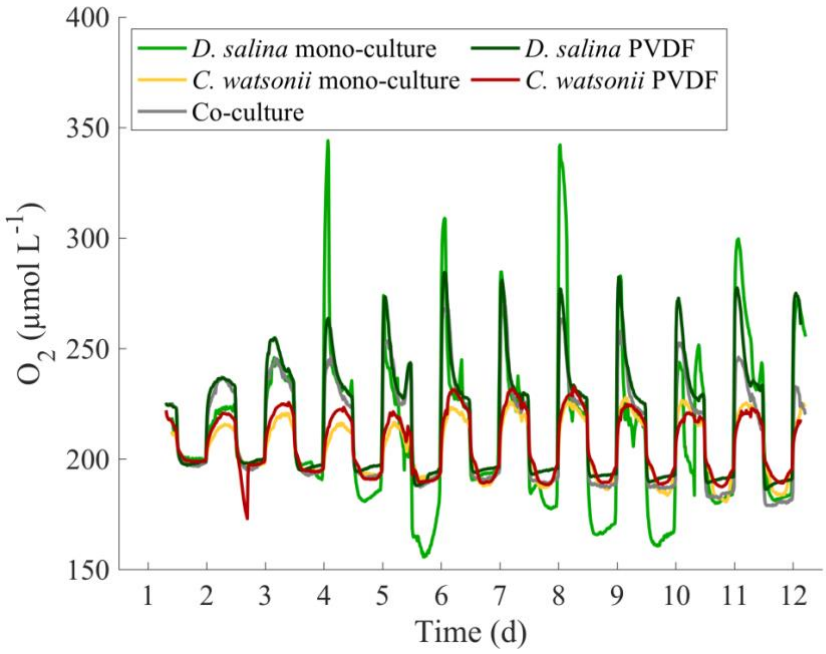

Figure 44 : Concentration en dioxygène au cours du temps (n = 2 sauf pour les mono-cultures où n = 1).

La dynamique est différente pour la mono-culture de *Dunaliella salina*. La concentration d'O_2 chute drastiquement dès le début de la phase de nuit pour atteindre un minimum moyen de 177 ±15 µmol.L^{-1} puis réaugmente doucement au cours de la nuit (Fig. 10 et 11), sûrement grâce au bullage. A l'inverse, la production d'O_2 est plus forte au début de la phase lumineuse (Figure 44), indiquant une activité photosynthétique accrue à ce moment-là avec une concentration maximale moyenne d'O_2 de 290 ±33 µmol.L^{-1}. Le niveau d'O_2 décroit ensuite de manière exponentielle au cours de la journée (Figure 44).

Les dynamiques d'O_2 sont propres à chaque espèce dans chacun des compartiments en co-culture PVDF (Figures 44, 45). Les membranes hydrophiles ne laissent pas passer les gaz, et

donc les bulles d'air, ce qui ne permet pas l'homogénéisation totale de la teneur en O_2 au sein de la co-culture avec séparation membranaire (Figure 44). Les concentrations d'O_2 ne sont pas significativement différentes en co-cultures PVDF et en mono-cultures de *C. watsonii* (Figure 44). Pour *D. salina*, les teneurs en O_2 ne sont pas non plus significativement différentes en co-cultures PVDF et en mono-cultures (Figure 44). Ces non-différences s'expliquent par le fait que l'O_2 dissous diffuse à travers la membrane mais que ce transfert s'avère largement minoritaire par rapport aux dynamiques propres aux deux microorganismes.

En co-culture cependant, la dynamique de variation de l'O_2 apparaît comme une moyenne entre la dynamique observée pour *C. watsonii* et celle pour *D. salina* (Figures 44, 45). La réduction de l'O_2 la nuit suit la tendance des mono-cultures de *C. watsonii* et semble donc induite par la cyanobactérie. La concentration d'O_2 minimale moyenne de 188 ±6 $\mu mol.L^{-1}$ est similaire aux valeurs obtenues pour les deux microorganismes. La potentielle compétition nocturne pour l'oxygène semble alors effacée par le bullage d'air et n'impacte pas la co-culture. Curieusement cependant, le niveau d'O_2 diurne suit la dynamique des mono-cultures de *D. salina* et n'est pas augmenté malgré la présence de *C. watsonii* (Figures 44, 45). La concentration d'O_2 maximale moyenne est d'ailleurs de 253 ±11 $\mu mol.L^{-1}$, ce qui correspond à la moyenne des valeurs maximales atteintes dans les mono-cultures de *C. watsonii* et de *D. salina*. Cette observation vient contredire l'hypothèse émise dans le Chapitre 3 qui supposait une production plus élevée d'O_2 en co-culture. La tendance observée indique au contraire que le niveau d'O_2 est réduit en co-culture ce qui signifie que *C. watsonii* semble réguler également la concentration d'O_2 de son environnement la journée. Le pic d'O_2 en début de phase lumineuse pourrait alors impacter négativement *C. watsonii* ce qui expliquerait en partie son déclin en co-culture (Figures 36, 44). En effet, pour réguler la production par *D. salina* la journée en co-culture, il est possible que *C. watsonii* augmente son activité respiratoire. *C. watsonii* utiliserait ainsi l'énergie produite par la photosynthèse plutôt pour augmenter sa respiration que pour assurer son activité cellulaire, entrainant alors son déclin (Figures 36, 44).

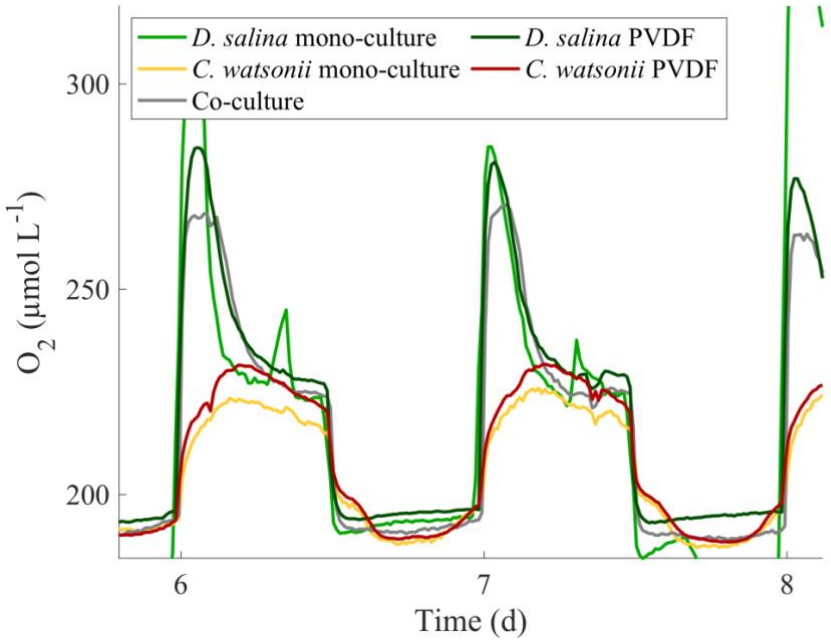

Figure 45 : Exemple de la dynamique cyclique en dioxygène au cours d'une journée (n = 2 sauf pour les mono-cultures où n = 1).

3.3.2 Dynamiques autour du CO_2

Les variations du pH sont également cycliques et fortement reliées au cycle jour/nuit (Figure 46). Elles témoignent de l'activité photosynthétique de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii*. Les dynamiques du CO_2 en mono-cultures de *C. watsonii* et *D. salina* sont ainsi cycliques (Figure 47) car ces deux microorganismes sont photosynthétiques le jour et respirent la nuit (Bonnefond et al., 2016; Masuda et al., 2018; Mohr et al., 2010).

De même que pour l'oxygène, les tendances observées en co-culture PVDF sont similaires aux mono-cultures. De même que pour l'O_2, les membranes hydrophiles ne permettent pas l'homogénéisation totale de la teneur en CO_2 au sein de la co-culture avec séparation membranaire (Figure 47). Les pH et concentrations de CO_2 ne sont en effet pas significativement différentes en co-cultures PVDF et en mono-cultures de *C. watsonii*. Il en est de même pour *D. salina* (Figures 46, 47). Ces non-différences s'expliquent par le fait que les échanges de CO_2 dissous à travers la membrane sont négligeables par rapport aux dynamiques de chaque microorganisme.

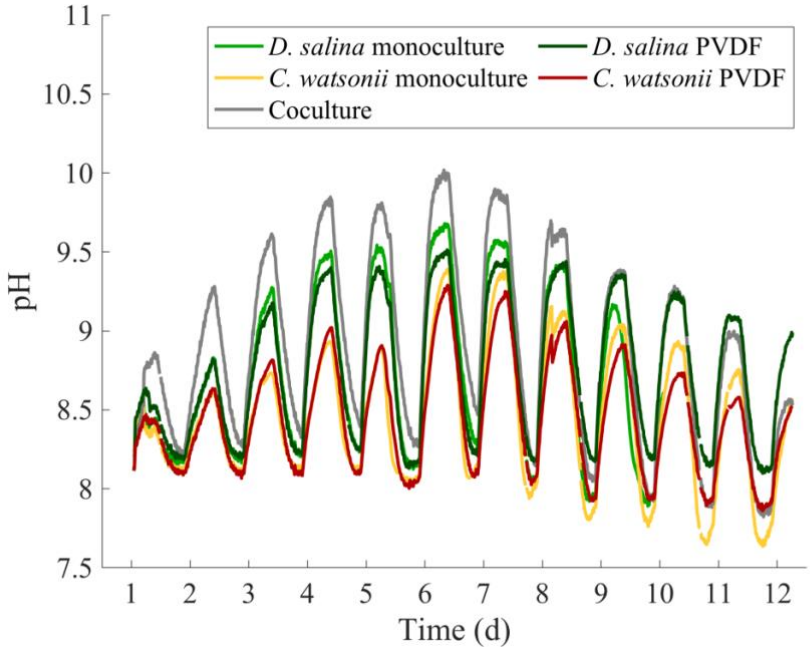

Figure 46 : Évolution du pH au cours du temps (n = 1 sauf pour la co-culture où n = 2).

En co-culture, le pH atteint cependant des niveaux élevés la journée (Figure 46), ce qui atteste d'une forte limitation par le CO_2 (Figure 47). *D. salina* et *C. watsonii* sont en effet en compétition pour cette ressource vitale à leur activité photosynthétique et donc à leur croissance cellulaire. Cette compétition pour le CO_2 en co-culture explique alors en partie l'impact négatif mutuel de *D. salina* et *C. watsonii* observé en co-culture mais pas en co-culture PVDF (Figures 36, 37) où chacune est bullée de manière indépendante et seul le milieu est partagé.

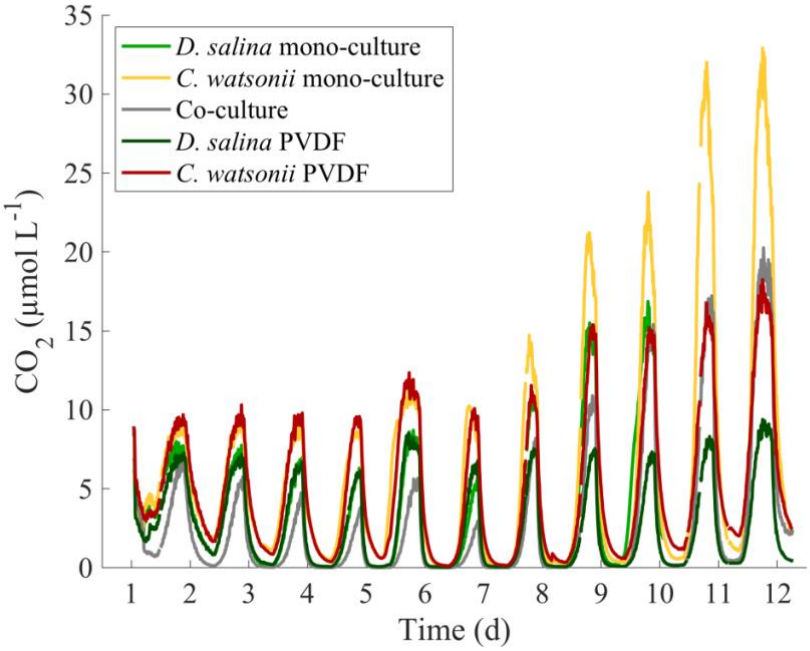

Figure 47 : Concentration en dioxyde de carbone au cours du temps (n = 1 sauf pour la co-culture où n = 2).

3.3.3 Une double interaction négative O_2/CO_2

La viabilité cellulaire de *C. watsonii* diminue au cours du temps en mono-culture et en co-culture PVDF (Figure 48). Cela signifie que les cellules ont tendance à mourir et que les cellules mortes, encore entières, s'accumulent dans les cultures. Cela est confirmé par le fait qu'aucune décroissance cellulaire n'est observée dans ces deux conditions (Figure 36). A contrario, on remarque que 94,7 ± 2,9% des cellules sont vivantes en co-culture. La décroissance cellulaire de *C. watsonii* (Figure 36) signifie que la présence de *D. salina* induit une mortalité et une dégénérescence cellulaire accrues. Peng et al. (2017) ont montré qu'un stress oxydatif couplé à une compétition pour le CO_2 a un effet délétère sur les microorganismes. Il est donc probable que la régulation du niveau d'O_2 la journée par *C. watsonii* en co-culture et la compétition pour le CO_2 ont alors un effet délétère sur *C. watsonii*.

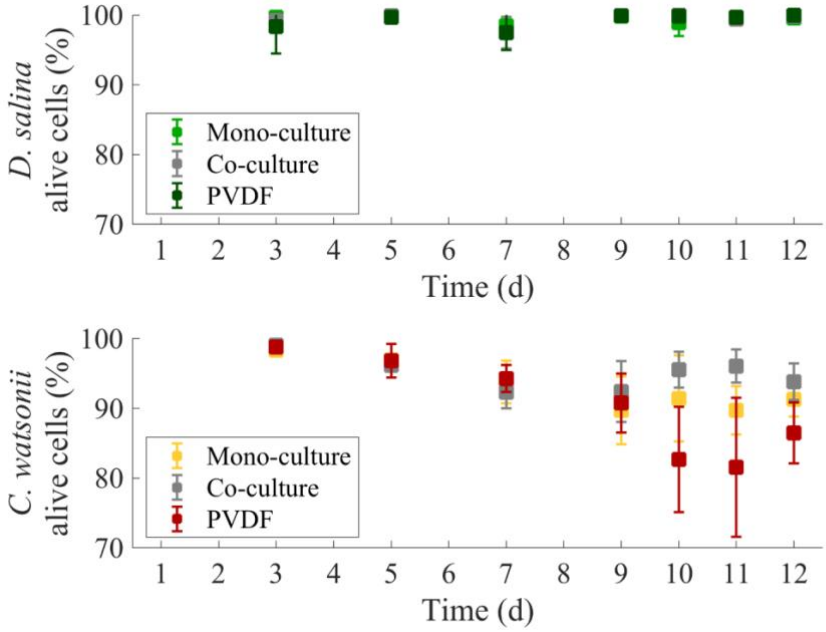

Figure 48 : Pourcentage de cellules vivantes de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les réplicats (n = 4 sauf en mono-cultures où n = 3).

Il semble par ailleurs peu probable qu'un stress oxydatif causé par une trop grande quantité d'O_2 impacte *D. salina*. Sa viabilité cellulaire est en effet constante au cours du temps (Figure 48) et de 99,4 ± 1,44% toutes conditions confondues. Cela signifie que les cellules intègres de *D. salina* dénombrées au Coulter Counter (Figure 37) sont toutes vivantes. *D. salina* n'a pas de paroi cellulaire mais est recouverte d'une fine enveloppe glycoprotéique (Jin and Melis, 2003). Une fois affectée négativement par un stress nutritif ou allélochimique, la cellule sera alors rapidement lysée (Borowitzka, 2018). La microalgue pourrait donc être affectée par une double compétition sur l'O_2 et le CO_2. *C. watsonii* a un taux de respiration élevé la nuit et limite alors l'accès à l'O_2 à *D. salina* qui ne peut pas totalement assurer son activité cellulaire (Bonnefond et al., 2016). La journée, les deux microorganismes sont en compétition pour le CO_2, ce qui limite en parallèle l'activité photosynthétique de la microalgue (Hu et al., 2018; Ying, 2014). La croissance de la microalgue est alors limitée et ne peut assurer son maintien cellulaire en phase stationnaire, entraînant une mortalité accrue en co-culture (Figure 37) également favorisée par l'effet allélopathique de *C. watsonii*.

4 Conclusions

Au cours de cette étude, *D. salina* et *C. watsonii* ont été co-cultivées dans des systèmes avec séparation membranaire poreuse PVDF. L'objectif était de favoriser les interactions positives et les échanges de l'azote dérivé de la diazotrophie de *C. watsonii* vers *D. salina* en s'affranchissant de la compétition pour la lumière. Même si cette configuration n'a pas amélioré la production de biomasse de *D. salina* malgré une forte croissance de *C. watsonii*, de nouvelles interactions au sein du consortium ont été mises en avant.

L'allélopathie de *C. watsonii* sur *D. salina* est probablement induite par le contact cellulaire, ce qui confirme l'hypothèse soulevée dans le Chapitre 3. Une double interaction négative O_2/CO_2 a également été caractérisée. En plus de la compétition pour le CO_2 la journée, *C. watsonii* semble impacter la croissance de *D. salina* en régulant la concentration en O_2 la nuit par sa forte activité respiratoire nécessaire à la diazotrophie tandis que *D. salina* semble impacter négativement *C. watsonii* due à sa forte activité photosynthétique le jour.

Les données récoltées lors de cette étude vont permettre de modéliser ces co-cultures par séparation membranaire et ainsi de quantifier l'effet de ces interactions sur le consortium.

5 Remerciements et contributions

Margaux Caia, Olivier Bernard et Jean-Philippe Steyer ont conçu l'étude réalisée par Margaux. Sophie Marro a trié et analysé les données récoltées par cytométrie en flux. Les autres résultats ont été analysés et interprétés par Margaux avec l'aide de Jean-Philippe et Olivier. Ce chapitre a été rédigé par Margaux, relu et corrigé par Jean-Philippe et Olivier.

Mille mercis à Hubert Bonnefond, Rodolphe Lemée et Laurent Gilletta pour le prêt du matériel de culture et du système d'éclairage.

Chapitre 6 : Analyse de la dynamique O_2/CO_2 induite par les interactions entre *D. salina* et *C. watsonii*

Dans le Chapitre 5, les interactions entre *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii* ont été caractérisées expérimentalement dans les systèmes de co-culture avec séparation membranaire. Ce dispositif permet d'éliminer la compétition pour la lumière entre *D. salina* et *C. watsonii* et l'effet allélopathique de la cyanobactérie sur la microalgue n'a pas été observé lorsque les deux microorganismes n'étaient pas en contact. Des interactions autour de l'O_2 et du CO_2 ont été identifiées et une compétition pour ces substrats de la respiration et de la photosynthèse est suspectée. Le modèle développé dans le Chapitre 3 et validé en erlenmeyer a servi de base pour modéliser les interactions au sein de ce système de culture et vérifier quantitativement si ces hypothèses sont plausibles. Le modèle développé dans ce chapitre permet de préciser le rôle de *D. salina* et de *C. watsonii* dans chacune des interactions observées. Le modèle s'appuie notamment sur la représentation du système des carbonates et la détermination de la concentration en CO_2 à partir de la mesure du pH, tel qu'il a été publié dans Algal Research sous le titre « Optimizing CO_2 transfer in algal open ponds » (2018, vol. 35, p. 530-538). Cet article caractérise et optimise les transferts de CO_2 dans un bassin de culture de *D. salina* en extérieur.

1 Introduction

Les chapitres précédents ont permis de caractériser les interactions principales au sein d'un assemblage artificiel de *D. salina* et de *C. watsonii*. Alors que l'azote organique dérivé de la diazotrophie n'était pas assimilé par *D. salina*, la compétition pour la lumière a été démontrée dans le Chapitre 3. Les effets allélopathiques de *C. watsonii* sur *D. salina* ont été tout d'abord mis en évidence expérimentalement en co-culture puis confirmé grâce au modèle décrit dans le Chapitre 4. Le Chapitre 5 a permis de s'affranchir de la compétition pour la lumière en co-culture avec séparation membranaire et, de manière plus surprenante, a permis de mettre en évidence que l'effet allélopathique nécessite un contact cellulaire comme décrit pour d'autres

cyanobactéries (Dunker et al., 2017). Des interactions de compétition concernant l'O_2 et le CO_2 ont également été caractérisées à l'aide de ce système de culture.

Cependant, pour mieux comprendre ces dynamiques O_2/CO_2 et quantifier la contribution de *D. salina* et de *C. watsonii* à chaque interaction, il est nécessaire d'adapter le modèle mathématique décrit dans le Chapitre 4 à ce système de co-culture avec séparation membranaire. Très peu de modèles décrivent simultanément les dynamiques O_2/CO_2 au sein de cultures (Camacho Rubio et al., 1999; Doucha and Lívanský, 2006). Les modèles s'intéressent en effet plus souvent à la baisse de productivité de biomasse due à de trop fortes concentrations en O_2 (Jiménez et al., 2003; Mendoza et al., 2013) ou à un manque de CO_2 (Chang et al., 2016; Malek et al., 2016; Ying, 2014). Les interactions entre les microorganismes au sein d'écosystèmes naturels et artificiels par le biais de l'O_2 et du CO_2 ont rarement été prises en compte. De plus, les transferts à travers la membrane du dispositif développé par Ternon et al. (2018) n'avaient pas été quantifiés et modélisés. Nous avons ainsi combiné des approches à la fois expérimentales et mathématiques pour identifier au mieux toutes les interactions établies entre *D. salina* et *C. watsonii*.

Cette étude synthétise les interactions définies précédemment entre *D. salina* et *C. watsonii*. Le modèle mathématique permet également de comprendre le rôle de ces deux microorganismes dans la modification de leur environnement et comment ces interactions influencent l'évolution du consortium.

Dans un premier temps, les conditions et les mesures expérimentales sont rapidement présentées. Après un rapide rappel du modèle de base, les modifications apportées sont détaillées. Les simulations obtenues sont ensuite comparées aux résultats expérimentaux de *D. salina* et de *C. watsonii* en mono-cultures, co-cultures et co-cultures avec séparation membranaire. Les contributions de *D. salina* et *C. watsonii* à la modification de leur environnement en co-culture sans et avec séparation membranaire sont ensuite comparées et permettent de mieux comprendre à quel point ces interactions impactent l'évolution du consortium.

2 Matériel et méthodes

2.1 Conditions expérimentales

Le système expérimental de co-culture utilisé est détaillé dans le Chapitre Matériel et méthodes général et l'expérience est analysée dans le Chapitre 5. Les différentes conditions mono-cultures, co-cultures et co-cultures avec séparation membranaire de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii* sont décrites dans le Chapitre 5. Le filtre utilisé dans la co-culture avec séparation membranaire est une membrane hydrophile en polyfluorure de vinylidène (PVDF) avec des pores de 0,2 µm. Cette condition est appelée « co-culture PVDF » dans la suite de l'étude.

2.2 Mesures expérimentales

Les différentes mesures expérimentales sont détaillées dans le Chapitre 5. Celles-ci comprennent les comptages cellulaires de *D. salina* et *C. watsonii*, l'évolution de la concentration en nitrates (NO_3^-), en azote organique dissous (DON), la mesure du pH et la concentration en O_2.

2.3 Modèle mathématique

2.3.1 Base du modèle

Le modèle sur les interactions entre *D. salina* et *C. watsonii* a tout d'abord été calibré et validé grâce à des expériences en Erlenmeyers en *batch*. Le fruit de ce travail est présenté dans le Chapitre 4. Ce modèle a ici servi de base et a été modifié pour représenter au mieux les interactions dans ces systèmes de culture où milieu et molécules sont échangés par transfert de part et d'autre de la membrane poreuse.

2.3.2 Modifications du modèle

D'une manière générale, le terme de dilution $-\upsilon X$ (υ représente le taux de dilution (jour^{-1}) et X la constante concernée) n'est pas utilisé ici car l'expérience et les simulations sont effectuées en *batch*. Le terme de dilution de chaque équation présentée dans le Chapitre 4 a donc été retiré des équations présentées dans ce chapitre.

Intensité lumineuse au sein du réacteur

Les cultures sont constamment bullées et agitées magnétiquement. La distribution de la lumière est alors supposée homogène au sein des cultures comme dans le Chapitre 4. Les cultures sont éclairées par le haut à une intensité lumineuse I_0 de 320 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} de 8h du matin à 8h du soir (phase de jour) et cette intensité lumineuse I_0 est de 0 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} le reste du temps (phase de nuit). L'atténuation lumineuse du fait des biomasses de *D. salina* et *C. watsonii* permet de représenter l'intensité lumineuse moyenne $\bar{I}$ (µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) par la même équation que précédemment :

$$\bar{I} = \frac{I_0}{L}\frac{1-e^{-\left(K_{ext,d}D+K_{ext,c}C\right)L}}{K_{ext,d}D+K_{ext,c}C} \tag{27}$$

où L est la distance entre la surface extérieure et le centre de la culture (m), $K_{ext,d}$, $K_{ext,c}$, D et C sont respectivement les coefficients d'extinction (m^2.cellule^{-1}) et concentrations cellulaires (cellule.m^{-3}) de *D. salina* et de *C. watsonii*.

Croissances cellulaires

La représentation mathématique de la croissance cellulaire de *D. salina* et de *C. watsonii* a été précédemment décrite dans le Chapitre 4. Cependant, les taux de mortalité cellulaire et de respiration ont été ici découplés par rapport au Chapitre 4 pour représenter plus finement les dynamiques O_2/CO_2. De plus, comme ces deux microorganismes sont photosynthétiques et utilisent le CO_2 comme ressource, celui-ci peut alors limiter leur croissance. Les équations sont ainsi modifiées comme suit (en rouge) pour que les croissances cellulaires de *D. salina* et de *C. watsonii* dépendent de la concentration en CO_2 du milieu et de leur affinité respective et d'un taux de mortalité cellulaire.

Pour *C. watsonii*, la cinétique de Michaelis-Menten (Grimaud et al., 2014) est modifiée comme suit :

$$\frac{dC}{dt} = \overline{\mu_C}\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,c}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,c}}C - M_C C \tag{28}$$

Où $\overline{\mu_C}$ est le taux maximal de croissance (jour^{-1}), $K_{I,c}$ est la constante d'affinité pour la lumière (µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), CO_2 est la concentration en CO_2 du milieu (mol.m^{-3}), $K_{CO_2,c}$ est la constante d'affinité pour la lumière (mol.m^{-3}) et M_c est le taux de mortalité (jour^{-1}).

Pour *D. salina*, la théorie de Droop qui considère que la croissance dépend du quota intracellulaire d'azote Q (mol N.cellule^{-1}) et de l'intensité lumineuse (Bernard, 2011) est modifiée comme ceci :

$$\frac{dD}{dt} = \overline{\mu_d}\left(1 - \frac{Q_0}{Q}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,d}}D - M_d D - m\frac{P}{P+K_P}D \qquad (29)$$

Où $\overline{\mu_d}$ est le taux maximal de croissance (jour^{-1}), Q_0 est le quota intracellulaire minimal mol N.cellule^{-1}), $K_{I,d}$ est la constante d'affinité pour la lumière (µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), CO_2 est la concentration en CO_2 du milieu (mol.m^{-3}), $K_{CO_2,d}$ est la constante d'affinité pour le CO_2 (mol.m^{-3}), M_d est le taux de mortalité (jour^{-1}), m est le taux de mortalité (jour^{-1}) induit par les molécules allélochimiques P produites par *C. watsonii* (mol.m^{-3}) en fonction de la constante d'affinité K_P de *D. salina* pour ces molécules allélopathiques (mol.m^{-3}).

Dynamique autour des nitrates

De même que pour la représentation de l'intensité lumineuse dans les cultures, la dynamique mathématique autour des nitrates n'a pas été modifiée par rapport au Chapitre 4. Cela signifie que les équations dynamiques de la représentation des nitrates S reprend les termes proposés par Bougaran et al. (2010) :

$$\frac{dS}{dt} = -\rho_m \frac{S}{S+K_s}\left(\frac{Q_L-Q}{Q_L-Q_0}\right)D \qquad (30)$$

Où ρ_m est le taux d'absorption maximal d'azote de *D. salina* (mol N.cellule^{-1}.jour^{-1}), K_s est la constant d'affinité pour l'azote (mol.L^{-1}), et Q_L est le quota intracellulaire d'azote pour lequel l'assimilation s'arrête (mol N.cellule^{-1}).

Le quota interne d'azote Q a été modifié car il dépend de la croissance cellulaire de *D. salina*, elle-même dépendante de la disponibilité du CO_2 (Équation (29)).

$$\frac{dQ}{dt} = \rho_m \frac{S}{S+K_s}\left(\frac{Q_L-Q}{Q_L-Q_0}\right) - \overline{\mu_d}\left(1 - \frac{Q_0}{Q}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,d}}Q \qquad (31)$$

Interaction allélopathique

La cinétique de production des molécules allélochimiques P de *C. watsonii* n'est pas modifiée et reste proportionnelle à la concentration cellulaire de la cyanobactérie comme décrit dans le Chapitre 5 :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha C \tag{32}$$

Où α est le taux de production cellulaire de composés allélochimiques (mol.cellule^{-1}.jour^{-1}).

Interactions autour du CO_2

Il est possible de connaître la concentration en CO_2 à partir du pH. Les quatre équations acido-basiques qui définissent la chimie de l'eau de mer (Copin-Montégut, 1996; Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001) ont été détaillées dans le Chapitre Matériel et méthodes général. L'impact de l'ajout de nutriments caractéristiques du milieu F/2 (Guillard, 1975) sur le système des carbonates a également été pris en compte.

L'équation suivante permet alors de déterminer la concentration en CO_2 à partir de la mesure du pH en milieu F/2 :

$$[CO_2] = \frac{10^{-pH} + [AT] + [Na_p^+] - [B(OH)_4^-] - [OH^-] - [H_2PO_4^-] - 2[HPO_4^{2-}] - 3[PO_4^{3-}]}{K_1/10^{-pH} + 2(K_1K_2)/(10^{-pH})^2} \tag{33}$$

où K_1 et K_2 sont les constantes d'équilibre dépendantes de la température des couples acide/base des ions carbonates (µmol.L^{-1}.Pa^{-1} ; Copin-Montégut, 1996), AT est l'alcalinité totale de l'eau de mer (µmol L^{-1}).

La mesure de la viabilité cellulaire effectuée dans le Chapitre 5 a démontré que les cellules entières avaient une activité enzymatique maximale. Pour caractériser la variation de la concentration en carbone inorganique du milieu (mol.m^{-3}), le quota maximum en azote Q_{max} de *D. salina* est utilisé dans le modèle de Droop car son activité photosynthétique, en termes de fixation de CO_2 ou de production d'O_2, est toujours maximale et s'avère indépendante (aux échelles de temps considérées) de la variation intracellulaire d'azote. En résumé, la croissance cellulaire est transitoirement découplée de la fixation de CO_2 et de la production d'O_2 qui perdurent même après la limitation en azote.

La variation du carbone inorganique (CI) du milieu dépend de l'absorption du CO_2 pendant la photosynthèse et de la production de CO_2 par la respiration en fonction de la biomasse cellulaire de *D. salina* et de *C. watsonii*. La variation du CI dépend également des transferts de CO_2 des bulles d'air vers le milieu. L'équation représentant la dynamique de la variation du CI est alors définie comme suit :

$$\frac{dCI}{dt} = -k_d\overline{\mu_d}\left(1-\frac{Q_0}{Q_{max}}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,d}}D + R_dD$$

$$-k_c\overline{\mu_c}\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,c}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,c}}C + R_cC - K_La_{CO_2}(CO_2 - K_HP_{CO_2,b}) \qquad (34)$$

où k_d et k_c sont respectivement les coefficients photosynthétiques d'absorption du CO_2 de *D. salina* et de *C. watsonii* (mol.cellule^{-1}), R_d et R_c sont les taux de production de CO_2 pendant la respiration de *D. salina* et de *C. watsonii* (mol.cellule^{-1}.jour^{-1}), $K_La_{CO_2}$ est le coefficient de transfert du CO_2 (jour^{-1}), K_H est la constante Henry du CO_2 (mol.m^{-3}.atm^{-1}) et $P_{CO_2,b}$ est la pression partielle de CO_2 des bulles d'air (atm).

Interactions autour de l'O_2

De même que pour la dynamique de la concentration de CI, l'activité respiratoire de *D. salina* est considérée indépendante du quota intracellulaire d'azote (aux échelles de temps considérées). La variation d'O_2 du milieu dépend de la production d'O_2 pendant la photosynthèse et de l'absorption d'O_2 par la respiration en fonction de la biomasse cellulaire de *D. salina* et de *C. watsonii*. La respiration photosynthétique est découplée de la croissance cellulaire. Comme pour la dynamique du CI, la variation d'O_2 dépend des transferts d'O_2 des bulles d'air vers le milieu. L'équation représentant la dynamique de la variation d'O_2 est alors définie comme suit :

$$\frac{dO_2}{dt} = k_{O,d}\overline{\mu_d}\left(1-\frac{Q_0}{Q_{max}}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,d}}D - R_{O,d}D$$

$$+k_{O,c}\overline{\mu_c}\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,c}}\frac{CO_2}{CO_2+K_{CO_2,c}}C - R_{O,c}C - K_La_{O_2}(O_2 - K_{H,O}P_{O_2,b}) \qquad (35)$$

où $k_{O,d}$ et $k_{O,c}$ sont respectivement les coefficients photosynthétiques de production d'O_2 de *D. salina* et de *C. watsonii* (mol.cellule^{-1}), $R_{O,d}$ et $R_{O,c}$ sont les taux d'absorption d'O_2 pendant la

respiration de *D. salina* et de *C. watsonii* (mol.cellule^{-1}.jour^{-1}), $K_L a_{O_2}$ est le coefficient de transfert d'O_2 (jour^{-1}), $K_{H,O}$ est la constante Henry d'O_2 (mol.m^{-3}.atm^{-1}) et $P_{O_{2,b}}$ est la pression partielle d'O_2 des bulles d'air (atm).

Transferts entre les deux compartiments

Dans le cas de co-culture avec séparation membranaire, les différentes molécules du milieu transitent librement d'un côté et de l'autre du système à travers la membrane poreuse PVDF. Les transferts concernent les nitrates, le carbone inorganique et l'O_2. Les molécules allélochimiques produites par *C. watsonii* ne sont pas concernées car l'effet allélopathique de *C. watsonii* sur *D. salina* a été détecté de manière expérimentale seulement dans le cas de co-culture (Chapitre 5). Un contact cellulaire semble alors requis, à moins que les molécules ne soient excrétées en continu par *C. watsonii* mais s'adsorbent sur le filtre et ne sont pas transférées du côté de *D. salina* dans le cas de co-cultures par séparation membranaire. Les transferts sont représentés comme suit :

$$\frac{dY_a}{dt} = k_Y(Y_b - Y_a) \tag{36}$$

Où Y_a et Y_b représentent la concentration en nitrates ou CI ou O_2 (mol.m^{-3}) de chaque côté du système de co-culture avec séparation membranaire et k_Y représente le coefficient de transfert propre à la molécule concernée (jour^{-1}).

2.3.3 Calibration des paramètres du modèle

Méthode des moindres carrés

Le modèle a été calibré et optimisé avec des données expérimentales issues d'une première campagne expérimentale (*Cf.* Annexe 2). Ces données sont issues de mono-cultures et de co-cultures avec et sans séparation membranaire de *D. salina* et de *C. watsonii* dans les mêmes conditions expérimentales que dans ce chapitre.

La méthode des moindres carrées permet d'ajuster le modèle au plus près des données expérimentales. Pour ce faire, les écarts entre la simulation du modèle et les données expérimentales sont sommés. Le but est de trouver le jeu de paramètres du modèle qui minimise cet écart.

En pratique, les fonctions décrivant le modèle sont simulées avec un ou plusieurs paramètres inconnus. La procédure de minimisation prédit alors différents jeux de paramètres en minimisant la somme au carré des écarts entre les données et les différentes prédictions simulées. L'ajustement par la méthode des moindres carrés permet ainsi de déterminer les paramètres du modèle qui produisent le meilleur ajustement aux données. Il est important de noter que la phase de calibration est suivie d'une phase de validation où d'autres données sont utilisées, démontrant ainsi les capacités prédictives du modèle.

Estimation des relations O_2/CO_2

Camacho Rubio et al. (1999) ont déterminé, en utilisant les développements de (Talbot et al., 1991) que le coefficient de transfert de l'O_2 dans l'eau est lié au transfert de CO_2 grâce au rapport de diffusivité de chacun des gaz considérés :

$$K_L a_{O_2} = 1{,}075 K_L a_{CO_2} \tag{37}$$

Grâce aux données d'une expérience préalable (*Cf.* Annexe 2), des quotients photosynthétiques (rapports des coefficients photosynthétiques) de 1,3 et 0,6 mol O_2/mol CO_2 ont respectivement été déterminés pour *D. salina* et *C. watsonii*. Le quotient photosynthétique est le rapport de la quantité de CO_2 absorbée sur la quantité d'O_2 produite au cours de la photosynthèse. Les quotients photosynthétiques des microalgues autotrophes sont compris entre 1,1 et 1,4 mol O_2/mol CO_2 (Karl and Church, 2017) et peuvent dans certaines conditions atteindre 1,8 pour *D. salina* (Burris, 1981). Concernant les cyanobactéries, aucune étude n'a été réalisée sur *C. watsonii* mais une étude sur la cyanobactérie diazotrophe *Trichodesmium* spp. a rapporté des quotients photosynthétiques de 0,46 à 0,61 mol O_2/mol CO_2 (Carpenter and Roenneberg, 1995).

Les quotients respiratoires de *D. salina* et *C. watsonii* représentent la quantité d'O_2 absorbée sur la quantité de CO_2 produite au cours de la respiration. Ils ont également été déterminés par la méthode des moindres carrés sur les données issues de l'expérience préalable. Des quotients respiratoires de 1,32 et de 1,38 mol CO_2/mol O_2 ont ainsi été établis pour *D. salina* et *C. watsonii*, respectivement. Ces quotients sont en accord avec ceux relevés dans la littérature qui varient entre 1 et 1,5 mol CO_2/mol O_2 pour les microalgues et les cyanobactéries (Grobbelaar and Soeder, 1985; Ploug and Bergkvist, 2015; Stehfest et al., 2005).

Transfert de molécules à travers la membrane

Un test préalable a été effectué pour caractériser la vitesse de diffusion de molécules d'un compartiment vers l'autre dans le cas d'une co-culture avec séparation membranaire. Le filtre laisse en effet passer des molécules jusqu'à 0,2 µm. Ce test a été réalisé avec de l'érythrosine, un colorant alimentaire rose également utilisé dans les tests de viabilité cellulaire pour marquer les cellules mortes (voir Chapitre Matériel et méthode général). Pour ce faire, 800 mL d'eau de mer étaient ajoutés dans chacun des compartiments. Les compartiments étaient bullés et agités magnétiquement dans les mêmes conditions que pendant l'expérience détaillée dans le Chapitre 5. Un mg d'érythrosine était alors ajouté d'un côté du système en triplicats (Figure 49). La densité optique de chaque compartiment était alors mesurée au spectrophotomètre (Perkin Elmer, Lambda 365 UV/Vis). Les mesures étaient acquises à une longueur d'onde de 530 nm qui correspond au maximum du spectre d'absorption de l'érythrosine. Un blanc était effectué avec de l'eau de mer avant les mesures. La cinétique mesurée au cours du temps a permis de calculer la vitesse de transfert au sein de ce système de culture.

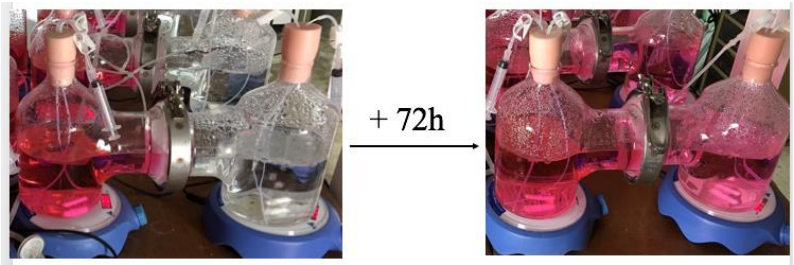

Figure 49 : Expérience pour caractériser le transfert de molécules et calculer la vitesse de diffusion à travers la membrane poreuse PVDF. Les photos ont été prises lors de l'ajout d'érythrosine d'un côté du système et 72 h après.

2.3.4 Contribution de *D. salina* et de *C. watsonii* à chaque interaction

Dans cette partie, l'impact de chaque interaction est caractérisé pour mieux comprendre son impact sur l'écosystème. Pour ce faire, un terme décrit la disponibilité de la ressource et son effet sur la croissance de chaque microorganisme, compte tenu de leur affinité pour cette ressource. Lorsque ce terme est élevé, la ressource est peu limitante et les organismes sont peu impactés. Typiquement, il s'agit de fonctions de type Michaelis-Menten. A contrario, un terme faible indique une ressource limitante pour l'organisme et un fort ralentissement de la croissance. L'interaction est alors forte et les microorganismes sont impactés négativement.

La manière dont *D. salina* et *C. watsonii* affectent leur environnement est caractérisé par une fonction φ indiquant quel organisme modifie le plus un facteur. Par exemple, un φ élevé pour une ressource indique que *D. salina* en est la principale consommatrice.

Interaction autour de la lumière

L'intensité de la compétition pour la lumière sur *D. salina* et *C. watsonii* est représentée par les termes $\bar{I}/(\bar{I}+K_{I,d})$ et $\bar{I}/(\bar{I}+K_{I,c})$, respectivement. La contribution de *D. salina* à l'atténuation lumineuse (φ_I) et donc à l'interaction pour la lumière est représentée comme suit :

$$\varphi_I = 1 - \frac{e^{-k_{ext,d}D}}{e^{-k_{ext,d}D}+e^{-k_{ext,c}C}} \tag{38}$$

Cette équation permet de comprendre à quel point chaque organisme contribue à l'atténuation lumineuse, alors que les termes $\bar{I}/(\bar{I}+K_{I,d})$ et $\bar{I}/(\bar{I}+K_{I,c})$ décrivent comment la limitation de cette ressource les impacte.

Interactions autour des nitrates

Le terme $S/(S+K_s)$ représente l'impact de la variation des nitrates sur *D. salina. C. watsonii* ne consomme pas de nitrates donc seule la microalgue contribue à modifier ce paramètre avec une contribution φ_N de :

$$\varphi_N = \frac{\rho_m \frac{1}{S+K_S}\left(\frac{Q_L-Q}{Q_L-Q_0}\right)D}{\rho_m \frac{1}{S+K_S}\left(\frac{Q_L-Q}{Q_L-Q_0}\right)D} = 1 \tag{39}$$

Interactions autour du CO_2

L'impact de la compétition pour le CO_2 est décrit par les termes $CO_2/(CO_2+K_{CO_2,d})$ et $CO_2/(CO_2+K_{CO_2,c})$ pour *D. salina* et *C. watsonii*, respectivement. La contribution de *D. salina* à la consommation du CO_2 (φ_{CI}) est alors définie comme suit :

$$\varphi_{CI} = \frac{k_d\overline{\mu_d}\left(1-\frac{Q_0}{Q_L}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}\frac{1}{CO_2+K_{CO_2,d}}D}{k_d\overline{\mu_d}\left(1-\frac{Q_0}{Q_L}\right)\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,d}}\frac{1}{CO_2+K_{CO_2,d}}D+k_c\overline{\mu_c}\frac{\bar{I}}{\bar{I}+K_{I,c}}\frac{1}{CO_2+K_{CO_2,c}}C} \tag{40}$$

Interactions autour de l'O_2

Dans le modèle, les fluctuations de l'O_2 n'impactent ni *D. salina* ni *C. watsonii*. La contribution de *D. salina* à la consommation de l'O_2 (φ_{O_2}) est alors définie comme suit :

$$\varphi_{O_2} = \frac{R_{O,d}D}{R_{O,d}D + R_{O,c}C} \tag{41}$$

Interaction allélopathique

Seule *D. salina* est affectée par les molécules allélochimiques de *C. watsonii*. L'intensité de cette interaction est représentée par le terme $P/(P + K_P)$. Une valeur élevée indique qu'une forte concentration en molécules allélopathiques impacte négativement la microalgue. La contribution de *D. salina* à l'interaction allélopathique φ_P est alors nulle car seule *C. watsonii* produit des molécules allélopathiques :

$$\varphi_P = \frac{0}{\alpha C} = 0 \tag{42}$$

3 Résultats et discussion

3.1 Estimation des paramètres

3.1.1 Transferts à travers la membrane

Un taux de diffusion de 0,2 jour^{-1} a été déterminé grâce à l'expérience de diffusion de l'érythrosine d'un côté vers l'autre (Figures 49, 50). Cependant, il s'avère que ce marqueur fluorescent est une molécule ayant une structure plus complexe que les molécules de NO_3^-, d'O_2 et de CO_2 et, en sus, possédant une cinétique de dégradation. De plus, l'agitation magnétique a été multipliée par 1,3 pendant l'expérience de culture de *D. salina* et de *C. watsonii* pour des raisons pratiques. Le taux de diffusion a été considéré dépendant de l'agitation magnétique car il dépend directement de la vitesse du milieu (Levenspiel and Smith, 1957). Alors considéré égal à 0,27 jour^{-1} pour l'érythrosine dans ces conditions, le même taux de diffusion a été appliqué par la suite pour les NO_3^-, l'O_2 et le CO_2.

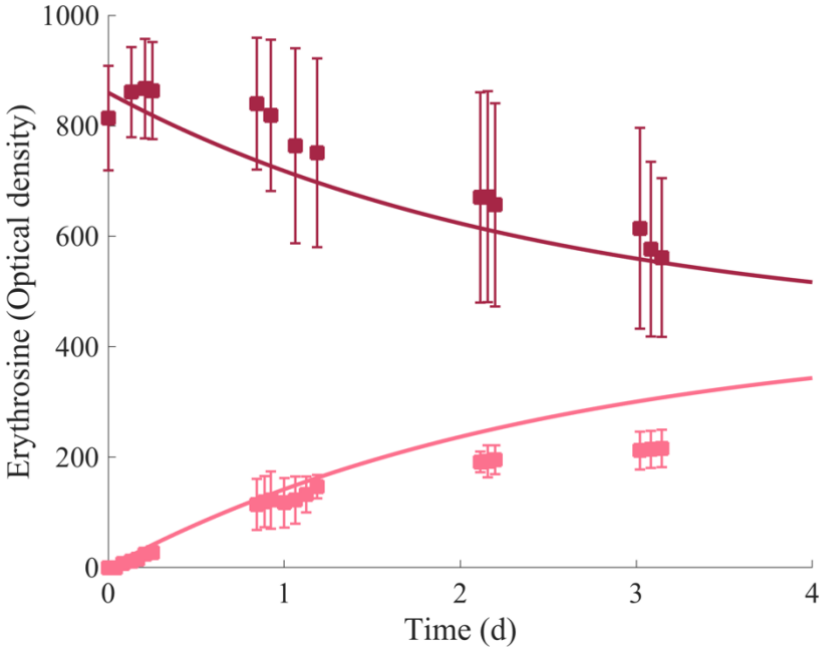

Figure 50 : Densité optique mesurée dans chaque compartiment après ajout de l'érythrosine pour caractériser la vitesse de transfert de molécule à travers la membrane PVDF (carrés : données expérimentales ; courbes : simulations des transferts par le modèle).

3.1.2 Ajustement des autres paramètres

Certains paramètres du modèle précédemment calibré et validé en erlenmeyer ont été adaptés grâce à une expérience préalable dédiée à la calibration (en rouge, Tableau 6). En effet, la géométrie du système influence notamment la distribution de la lumière et joue également sur le $K_L a$. Les données de cette expérience de calibration ont également permis d'ajuster par la méthode des moindres carrés les coefficients photosynthétiques et respiratoires pour *D. salina* et *C. watsonii* (Tableau 6). Cette méthode a également permis d'ajuster le coefficient de transfert du CO_2 des bulles vers l'eau de mer.

Tableau 6 : Liste des paramètres (optimisation grâce à une expérience de calibration par (a) : calibration experte ; (b) : la méthode des moindres carrés)

Symbole	Paramètre	Valeur	Méthode
$\overline{\mu_c}$	Taux de croissance cellulaire	0,58 → 0,81 $jour^{-1}$	(a)
$K_{CO_2,c}$	Constante d'affinité pour le CO_2	$5{,}0.10^{-8}$ $jour^{-1}$	(a)
M_c	Taux de mortalité cellulaire	0,09 → 0,13 $jour^{-1}$	(a)
$\overline{\mu_d}$	Taux de croissance cellulaire	4,99 → 6,99 $jour^{-1}$	(a)
$K_{I,d}$	Constante d'affinité pour la lumière	154 → 77 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$	(a)
$K_{CO_2,d}$	Constante d'affinité pour le CO_2	$5{,}0.10^{-8}$ $jour^{-1}$	(a)
M_d	Taux de mortalité cellulaire	0,16 → 0,08 $mol.jour^{-1}$	(a)
m	Taux de mortalité cellulaire induit par les molécules allélochimiques	$3{,}4.10^{-2}$ → $9{,}9.10^{-2}$ $jour^{-1}$	(a)
$K_L a_{CO_2}$	Coefficient de transfert du CO_2 des bulles vers l'eau de mer	41,6 $jour^{-1}$	(b)
k_d	Coefficient photosynthétique d'assimilation de CO_2	$2{,}7.10^{-12}$ $mol.cellule^{-1}$	(b)
R_d	Taux de production de CO_2 pendant la respiration	$3{,}6.10^{-13}$ $mol.cellule^{-1}.jour^{-1}$	(b)
k_c	Coefficient photosynthétique d'assimilation de CO_2	$9{,}0.10^{-13}$ $mol.cellule^{-1}$	(b)
R_c	Taux de production de CO_2 pendant la respiration	$1{,}8.10^{-13}$ $mol.cellule^{-1}.jour^{-1}$	(b)
k_Y	Vitesse de diffusion à travers la membrane PVDF	0,27 $jour^{-1}$	(a)

4.1.1 Croissances cellulaires

Les simulations des croissances cellulaires de *C. watsonii* et de *D. salina* ont été validées avec des données expérimentales non utilisées pour la calibration. Seules les conditions initiales concernant l'intensité lumineuse, les densités cellulaires et la concentration en nitrates sont renseignées dans le modèle. Celui-ci simule alors l'expérience grâce aux paramètres préalablement calibrés et décrits dans le Tableau 6. Le modèle représente correctement les croissances cellulaires de *C. watsonii* et de *D. salina*, que ce soit en mono-culture ou dans les deux types de co-cultures (Figures 51, 52).

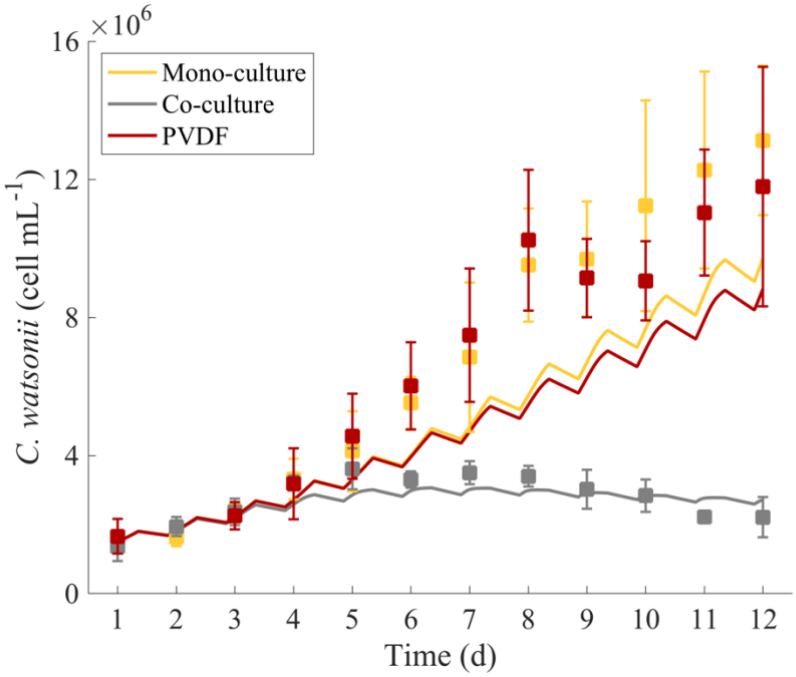

Figure 51 : Concentration cellulaire de *C. watsonii* au cours du temps. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement.

Le modèle semble cependant sous-estimer la croissance cellulaire de *C. watsonii* quand elle est en mono-culture et en co-culture PVDF, donc en l'absence de *D. salina* (Figure 51). Cette sous-estimation de la croissance cellulaire par le modèle a tout de même du sens car il a été montré dans le Chapitre 5 que 90,8 ± 4,3% des cellules de *C. watsonii* étaient vivantes à partir du sixième jour de culture et jusqu'à la fin de l'expérience. Il est donc très vraisemblable qu'une

partie de la biomasse soit composée de cellules mortes. La dynamique de croissance de *D. salina* en co-culture PVDF est, quant à elle, bien simulée (Figure 52). Cela confirme qu'il n'y pas d'effet allélopathique sur *D. salina* en l'absence de contact physique. Le modèle considère qu'il y a une production allélopathique par *C. watsonii* mais les substances produites n'ont pas d'effet puisqu'elles ne sont pas transférées vers le compartiment de *D. salina*.

De plus, le modèle sous-estime la vitesse de croissance de *D. salina* en co-culture (Figure 52), sans doute car la mortalité liée à la présence de molécules allélochimiques est surestimée. Cet effet allélopathique réduit la vitesse de croissance de *D. salina* en co-culture ainsi que sa biomasse maximale par rapport à la mono-culture. Il est possible que l'effet allélopathique ne conduise à une mortalité qu'à partir d'un certain niveau d'accumulation de substances allélopathique, alors que le modèle contient un effet plus progressif.

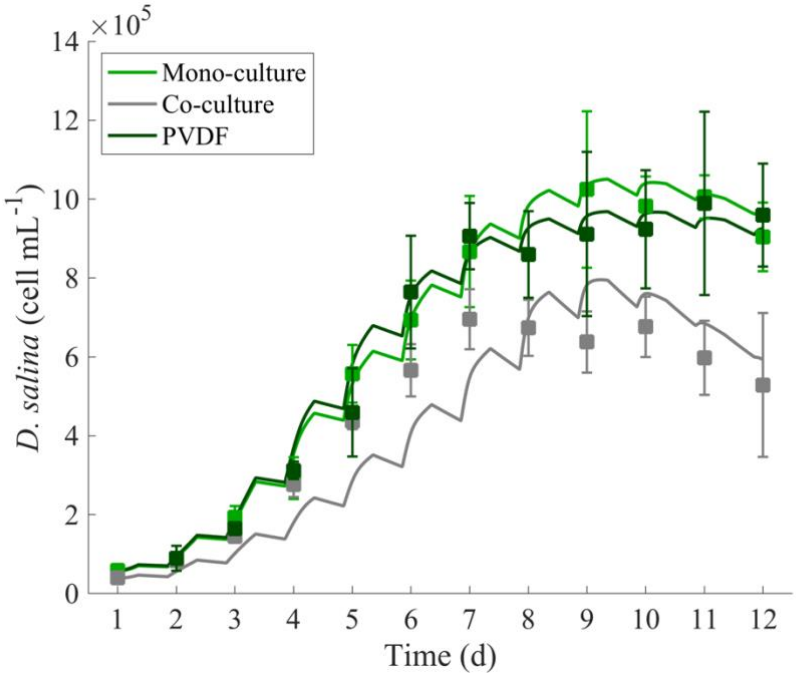

Figure 52 : Concentration cellulaire de *D. salina* au cours du temps. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement.

4.1.2 Concentration en nitrates

Le modèle représente bien l'absorption des nitrates au cours du temps par *D. salina* en mono-culture (Figure 53). La croissance cellulaire de la microalgue s'arrête quelques temps après

avoir épuisé la ressource du milieu en nitrates, comme supposé par la théorie de Droop (1968) et observé expérimentalement (Figure 52, 53).

Le modèle représente le fait que *C. watsonii* en mono-culture n'assimile pas les nitrates de manière détectable (Figure 53). En effet, elle utilise majoritairement le N_2 comme ressource azotée (Dekaezemacker and Bonnet, 2011; Dron et al., 2012). Ceci est en adéquation avec les observations expérimentales analysées au cours de cette thèse.

Cependant, l'assimilation des nitrates est sous-évaluée en co-culture (Figure 53) par rapport aux données expérimentale. Ceci s'explique par le fait que celle-ci dépend directement de la concentration cellulaire de *D. salina* (Équation 30), elle-même sous-estimée par le modèle (Figure 52).

En co-culture PVDF, les nitrates sont rapidement consommés du côté de *D. salina* et diffusent depuis le compartiment de *C. watsonii* (Figure 53). La vitesse de diffusion caractérisée pour l'érythrosine permet de représenter correctement les transferts de nitrates d'un compartiment vers l'autre. Les nitrates sont alors assimilés par *D. salina* et permettent une biomasse maximale semblable à la mono-culture (Figures 52, 53)

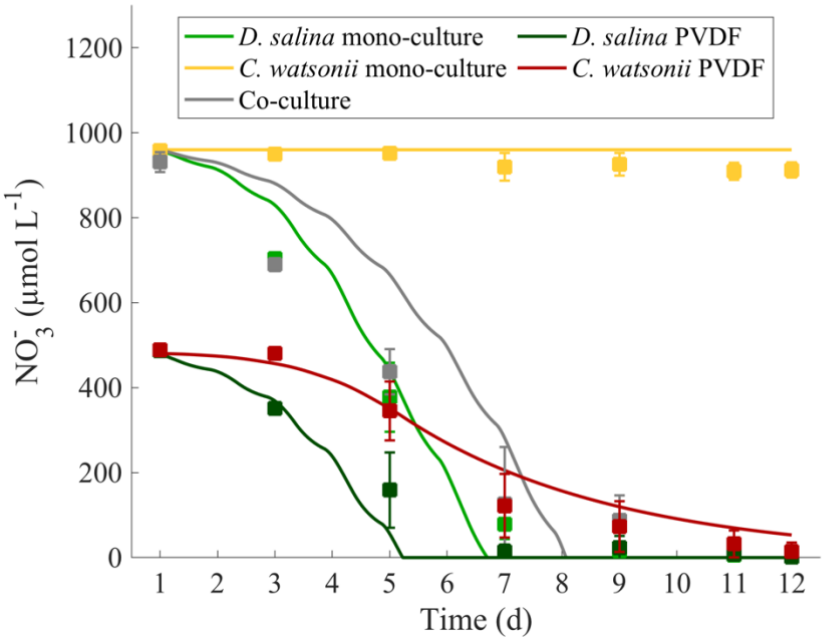

Figure 53 : Concentration en nitrates au cours du temps. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement.

4.1.3 Intensité lumineuse

L'atténuation de l'intensité lumineuse au cours du temps a été préalablement calibrée et validée dans le Chapitre 3. Les simulations de la Figure 54 mettent en évidence l'effet d'une absence de compétition pour la lumière au sein des co-cultures avec séparation membranaire PVDF. En effet, les dynamiques de l'intensité lumineuse sont les mêmes en mono-cultures et co-cultures PVDF pour *C. watsonii* et *D. salina* (Figure 54). De même que dans les simulations en erlenmeyers, *D. salina* est responsable de la majorité de l'atténuation lumineuse en co-culture. Au final, la baisse de l'intensité lumineuse limite fortement la croissance de *C. watsonii* (Figures 51, 54).

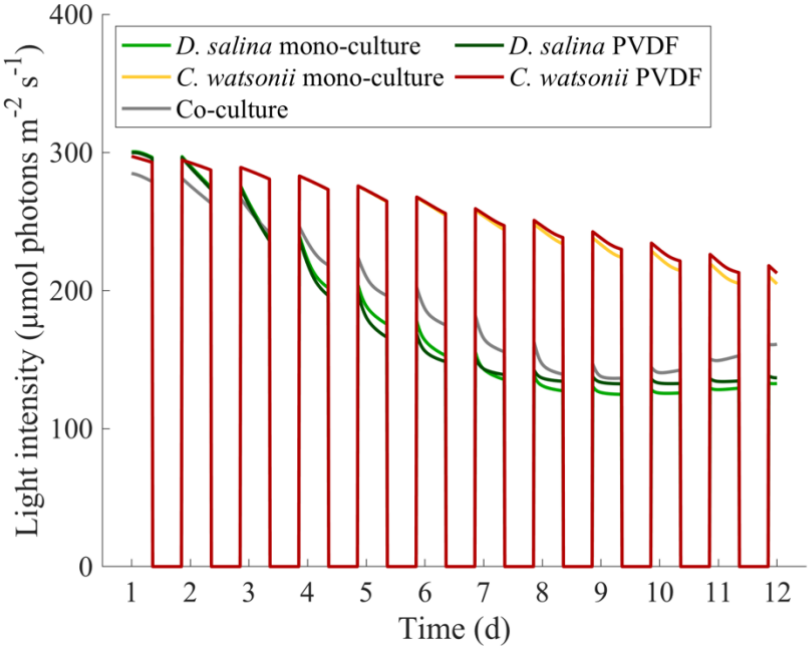

Figure 54 : Prévisions de l'intensité lumineuse au cours du temps dans les mono-cultures et les deux types de co-cultures de *D. salina* et *C. watsonii*.

4.1.4 Concentration d'O_2

Les dynamiques de la variation de la concentration d'O_2 ont été calibrées pour les mono-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* grâce à une expérience préalable dans les mêmes conditions de culture. Le modèle mathématique représente bien les observations expérimentales en mono-culture de *D. salina* et de *C. watsonii* (Figure 55). Les dynamiques jour/nuit sont elles aussi fidèles aux données expérimentales. Le modèle surestime cependant légèrement les

concentrations journalières d'O_2 en co-culture (Figure 56). Il a été montré dans le Chapitre 5 que *C. watsonii* semble limiter la teneur en O_2 du milieu la journée, ce qui n'est pas pris en compte dans le modèle. Les concentrations d'oxygène supérieures à la saturation peuvent également inhiber la photosynthèse (Christenson and Sims, 2011) par photorespiration, c'est-à-dire lorsque l'O_2 se substitue au CO_2 dans le cycle de Calvin.

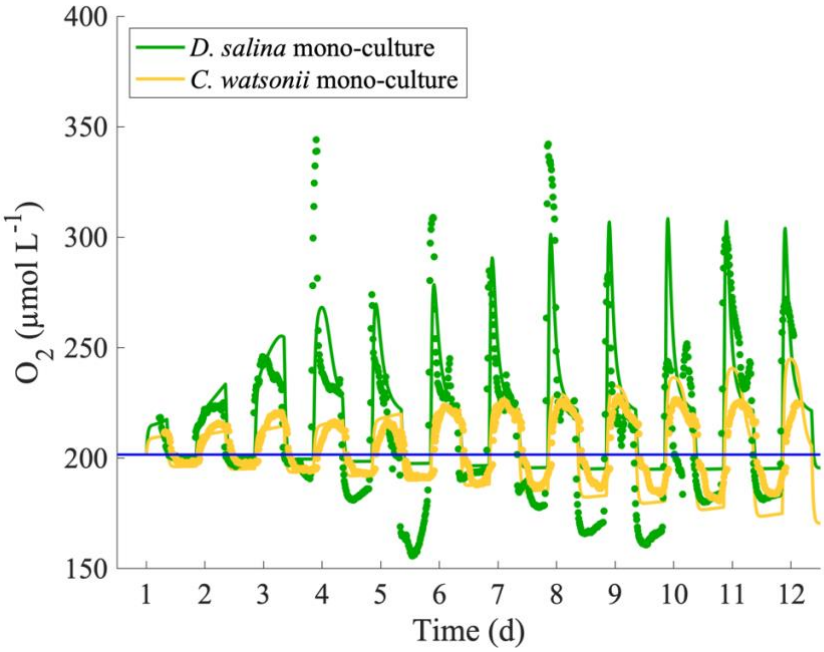

Figure 55 : Concentration en dioxygène au cours du temps dans les mono-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les points représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. La ligne bleue représente la concentration en dioxygène de l'eau de mer sans microorganismes et en équilibre avec l'atmosphère.

La modélisation des transferts d'O_2 dissous permet de simuler convenablement les dynamiques d'O_2 en co-culture PVDF (Figure 57). Les échanges à travers la membrane influent légèrement sur les dynamiques propres de *D. salina* et *C. watsonii* et modulent les dynamiques (Figure 57).

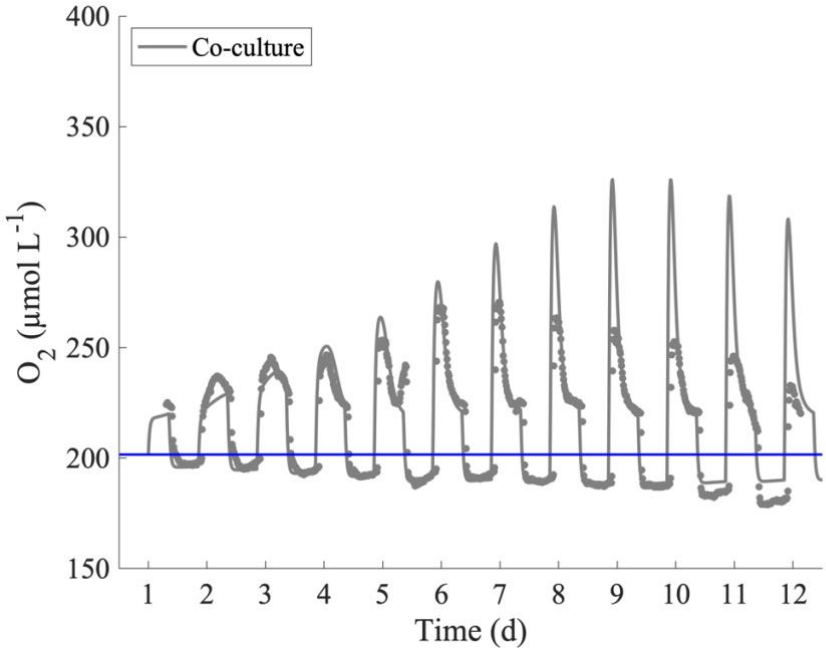

Figure 56 : Concentration en dioxygène au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. La ligne bleue représente la concentration en dioxygène de l'eau de mer sans microorganismes et en équilibre avec l'atmosphère.

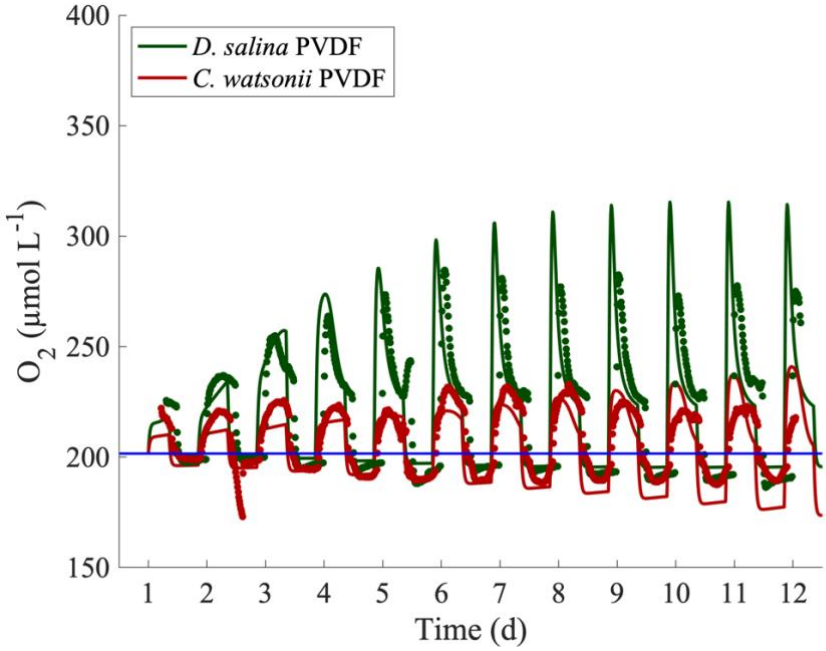

Figure 57 : Concentration en dioxygène au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* avec séparation membranaire (PVDF). Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement. La ligne bleue représente la concentration en dioxygène de l'eau de mer sans microorganismes et en équilibre avec l'atmosphère.

4.1.5 Évolution du pH

Les dynamiques du pH ont été calibrées en même temps que la dynamique de l'O_2, grâce à l'expérience préalable. Les simulations représentent correctement les observations expérimentales au début des mono-cultures et de la co-culture de *D. salina* et de *C. watsonii* (Figure 58). Les dynamiques jour/nuit sont elles aussi fidèles. Cependant, le modèle sous-estime l'amplitude de variation du pH de *D. salina* (Figure 58). Cela est dû à l'ajustement qui a estimé simultanément les paramètres liés aux dynamiques O_2/CO_2 et obtenu un compromis entre l'ajustement sur l'O_2 et celui sur le CO_2. Mais la méthode a plus de flexibilité pour identifier les paramètres liés à l'O_2 car ils n'influent pas sur le taux de croissance et la production de biomasse (Équations (28) et (29)) mais en dépendent (Équation (35)). Les paramètres liés au CO_2 dépendent non seulement de la biomasse et du taux de croissance (Équation (34)) mais impactent leurs dynamiques également (Équations (28) et (29)). Les dynamiques O_2/CO_2 sont donc intimement liées grâce à l'activité cellulaire.

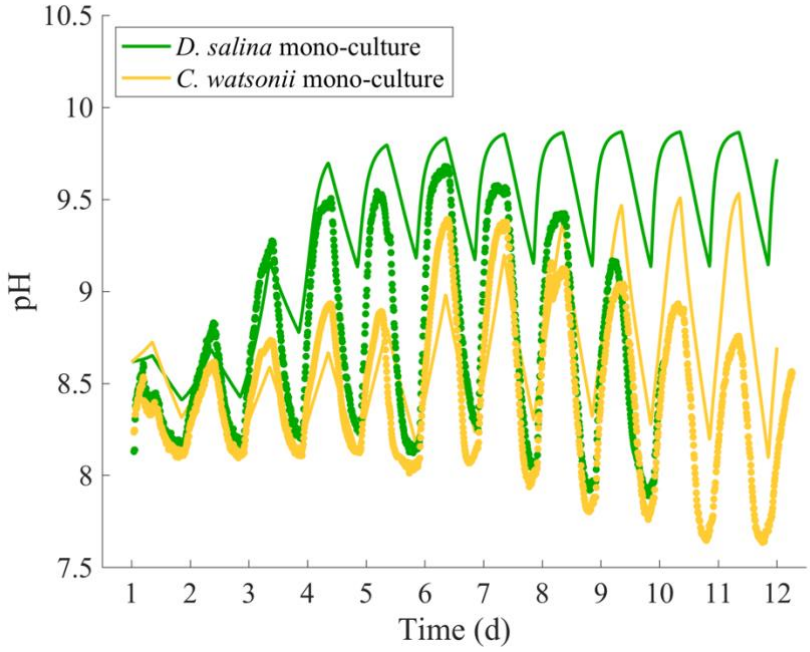

Figure 58 : Évolution du pH au cours du temps dans les mono-cultures et co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement.

La modélisation du pH permet de simuler convenablement les dynamiques observées en co-culture où *D. salina* et *C. watsonii* modulent ensemble ces variations (Figure 59). En co-culture

PVDF, la diffusion de carbone dissous à travers la membrane impacte peu les dynamiques propres de *D. salina* et *C. watsonii* qui sont alors comparables aux mono-cultures (Figures 58, 60).

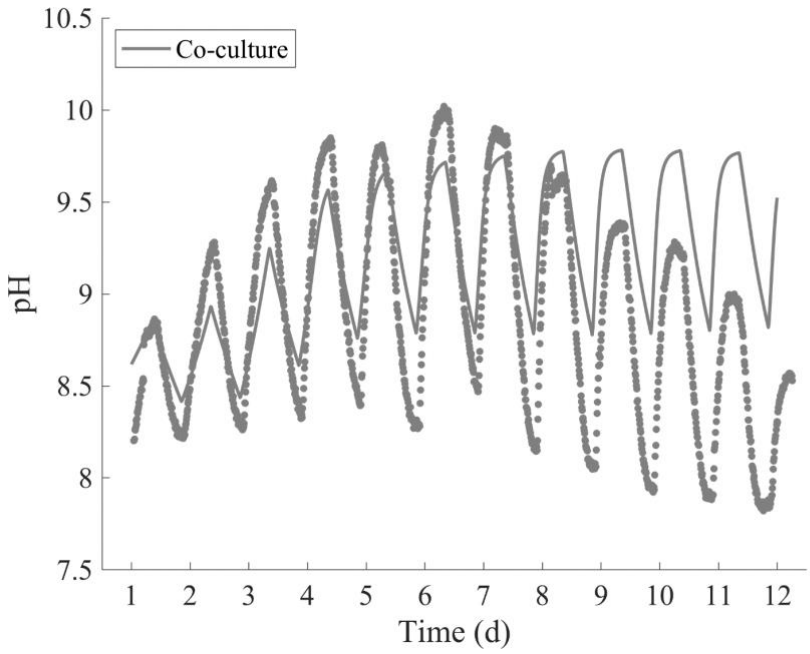

Figure 59 : Évolution du pH au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement.

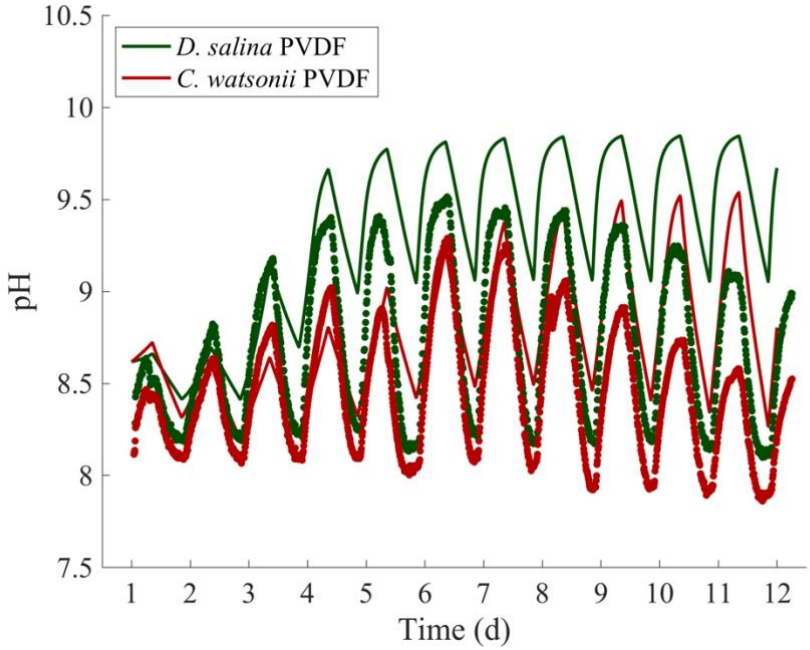

Figure 60 : Évolution du pH au cours du temps dans les co-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii* avec séparation membranaire (PVDF). Les courbes et les carrés représentent les simulations du modèle et les données expérimentales, respectivement.

4.1.6 Contribution à la modification de l'environnement

La Figure 61 illustre la contribution de *D. salina* à la modification de l'environnement en co-culture et co-culture PVDF au dernier jour de l'expérience d'après les Équations (38) à (42).

Tout d'abord, en co-culture comme en co-culture PVDF, *D. salina* contribue à 100% de la consommation des nitrates (Figure 61) car *C. watsonii* n'en consomme pas (Figure 53). *D. salina* est également fortement impactée car sa propre consommation de nitrates limite sa croissance cellulaire (Figures 52, 53).

Concernant l'interaction allélopathique, la contribution de *D. salina* est nulle dans les deux types de co-cultures (Figure 61) car seule *C. watsonii* produit des molécules allélopathiques. Cependant, seule *D. salina* est impactée par cette allélopathie qui existe seulement lors d'un contact cellulaire avec *C. watsonii* (Figure 52).

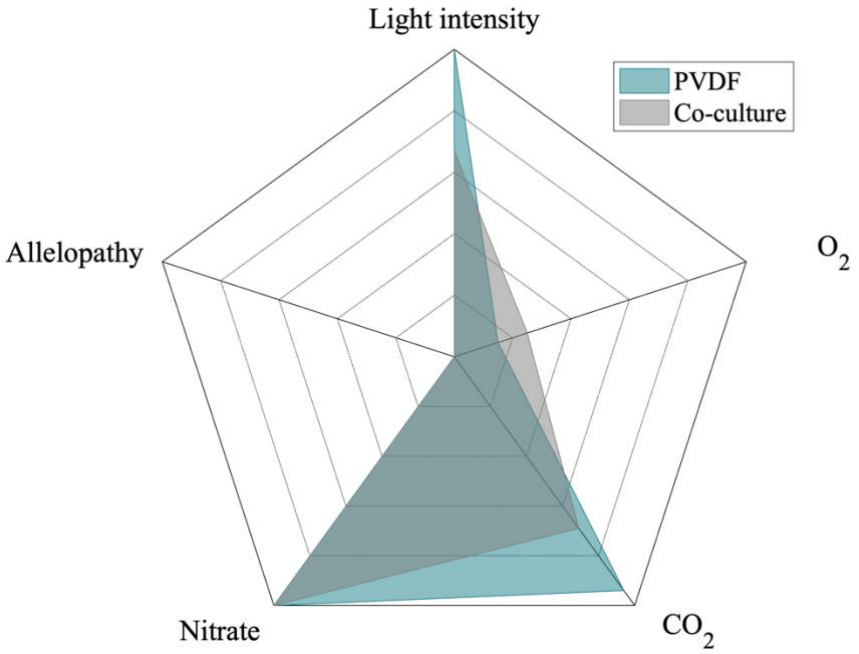

Figure 61 : Contribution de *D. salina* à la modification de l'environnement dans les co-cultures et co-cultures avec séparation membranaire (PVDF) le dernier jour expérimental.

La compétition pour la lumière est une interaction plus complexe (Figure 61). En co-culture, *D. salina* et *C. watsonii* font toutes les deux de l'auto-ombrage et contribuent à cette interaction (Figures 54, 62) comme observé expérimentalement dans les chapitres précédents. La contribution de *D. salina* à la modification de ce facteur limitant est de 67% au dernier jour de l'expérience de co-culture. La microalgue limite majoritairement la lumière à la fin de l'expérience alors que *C. watsonii* et *D. salina* y participaient de manière égale au premier jour de l'expérience (Figure 62). *D. salina* est également plus impactée par la variation de la lumière que *C. watsonii* qui y contribue très peu (Figure 62). Cela est confirmé par l'analyse de la contribution à la modification de l'intensité lumineuse en co-culture PVDF qui montre que *D. salina* contribue à 100% et au final impose sa propre photolimitation *(Cf.* Annexe 2).

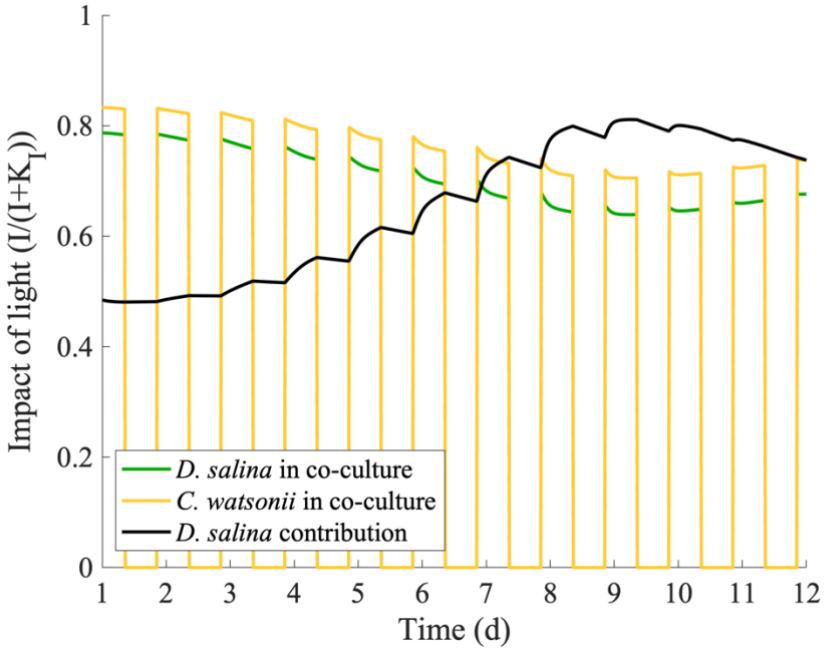

Figure 62 : Impact de la variation de l'intensité lumineuse sur *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution de *D. salina* à l'atténuation de la lumière au cours du temps en co-culture.

En co-culture, *D. salina* et *C. watsonii* sont également en compétition pour le CO_2 la journée. Cette partie confirme que *D. salina* a une activité photosynthétique plus forte que *C. watsonii* car elle contribue à 69% de la consommation du CO_2 en co-culture (Figure 61) pour augmenter sa concentration cellulaire (Figures 52, 63). Les deux microorganismes sont cependant impactés de la même manière car elles ont la même affinité pour le CO_2 (Figure 63). La présence de *D. salina* limite cependant l'accès au carbone nécessaire à l'accumulation d'énergie et à la croissance cellulaire de *C. watsonii* en co-culture. Cela est confirmé par la contribution à la consommation du CO_2 par *D. salina* en co-culture PVDF qui est de 94% (Figure 61). *D. salina* est alors seulement impactée car sa propre dynamique liée au CO_2 qui limite son développement cellulaire (*Cf.* Annexe 2). Ceci confirme que la diffusion de CO_2 à travers la membrane a un impact mineur sur les dynamiques liées au CO_2 et la compétition pour ce nutriment en co-culture PVDF.

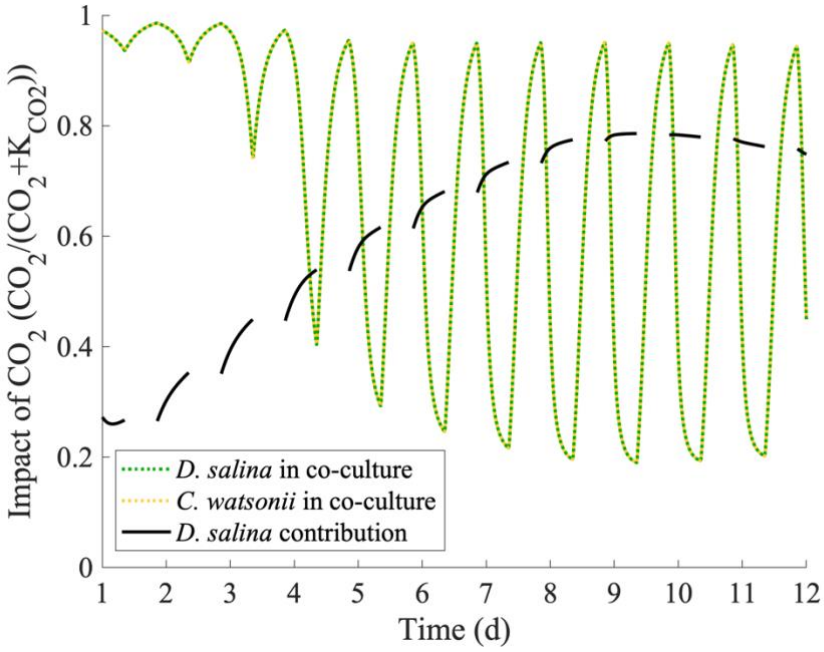

Figure 63 : Impact de la limitation pour le CO_2 de *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution de *D. salina* à la limitation pour le CO_2 au cours du temps en co-culture.

En co-culture, *D. salina* et *C. watsonii* sont également en compétition pour l'O_2 la nuit. *D. salina* consomme 5% de l'O_2 disponible au début de l'expérience puis 25% à la fin de celle-ci (Figure 61), confirmant l'activité respiratoire plus conséquente de *C. watsonii* entraînant la limitation du niveau d'O_2 observée en co-culture (Figure 56). *C. watsonii* contribue en effet à 75% de la consommation de l'O_2 en co-culture, ce qui atteste de sa forte respiration de jour comme de nuit pour diminuer le niveau d'O_2 même lorsque sa croissance cellulaire est limitée. La présence de *C. watsonii* limite donc l'accès à l'O_2, ce qui impacte peu *D. salina* (Figures 52, 64), sûrement grâce au bullage d'air qui limite la compétition pour cette ressource. D'après le modèle, *C. watsonii* et *D. salina* ne sont pas impactées par les variations d'O_2 du milieu. De même que pour le CO_2, *D. salina* contribue à 15% de la consommation totale d'O_2 en co-culture PVDF (Figure 61), ce qui indique que la diffusion d'O_2 à travers la membrane a un impact mineur sur les dynamiques de l'O_2.

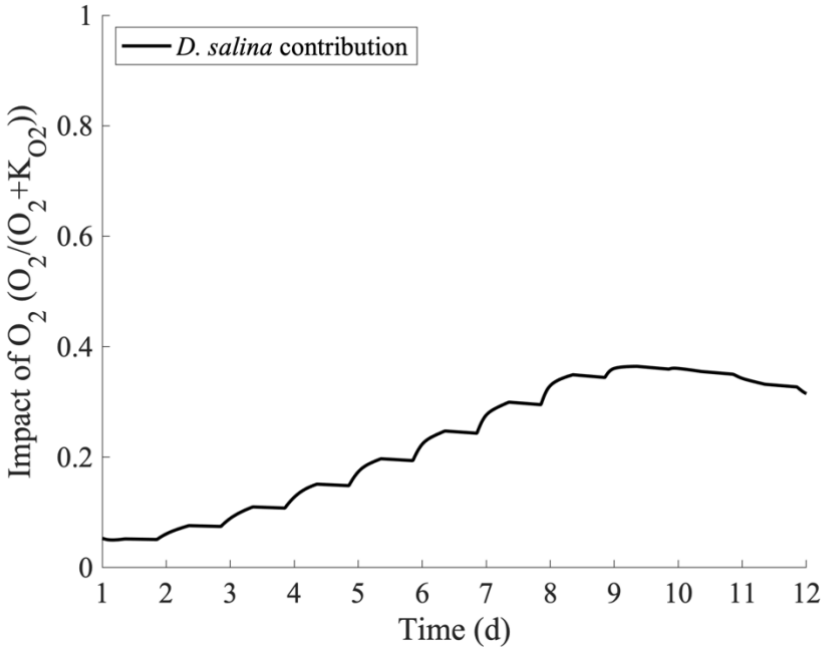

Figure 64 : Contribution de *D. salina* à la consommation d'O_2 au cours du temps en co-culture.

5 Conclusions

Ce modèle a permis de représenter correctement les données expérimentales de mono-cultures et de co-cultures avec et sans séparation membranaire de *Dunaliella salina* et de *Crocosphaera watsonii*. Ces systèmes de culture originaux ont ainsi été modélisés pour la première fois et les dynamiques simulées au sein de l'assemblage ont été validées expérimentalement. Les transferts sont pris en compte et modulent les interactions. Le modèle intègre toutes les interactions impactant *D. salina* et *C. watsonii* qui concernent la compétition pour la lumière, l'effet allélopathique de la cyanobactérie sur la microalgue et les dynamiques O_2/CO_2, rarement prises en compte de manière simultanée. Ces dynamiques O_2/CO_2 mettent en évidence une compétition pour le CO_2 entre *D. salina* et *C. watsonii* mais pas pour l'O_2. Le modèle permet notamment de mettre en évidence le découplage entre croissance et photosynthèse : l'oxygène continue à être produit et le CO_2 est toujours fixé alors que la croissance a cessé après la disparition des nutriments. Une quantité importante de carbone est également réexcrétée durant cette période. Ce modèle atteste de la complexité des interactions au sein d'un écosystème et permet d'identifier la contribution de chaque microorganisme.

Ce modèle peut être amélioré notamment pour la dynamique du pH, et donc du CO_2. Des expériences courtes dédiées à la mesure de l'activité photosynthétique peuvent être réalisées par la suite pour mieux identifier les paramètres dédiés à cette dynamique comme réalisé par Béchet et al. (2017).

Conclusions et perspectives

Cette thèse s'inscrit dans un contexte de changement de paradigme de la culture industrielle de microalgues où les polycultures permettent de réduire les impacts environnementaux et les coûts économiques. Des co-cultures ont en effet conduit à une augmentation de la résilience et de la productivité (Fouilland, 2012). En particulier, l'assemblage de microalgues et de cyanobactéries diazotrophes est une voie prometteuse pour favoriser la production de biomasse et de molécules d'intérêt, tout en diminuant l'apport d'engrais azoté (Gonçalves et al., 2016). Les interactions au sein d'un écosystème sont cependant complexes et peuvent être négatives (production de molécules allélopathiques, compétition), positives (échanges de nutriments) ou neutres (Bittencourt-Oliveira et al., 2015; Le Chevanton et al., 2013). Elles sont également dynamiques et dépendent des conditions environnementales (Le Chevanton et al., 2016).

La microalgue d'intérêt économique *Dunaliella salina* et la cyanobactérie diazotrophe *Crocosphaera watsonii* ont été cultivées ensemble. Cet assemblage devait permettre l'augmentation de la production de biomasse de *D. salina* en limitant l'apport d'engrais azoté grâce à l'excrétion d'azote dérivé de la diazotrophie par *C. watsonii*. Cette thèse a mobilisé des approches expérimentales et des approches de modélisation mathématique pour appréhender au mieux les interactions au sein de cet assemblage artificiel. Les principales conclusions obtenues sont décrites ci-après.

La compétition pour la lumière, l'interaction principale entre *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii*

L'objectif premier de cette thèse était de caractériser les interactions entre *Dunaliella salina* et *Crocosphaera watsonii*. Des mono-cultures et des co-cultures ont tout d'abord été étudiées dans le Chapitre 3. Il a été remarqué que l'interaction principale au sein de l'assemblage était la compétition pour la lumière qui favorisait *D. salina* et limitait la croissance de *C. watsonii*. La cyanobactérie limitée produisait alors peu d'azote organique dissous (DON) dérivé de la diazotrophie. De plus, cet azote n'était pas assimilé par *D. salina.* Ceci a été confirmé lors d'une co-culture avec une culture dense de *C. watsonii* (Chapitre 3) où la cyanobactérie produisait alors du DON mais aucun gain de biomasse n'était observé pour *D. salina*. Il a pourtant été montré que cette forme azotée produite par *C. watsonii* était assimilable par d'autres espèces

phytoplanctoniques (Berthelot et al., 2016). Nos expériences ont par ailleurs permis de mettre en avant un effet allélopathique négatif de *C. watsonii* sur *D. salina* en co-culture. Aucune propriété allélopathique n'avait jusqu'alors été observée chez *C. watsonii* mais les cyanobactéries sont connues pour produire des molécules allélochimiques (Dias et al., 2017; Dunker et al., 2017). Le modèle mathématique de compétition entre *D. salina* et *C. watsonii* décrit dans le Chapitre 4 et basé sur les travaux de Bernard (2011), Bougaran et al. (2010) et Grimaud et al. (2014) a permis de mieux appréhender les différentes interactions observées expérimentalement et a confirmé l'existence potentielle de cet effet allélopathique de *C. watsonii* sur *D. salina*.

Les bactéries, des microorganismes nécessaires à la croissance du phytoplancton

D'autres études ont mis en avant une augmentation de la production de biomasse lors de l'ajout de bactéries qui favorisaient les échanges de nutriments (Chapitre 1). Cependant, le *screening* d'espèces bactériennes susceptibles de reminéraliser les excrétions riches en azote sont longues et laborieuses (Le Chevanton et al., 2013; Vu et al., 2018). Dans notre cas, il aurait fallu étudier l'impact de chaque bactérie potentiellement intéressante sur *D. salina* et *C. watsonii*, séparément, puis en co-culture. De plus, ces expériences de sélection de bactéries reminéralisatrices nécessitent l'utilisation de souches axéniques pour étudier précisément les interactions entre ces bactéries et la souche sélectionnées.

Dans notre cas, la souche de *C. watsonii* étudiée était probablement associée à un cortège bactérien dont il n'a pas été possible de s'affranchir. En effet, les différentes tentatives pour éliminer les bactéries de la phycosphère ont conduit à une souche qui ne poussait plus (Sophie Rabouille, comm. pers.). Les mesures par cytométrie en flux ont également démontré que cette population bactérienne restait toujours minoritaire en biomasse par rapport à celle de *C. watsonii*, mais il y a très vraisemblablement une symbiose obligatoire avec ces bactéries. Ainsi, les propos doivent être nuancés car les interactions que nous avons décrites autour de *C. watsonii* pourraient être liées à son cortège bactérien associé. De même, la souche de *D. salina* étudiée était associée à son propre cortège bactérien car l'axéniser peut la rendre moins productive (Le Chevanton et al., 2013). Les expériences se sont cependant déroulées dans des conditions stériles et les cultures n'ont pas été contaminées par des microorganismes extérieurs si bien que la biomasse bactérienne est restée minoritaire au cours des expériences. Un

screening de bactéries reminéralisatrices du DON devra donc aussi prendre en compte la compatibilité avec les bactéries des cortèges de *C. watsonii* et de *D. salina*. Remarquons tout de même que dans la perspective de cultures ouvertes à grande échelle, il ne serait de toute façon pas utile d'axéniser les souches qui seraient quoi qu'il arrive naturellement contaminées par les microorganismes de l'environnement (Lam et al., 2018; Vu et al., 2018).

Même si nous n'avons pas réalisé cette expérience de *screening*, le modèle mathématique a pu simuler la reminéralisation par des bactéries de l'azote produit par *C. watsonii* et sa biodisponibilité pour *D. salina*. Cette reminéralisation augmentait la production de biomasse de *D. salina.* Cependant, ce scénario théorique, probablement très optimiste sur le gain de productivité induit pour *D. salina*, ne conduisait au final qu'à un gain de biomasse très modéré. La forte compétition pour la lumière pénalisait effectivement la croissance de la diazotrophe et le flux d'azote recyclé au sein de l'assemblage restait extrêmement limité. L'outil de modélisation mathématique, en plus d'améliorer la compréhension des interactions entre *D. salina* et *C. watsonii*, a permis de prédire que le recyclage par des bactéries n'est pas une solution suffisante pour stimuler la croissance de *D. salina* en co-culture avec *C. watsonii*. Ce résultat est sans doute vrai quel que soit le type d'assemblage considéré entre une microalgue et une cyanobactérie diazotrophe. La culture à haute densité de la microalgue d'intérêt (condition nécessaire de rentabilité industrielle) associée à une diazotrophe ne permet pas un flux photonique suffisant dans la culture pour supporter le coût énergétique lié à l'activité diazotrophe. L'idée d'une co-culture avec des bactéries non photosynthétiques garde donc tout son sens pour occuper les différentes niches écologiques de l'écosystème et limiter les contaminations extérieures. Même si elles n'ont pas d'effet direct sur les microalgues, à partir du moment où ces bactéries consomment les ressources nécessaires au développement d'autres populations potentiellement nuisibles pour les microalgues, elles réduiront les risques de développement des contaminants biologiques y compris pour des déploiements à grande échelle sur des systèmes ouverts (Lian et al., 2018).

Même en supprimant la compétition pour la lumière, la biomasse de *Dunaliella salina* n'augmente pas

Dans un deuxième temps, il fallait s'affranchir de la compétition pour la lumière pour espérer favoriser les interactions positives et les échanges azotés entre *C. watsonii* et *D. salina*. Grâce aux systèmes de co-culture avec séparation membranaire développés au LOV par Ternon et al.

(2018), il a été possible de co-cultiver *C. watsonii* et *D. salina* sans contact cellulaire (Chapitre 5). Cette co-culture sans contact n'a pas permis de favoriser la production de biomasse de *D. salina* malgré la forte croissance de *C. watsonii* et la production d'azote dérivé de la diazotrophie. L'effet allélopathique de *C. watsonii* sur *D. salina* ne s'est cependant pas manifesté en co-culture séparée. Il s'est produit exclusivement en co-culture et le modèle décrit dans le Chapitre 6 confirme quantitativement cette observation. Un contact cellulaire est donc vraisemblablement nécessaire pour affecter la compétitrice de la cyanobactérie. Cette observation montre que les co-cultures par échanges membranaires ont un réel potentiel. Elles empêchent la compétition pour la lumière et en même temps réduisent les inhibitions allélopathiques. Trouver une espèce bactérienne, ou un assemblage bactérien, capable de reminéraliser l'azote produit par *C. watsonii* permettrait alors de stimuler la croissance de *D. salina* dans le compartiment voisin.

Cependant, cette observation soulève d'autres questions. En effet, l'allélopathie et son rôle au sein des écosystèmes sont encore méconnus (Bittencourt-Oliveira et al., 2015). Il serait intéressant de savoir si les molécules impactant négativement les autres microorganismes sont produites constamment ou seulement en présence d'un compétiteur. Ceci peut être vérifié par des expériences complémentaires. Il faut ainsi co-cultiver *D. salina* et *C. watsonii* pour être certain que *C. watsonii* produise des molécules allélochimiques. Puis récupérer le filtrat et inoculer des mono-cultures de *D. salina* et de *C. watsonii*. Ainsi, dès lors que les molécules excrétées par *C. watsonii* ne sont pas retenues par le filtre, il serait possible de vérifier si *D. salina* peut se développer sans être affectée.

Il faudrait également analyser les molécules excrétées par *C. watsonii* en présence et en l'absence d'un compétiteur pour comprendre si les molécules allélopathiques ont un rôle de structuration, de communication ou d'échange au sein de la communauté. Certaines molécules pourraient en effet être seulement assimilable par la colonie de *C. watsonii* et permettre des échanges nutritifs au sein de celle-ci. Au-delà de l'intérêt écologique de ces molécules, leur identification et leur isolation pourraient également avoir un intérêt économique, notamment dans la pharmaceutique. Cela est déjà le cas chez certaines cyanobactéries productrices de molécules antibiotiques (Dias et al., 2017).

Des dynamiques liées aux métabolismes différents au sein de l'assemblage

D. salina et *C. watsonii* sont deux organismes photosynthétiques avec des dynamiques O_2/CO_2 spécifiques à chacune. Des interactions de compétition pour le CO_2 le jour et pour l'O_2 la nuit ont été observées. Les expériences décrites dans le Chapitre 5 ont montré qu'elles étaient effectivement en compétition pour le CO_2 la journée, avec une situation plus favorable à la croissance de *D. salina*. En effet, *D. salina* a une activité photosynthétique plus importante que *C. watsonii.* Par conséquent, la cyanobactérie semble augmenter son activité respiratoire au détriment de son entretien cellulaire pour réduire la forte teneur en O_2 causée par *D. salina* en co-culture la journée. Une estimation de la viabilité cellulaire a effectivement montré l'impact négatif de la présence de *D. salina* sur la cyanobactérie. La nuit, elles sont en compétition pour l'O_2 qui favorise *C. watsonii* grâce à sa respiration accrue et nécessaire pour son activité diazotrophe. La forte respiration nocturne de *C. watsonii,* permettant de réduire le niveau d'O_2 et d'activer la nitrogénase, est renseignée dans la littérature (Gradoville et al., 2014; Masuda et al., 2018) mais rien n'est connu sur sa propension à réduire l'O_2 au cours de la journée. Cette compétition pour l'O_2 la nuit semble cependant ne pas impacter *D. salina*. L'approche théorique développée ensuite à l'aide d'un modèle mathématique a permis de quantifier cette double dynamique O_2/CO_2 et de montrer que les hypothèses émises permettaient d'expliquer précisément les observations.

Dans nos expériences, le flux d'air dans les cultures a réduit les effets de cette double compétition, celle-ci pouvant être facilement modulée en jouant sur le $K_L a$ du procédé ou sur les flux d'O_2 et de CO_2. En effet, le transfert du CO_2, et donc celui de l'O_2, des bulles vers la phase liquide peuvent être optimisés en augmentant par exemple le débit d'air du système et en diminuant la taille des bulles. Un nombre important de bulles augmente la surface d'échange entre le gaz et l'eau (Zhang et al., 2002) tandis que des bulles de petites tailles peuvent se dissoudre totalement avant de remonter à la surface. Les transferts du CO_2 et de l'O_2 vers la phase liquide sont alors favorisés et les pertes vers l'atmosphère réduites. Ces flux plus rapides de CO_2 et d'O_2 vers le milieu peuvent ainsi mieux compenser l'absorption de ces deux éléments par la culture et limiter la compétition.

Un modèle mathématique, outil indispensable pour guider les travaux de recherche

Le modèle développé a permis de mieux comprendre les interactions observées expérimentalement. Il est toutefois possible d'affiner ce modèle pour gagner en précision. Pour ce faire, des expériences courtes de caractérisation de l'activité photosynthétique de *D. salina* et *C. watsonii* pourraient être effectuées. Des essais ont été réalisés au LOV grâce au « PI meter » développé par Béchet et al. (2015). Ce système fermé permet de tester l'activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse et de la température lors d'expériences courtes de 30 min. Même si ces tests sont faciles à interpréter en mono-cultures, il est plus compliqué d'interpréter la part de chacune dans les variations d'O_2 et de CO_2 en co-culture sur de si courtes périodes de jour et de nuit. En effet, il faut prendre en compte l'impact des différentes interactions à la fois sur le court et le long terme. Les tests effectués avaient mis en évidence que le niveau d'O_2 était toujours limité en co-culture même lors de fortes intensités lumineuses limitant l'autoombrage de *D. salina* et *C. watsonii*. Ils n'avaient cependant pas permis d'interpréter avec précision les dynamiques liées à l'O_2 et au CO_2 en co-culture. Par ailleurs, nous avons montré dans cette thèse qu'il pouvait y avoir un découplage très marqué entre la production d'O_2 ou la consommation de CO_2 et la croissance cellulaire, en particulier en cas de carence en azote (Chapitre 6). Cela signifie que le « PI meter » ne peut pas être utilisé en cas de carence azotée. Des recherches supplémentaires doivent donc être menées pour optimiser cet outil et mesurer efficacement l'impact de l'activité photosynthétique en co-cultures.

Les plus fortes teneurs en O_2 dissous en présence de *D. salina* semblent impacter négativement *C. watsonii*. Cet aspect doit être intégré dans le modèle pour affiner la simulation des cycles de CO_2 et d'O_2. Prendre en compte la mortalité cellulaire en fonction de la teneur en O_2 permettrait également de corriger la sous-estimation de la croissance de la cyanobactérie. Des modifications du modèle dans ce sens se sont montrées prometteuses. Elles nécessitent cependant plus de recherche pour améliorer le compromis entre une moins grande flexibilité du modèle en diminuant le nombre de paramètres et une meilleure représentation des données. L'utilisation d'un critère d'information type Akaike permettra également de voir si un modèle contenant davantage de paramètres (donc plus flexible et forcément mieux ajusté) propose un réel gain.

D'un autre côté, la compétition pour le CO_2 en co-culture peut être levée en régulant le pH par un apport de CO_2 pendant la journée. Cette régulation repose sur l'injection de CO_2 dans la culture dès que le pH augmente pour compenser la consommation du CO_2. Le modèle mathématique, une fois les dynamiques O_2/CO_2 optimisées, pourrait simuler cette régulation par le pH. Cependant, il faut avoir également caractérisé expérimentalement l'impact du pH sur la croissance de chaque microorganisme. Cette étude mathématique permettrait alors de définir différents scénarios de productivité de biomasse en co-culture en fonction du pH à différentes échelles. Le modèle pourrait également prédire les différents transferts de CO_2 pour favoriser les échanges des bulles vers l'eau et l'absorption par la culture tout en limitant les pertes atmosphériques. Cela a déjà été étudié théoriquement pour la culture à grande échelle pour *D. salina* mais en utilisant un modèle extrêmement simple en mono-culture (*Cf.* Annexe 4). Le modèle permettrait d'identifier un scénario d'optimisation de la production de biomasse tout en limitant les pertes de CO_2 atmosphériques, dans une double optique économique et environnementale.

Conclusions et perspectives de cette thèse

L'assemblage artificiel de la cyanobactérie diazotrophe *Crocosphaera watsonii* et de la microalgue *Dunaliella salina* ne s'est malheureusement pas révélé idéal car il n'a pas permis de favoriser la production de biomasse en diminuant l'apport de fertilisant azoté. Des bactéries reminéralisatrices pourraient recycler une partie de l'azote dérivé de la diazotrophie et le rendre biodisponible pour le compartiment de *D. salina* lorsque les réactions allélopathiques ne sont pas déclenchées en co-culture avec séparation membranaire. Ce système de co-culture est également une solution prometteuse pour s'affranchir de la compétition pour la lumière en co-culture.

Cette association a cependant permis de caractériser de manière complète les interactions au sein d'un assemblage artificiel. Cette étude a en effet mis en évidence une compétition pour la lumière favorisant la microalgue, un effet allélopathique de la cyanobactérie, une compétition pour le CO_2 et la régulation du niveau d'O_2 par *C. watsonii* la journée (Figure 65). Les interactions identifiées sont complexes et permettent d'apporter de nouveaux éléments de réponse dans le domaine des interactions microalgues-bactéries. De plus, cette étude confirme l'importance de coupler expérimentations et modélisation pour comprendre toutes les interactions et le rôle de chaque organisme au sein d'un écosystème. Réel outil de

compréhension, le modèle sert également d'outil prédictif pour de futures expériences d'optimisation de co-culture.

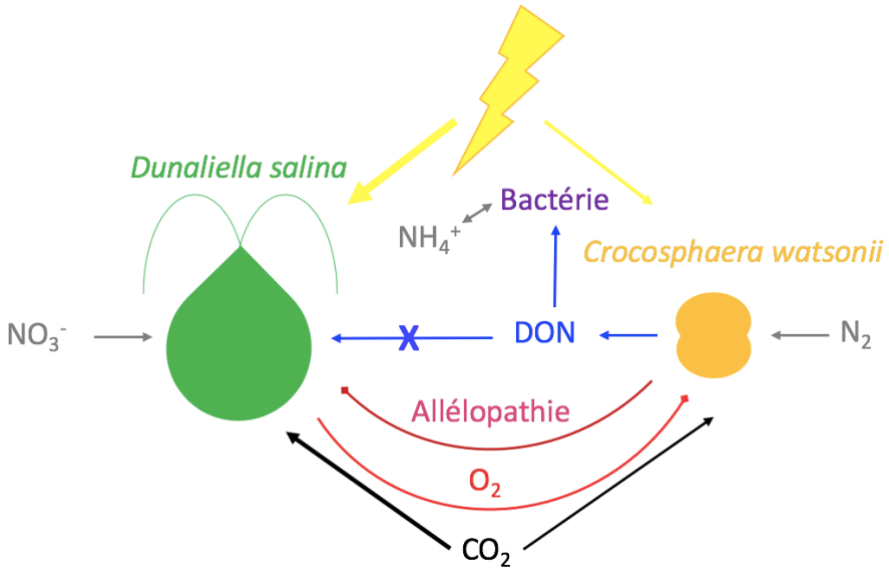

Figure 65 : Schéma bilan des interactions entre *D. salina* et *C. watsonii*

Il serait par ailleurs intéressant d'étudier d'autres assemblages composés de bactéries reminéralisatrices d'azote organique, de cyanobactéries diazotrophes et de microalgues qui se retrouvent naturellement dans le même milieu. Ces microorganismes auraient les mêmes besoins environnementaux et auraient l'habitude de coexister, ce qui permettrait de minimiser les interactions négatives. Les différentes associations peuvent avoir pour but d'occuper les différentes niches de l'écosystème pour limiter les contaminations ou pour optimiser la production de molécules d'intérêt et de biomasse. Une fois un assemblage idéal identifié à l'échelle du laboratoire, celui-ci pourra être déployé à l'échelle pilote puis à l'échelle industrielle. Chaque échelle nécessite cependant une optimisation du système de culture dans un souci de pérennité économique et environnementale. Ceci concerne notamment le maintien de l'écosystème sélectionné en limitant les contaminations extérieures, la limitation de l'auto-ombrage et l'optimisation d'injection de gaz et de la récolte.

Annexes

Annexe 1 – Chapitre 3

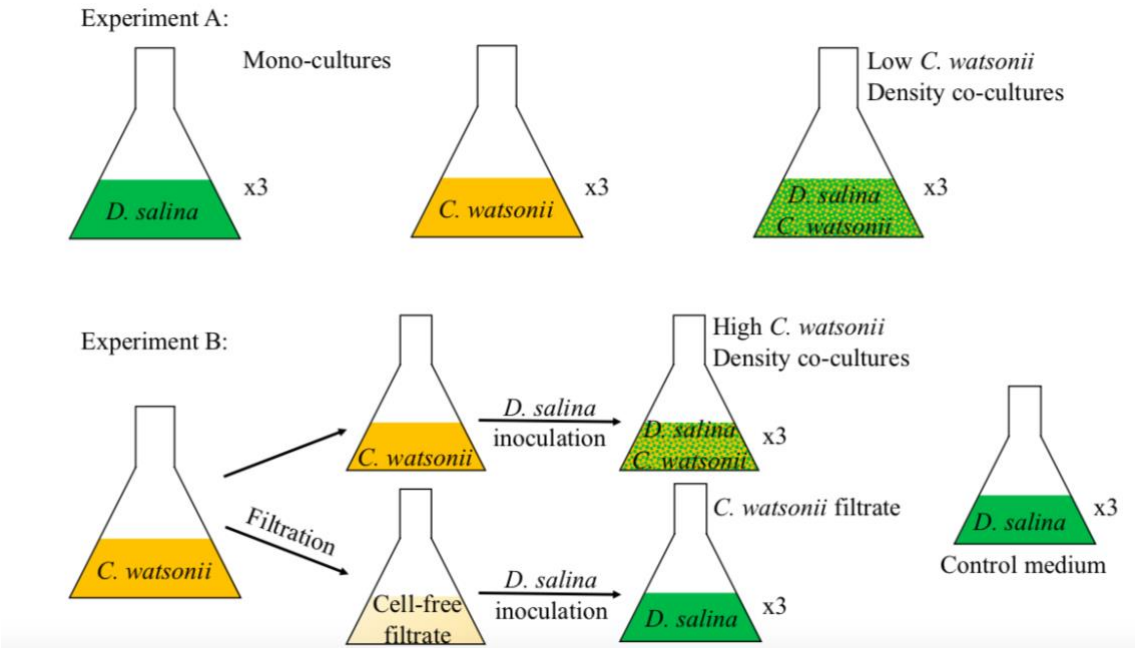

Figure 66: Experimental set-ups

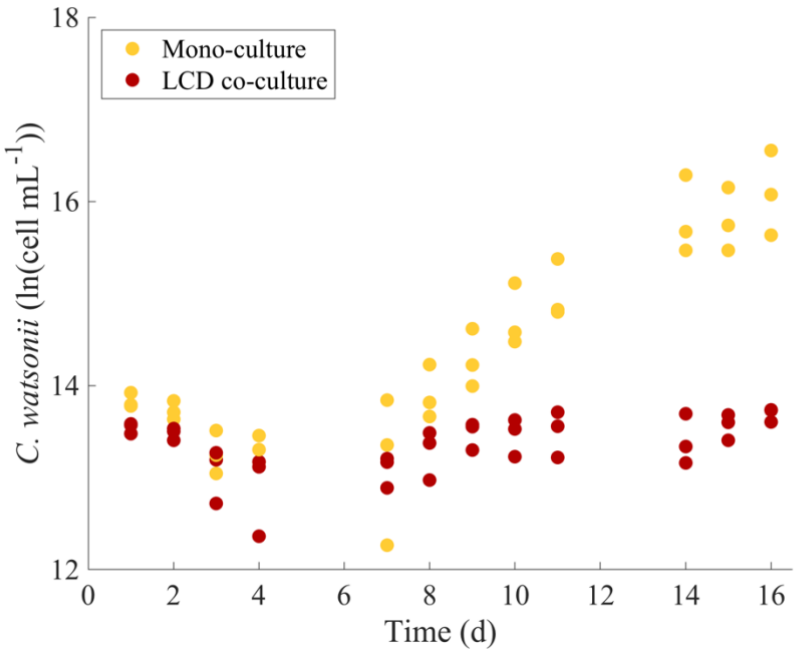

Figure 67: *C. watsonii* cell densities over time in triplicates of mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A)

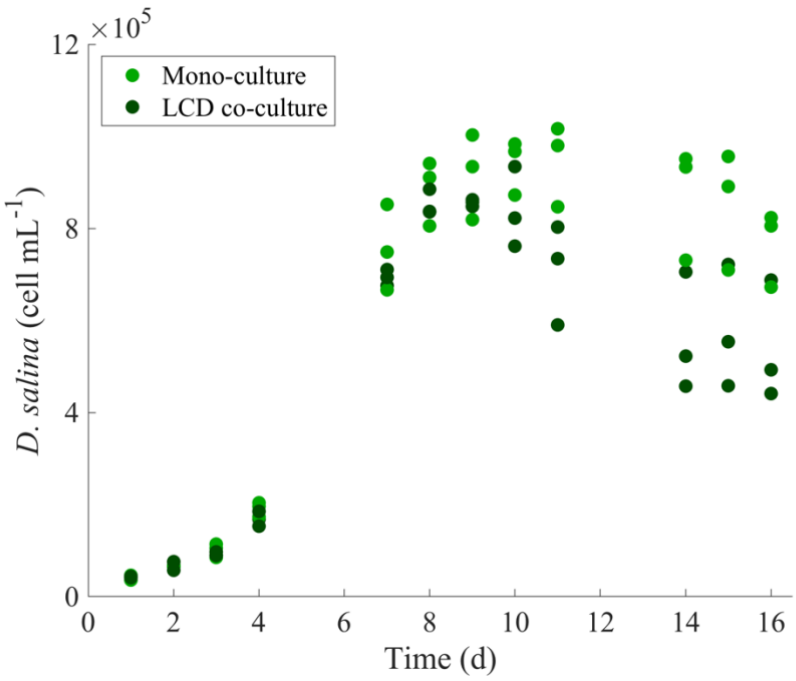

Figure 68: *D. salina* cell densities over time in triplicates of mono-cultures and Low *C. watsonii* Density co-cultures (Experiment A)

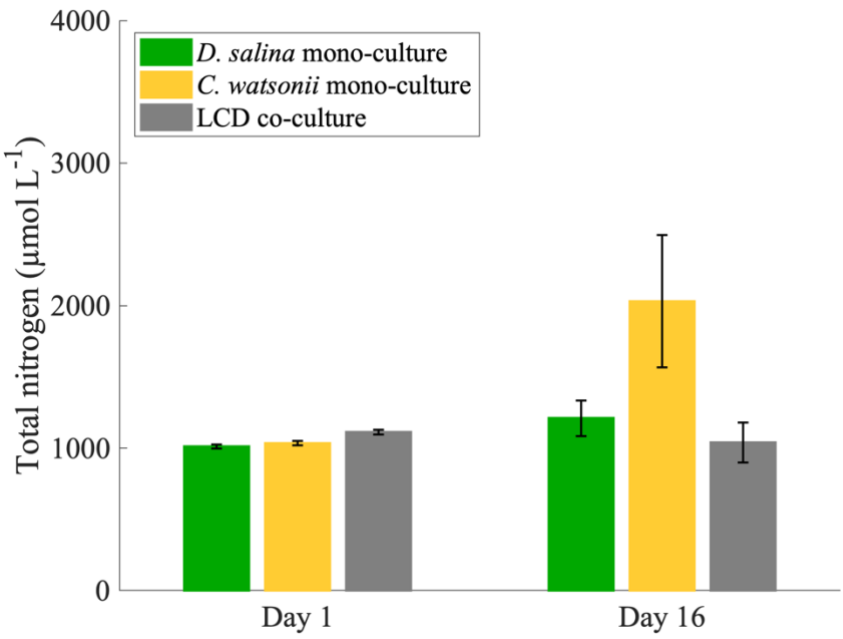

Figure 69: Total nitrogen (particulate and dissolved) at the beginning and at the end of *D. salina*, *C. watsonii* mono-cultures and in Low *C. watsonii* density co-cultures (Experiment A).

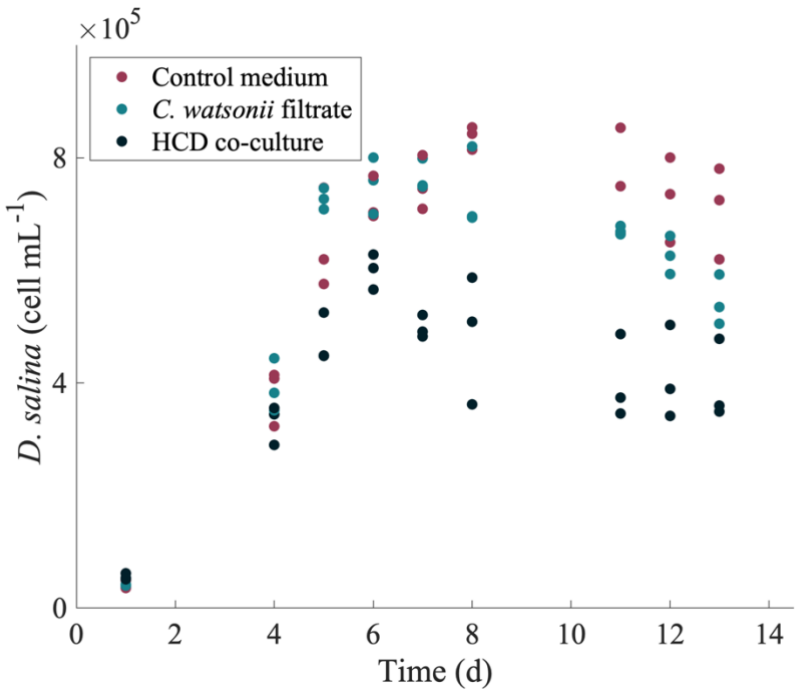

Figure 70: *D. salina* cell densities over time in triplicates in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B)

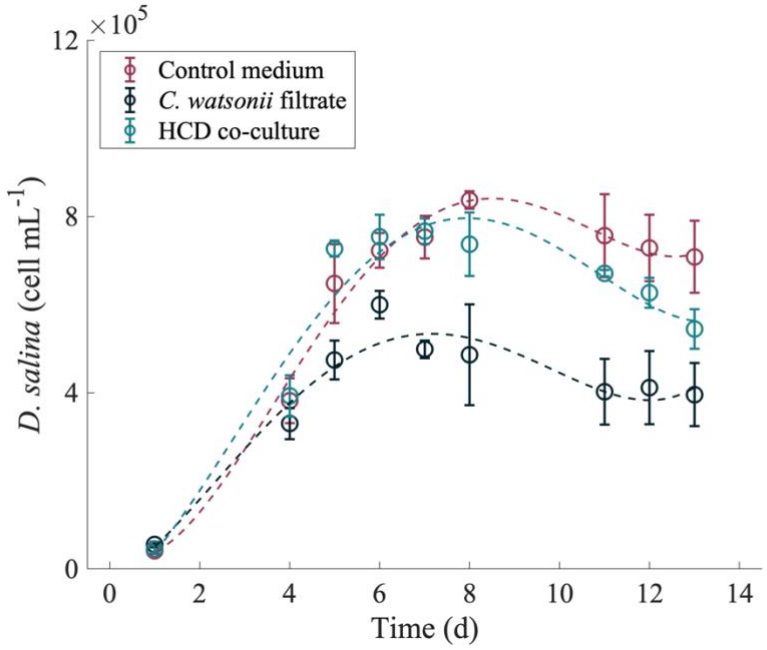

Figure 71: *D. salina* cell densities over time in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B). Error bars correspond to the standard deviation between samples (n = 3).

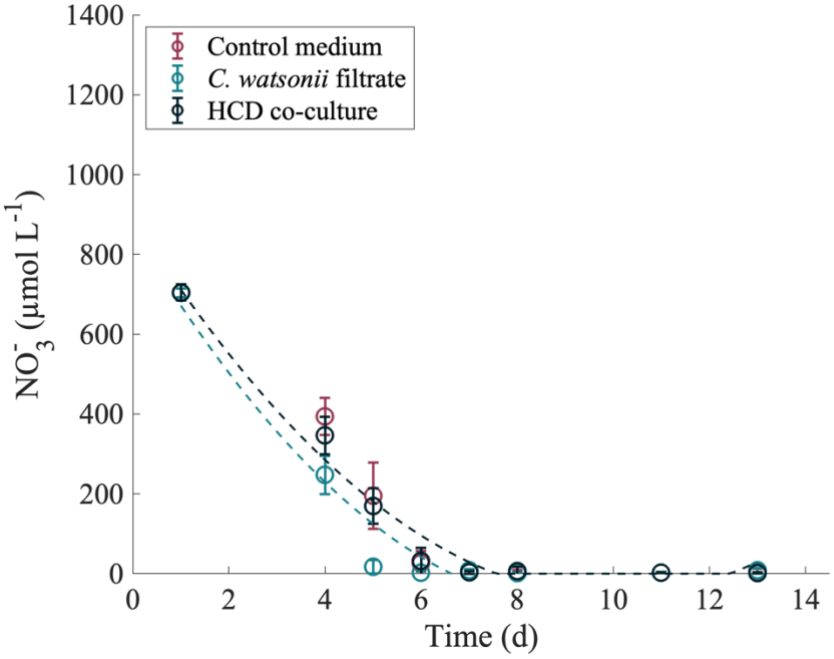

Figure 72: Nitrate over time in *D. salina* cultures in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B).

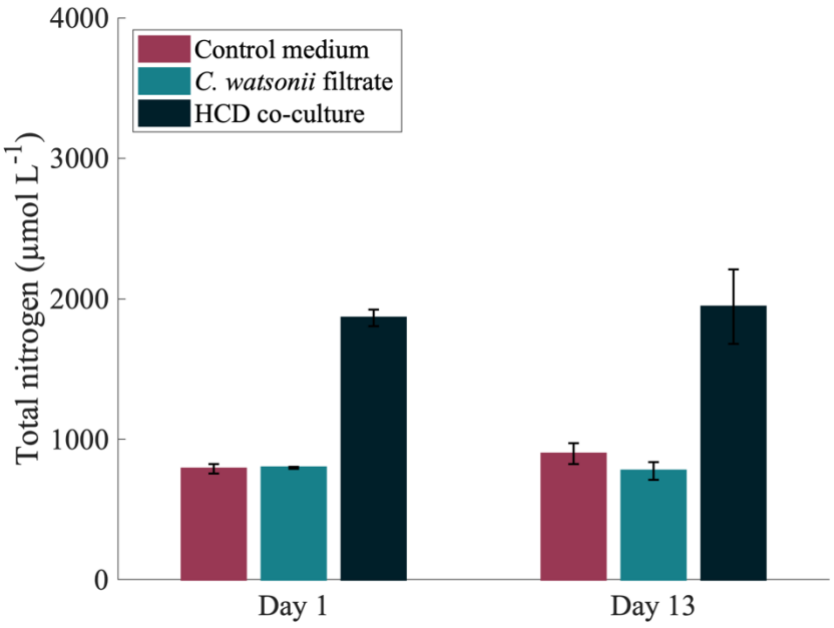

Figure 73: Total nitrogen (particulate and dissolved) at the beginning and at the end of *D. salina* cultures in control medium and in High *C. watsonii* Density filtrate and co-cultures (Experiment B).

Annexe 2 – Chapitre 6

L'expérience de calibration représentée par les FiguresFigure 74 Figure 76 a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'expérience utilisée pour la validation. Cependant, *C. watsonii* et *D. salina* ont été inoculées en même temps à des concentrations respectives de 1.10^6 et 4.10^4 cell.mL^{-1}. Il y avait également deux fois plus de nitrates en co-culture PVDF dans cette expérience de calibration que dans l'expérience de validation.

L'expérience de calibration représentée par les Figures Figure 77 et Figure 78 a quant à elle été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'expérience utilisée pour la validation.

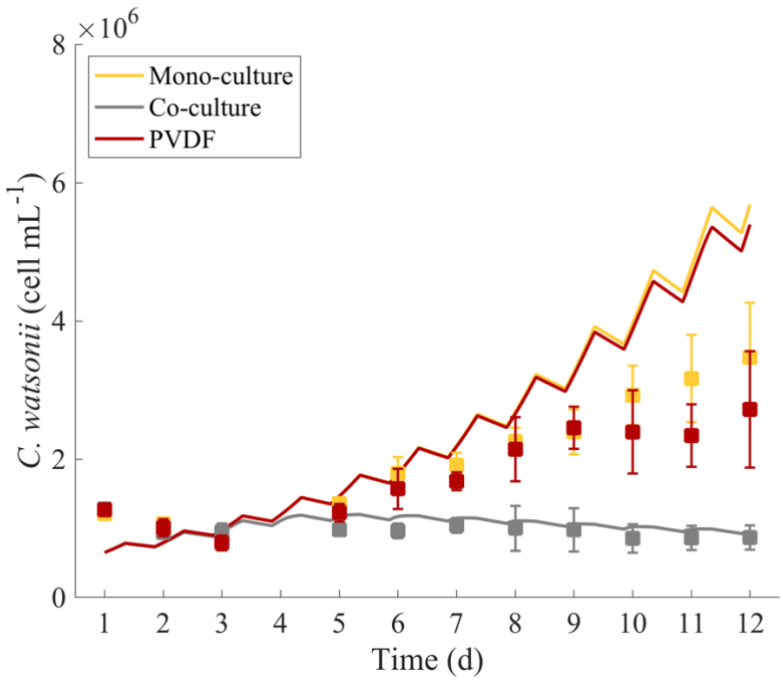

Figure 74 : Expérience 1 de calibration : concentrations cellulaires de *C. watsonii* au cours du temps en mono-culture, co-culture et co-culture PVDF

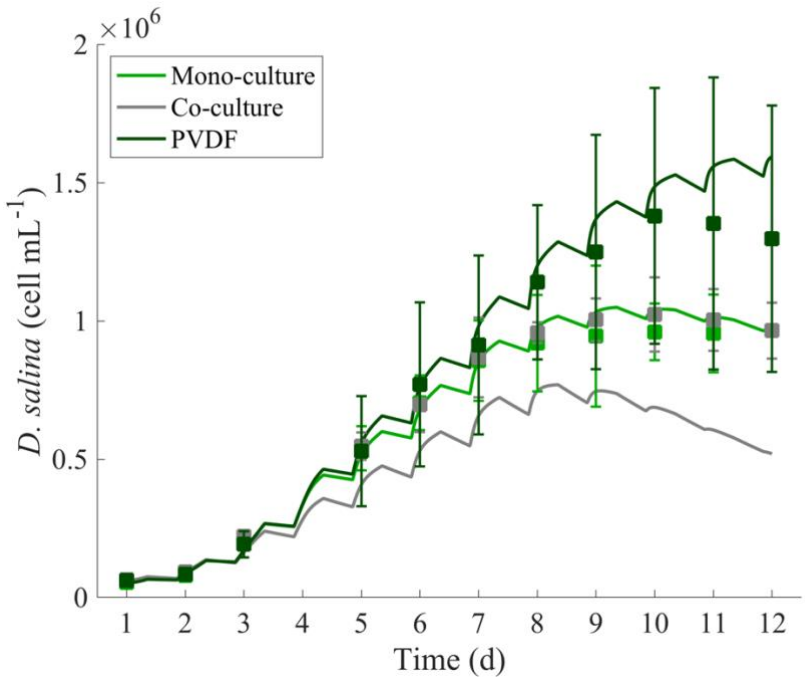

Figure 75 : Expérience 1 de calibration : concentrations cellulaires de *D. salina* au cours du temps en mono-culture, co-culture et co-culture PVDF

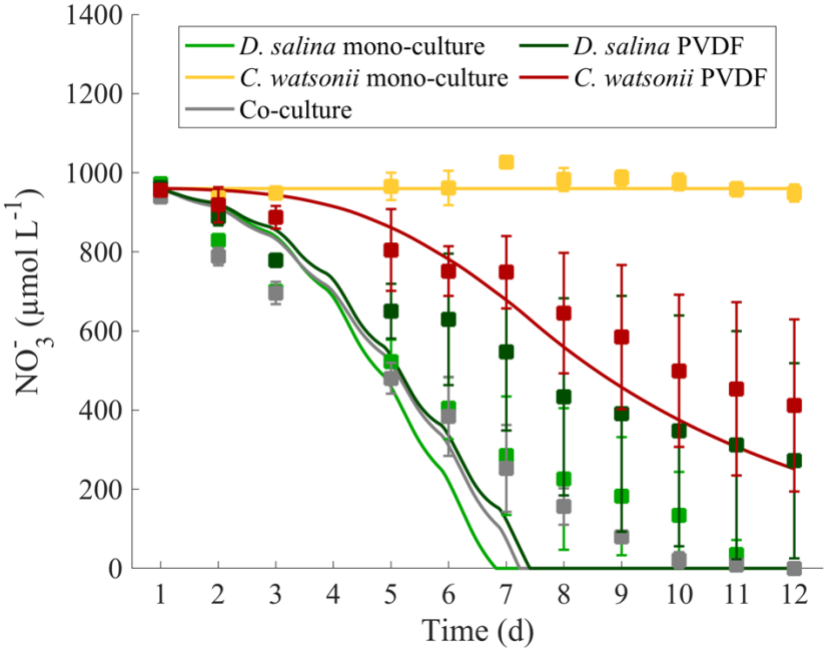

Figure 76 : Expérience 1 de calibration : concentration en nitrates au cours du temps en mono-culture, co-culture et co-culture PVDF

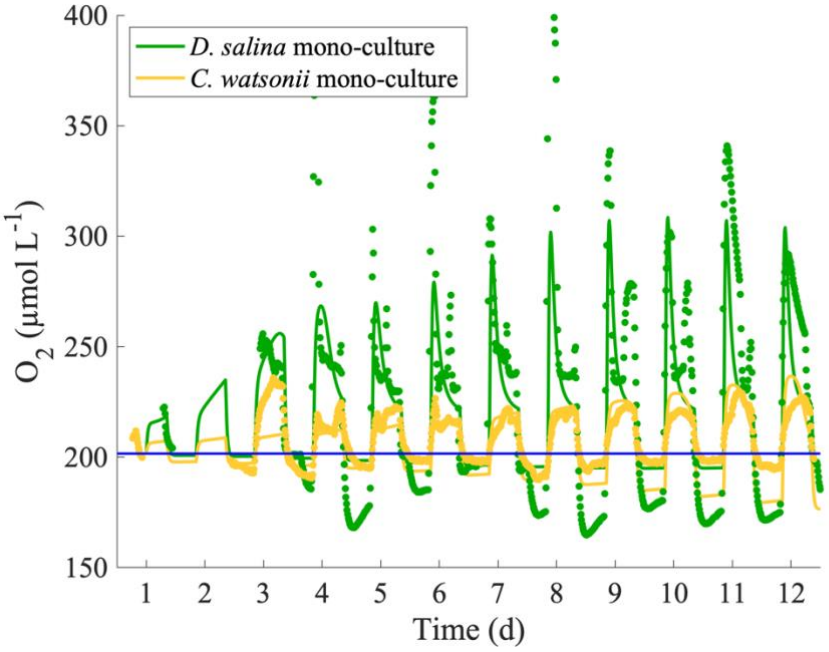

Figure 77 : Expérience 2 de calibration : teneur en O_2 au cours du temps en mono-cultures

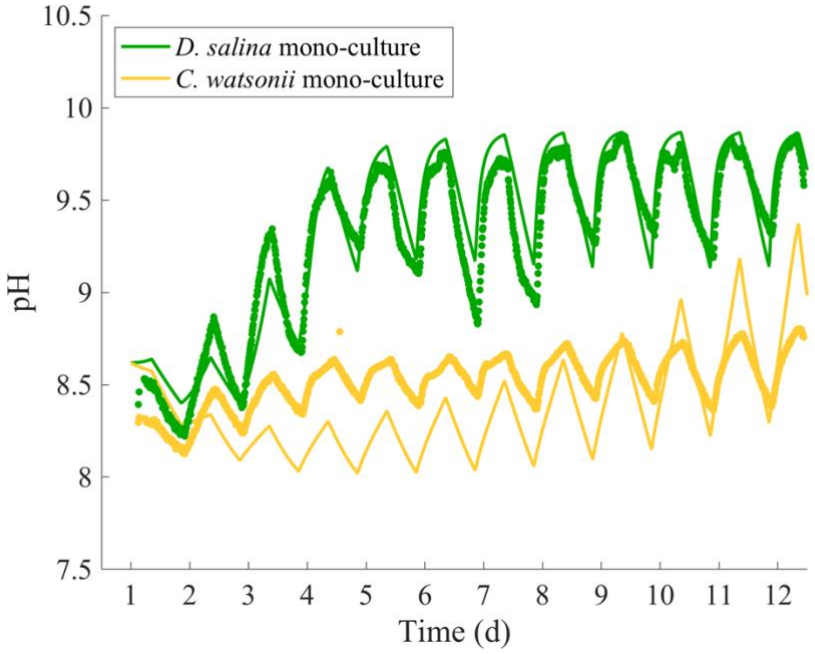

Figure 78 : Expérience 2 de calibration : pH au cours du temps en mono-cultures

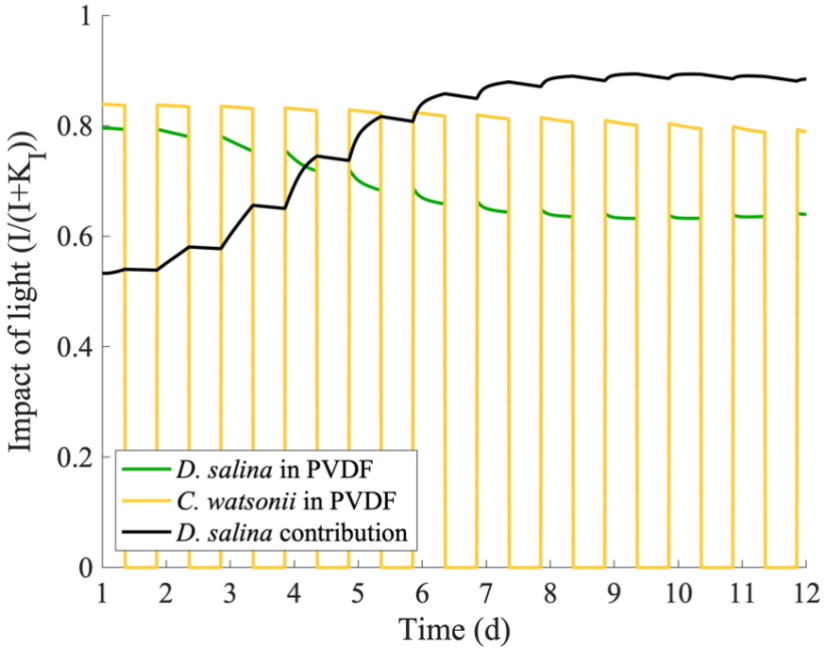

Figure 79 : Impact de l'atténuation lumineuse sur *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture PVDF au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution φ_I de *D. salina* dans la limitation de cette ressource au cours du temps en co-culture PVDF.

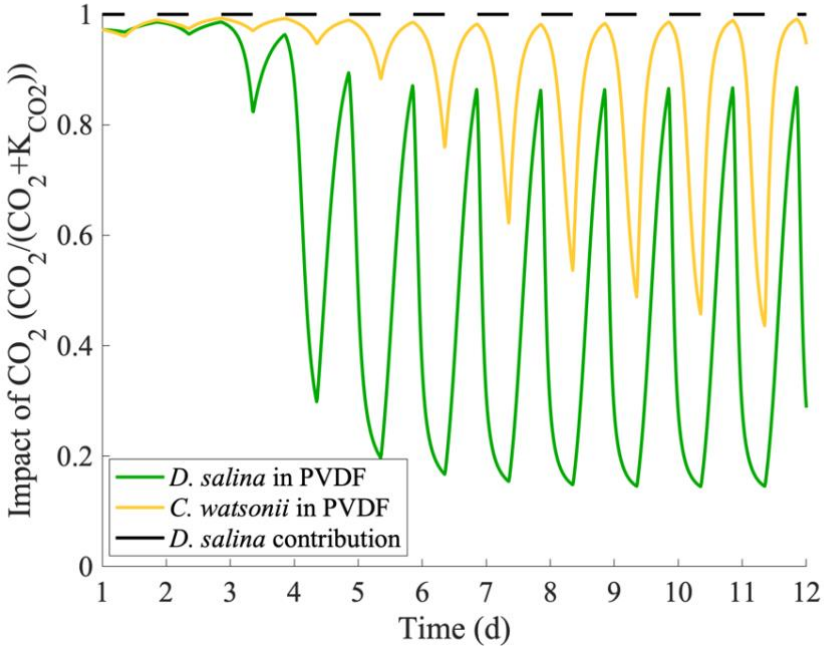

Figure 80 : Impact de la compétition pour le CO_2 de *D. salina* et *C. watsonii* en co-culture PVDF au cours du temps (courbes verte et jaune, respectivement). La courbe noire représente la contribution φ_{CI} de *D. salina* dans cette compétition au cours du temps en co-culture PVDF.

Annexe 3 – "Modelling an artificial microalgae-cyanobacteria ecosystem"

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

IFAC PapersOnLine 51-2 (2018) 655–660

Modelling an Artificial Microalgae-Cyanobacteria Ecosystem

Margaux Caia [*,**,***,1] Olivier Bernard [**,***]
Jean-Philippe Steyer [*]

[*] *LBE, Univ. Montpellier, INRA, Narbonne, France*
[**] *Univ. Nice Côte d'Azur, INRIA BIOCORE, 06902 Sophia Antipolis, France*
[***] *Sorbonne Universités, UPMC, INSU-CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, 06230 Villefranche-sur-Mer, France*

Abstract: Microalgae based processes have been actively studied in the last decades with perspective for food, feed, and source of chemicals such as biofuels. Most of the developments focused on monospecific culture of microalgae, with dedicated practices to avoid any contaminations. However, interactions between microalgae and bacteria are likely to enhance microalgae growth, provide more resilience to external changes and eventually limit external contaminations. But interactions within these natural ecosystems are still poorly understood and are affected by the environment. A photosynthetic marine ecosystem composed of the microalgae *Dunaliella salina* and the nitrogen fixing cyanobacteria *Crocosphaera watsonii* was therefore studied. A model was designed to represent the competition for light and the interactions with nitrogen between these two microorganisms. An allelopathic effect was noticed and a toxin production by *C. watsonii* was assumed and included in the model. Calibration was carried out with experimental data where cell densities and nitrate concentrations were measured. The predictions of the mathematical model accurately represented the experimental data. The model therefore highlighted the interactions within this artificial ecosystem. The model confirms that *D. salina* growth was limited by nitrate concentration and did not consume dissolved organic nitrogen produced by *C. watsonii* from its diazotrophic activity. *D. salina* and *C. watsonii* were competing for light, which favored *D. salina* and limited *C. watsonii* when grown in cocultures. The model supports the hypothesis that *C. watsonii* produced toxins enhancing *D. salina* mortality in the cocultures.

© 2018, IFAC (International Federation of Automatic Control) Hosting by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Interactions, Environmental engineering, Ecology, Modelling, Biotechnology, *Crocosphaera watsonii*, *Dunaliella salina*, Diazotrophy, Nitrogen fixation, Allelopathy.

1. INTRODUCTION

Photosynthetic microalgae are part of the phytoplankton and play a major part in the biogeochemical cycles of the ocean (Minowa and Sawayama, 1999). Microalgae have attracted much interests in the last decade because of their potential to produce, at a high rate and with limited environmental impact, lipids, proteins, antioxidant or pigments which can be used in different industries (Barra et al., 2014). Most of the processes use monospecific microalgae at a high cost to limit external contaminations. However, symbiotic cultures with bacteria or cyanobacteria are likely to enhance microalgae growth, provide more resilience to external changes and eventually limit external contaminations (Le Chevanton et al., 2013). In particular, growing simultaneously microalgae with nitrogen fixing cyanobacteria has been described as a promising way to support the nitrogen need of microalgae (Do Nascimento et al., 2015).

Interactions between microalgae, cyanobacteria and bacteria are still poorly understood (Fouilland, 2012; Fuentes et al., 2016). Interactions between the different organisms can either be positive, negative or neutral (Ramanan et al., 2016). Interactions between algae and bacteria are affected by environmental parameters such as pH, CO_2 and nitrogen source and concentration (Huisman et al., 1999; Le Chevanton et al., 2013; Ying et al., 2014). An artificial ecosystem composed of algae and bacteria is likely to be more resistant to variations in temperature and medium composition and to limit external contaminations by occupying all the ecological niches (Fouilland, 2012).

No living eukaryotic organism is known to uptake atmospheric N_2 as a source of nitrogen whereas it is the principal pathway for nitrogen acquisition in diazotrophic cyanobacteria (Thompson et al., 2012). In particular, the unicellular cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* is known for its high diazotrophic activity. The idea that we explore here is to assemble these cyanobacteria together with *Dunaliella salina*, a microalgae of commercial interest. The N_2 uptaken and partially released in the form of organic dissolved nitrogen (Berthelot et al., 2015, 2016) is therefore expected to be used as a nitrogen substrate by *D. salina*. No negative interactions between cyanobacteria

[1] Corresponding author, email: margaux.caia@nra.fr

2405-8963 © 2018, IFAC (International Federation of Automatic Control) Hosting by Elsevier Ltd. All rights reserved.
Peer review under responsibility of International Federation of Automatic Control.
10.1016/j.ifacol.2018.03.111

and microalgae have been described (Olli et al., 2015) but both *D. salina* and *C. watsonii* use light for photosynthesis. A competition for light is thus expected.

The objective of this work was therefore to assess the main interactions within an artificial ecosystem composed of *D. salina* and *C. watsonii*. A mathematical model was built to support the hypotheses on the interactions and quantify their impacts on overall productivity.

The paper first rapidly presents the experimental material and methods. The ecosystem model is then presented and calibrated. Simulations are then analysed to assess the potential of this ecosystem.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental settings

Medium culture. Seawater was filtered on 0.1 μm. F/2 nutrients were added by filtration to the previously autoclaved filtered seawater (Guillard, 1975).

Monocultures and cocultures of C. watsonii and D. salina. Two monocultures and one coculture of *C. watsonii* and *D. salina* were cultivated in triplicates in batch in 250 mL Erlenmeyers. Non-axenic strains of *C. watsonii* WH8501 and *D. salina* CCAP19/18 were inoculated from cultures kept in exponential growth phase in order to obtain a cellular concentration of respectively 1.10^9 and 4.10^7 cell.L^{-1} to ensure an adequate cyanobacteria/microalgae ratio through the experiment. The cultures were kept in an incubator (SANYO MLR-351, Japan) at 27°C, and at a light intensity of 220 μmol photons.m^{-2}.s^{-1} with a day/night cycle of 12h:12h. 0.2 μm filtered air was bubbled constantly in the agitated cultures.

2.2 Measurements

Cell counts and growth rates. Cell counts were performed with a Coulter Counter (Multisizer III; Beckman-Coulter) to follow both cyanobacteria and microalgae growths. *C. watsonii* and *D. salina* can be numbered easily because of their different diameter size (respectively 1.5-3 μm and 7-13 μm).

The growth rate was calculated during the exponential growth phase. Each cell count was converted into its neperian logarithm. A linear regression was performed on the neperian logarithms. The growth rate corresponded to the slope of the line.

Nitrate. Nitrate (NO_3^-) concentration was measured to follow the microalgae consumption. Cultures samples were filtered with 0.2 μm pore diameters syringe-filters to eliminate cellular biomass and were then analyzed with an Auto-analyser II Technicon.

Dissolved organic nitrogen measurement. Cultures were filtered with 0.2 μm pore diameters syringe-filters. Dissolved Organic Nitrogen (DON) concentration was measured according to the wet-oxydation protocol from Pujo-Pay and Raimbault (1994) with an Auto-analyser II Technicon.

Light intensity. The light intensity received by the cultures vary depending on the Erlenmeyers position because of their proximity to the neons in the incubator. The light intensity was measured at the center of the cultures each morning with a Quantameter (PAR Sensor QSL-2100, Biospherical Instruments).

3. MODEL DESIGN

3.1 Light intensity along the reactor

Cultures were lightened on their external sides with a constant light intensity I_0. The light intensity I_0 was constant from 8 am until 8 pm and was equal to 220 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}. The rest of the day was a night period, and light intensity I_0 was 0 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}. The self-shading by the microalgae and cyanobacteria was considered, assuming that both species contribute to attenuate light. Light is attenuated due to absorption and scattering, depending on cell concentrations, size and pigment content.

$$I = I_0 \mathrm{e}^{-K(X)L} \tag{1}$$

where I is the light intensity at the center of the Erlenmeyer, assuming an optical path L between the external surface and the core of the Erlenmeyer (m). $K(X)$ is the extinction coefficient (m^2.cell^{-1}) depending on X, the concentration vector of the two biomasses.

Light attenuation characteristics are specific to each species and are represented in (2) as the extinction coefficient K_{ext}. The overall attenuation coefficient $K(X)$ is assumed to be the sum of the attenuations due to each species. D and C denote respectively *D. salina* and *C. watsonii* algal concentrations (cell.m^{-3}). $K_{\mathrm{ext,d}}$ and $K_{\mathrm{ext,c}}$ are respectively *D. salina* and *C. watsonii* light extinction coefficients (m^2.cell^{-1}), so that $K(X) = K_{\mathrm{ext,d}}D + K_{\mathrm{ext,c}}C$ in cocultures.

Average light intensity within the culture medium $\overline{I}$ was considered to drive photosynthesis.

$$\overline{I} = \frac{I_0}{L} \frac{1 - \mathrm{e}^{-(K_{\mathrm{ext,d}}D + K_{\mathrm{ext,c}}C)L}}{K_{\mathrm{ext,d}}D + K_{\mathrm{ext,c}}C} \tag{2}$$

3.2 Growth and substrate uptake

C. watsonii growth rate is assumed to depend on the light intensity $\overline{I}$ with a simple Michaelis-Menten kinetics (Grimaud et al., 2014). The respiration rate was also considered. *C. watsonii* growth can therefore be represented by following dynamics:

$$\frac{dC}{dt} = \overline{\mu_{\mathrm{c}}} \frac{\overline{I}}{\overline{I} + K_{\mathrm{I,c}}} C - R_{\mathrm{c}} C - \upsilon C \tag{3}$$

where $\overline{\mu_{\mathrm{c}}}$ is the maximum growth rate (d^{-1}), $K_{\mathrm{I,c}}$ is the half-saturation constant for light (μmol photons.m^{-2}.s^{-1}), and R_{c} is the respiration rate (d^{-1}). Finally, υ is the dilution rate of the reactor (d^{-1}).

Cyanobacteria are known to produce cyanotoxins in presence of a competitor but nothing is known about a potential production by *C. watsonii* (Dunker et al., 2017). In order to fit experimental observations, we assume here

that *C. watsonii* produces a nitrogen rich inhibiting compound P (mol.L^{-1}), proportionally to the cyanobacteria cell concentration:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha C - \upsilon P \tag{4}$$

where α is the toxin production rate (mol.cell^{-1}.d^{-1}).

For the microalgae *D. salina*, we follow Droop's theory and we assume that growth depends on internal nitrogen quota and on light intensity (Bernard, 2011). We also consider that cell mortality is induced by the compound P produced by *C. watsonii*. Finally, the resulting dynamics is:

$$\frac{dD}{dt} = \overline{\mu_{\mathrm{d}}}(1-\frac{Q_0}{Q})\frac{\overline{I}}{\overline{I}+K_{\mathrm{I,d}}}D - R_{\mathrm{d}}D - m\frac{P}{P+K_{\mathrm{P}}D} - \upsilon D \tag{5}$$

where $\overline{\mu_{\mathrm{d}}}$ is the growth rate at infinite nitrogen quota (d^{-1}), Q is the intracellular nitrogen quota and Q_0 is the minimum intracellular nitrogen quota (mol N.cell^{-1}), R_{d} is the respiration rate (d^{-1}), $K_{\mathrm{I,d}}$ is the half-saturation constant for light (μmol photons.m^{-2}.s^{-1}), m is the maximum mortality rate (d^{-1}), and K_{P} is the half-saturation constant for *C. watsonii* potential toxins (mol P.L^{-1}).

The nitrogen concentration (mol N.L^{-1}), denoted S, results from the balance between nitrogen supply at concentration S_{in} and uptake by *D. salina* (*C. watsonii* does not consume any nitrate). We use the expression proposed by Bougaran et al. (2010) to account for the downregulation of nitrogen uptake for high nitrogen quota. Finally, equation 6 represents the inorganic nitrogen dynamics:

$$\frac{dS}{dt} = -\rho_{\mathrm{m}}\frac{S}{S+K_{\mathrm{S}}}(\frac{Q_{\mathrm{L}}-Q}{Q_{\mathrm{L}}-Q_0})D + \upsilon S_{\mathrm{in}} - \upsilon D \tag{6}$$

where ρ_{m} is *D. salina* maximum rate of nitrogen acquisition (mol N.cell^{-1}.d^{-1}), K_{S} is the half-saturation constant for nitrogen (mol.L^{-1}), and Q_{L} is the intracellular nitrogen quota for which nitrogen uptake stops (mol N.cell^{-1}).

The dynamics of the nitrogen quota for *D. salina* result from nitrogen uptake and dilution by cell growth. The quota dynamics are therefore determined as follows:

$$\frac{dQ}{dt} = \rho_{\mathrm{m}}\frac{S}{S+K_{\mathrm{S}}}(\frac{Q_{\mathrm{L}}-Q}{Q_{\mathrm{L}}-Q_0}) - \overline{\mu_{\mathrm{d}}}(1-\frac{Q_0}{Q})\frac{\overline{I}}{\overline{I}+K_{\mathrm{I,d}}}Q \tag{7}$$

3.3 Model calibration

C. watsonii. The net growth rate μ_{net} and half-saturation constant for light for *C. watsonii* were reported from Goebel et al. (2008). The maximum growth rate and respiration rate were calculated from preliminary *C. watsonii* monoculture experiments under various lights as follows:

$$\begin{cases} \overline{\mu_{\mathrm{c}}} = \mu_{\mathrm{net}} + R_{\mathrm{c}} \\ R_{\mathrm{c}} = \overline{\mu_{\mathrm{c}}}\dfrac{I_{\mathrm{x,c}}}{I_{\mathrm{x,c}} + K_{\mathrm{I,c}}} - \mu_{\mathrm{x,c}} \end{cases} \tag{8}$$

where $\mu_{\mathrm{x,c}}$ is the experimental growth rate (d^{-1}), and $I_{\mathrm{x,c}}$ is the average experimental light intensity measured during the exponential growth phase (μmol photons.m^{-2}.s^{-1}).

D. salina. The respiration rate and half-saturation coefficient for nitrogen were reported from Fachet et al. (2014) whereas the nitrogen acquisition rate was reported from Bonnefond et al. (2016). The growth rate at infinite nitrogen quota and half-saturation constant for light of *D. salina* were determined from preliminary monoculture experiments of *D. salina* where the growth rate was measured for various light intensities, as described in Section 2.2. The two parameters were thus computed to fit these experimental data, by considering the linear regression between $1/(\mu_{\mathrm{x,d}}+R_{\mathrm{d}})$ and $1/\overline{I}$ (9) to calculate *D. salina* maximum growth rate and half-saturation constant for light as follows:

$$\frac{1}{\mu_{\mathrm{x,d}}+R_{\mathrm{d}}} = \frac{K_{\mathrm{I,d}}}{\overline{\mu_{\mathrm{d}}}}\frac{Q_{\max}}{Q_{\max}-Q_{\min}}\frac{1}{I_{\mathrm{x,d}}} + \frac{1}{\overline{\mu_{\mathrm{d}}}}\frac{Q_{\max}}{Q_{\max}-Q_{\min}} \tag{9}$$

where $\mu_{\mathrm{x,d}}$ is the experimental growth rate (d^{-1}), $I_{\mathrm{x,d}}$ is the average experimental light intensity measured during the exponential growth phase (μmol photons.m^{-2}.s^{-1}), and $Q_{\max}$ and $Q_{\min}$ are respectively the maximum and minimum nitrogen cellular quota (mol N.cell^{-1}). The calculated $\overline{\mu_{\mathrm{d}}}$ was doubled in order to fit the day/night cycle and reach the appropriate average growth rate in 24h.

Other parameters estimations. The light extinction coefficients were estimated from preliminary *D. salina* and *C. watsonii* monocultures experiments to make the model fit the data. The minimal and maximal nitrogen intracellular quota were obtained from simulations of preliminary experiments. However, the toxin production rate by *C. watsonii*, the half-saturation constant for toxin and mortality rate for *D. salina* were estimated from the cocultures experimental data since nothing is known about the toxin productivity and impact.

Table 1. Parameters list (obtained from (a): preliminary experiments; (b): bibliography; (c): fitting)

Parameter		Value and unit	Source
$\overline{\mu_{\mathrm{c}}}$	Growth rate	0.58 d^{-1}	(a,b)
$K_{\mathrm{I,c}}$	Half-saturation constant for I	57 μmol photons. m^{-2}.s^{-1}	(b)
R_{c}	Respiration rate	9·10^{-2} d^{-1}	(a,b)
α	Toxin production rate	1·10^{-4} mol.cell^{-1}	(c)
$K_{\mathrm{ext,c}}$	Light extinction coefficient	1·10^{-10} m^2.cell^{-1}	(a)
$\overline{\mu_{\mathrm{d}}}$	Growth rate	4.99 d^{-1}	(a)
$K_{\mathrm{I,d}}$	Half-saturation constant for I	154 μmol photons. m^{-2}.s^{-1}	(a)
R_{d}	Respiration rate	0.16 mol.d^{-1}	(b)
$K_{\mathrm{ext,d}}$	Light extinction coefficient	2.3·10^{-9} m^2.cell^{-1}	(a)
K_{P}	Half-saturation constant for toxins	5·10^{-2} mol P.m^{-3}	(c)
m	Mortality rate	3.4·10^{-2} d^{-1}	(c)
ρ_{m}	Nitrogen acquisition rate	9.8·10^{-7} mol N.cell^{-1}.d^{-1}	(b)
K_{S}	Half-saturation constant for N	1.1·10^{-2} mol N.m^{-3}	(b)
$Q_{\max}$	Maximum N cellular quota	1.3·10^{-6} mol N.cell^{-1}	(a)
$Q_{\min}$	Minimum N cellular quota	5.4·10^{-7} mol N.cell^{-1}	(a)

4. SIMULATION OF THE INTERACTIONS BETWEEN *D. SALINA* AND *C. WATSONII*

The model was validated with data not used for calibration and accurately represents both cellular growth and nitro-

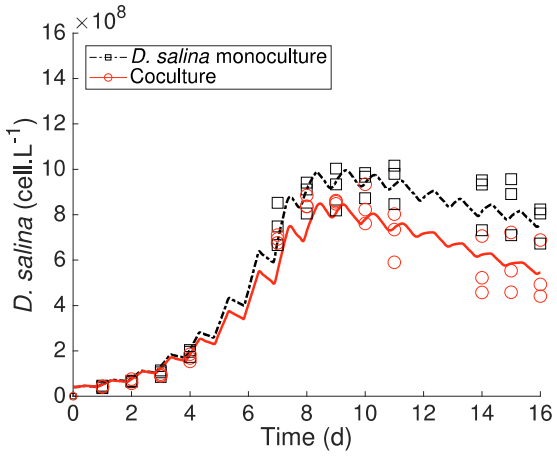

Fig. 1. *D. salina* in monocultures and cocultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data)

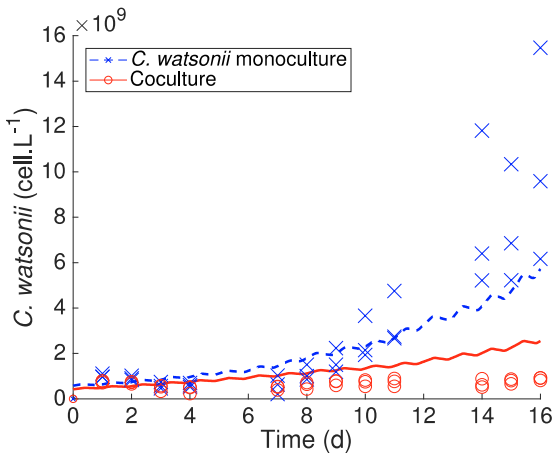

Fig. 2. *C. watsonii* in monocultures and cocultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data)

gen consumption for the two microorganisms in monocultures. *D. salina* exponential growth phase slows down when nitrate is consumed and eventually stops (Figures 1 and 3). NO_3^- is therefore limiting growth. The dynamics are very different for the diazotrophic cyanobacterium *C. watsonii* which only uses atmospheric N_2 (Dron et al., 2012) as nitrogen source. *C. watsonii* growth never stops, but is progressively reduced by the lower light, while nitrate is never consumed (Figures 2 and 3).

An amount of 105±32 μmol.L^{-1} of Dissolved Organic Nitrogen (DON) is measured into *C. watsonii* monocultures, as a by-product of diazotrophic fixation whereas 6.4±28 μmol.L^{-1} DON are measured in the cocultures. *D. salina* maximal cell concentration is not higher when cocultivated and is eventually limited by NO_3^- as in the monocultures (Figures 1 and 3). *D. salina* therefore do not consume the DON produced by *C. watsonii* in the cocultures. The lower DON might result from the lower biomass (and diazotrophic activity) when *C. watsonii* is cocultivated. This result is consistent with the pattern of the hypothesized compound P, which is 2.7 times lower in coculture than in monoculture. However, the difference between the model and the cultures could be explained by a DON consumption by bacteria since the cultures were not axenic.

C. watsonii growth is significantly reduced in the cocultures whereas *D. salina* exponential growth phase is only marginally affected as shown in Figures 1 and 2. The microalgae and the cyanobacteria are not in competition for nutrients, and it results that *C. watsonii* still grow in cocultures, at a reduced rate, at the end of the experiment (Figure 2).

Light attenuation is mostly due to *D. salina* biomass accumulation (Figures 1 and 4). This light attenuation rapidly shadows *C. watsonii* which requires light in order to support both growth during the day and nitrogen fixation activity during the night. There is therefore a competition for light between the microalgae and the cyanobacteria (Huisman et al., 1999) which favors *D. salina* (Figure 4). This light competition is correctly represented by the model which also accurately simulates the day/night cycle of 12h:12h, as shown in Figure 4.

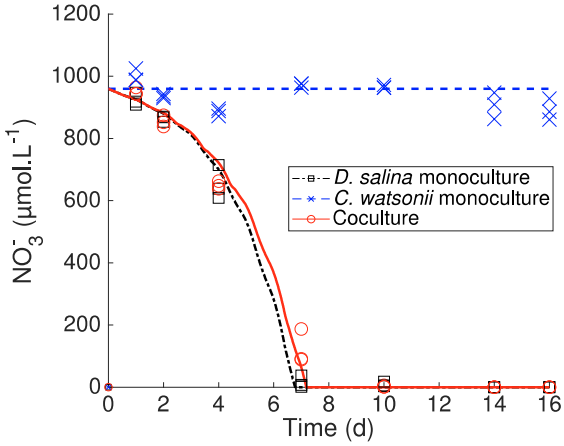

Fig. 3. Nitrate in monocultures and cocultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data)

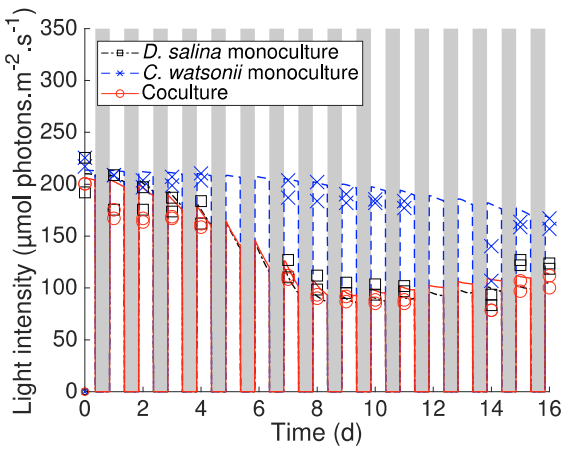

Fig. 4. Light in monocultures and cocultures (lines: theoretical data, symbols: experimental data). White and grey areas stand for daytime and nighttime, respectively.

Moreover, the model represents the increase of *D. salina*'s mortality when cocultivated with *C. watsonii* (Figure 1). Some cyanobacteria are known to produce cyanotoxins (Dunker et al., 2017; Zanchett and Oliveira-Filho, 2013) but nothing is known about a potential production of toxins by *C. watsonii*. The model thus supports the hypothesis that such toxin induces mortality. This allelopathic effect of *C. watsonii* on *D. salina* is well simulated by the model (Figure 1).

5. SIMULATING NITROGEN RECYCLING

5.1 Model adaptation

In this last section, we assume that a fraction of the diazotroph-derived compound P can be recycled by heterotrophic bacteria and eventually produce a source of nitrogen which can be uptaken by *D. salina*. The model was therefore modified to account for this potential (and desirable) recycling.

Equation 4 was modified to account for the consumption by bacteria. For sake of simplicity, bacteria were assumed to be at a high enough density, so that recycling rate is simply proportional to the concentration of P:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha C - \upsilon P - \gamma P \tag{10}$$

where γ is the diazotroph-derived product uptake rate (d^{-1}).

Only a fraction β of the consumed P by bacteria is assumed to be remineralized and available for *D. salina*. The dynamics of nitrogen substrate must then be modified accordingly, by integrating this new source of nitrogen as follows:

$$\frac{dS}{dt} = -\rho_{\mathrm{m}} \frac{S}{S+K_{\mathrm{S}}} \left(\frac{Q_{\mathrm{L}}-Q}{Q_{\mathrm{L}}-Q_0}\right) D + \upsilon S_{\mathrm{in}} - \upsilon D + \beta\gamma P \tag{11}$$

5.2 Biomass productivity of the coupled ecosystem

The performance of this microalgae-cyanobacteria-bacteria ecosystem was simulated for various dilution rates and influent nitrate S_{in}. The objective was to determine the operational conditions which enhance the production of *D. salina*, in comparison to the monoculture which does not benefit from diazotrophy.

The biomass nitrogen productivity δ was determined as the product of the dilution rate and *D. salina* cellular concentration per unit of nitrogen:

$$\delta = \frac{\upsilon D}{S_{\mathrm{in}}} \tag{12}$$

A biomass nitrogen productivity ratio Δ was therefore calculated to determine the best case conditions for enhancing biomass nitrogen productivity from monoculture to coculture as shown in Figure 5:

$$\Delta = \frac{\delta_{\mathrm{coculture}}}{\delta_{\mathrm{monoculture}}} \tag{13}$$

The nitrogen use efficiency η was determined as follows:

$$\eta = \frac{QD}{S_{\mathrm{in}}} \tag{14}$$

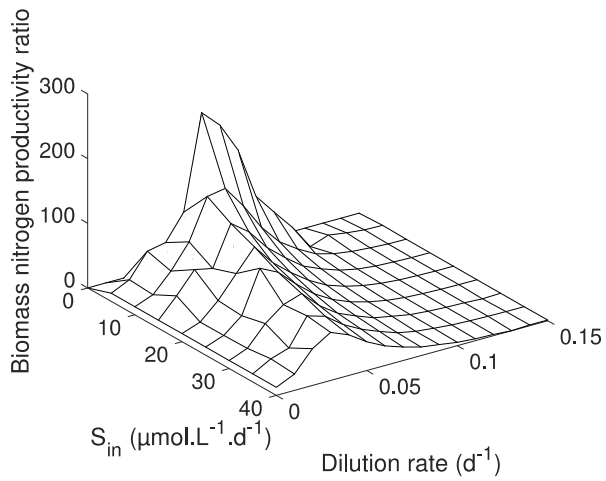

Fig. 5. *D. salina* biomass nitrogen productivity ratios

.

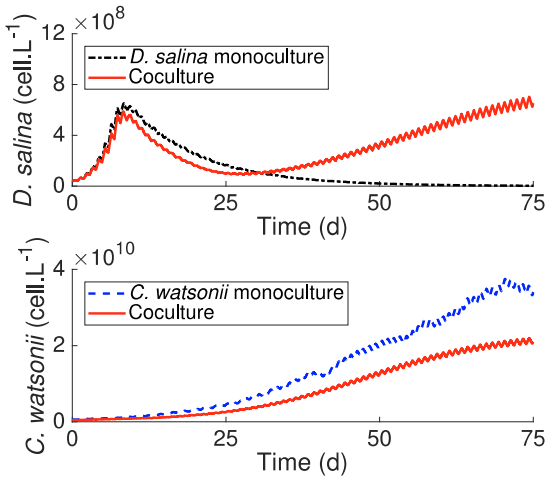

Fig. 6. *D. salina* and *C. watsonii* in monocultures and cocultures

.

In the simulated cases, biomass nitrogen productivity is better enhanced when dilution rate is 0.05 d^{-1} and influent nitrate is 5 μmol.L^{-1}.d^{-1} (Figure 5). As a result, biomass nitrogen productivity and nitrogen use efficiency are 253 and 367 higher, respectively. Cell growths over time were therefore simulated in this case as shown in Figure 6. Nitrate addition to the coculture promotes *D. salina* growth. But then, the shading of *D. salina* penalizes *C. watsonii* (Figure 6). Finally, efficient nitrogen recycling rates are only obtained for very low *D. salina* biomass productivities.

6. CONCLUSION

This study shows that it is possible to enhance *D. salina*'s productivity when cocultivated with *C. watsonii*. This strategy can work when some bacterial communities efficiently recycle nitrogen derived from diazotrophic activity. However, the shading of *D. salina* jeopardizes *C. watsonii*

growth and eventually cancels the benefit of the coculture. To bypass this negative interaction, the two species should be cultivated in membrane-separated reactors to avoid light competition but to allow molecular exchanges. In this case, both species will no more compete for light. More works remain to be done to explore this possibility.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Sophie Marro, Sophie Rabouille, Amélie Talec and Meng Zhang for their help and comments. This work was supported by the ANR Phycover (ANR-14-CE04-0011) and the Inria Project Lab Algae in silico. M. Caia benefited from an INRA funding.

REFERENCES

Barra, L., Chandrasekaran, R., Corato, F., and Brunet, C. (2014). The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. *Marine drugs*, 12(3), 1641–1675.

Bernard, O. (2011). Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO_2 mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control*, 21(10), 1378–1389.

Berthelot, H., Bonnet, S., Camps, M., Grosso, O., and Moutin, T. (2015). Assessment of the dinitrogen released as ammonium and dissolved organic nitrogen by unicellular and filamentous marine diazotrophic cyanobacteria grown in culture. *Frontiers in Marine Science*, 2, 80.

Berthelot, H., Bonnet, S., Grosso, O., Cornet, V., and Barani, A. (2016). Transfer of diazotroph-derived nitrogen towards non-diazotrophic planktonic communities: a comparative study between *Trichodesmium erythraeum*, *Crocosphaera watsonii* and *Cyanothece* sp. *Biogeosciences*, 13(13), 4005–4021.

Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Bernard, O., and Sciandra, A. (2016). Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 14, 72–78.

Bougaran, G., Bernard, O., and Sciandra, A. (2010). Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of theoretical biology*, 265(3), 443–454.

Do Nascimento, M., Rizza, L.S., Di Palma, A.A., de los Angeles Dublan, M., Salerno, G., Rubio, L.M., and Curatti, L. (2015). Cyanobacterial biological nitrogen fixation as a sustainable nitrogen fertilizer for the production of microalgal oil. *Algal Research*, 12, 142–148.

Dron, A., Rabouille, S., Claquin, P., Chang, P., Raimbault, V., Talec, A., and Sciandra, A. (2012). Light: dark (12: 12 h) quantification of carbohydrate fluxes in *Crocosphaera watsonii*. *Aquatic Microbial Ecology*, 68(1), 43–55.

Dunker, S., Althammer, J., Pohnert, G., and Wilhelm, C. (2017). A fateful meeting of two phytoplankton species–chemical vs. cell-cell-interactions in co-cultures of the green algae *Oocystis marsonii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbial ecology*, 1–11.

Fachet, M., Flassig, R.J., Rihko-Struckmann, L., and Sundmacher, K. (2014). A dynamic growth model of *Dunaliella salina*: Parameter identification and profile likelihood analysis. *Bioresource technology*, 173, 21–31.

Fouilland, E. (2012). Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11(1), 1–4.

Fuentes, J.L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del Valle, M., and Vílchez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine drugs*, 14(5), 100.

Goebel, N.L., Edwards, C.A., Carter, B.J., Achilles, K.M., and Zehr, J.P. (2008). Growth and carbon content of three different-sized diazotrophic cyanobacteria observed in the subtropical north pacific. *Journal of Phycology*, 44(5), 1212–1220.

Grimaud, G.M., Rabouille, S., Dron, A., Sciandra, A., and Bernard, O. (2014). Modelling the dynamics of carbon–nitrogen metabolism in the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501, under variable light regimes. *Ecological modelling*, 291, 121–133.

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In M.H. Chanley and W.L. Smith (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 26–60. Plenum Press, New York.

Huisman, J., Jonker, R.R., Zonneveld, C., and Weissing, F.J. (1999). Competition for light between phytoplankton species: experimental tests of mechanistic theory. *Ecology*, 80(1), 211–222.

Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.B., Fouilland, E., Bernard, O., and Cadoret, J.P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2(3), 212–222.

Minowa, T. and Sawayama, S. (1999). A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling. *Fuel*, 78(10), 1213–1215.

Olli, K., Klais, R., and Tamminen, T. (2015). Rehabilitating the cyanobacteria–niche partitioning, resource use efficiency and phytoplankton community structure during diazotrophic cyanobacterial blooms. *Journal of Ecology*, 103(5), 1153–1164.

Pujo-Pay, M. and Raimbault, P. (1994). Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology Progress Series*, 203–207.

Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Oh, H.M., and Kim, H.S. (2016). Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, 34(1), 14–29.

Thompson, A.W., Foster, R.A., Krupke, A., Carter, B.J., Musat, N., Vaulot, D., Kuypers, M.M., and Zehr, J.P. (2012). Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science*, 337(6101), 1546–1550.

Ying, K., Zimmerman, W., and Gilmour, D. (2014). Effects of CO_2 and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(3), 167–173.

Zanchett, G. and Oliveira-Filho, E.C. (2013). Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins*, 5(10), 1896–1917.

Annexe 4 – “Optimizing CO_2 transfer in algal open ponds”

Algal Research 35 (2018) 530–538

Contents lists available at ScienceDirect

Algal Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/algal

Optimizing CO_2 transfer in algal open ponds

Margaux Caia[a,b,c], Olivier Bernard[b,c,*], Quentin Béchet[b,c]

[a] LBE, Univ. Montpellier, INRA, 102 Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France
[b] Biocore, INRIA, Univ. Nice Côte d'Azur, 06902 Sophia Antipolis, France
[c] Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, 06230 Villefranche-sur-Mer, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Microalgae
k_La
pH
Dunaliella salina
Raceway pond
Productivity

ABSTRACT

The objective of this study was to optimize the CO_2 injection system of algal raceway open ponds to minimize CO_2 losses to the atmosphere and therefore reduce operational costs. CO_2 transfers can be optimized by increasing the bubble-to-culture CO_2 transfer rate and by decreasing the culture-to-atmosphere CO_2 transfer rate. CO_2 transfer coefficients were first experimentally determined on a pilot-scale algal pond for different designs of the injection system. The impact of five design parameters was tested: the CO_2 diffuser length, the CO_2 diffuser position, the CO_2 flow rate, the paddle wheel rotation speed and the water level. Culture-to-atmosphere transfer coefficient was only significantly impacted by the paddle wheel rotation speed (range: 3.42–48.7 10^{-3} min^{-1}; base-case value: 17.1 10^{-3} min^{-1}). Bubble-to-culture transfer coefficient, determined for a mix of fine and coarse CO_2 bubbles, varied significantly with the CO_2 injection flow rate (range: 1.47–18.3 10^{-4} min^{-1}; base-case value: 9.11 10^{-4} min^{-1}) and water level (range: 7.46–14.4 10^{-4} min^{-1}). The efficiencies of the various system designs at full-scale were then extrapolated through simulation by coupling an algal productivity model to the CO_2 transfer model developed in this study. Reducing the water level from 0.2 m down to 0.1 m reduced CO_2 supply by 14%. Reducing the paddle wheel rotation speed from 21 rpm to 13 rpm decreased CO_2 supply by 40%. Increasing the pH set point from 7.2 to 8 reduced CO_2 supply by 38% but also decreased *Dunaliella salina* biomass productivity by 17%. A trade-off must be achieved between high biomass productivity and lower environmental footprint.

1. Introduction

While biofuels from microalgae are considered as a potential alternative to fossil fuels, the cost-efficiency of the process is still under study [1,2]. Current estimations based on large scale extrapolation place the cost of biofuels from microalgae between 2.8 and 3.7 USD·L^{-1} [3,4]. The variations across studies are mostly due to assumptions regarding productivity predictions, system operation and assumptions regarding various costs [5]. As this relatively high price makes algal biofuels non-competitive with fossil fuels, recent studies aimed to improve algal productivity by optimizing system design and operation. For example, Béchet et al. [6] optimized the water level and hydraulic retention time to maximize algal productivity while reducing water demand. Putt et al. [7] optimized the CO_2 injection system by adding a carbonation column. The use of flue gases or wastewater were also studied to maximize algal productivity while decreasing nutrients demand [6–9].

CO_2 is often considered as a free resource in technico-economic assessments of full-scale algal production whereas CO_2 injection costs were reported to represent up to 27% of algal production costs [9]. These costs are particularly high in open systems as a non-negligible fraction of injected CO_2 is lost in the atmosphere through gas transfer. For example, Doucha and Lívanský [10] showed that only 45.3% of CO_2 injected in an algal pond was absorbed by the algae, the rest being lost in the atmosphere. Only few studies aimed to quantify the impact of the pond design on the CO_2 transfer rates. Such characterization is however crucial for system optimization. Within this context, the objective of this study was to optimize the design of the CO_2 injection system of algal open ponds to minimize CO_2 losses and therefore reduce operational costs. CO_2 transfer rates were therefore first experimentally determined for different designs of the CO_2 injection system of a pilot-scale open pond. The efficiency of these different designs at reducing CO_2 losses was then quantified through simulations by coupling an algal productivity model to the CO_2 transfer model developed in this study.

* Corresponding author at: Biocore, INRIA, Univ. Nice Côte d'Azur, 06902 Sophia Antipolis, France.
E-mail address: olivier.bernard@inria.fr (O. Bernard).

https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.009
Received 21 December 2017; Received in revised form 17 May 2018; Accepted 16 September 2018
2211-9264/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

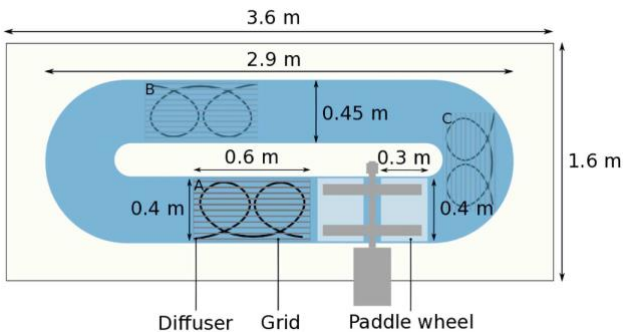

Fig. 1. Raceway pond and CO_2 diffusion system in the base-case (see Table 1 for details) - A, B, and C represent the position of the diffuser (A: downstream position (base-case); B: opposite position; C: upstream position).

2. Materials and methods

2.1. System design

The pilot fiber-glass raceway pond used in this study (surface area: 2.61 m^2; depth: 25 cm; Fig. 1) was equipped with a stainless steel paddle wheel (with 4 paddles) to ensure homogenous mixing. CO_2 was bubbled into the pond through a microporous tube (*Aqua Flow A2000*) maintained at the pond bottom by a stainless steel grid.

2.2. Possible variations in set-up parameters

Various design parameters can be modified to minimize CO_2 losses, which are due to two distinct mechanisms. First, a fraction of the CO_2 bubbles injected at the pond bottom reaches the pond surface before dissolving into the culture. Higher bubble-to-culture CO_2 transfer rates can therefore contribute to minimize CO_2 losses. Secondly, as CO_2 concentration in the pond often exceeds the equilibrium concentration with the atmosphere, CO_2 tends to transfer from culture to the atmosphere [11]. Decreasing culture-to-atmosphere CO_2 transfer rates would therefore reduce CO_2 losses. The following five parameters can theoretically be optimized to minimize CO_2 losses:

- The **CO_2 diffuser length**: bubble-to-culture transfer rates are theoretically proportional to the bubbles surface area, and therefore to the size and density of bubbles [12,13]. As the diffuser length influences the number of bubbles within the medium, this parameter was made vary between 2 m and 4 m (base-case value of 3 m).
- The **CO_2 diffuser position**: The bubble retention time (i.e. the amount of time that bubbles remain in the culture before reaching the pond surface) theoretically depends on the diffuser position. For example, relative positions of the paddle wheel and CO_2 diffuser may impact bubbles trajectories, hence bubble retention time. Diffuser position may therefore influence the bubble-to-culture transfer rate as a longer bubble retention time means a higher rate of CO_2 transfer from bubbles to culture medium [14]. Three different positions were selected for the CO_2 diffuser: upstream of the paddle wheel, downstream of the paddle wheel (base-case position) and at the opposite position of the paddle wheel (Fig. 1).
- The **CO_2 flow rate**: The CO_2 flow rate impacts the bubbles density and therefore the bubble-to-culture transfer rate. The following calculations were performed to estimate the range of relevant values for the CO_2 flow rate. The maximum CO_2 flow rate theoretically needed in this algal pond was determined from the maximum light intensity that can reach an outdoor pond (approximately 1000 $W \cdot m^{-2}$). As 45% of this radiation is photosynthetically active [15] and based on a conservative assumption of a photosynthetic efficiency of 6.56% [16], a heat value of 17.5 $kJ \cdot g^{-1}$ [17], a carbon content of 50% [18], and a CO_2 injection efficiency of 55% [10], the maximum CO_2 flow rate tested in this study was 0.67 $L \cdot min^{-1}$. The minimal CO_2 flow rate was set at 0.05 $L \cdot min^{-1}$ and the mid-value 0.36 $L \cdot min^{-1}$ was used as a base-case value.
- The **paddle wheel rotation speed and related flow speed**: The paddle wheel rotation speed impacts the level of turbulence at the pond surface and the transfer at the paddle wheel [19]. This design parameter should therefore impact the culture-to-atmosphere transfer rate [20]. Minimum and maximum paddle wheel rotation speeds of 13 rpm and 29 rpm were selected in this study, 21 rpm being used as a base-case value (these values were observed to ensure homogeneous mixing in the pond without causing mechanical stress on the algal cells [21]). The following relationship exists between the rotation speed of the paddle wheel (*RPM*, in rpm) and the flow speed (v, in $m\,s^{-1}$):

$$v = \frac{2r\pi}{60} RPM \tag{1}$$

where r is the radius of the paddle wheel (m).

Based on Eq. (1), the flow speeds at the paddle wheel should theoretically be 0.66, 0.91 and 0.44 $m \cdot s^{-1}$ for the base-case, high and low paddle wheel rotation speeds, respectively. However, as the flow speed decreases as the water flows in the pond channels, the average flow speed is expected to be lower than these values.

- The **water level**: Water level impacts the bubble retention time and should therefore impact the bubble-to-culture CO_2 transfer rate. Minimum and maximum water levels of 0.1 m and 0.2 m were selected in this study; 0.15 m being used as a base-case value.

A total of eleven experiments were carried out to quantify the impact of each of these five design parameters on the CO_2 transfer rates. Transfer rates were first measured in the base-case when parameters were all set at their base-case values (Table 1). CO_2 transfer rates were then measured when all parameters were set at their base-case values apart from one parameter set at either its high or its low value (Table 1). For example, to estimate the impact of the high water level on CO_2 transfer rates, the CO_2 flow rate, the diffuser length and position, and the paddle wheel rotation speed were set at their base-case values (0.36 $L \cdot min^{-1}$, 3 m, 'downstream of the paddle wheel', 21 rpm, respectively), the water depth was set at its high value (0.2 m).

2.3. Determination of CO_2 transfer coefficients

This section details how the two rates of CO_2 transfer were experimentally determined (i.e. from bubbles to culture and from culture to atmosphere). In each experiment, the pond was first filled with seawater up to the desired water level as listed in Table 1. The paddle wheel was started and CO_2 injection began once pH was steady, resulting from equilibrium with atmospheric CO_2 (Material used: InPro 4881i glass pH probe; Data logger: Mettler Toledo M300). CO_2 injection was stopped after 20–30 min and pH was monitored for several additional hours to record the increase of pH over time.

Table 1
System design parameters and their values.

Parameters tested	Base-case	High	Low
CO_2 flow rate ($L \cdot min^{-1}$)	0.36	0.67	0.05
Water depth (m)	0.15	0.2	0.1
Diffuser length (m)	3	4	2
Diffuser position	Downstream of the paddle wheel	Upstream of the paddle wheel	At the opposite of the paddle wheel
Paddle wheel rotation speed (rpm)	21	29	13

Microalgae photosynthetic activity directly impacts CO_2 concentration as microalgae absorb CO_2 during daytime and release CO_2 at night, affecting culture-to-atmosphere CO_2 transfer rate. The impact of biomass concentration on CO_2 transfers was not optimized experimentally because pH (and also CO_2, for constant alkalinity), was regulated by CO_2 injection during daytime. With pH regulation, the impact of biomass concentration on CO_2 transfer is therefore very limited. In this study, the two rates of CO_2 transfer (i.e. from bubble to culture and from culture to atmosphere) were then measured in seawater and not in microalgae cultures in order to optimize the main five design parameters of the raceway pond (Section 2.2).

2.3.1. Determination of culture-to-atmosphere CO_2 transfer coefficients

The only CO_2 transfer to consider when bubbling was stopped was the culture-to-atmosphere transfer. The evolution of total inorganic carbon concentration (*IC*, in mol·m^{-3}) was expressed from basic transfer laws as follows [13]:

$$\frac{dIC}{dt} = -k_L a_{atm}\left(\frac{[CO_2]}{K} - P_{CO_2,atm}\right) \tag{2}$$

where $k_L a_{atm}$ is the transfer coefficient (mol·s^{-1}·m^{-3}·Pa^{-1}), K is the temperature-dependent Henry's law constant for CO_2 (mol·m^{-3}·Pa^{-1}) [22], and $P_{CO_2,atm}$ is the CO_2 partial pressure in the atmosphere (39.4 Pa). Eq. (2) cannot be solved analytically as CO_2 concentration is a complex function of total inorganic carbon concentration *IC*, alkalinity and pH (see Section 2.4). The following computational strategy was therefore used to determine the value of $k_L a_{atm}$:

1. Total inorganic carbon and CO_2 concentrations over time were calculated from the measured pH profile in seawater, as explained in Section 2.4.
2. The evolution of total inorganic carbon concentration over time was fitted by polynomial interpolation and then differentiated with respect to time.
3. The term $k_L a_{atm}$ was then determined from a linear regression between the left-hand term in Eq. (2) and the partial pressure difference in the right-hand term of Eq. (2).

2.3.2. Determination of bubble-to-culture CO_2 transfer coefficients

During CO_2 injection, the evolution of total inorganic carbon concentration is the result of both bubble-to-culture and culture-to-atmosphere CO_2 transfers, which can be expressed as follows [13]:

$$\frac{dIC}{dt} = k_L a_B\left(P_{CO_2,B} - \frac{[CO_2]}{K}\right) - k_L a_{atm}\left(\frac{[CO_2]}{K} - P_{CO_2,atm}\right) \tag{3}$$

where $k_L a_B$ is the bubble-to-culture transfer coefficient (mol·s^{-1}·m^{-3}·Pa^{-1}) and $P_{CO_2,B}$ is the CO_2 partial pressure in bubbles (10^5 Pa).

Similarly to Eq. (2), Eq. (3) cannot be solved analytically and the following strategy was used to determine the value of $k_L a_B$:

1. Total inorganic carbon and CO_2 concentrations over time were calculated from pH measurements in seawater during CO_2 injection, as detailed in Section 2.4.
2. In all the experiments, total inorganic carbon concentration increased linearly over time (data not shown), which indicated that the right-hand term in Eq. (3) did not significantly vary over time. This slow variation was explained by the fact that CO_2 partial pressure in bubbles was always significantly higher than the term $[CO_2]/K$ in Eq. (3). Eq. (3) was therefore modified as follows:

$$\frac{dIC}{dt} = k_L a_B\left(P_{CO_2,B} - \frac{\overline{[CO_2]}}{K}\right) - k_L a_{atm}\left(\frac{\overline{[CO_2]}}{K} - P_{CO_2,atm}\right) \tag{4}$$

where $\overline{[CO_2]}$ is the mean CO_2 concentration over the duration of each experiment (mol·m^{-3}).

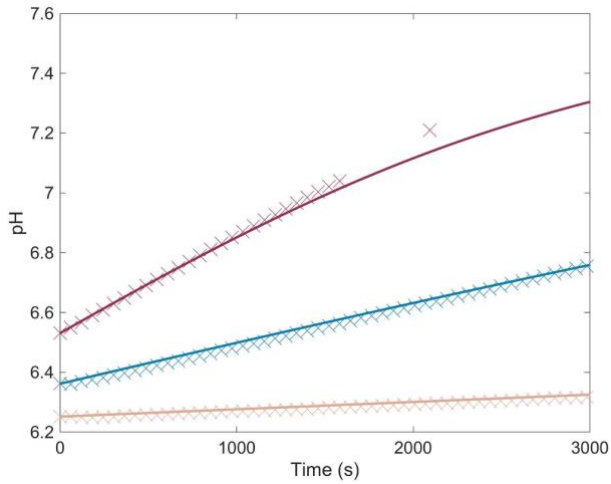

Fig. 2. pH evolution over time when bubbling was stopped (crosses: experimental data (purple: high paddle wheel rotation speed; blue: base-case experiment; beige: low paddle wheel rotation speed); plain line: simulation) – see Table 1 for parameters values. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3. The term $k_L a_B$ was then determined as follows

$$k_L a_B = \left[\alpha_{IC} + k_L a_{atm}\left(\frac{\overline{[CO_2]}}{K} - P_{CO_2,atm}\right)\right] \Big/ \left(P_{CO_2,B} - \frac{\overline{[CO_2]}}{K}\right) \tag{5}$$

where α_{IC} is the slope of *IC* over time (mol·m^{-3}·s^{-1}).

Figs. 2 and 3 show that the computational techniques used in this study accurately determined the transfer coefficients $k_L a_{atm}$ and $k_L a_B$ as theoretical inorganic carbon concentrations satisfactorily fitted experimental data, differences being mostly due to experimental errors.

2.4. Determination of total inorganic carbon and CO_2 concentrations from pH and alkalinity

As detailed in Section 2.3, pH was measured continuously during the experiment. This section details how the pH values were used to

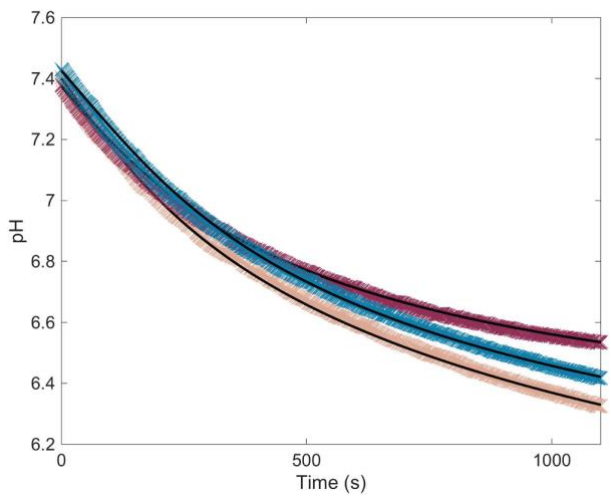

Fig. 3. pH evolution over time when bubbling was on (crosses: experimental data (purple: high paddle wheel rotation speed; blue: base-case experiment; beige: low paddle wheel rotation speed); plain line: simulation) – see Table 1 for parameters values. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

determine the concentration of CO_2 and inorganic carbon in the pond. The four following equations were derived from the definition of equilibrium constants for four acid/base couples [23,24]:

$$[OH^-] = \frac{10^{-14}}{[H^+]};\ K_\omega = \frac{[OH^-]}{[H^+]} \tag{6}$$

$$H_2O + CO_2 \rightleftarrows HCO_3^- + H^+;\ K_1 = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]} \tag{7}$$

$$HCO_3^- \rightleftarrows CO_3^{2-} + H^+;\ K_2 = \frac{[CO_3^{2-}][H^+]}{[HCO_3^-]} \tag{8}$$

$$H_2O + B(OH)_3 \rightleftarrows B(OH)_4^- + H^+;\ K_B = \frac{[B(OH)_4^-][H^+]}{[B(OH)_3]} \tag{9}$$

where K_ω, K_1, K_2 and K_B are temperature-dependent equilibrium constants ($mol{\cdot}m^{-3}{\cdot}Pa^{-1}$) [24]. These four acid-base couples, including the Boric acid, were identified in previous studies as the chemical species significantly impacting seawater pH as detailed by Zeebe and Wolf-Gladrow [23]. Electro-neutrality in seawater yields the following equation:

$$[OH^-] + [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] - [H^+] - [TA] = 0 \tag{10}$$

where TA is total alkalinity of seawater ($mol{\cdot}m^{-3}$). The [TA] term represents the balance between cations and anions in seawater in addition to the compounds already accounted for in Eqs. (6) to (9) [23]. CO_2 and total inorganic carbon concentrations can be expressed by combining Eqs. (6) to (10):

$$[CO_2] = \frac{[H^+] + [TA] - [B(OH)_4^-] - [OH^-]}{K_1/[H^+] + 2(K_1K_2)/[H^+]^2} \tag{11}$$

$$[IC] = \left(1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2}\right)\frac{[H^+] + [TA] - [B(OH)_4^-] - [OH^-]}{K_1/[H^+] + 2(K_1K_2)/[H^+]^2} \tag{12}$$

Zeebe & Wolf-Gladrow [23] showed that total alkalinity of seawater can slightly vary depending on season and location with salinity, calcium carbonate and dissolved inorganic nitrogen concentrations. Total alkalinity of the seawater used in experiments was therefore calculated in situ by measuring the pH at equilibrium with pure CO_2. In these conditions, total alkalinity was expressed by combining Eq. (11) and Henry's law as follows:

$$[TA] = \frac{K_1KP_{CO_2}}{10^{-pH}} + 2\frac{K_1K_2KP_{CO_2}}{(10^{-pH})^2} + [B(OH)_4^-] + \frac{K_\omega}{10^{-pH}} - 10^{-pH} \tag{13}$$

where P_{CO_2} is the CO_2 partial pressure in seawater at equilibrium with pure CO_2.

2.5. Simulations: CO_2 and biomass productivity model

Simulations were performed to quantify the efficiency of several CO_2 injection system designs in an algal pond operated at full-scale. *Dunaliella salina* was chosen as a commercial marine species, for its potential to produce both carotenoids and triacylglycerols (TAG) with a cultivation at marine salinity [25]. This species is the third most cultivated microalgae [26]. The algal pond considered was located in a Mediterranean climate (Merced, California) and was identical to the pond described in Section 2.1. The system was operated in a continuous regime with a hydraulic retention time of 10 days (i.e. 10% of the culture was renewed daily with fresh medium). The inorganic carbon concentrations in the pond inflows and outflows were assumed to be equal, so that culture change did not impact the inorganic carbon concentration in the pond. Water level was maintained constant by continuously adding water to compensate for evaporation losses. The culture medium was F medium [27,28] enriched in nitrogen and phosphorous (N: 1.59 10^1 $mol{\cdot}m^{-3}$ as $NaNO_3$; P: 6.52 10^{-1} $mol{\cdot}m^{-3}$ as NaH_2PO_4) to avoid any nutrient limitation. Seawater alkalinity was assumed constant (1.7 $mol{\cdot}m^{-3}$ as measured during experiments; Section 2.4) as Zeebe & Wolf-Gladrow [23] showed that total alkalinity of seawater does not significantly vary with temperature or microalgal activity in seawater. Microalgal inorganic carbon uptake does not impact either total alkalinity of seawater in algal ponds when pH is regulated [29]. The pond pH was therefore controlled by CO_2 injection at daytime in the range of pH values when dissolved inorganic carbon concentrations were above the saturating level of 1 $mol{\cdot}m^{-3}$ (6–8.5; [30]). Within this range of pH, the O_2 generation rate by *D. salina* during photosynthesis πO_2 is strongly impacted, with an optimal pH value of 7.2 [31]. To account for the impact of pH on algal productivity, a polynomial function of degree 2 was fitted to the experimental results presented by Ying et al. [31]:

$$\pi O_2 = -0.11613pH^2 + 1.6768pH - 5.5632;\ R^2 = 0.94 \tag{14}$$

where πO_2 is in $\mu mol{\cdot}L^{-1}{\cdot}min^{-1}{\cdot}mg_{chlorophyll}{}^{-1}$.

The efficiency E of the CO_2 injection system was defined as follows:

$$E = Q_{CO_2,abs}/Q_{CO_2,inj} \tag{15}$$

where Q_{CO_2},*abs* is the amount of CO_2 absorbed by the algae ($mol{\cdot}m^{-2}{\cdot}yr^{-1}$) and Q_{CO_2},*inj* is the amount of CO_2 injected into the pond ($mol{\cdot}m^{-2}{\cdot}yr^{-1}$). Q_{CO_2}, *abs* was expressed as follows:

$$Q_{CO_2,abs} = Q_{CO_2,inj} - Q_{CO_2,B} - Q_{CO_2,atm} \tag{16}$$

where Q_{CO_2},*B* is the CO_2 losses caused by CO_2 bubbles reaching the pond surface before dissolving into the culture ($mol{\cdot}m^{-2}{\cdot}yr^{-1}$) and Q_{CO_2},*atm* is the CO_2 losses caused by culture-to-atmosphere transfer ($mol{\cdot}m^{-2}{\cdot}yr^{-1}$). CO_2 losses were expressed by integrating over time bubble-to-culture and culture-to-atmosphere CO_2 transfers as follows:

$$Q_{CO_2,atm} = \int_{t_{ini}}^{t_{end}} k_L a_{atm}\left(P_{CO_2,atm} - \frac{[CO_2]}{K}\right)dt \tag{17}$$

$$Q_{CO_2,B} = \int_{t_{ini}}^{t_{end}} k_L a_B\left(P_{CO_2,B} - \frac{[CO_2]}{K}\right)dt \tag{18}$$

where t_{ini} and t_{end} are the initial and final times of the integration (in s), respectively.

CO_2 concentration over time was determined by first resolving the following differential equation derived from a mass balance on inorganic carbon:

$$\frac{dIC}{dt} = k_L a_B\left(P_{CO_2,B} - \frac{[CO_2]}{K}\right) + k_L a_{atm}\left(P_{CO_2,atm} - \frac{[CO_2]}{K}\right) + P - A \tag{19}$$

where P and A are the rates of CO_2 production (during respiration) and consumption (during photosynthesis) of micro-algae (in $mol{\cdot}m^{-3}{\cdot}s^{-1}$), respectively. CO_2 concentration in the medium was then determined at each time step from the value of *IC* by reverting the equations listed in Section 2.4. Eq. (19) was also used to determine the amount of CO_2 injected at each time step of the simulation to maintain pH at a constant value during daytime. A control law was therefore used in the mathematical model to inject CO_2 when the measured pH was higher than the set point in order to decrease the pH of the culture until it reached the set point during daytime.

The "production" and "absorption" terms P and A in Eq. (19) were determined by combining the predictions of four mathematical models. Firstly, the temperature of the raceway pond was predicted by using the model of Béchet et al. [32] accounting for meteorological conditions, system operation and geometry. Hourly meteorological data used for simulations were obtained from the National Climatic Data Center of the US National Oceanic and Atmospheric Administration (see [33] for a complete description of the data set). This temperature model was validated against experimental data collected over one year in New Zealand (accuracy of ± 1.2–1.3 °C, N = 33,221; [32]). Secondly, the model developed by Béchet et al. [6] was used to predict the oxygen and biomass productivities of *D. salina* from the pond temperature and

the solar irradiance reaching the pond surface. This model was calibrated with experimental data [34] and validated in outdoor cultivation ponds [36]. Thirdly, a model was derived to assess the impact of pH between 6.5 and 8 on O_2 generation rate by *D. salina* during photosynthesis based on experimental results from Ying et al. [31] (Eq. (14)). The biomass and oxygen productivities were multiplied by this polynomial function to account for the impact of pH on algal growth. Finally, CO_2 consumption and production rates were calculated at each time step from O_2 production and consumption rates by assuming a gross ratio of 1 mole CO_2 consumed per mole O_2 produced (see Supplementary material for references).

The sensitivity analysis described in Section 3.3 was performed to quantify the inaccuracy of CO_2 efficiency predictions. This analysis considered the uncertainty of the following model inputs:

- The gross ratio of 1 mole CO_2 consumed per mole O_2 produced was accurate within 20% based on the results from the literature (see Supplementary material);
- Photosynthesis and respiration rates were accurate within 20% and 5%, respectively, based on the study of Béchet et al. [6].
- The CO_2 transfer coefficients between the culture and the atmosphere and between the bubbles and the culture were accurate within 15% and 6%, respectively, based on the results discussed in Sections 2.4 and 2.5.

When compared to full-scale data, this modelling approach was found to be accurate within ± 20–30% [36], which was attributed to experimental error and uncertainty on model parameters. For example, the uncertainties on photosynthetic and respiration rates could be responsible for a prediction inaccuracy of ± 20% [6]. Note that Béchet's study did not account for the impact of pH but it is likely that impact of pH on algal growth may also be accurate within the same range.

3. Results and discussion

3.1. Culture-to-atmosphere transfer coefficients

Fig. 4 shows that our values of the culture-to-atmosphere transfer coefficients k_La_{atm} for different system designs (3.42–48.7 10^{-3} min^{-1}) were within the range of values reported in the literature for open systems from small to full scale (2.22–581 10^{-3} min^{-1}; see Supplementary material). Interestingly, the range of known values for this transfer coefficient covers several orders of magnitude. This large discrepancy of values is most likely due to the fact that the culture-to-atmosphere transfer coefficients were determined with different approaches from one study to another.

The rotation speed of the paddle wheel was the only design parameter significantly impacting the culture-to-atmosphere transfer coefficient (Fig. 4), which can be explained by two reasons. Firstly, culture-to-atmosphere transfer mostly occurs at the paddle wheel [19] and secondly, increasing the water flow speed enhances convection at the pond surface, hence CO_2 transfer [37,38]. The water level does not significantly impact the culture-to-atmosphere transfer coefficient (Fig. 4) as the k_La_{atm} value depends mostly on the exchange surface area between culture and atmosphere, which does not change with depth. Diffuser position, diffuser length and CO_2 flow rate obviously do not impact the culture-to-atmosphere transfer coefficient as k_La_{atm} was determined when bubbling was off (Section 2.3). Slight variations observed between these eight experiments may be due to slight temperature variations between experiments (19–22.5 °C), similarly to the observations of Hill [20]. These eight measurements were therefore considered as replicate measurements of the base-case value. The base-case value of k_La_{atm} used in the following was therefore the average of these eight values (k_La_{atm} = 17.2 ± 2.20 10^{-3} min^{-1}, N = 8).

3.2. Bubble-to-culture CO_2 transfer coefficient

The values of our bubble-to-culture transfer coefficients k_La_B (1.47–18.3 10^{-4} min^{-1}; Fig. 5) were in the lower range of values reported from literature (36–20,000 10^{-4} min^{-1}; see Supplementary material). These relatively low values are explained by the fact that most prior studies were carried on closed photobioreactors where CO_2 bubble retention times are higher in closed systems than in open ponds. The value from Li et al. [39], the only one reported for a pond, is lower than our estimation. Li et al. [39] studied a closed raceway pond covered to retain the CO_2 bubbles into the culture (except at the paddle wheel). The cover was directly in contact with the culture, which increased the CO_2 bubble retention time and optimized the bubble-to-culture transfer. The cover therefore explains why the transfer coefficient measured by Li et al. [39] was higher than the value obtained from our study. Fig. 4 shows that the CO_2 flow rate impacted the most k_La_B. This high impact is explained by the fact that enhancing the flow rate increased the number of bubbles of CO_2, hence the exchange surface area between bubbles and culture.

Similarly to the study of Zhang et al. [12], CO_2 flow rate was

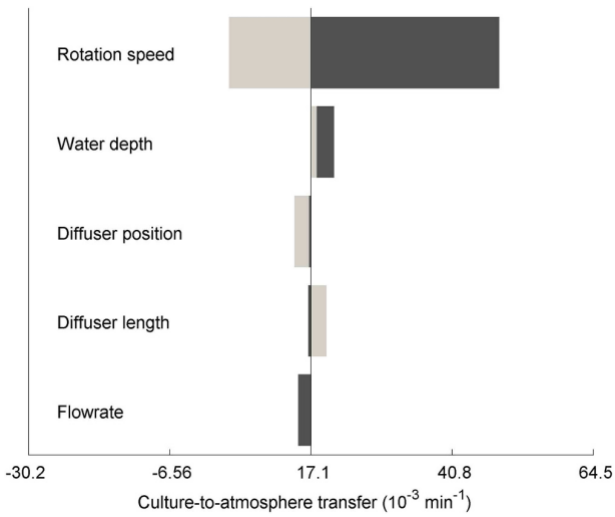

Fig. 4. Culture-to-atmosphere CO_2 mass transfer coefficient for different system designs (light grey: low parameter value; dark grey: high parameter value).

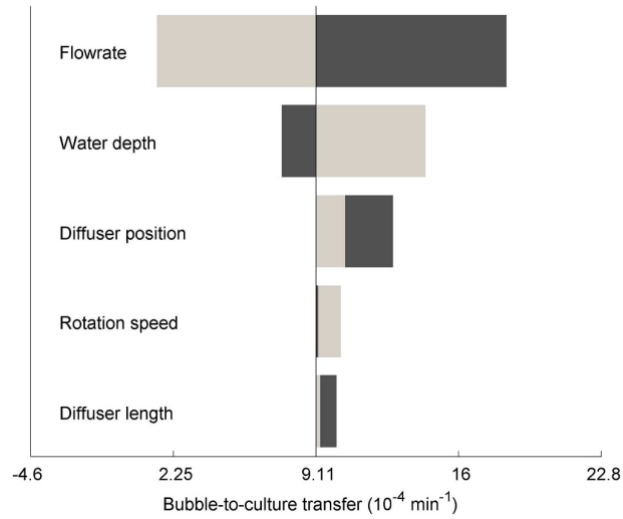

Fig. 5. Bubble-to-culture CO_2 mass transfer coefficient for different system designs (light grey: low parameter value; dark grey: high parameter value).

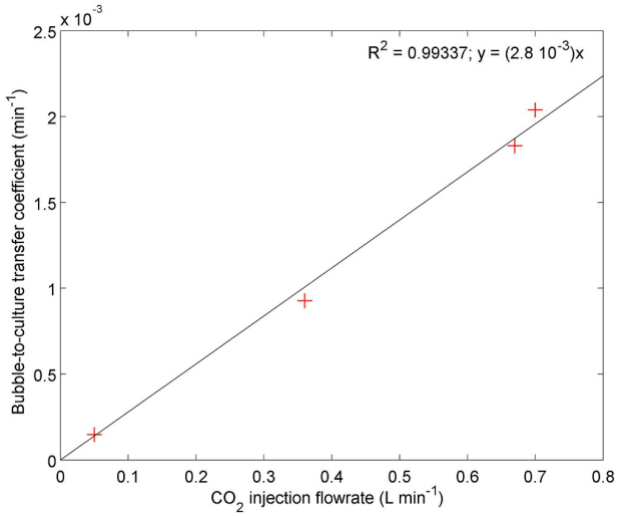

Fig. 6. Bubble-to-culture transfer coefficient depending on flowrate (crosses: experimental data; plain line: linear regression).

linearly correlated to $k_L a_B$ (Fig. 6):

$$\frac{k_L a_B}{\delta} = 2.8\ 10^3\ \mathrm{L}^{-1};\ \ \mathrm{R}^2 = 0.99 \tag{20}$$

where δ is the CO_2 flow rate ($\mathrm{L{\cdot}min^{-1}}$).

This linear relationship was used in the rest of this study to calculate the $k_L a_B$ for any CO_2 flow rate when all other design parameters were set at their base-case values (Table 1).

The second factor impacting the most $k_L a_B$, but to a lesser extent than the CO_2 injection flowrate, was the water level (Fig. 5). This is mostly explained by the definition of the term $k_L a_B$:

$$k_L a_B = k_L \times \frac{S_B}{V} \tag{21}$$

where k_L is the transfer coefficient ($\mathrm{mol{\cdot}m^{-2}{\cdot}s^{-1}{\cdot}Pa^{-1}}$), S_B the exchange surface area between the bubbles and the culture ($\mathrm{m^2}$) and V is the culture volume ($\mathrm{m^3}$). However, Table 2 shows that the term $k_L S_B$ (simply obtained by multiplying the values of $k_L a_B$ by the culture volume; Eq. (21)) does not significantly vary with the water level. In other words, the total amount of CO_2 transferred from the bubbles to the culture does not significantly vary with the water level. This is most likely explained by the fact that the large majority of bubbles diffused in the culture dissolved in the first 10 cm of the culture. Most of the fine bubbles indeed dissolved rapidly into the culture while coarser bubbles outgassed directly.

Table 2
System design parameters and their related $k_L S_B$ and $k_L a_{atm} * V$ values (values in bold and italic are the constant for the low and high parameter values, respectively).

Parameters tested	$k_L S_B$ (10^{-9} mol·s^{-1}·Pa^{-1})	$k_L a_{atm} * V$ (10^{-8} mol·s^{-1}·Pa^{-1})
Base-case	2.10 ± 0.867	3.78 ± 0.482
CO_2 flow rate (L·min^{-1})	**0.322**	**0.750**
	4.00	3.28
Water depth (m)	**2.09**	**2.64**
	2.18	*6.12*
Diffuser length (m)	**2.04**	**4.31**
	2.21	*3.66*
Diffuser position	**2.30**	**3.14**
	2.80	*3.69*
Paddle wheel rotation speed (rpm)	**2.25**	**10.7**
	2.02	*0.748*

Finally, moving the diffuser from its base-case downstream position to an upstream position lead to slightly increase CO_2 transfer (Fig. 5). This increase may be mostly due to the fact that coarser bubbles were forced to flow under the paddle wheel, which extended the retention time of these bubbles, therefore allowing a bigger part of them to dissolve entirely. On the contrary, moving the diffuser to the opposite position of the paddle wheel did not significantly affect $k_L a_B$. The rotation speed of the paddle wheel did not significantly impact the bubble-to-culture transfer coefficient (Fig. 5), probably because bubbles trajectories were not significantly impacted by flow speed [40]. Similarly, diffuser length did not impact the bubble retention time and therefore had no significant impact on the bubble-to-culture transfer coefficient (Fig. 5). Similarly to the culture-to-atmosphere transfer coefficient, slight variations of bubble-to-culture transfer coefficients observed between these last five experiments were most likely explained by slight temperature changes [20]. The base-case value of $k_L a_B$ used in the following was therefore the average of these five values ($9.60 \pm 0.548\ 10^{-4}\ \mathrm{min^{-1}}$, N = 5).

3.3. Sensitivity analysis

Simulations were performed to determine the efficiency of the CO_2 injection system during full-scale algal cultivation in raceway ponds. This section aims to determine the inaccuracy of CO_2 efficiency predictions caused by uncertainty on model inputs. Fig. 7 shows that the uncertainty on $k_L a_B$ caused an inaccuracy of approximately ± 15% on the predicted CO_2 injection efficiency. This relatively high impact is explained by the strong dependence of the fraction of CO_2 bubbles non-dissolved in the culture on this coefficient. For example, our simulations show that a decrease of $k_L a_B$ by 15% would cause an increase of CO_2 losses to the atmosphere by a factor 3. The uncertainty on $k_L a_{atm}$ has a limited influence on the prediction accuracy (Fig. 7), mainly because culture-to-atmosphere CO_2 losses depend mostly on respiration rates at nighttime. Finally, biological model inputs did not significantly impact the predicted CO_2 injection efficiency (Fig. 7). Based on these results, the confidence interval of predicted CO_2 injection efficiencies shown in the next section was on the order of ± 15%.

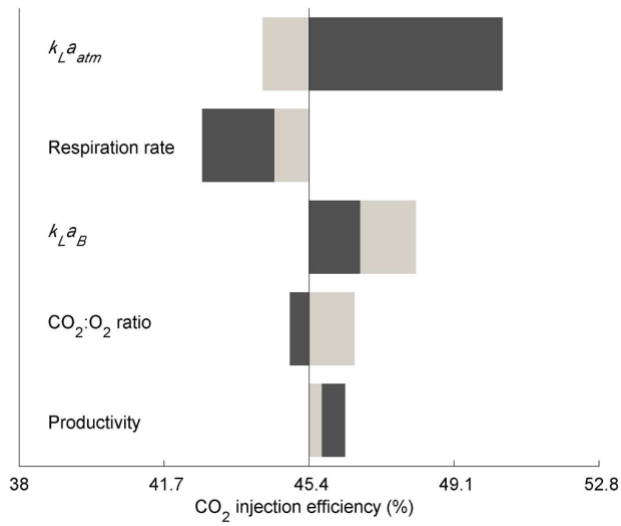

Fig. 7. CO_2 injection efficiency depending on inputs uncertainty (light grey: low input value; dark grey: high input value).

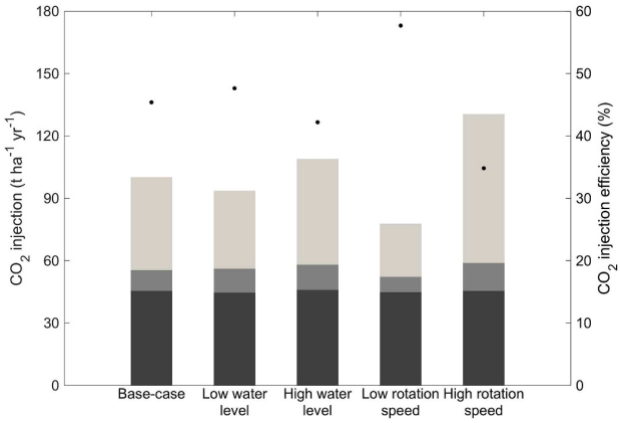

Fig. 8. Fractions of CO_2 lost and absorbed by algae and CO_2 injection efficiency for different system designs (stacked bar: CO_2 injection (light grey: CO_2 atmospheric losses; grey: CO_2 lost by bubbles; dark grey: CO_2 absorption); dots: CO_2 injection efficiency).

4. Optimization of the CO_2 injection system design at full-scale

4.1. Optimizing water level

Fig. 8 shows that the CO_2 injection efficiency was slightly higher for a 0.1 m-deep pond than for a 0.2 m-deep pond. As most the pond depth does not significantly impact the efficiency of bubble-to-culture CO_2 transfer (see Section 2.5), this surprising result is due to biological mechanisms. Increasing depth indeed increases the pond thermal inertia and therefore the nighttime temperatures [43].

As a result, nighttime respiration rates were higher in the 0.2 m-deep pond, resulting in higher atmospheric CO_2 losses (Fig. 8). The daytime respiration rates were lower because of lower temperatures in the 0.2 m-deep pond, but this did not impact the atmospheric losses as algae re-capture the CO_2 produced during daytime respiration during photosynthesis. Based on a CO_2 price of 11–23 USD·ton^{-1} CO_2 (range of CO_2 prices in California between 2011 and 2017; [41]), decreasing the pond depth from 0.2 m to 0.1 m would lead to a decrease of the CO_2 operational costs of 169–352 USD·ha^{-1}·yr^{-1} (Table 3). Ruiz et al. [42] estimated a revenue of 357 USD t^{-1} for algal biomass used for biofuel production. Consequently, based on estimated revenues of 7269 USD·ha^{-1}·yr^{-1}, CO_2 savings through optimization of the water level cannot significantly increase revenues at full-scale. However, even if not illustrated by the simulations undertaken in this study, water level can have a significant impact on algal productivity, water demand [6,43] and nutrient use. The optimization of the water level to maximize system profitability can therefore be performed regardless of associated CO_2 costs.

Table 3
Operational costs depending on the inputs (cost: values in bold and italic were calculated from 2011 to 2017 CO_2 price range [41] and estimated from the CO_2 price range predicted in 2050 [49], respectively).

	CO_2 injection (t CO_2·ha^{-1}·yr^{-1})	CO_2 injection efficiency (%)	Cost (USD·ha^{-1}·yr^{-1})
Base-case	100.2	45.4	1102–2305 *4509–12,024*
Low depth	93.68	47.7	1030–2155 *4216–11,241*
High depth	109.0	42.2	1199–2507 *4905–13,080*
Low rotation speed	77.82	57.7	856–1790 *3502–9338*
High rotation speed	130.5	34.8	1436–3002 *5872–15,660*
pH = 6.5	208.5	19.1	2294–4796 *9383–25,020*
pH = 8	62.65	61.2	689–1441 *2819–7518*

4.2. Optimizing paddle wheel rotation speed

Fig. 8 shows that decreasing the paddle wheel rotation speed from 29 to 13 rpm leads to an increase of the CO_2 injection efficiency from 35 to 58%. This increase was mostly due to a reduction of CO_2 atmospheric losses by 64% (Fig. 8). In addition, CO_2 lost by bubbles reaching the pond surface decreased by 45% when the rotation speed of the paddle wheel decreased from 29 to 13 rpm as less CO_2 was injected to compensate for CO_2 atmospheric losses (Fig. 8). By using the same assumptions than in the optimization of water level, a low paddle wheel rotation speed of 13 rpm could reduce CO_2 operational costs by 246–515 USD·ha^{-1}·yr^{-1} for an equivalent biomass production compared to the base-case paddle wheel rotation speed (Table 3) while reducing CO_2 emissions by 21.8 t·ha^{-1}·yr^{-1}. Energy demand should also be considered when optimizing the paddle wheel rotation speed [38,44].

4.3. Optimizing pH set point

The work from Ying et al. [31] was used to determine the optimal pH for *D. salina* growth since they studied the same algal species with a similar pH control strategy. Ying et al. [31] showed that *D. salina* photosynthetic activity and biomass productivity are impacted by pH within the pH range 6.5–8 whereas its optimal culture pH is 7.2. This section therefore aims to quantify the impact of pH values within this range on the CO_2 injection efficiency. Fig. 9 shows that CO_2 injection efficiency increased by 42% and the injected CO_2 was reduced from 208 t·ha^{-1}·yr^{-1} to 62.7 t·ha^{-1}·yr^{-1} when pH was controlled at 8 instead of 6.5.

This increase in CO_2 injection efficiency is explained by the fact that inorganic carbon concentration in the algal pond significantly decreased when pH increased. CO_2 atmospheric losses thus decreased by 87% when pH increased from 6.5 to 8 (Fig. 9). In addition, CO_2 lost by bubbles reaching the pond surface decreased by 76% when pH set point was increased from 6.5 to 8 as less CO_2 was injected to compensate for CO_2 atmospheric losses (Fig. 9). CO_2 losses were therefore reduced, hence related greenhouse gas emissions [45], when pH set point was increased from 6.5 to 8. Based on the range of CO_2 prices given in the

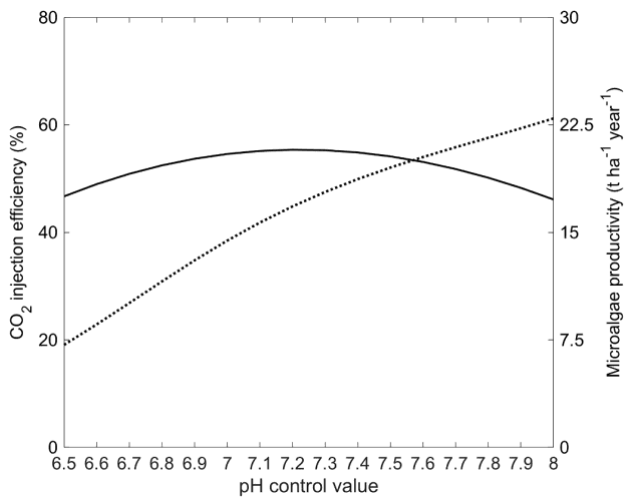

Fig. 9. CO_2 injection efficiency depending on pH set point (dotted line: CO_2 injection efficiency; plain line: microalgae productivity).

previous paragraphs (11–23 USD·t^{-1}; [41]), CO_2 operational costs could therefore be reduced by 1605–3355 USD·ha^{-1}·yr^{-1} when pH set point is increased from 6.5 to 8 (Table 3), which could also improve income by 26–55% [42].

The preferential range of pH for *D. salina* mass culture is therefore 7.2 (optimum pH) to 8 to limit CO_2 losses (Fig. 9). When pH set point was increased from 7.2 to 8, CO_2 losses were reduced by 57% but *D. salina* productivity also decreased from 20.7 down to 17.3 t·ha^{-1}·yr^{-1} reducing revenue by 1216 USD·ha^{-1}·yr^{-1} (based on an estimated revenue of 357 USD·t^{-1} [42]). The pH set point therefore needs to be optimized within this 7.2–8 range to find the best compromise between a high biomass growth rate and low CO_2 losses to reduce related greenhouse gas emissions. pH set point must also be optimized by considering the impact of pH on contamination risks rather than the associated CO_2 costs. pH has indeed been shown to impact the competition between microalgae and other unwanted biological contaminants by affecting differently their growth rates [46]. For example, Wang et al. [47] and Muñoz and Guieysse [48] reported that high pH can inhibit ciliate grazers and limit bacterial growth.

Finally, reducing CO_2 losses also contributes to reduce process footprint. This is straightforward for high added value biomass production where pure CO_2 is used. With industrial CO_2, increasing CO_2 capture efficiency does not result in increasing the amount of mitigated CO_2. Indeed, with a pH regulation scheme the same biomass quantity is eventually produced and the same amount of CO_2 is captured by the algae. But the infrastructure to harvest and carry the industrial CO_2 can be downsized and less electricity will be required for pressuring and injecting the gas. Decreasing both the material quantity for infrastructure set-up and the electricity will mechanically reduce the greenhouse gas release induced by biomass production. Remark that selecting a cultivation process with lower depth also means less material and lower energetic need to inject the gas, further reducing the greenhouse gas emissions.

5. Conclusions

Changing the water level does not impact significantly CO_2 losses, hence CO_2 supply costs. Decreasing the paddle wheel rotation speed from 21 rpm to 13 rpm can decrease CO_2 emissions by 21.8 t·ha^{-1}·yr^{-1}, reducing CO_2 operational costs by 22%. Increasing pH set point from 7.2 to 8 can decrease CO_2 losses by 31.7 t·ha^{-1}·yr^{-1}, reducing CO_2 supply costs by 38%. Such higher efficiency of CO_2 use can significantly decrease CO_2 operational costs while the environmental footprint of the cultivation system is significantly improved. Simultaneously, increasing pH set point from 7.2 to 8 would also decrease algal productivity by 17% (1216 USD·ha^{-1}·yr^{-1}). A trade-off between productivity and costs must therefore be achieved, depending on the selling price of biomass (biofuel vs high value metabolites) and CO_2 cost (flue gas vs pure CO_2).

Based on the current price of CO_2 flue gas and revenue of biofuel, CO_2 savings will not significantly increase system profitability. However, if pure CO_2 is used or if the price of waste CO_2 increases up to a level of 120 USD·t^{-1} [49], these optimization strategies could strongly reduce costs. This study also more accurately characterizes CO_2 losses at a pilot scale system which are rarely considered in life cycle assessment for microalgae production.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of the Phycover ANR-14-CE04-0011 and INRIA Project Lab Algae in silico.

Declaration of authors' contribution

Margaux Caia and Quentin Béchet conceived the study. Margaux Caia performed the experiments and the data were analyzed by all authors. Olivier Bernard provided financial support. Margaux Caia wrote the manuscript which was revised by Quentin Béchet and Olivier Bernard. The final version of the manuscript was read and approved by all authors.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts, informed consent, human or animal rights applicable.

Funding

This work was supported by the ANR Phycover (ANR-14-CE04-0011) and the INRIA, France Project Lab Algae in silico. M. Caia benefited from an INRA funding.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.009.

References

[1] J.W. Richardson, M.D. Johnson, J.L. Outlaw, Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest, Algal Res. 1 (2012) 93–100, https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.04.001.
[2] A. Sun, R. Davis, M. Starbuck, A. Ben-Amotz, R. Pate, P.T. Pienkos, Comparative cost analysis of algal oil production for biofuels, Energy 36 (2011) 5169–5179, https://doi.org/10.1016/j.energy.2011.06.020.
[3] L.Y. Batan, G.D. Graff, T.H. Bradley, Techno-economic and Monte Carlo probabilistic analysis of microalgae biofuel production system, Bioresour. Technol. 219 (2016) 45–52, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.085.
[4] A.E.-F. Abomohra, W. Jin, R. Tu, S.-F. Han, M. Eid, H. Eladel, Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: current status and perspectives, Renew. Sust. Energ. Rev. 64 (2016) 596–606, https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056.
[5] G. Thomassen, M. Van Dael, B. Lemmens, S. Van Passel, A review of the sustainability of algal-based biorefineries: towards an integrated assessment framework, Renew. Sust. Energ. Rev. (2016) 1–12, https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.02.015.
[6] Q. Béchet, A. Shilton, B. Guieysse, Maximizing productivity and reducing environmental impacts of full-scale algal production through optimization of open pond depth and hydraulic retention time, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 4102–4110, https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05412.
[7] R. Putt, M. Singh, S. Chinnasamy, K.C. Das, An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO_2 mass transfer, Bioresour. Technol. 102 (2011) 3240–3245, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.029.
[8] A. Mehrabadi, M.M. Farid, R. Craggs, Variation of biomass energy yield in wastewater treatment high rate algal ponds, Algal Res. 15 (2016) 143–151, https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.016.
[9] I. de Godos, J.L. Mendoza, F.G. Acién, E. Molina, C.J. Banks, S. Heaven, F. Rogalla, Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases, Bioresour. Technol. 153 (2014) 307–314, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.087.
[10] J. Doucha, K. Lívanský, Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: productivity and operational parameters, Arch. Hydrobiol. Algol. Stud. 76 (1995) 129–147.
[11] J.C. Weissman, R.P. Goebel, J.R. Benemann, Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation, Biotechnol. Bioeng. 31 (1988) 336–344, https://doi.org/10.1002/bit.260310409.
[12] K. Zhang, N. Kurano, S. Miyachi, Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor, Bioprocess Biosyst. Eng. 25 (2002) 97–101, https://doi.org/10.1007/s00449-002-0284-y.
[13] P. Talbot, M.P. Gortares, R.W. Lencki, J. de la Noüe, Absorption of CO_2 in algal mass culture systems: a different characterization approach, Biotechnol. Bioeng. 37 (1991) 834–842, https://doi.org/10.1002/bit.260370907.
[14] J. Cheng, Z. Yang, Q. Ye, J. Zhou, K. Cen, Improving CO_2 fixation with microalgae by bubble breakage in raceway ponds with up-down chute baffles, Bioresour. Technol. 201 (2016) 174–181, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.044.
[15] C.M. Britton, J.D. Dodd, Relationships of photosynthetically active radiation and shortwave irradiance, Agric. Meteorol. 17 (1976) 1–7, https://doi.org/10.1016/0002-1571(76)90080-7.
[16] R. Hase, H. Oikawa, C. Sasao, M. Morita, Y. Watanabe, Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai City, J. Biosci. Bioeng. 89 (2000) 157–163, https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88730-7.
[17] J.W. Hong, O.H. Kim, H. Kim, S.W. Jo, H.W. Cho, H.S. Yoon, Mass cultivation from a Korean raceway pond system of indigenous microalgae as potential biofuel

feedstock, Oil Gas Res. 2 (2016) 1–5, https://doi.org/10.4172/ogr.1000108.
[18] J. Doucha, K. Lívanský, Productivity, CO_2/O_2 exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate, J. Appl. Phycol. 18 (2006) 811–826, https://doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4.
[19] J.L. Mendoza, M.R. Granados, I. de Godos, F.G. Acién, E. Molina, S. Heaven, C.J. Banks, Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways, Bioresour. Technol. 137 (2013) 188–195, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.127.
[20] G.A. Hill, Measurement of overall volumetric mass transfer coefficients for carbon dioxide in a well-mixed reactor using a pH probe, Ind. Eng. Chem. Res. 45 (2006) 5796–5800, https://doi.org/10.1021/ie060242t.
[21] X. Guo, L. Yao, Q. Huang, Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae, Bioresour. Technol. 190 (2015) 189–195, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.077.
[22] R. Sander, Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent, Atmos. Chem. Phys. 15 (2015) 4399–4981, https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015.
[23] R.E. Zeebe, D. Wolf-Gladrow, CO_2 in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes, 2nd ed., Elsevier Oceanography Series, Amsterdam, 2001.
[24] G. Copin-Montégut, Chimie de l'eau de mer, Institut Océanographique, Paris, 1996.
[25] H. Bonnefond, N. Moelants, A. Talec, P. Mayzaud, O. Bernard, A. Sciandra, Biotechnology for biofuels coupling and uncoupling of triglyceride and beta-carotene production by *Dunaliella salina* under nitrogen limitation and starvation, Biotechnol. Biofuels 10 (2017) 25, https://doi.org/10.1186/s13068-017-0713-4.
[26] J. Benemann, Microalgae for biofuels and animal feeds, Energies 6 (2013) 5869–5886, https://doi.org/10.3390/en6115869.
[27] R.R.L. Guillard, J.H. Ryther, Studies of marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana Hustedt, and Detonula confervasea(Cleve) Gran, Can. J. Microbiol. 8 (1962) 229–239, https://doi.org/10.1139/m62-029.
[28] R.R.L. Guillard, Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, Cult. Mar. Invertebr. Anim, 1975, pp. 29–60, , https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9.
[29] J.C. Goldman, M.R. Dennett, C.B. Riley, Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO_2 supply in intensive microalgal cultures, Biotechnol. Bioeng. XXIV (1982) 619–631.
[30] M. Giordano, G. Bowes, Gas exchange and C allocation in *Dunaliella salina* cells in response to the N source and CO_2 concentration used for growth, Plant Physiol. 115 (1997) 1049–1056.
[31] K. Ying, J. Gilmour, W.B. Zimmerman, Effects of CO_2 and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*, J. Microb. Biochem. Technol. 6 (2014) 167–173, https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000138.
[32] Q. Béchet, A. Shilton, J.B.K. Park, R.J. Craggs, B. Guieysse, Universal temperature model for shallow algal ponds provides improved accuracy, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 3702–3709, https://doi.org/10.1021/es1040706.
[33] B. Guieysse, Q. Béchet, A. Shilton, Variability and uncertainty in water demand and water footprint assessments of fresh algae cultivation based on case studies from five climatic regions, Bioresour. Technol. 128 (2013) 317–323, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.096.
[34] Q. Béchet, P. Moussion, O. Bernard, Calibration of a productivity model for the microalgae *Dunaliella salina* accounting for light and temperature, Algal Res. 21 (2017) 156–160, https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.001.
[36] Q. Béchet, N. Coulombier, C. Vasseur, T. Lasserre, L. Le Dean, O. Bernard, Full-scale validation of an algal productivity model including nitrogen limitation, Algal Res. (2018), https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.010.
[37] T. Duarte-Santos, J.L. Mendoza-Martín, F.G. Acién Fernández, E. Molina, J.A. Vieira-Costa, S. Heaven, Optimization of carbon dioxide supply in raceway reactors: influence of carbon dioxide molar fraction and gas flow rate, Bioresour. Technol. 212 (2016) 72–81, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.023.
[38] J.L. Mendoza, M.R. Granados, I. de Godos, F.G. Acién, E. Molina, C. Banks, S. Heaven, Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production, Biomass Bioenergy 54 (2013) 267–275, https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.017.
[39] S. Li, S. Luo, R. Guo, Efficiency of CO_2 fixation by microalgae in a closed raceway pond, Bioresour. Technol. 136 (2013) 267–272, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.025.
[40] J.J. Baker, F. Crivellari, Z. Gagnon, M.J. Betenbaugh, Microfluidic bubbler facilitates near complete mass transfer for sustainable multiphase and microbial processing, Biotechnol. Bioeng. 113 (2016) 1924–1933, https://doi.org/10.1002/bit.25972.
[41] C.P. Initiative, California carbon dashboard, http://calcarbondash.org , Accessed date: 8 March 2016(n.d.).
[42] J. Ruiz, G. Olivieri, J. De Vree, R. Bosma, P. Willems, J.H. Reith, M.H.M. Eppink, D.M.M. Kleinegris, H. Wijffels, M.J. Barbosa, Towards industrial products from microalgae, Energy Environ. Sci. 9 (2016) 3036–3043, https://doi.org/10.1039/C6EE01493C.
[43] R. De-Luca, F. Bezzo, Q. Béchet, O. Bernard, Exploiting meteorological forecasts for the optimal operation of algal ponds, J. Process Control 55 (2017) 55–65.
[44] H. Hadiyanto, S. Elmore, T. Van Gerven, A. Stankiewicz, Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design, Chem. Eng. J. 217 (2013) 231–239, https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.015.
[45] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, Renew. Sust. Energ. Rev. 14 (2010) 217–232, https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020.
[46] H. Wang, W. Zhang, L. Chen, J. Wang, T. Liu, The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae, Bioresour. Technol. 128 (2013) 745–750.
[47] Y. Wang, E. Eustance, M. Castillo-Keller, M. Sommerfeld, Evaluation of chemical treatments for control of ciliate grazers in algae cultures: a site study, J. Appl. Phycol. 29 (2017) 2761–2770.
[48] R. Muñoz, B. Guieysse, Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, Water Res. 40 (2006) 2799–2815.
[49] P. Luckow, E.A. Stanton, S. Fields, B. Biewald, S. Jackson, J. Fisher, R. Wilson, Carbon Dioxide Price Forecast, Synap. Energy Econ. Inc, 2015, pp. 1–39.

Bibliographie

Abomohra, A.E.-F., Jin, W., Tu, R., Han, S.-F., Eid, M., Eladel, H., 2016. Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: current status and perspectives. Renew. Sustain. Energy Rev. 64, 596–606. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056

Adam, B., Klawonn, I., Svedén, J.B., Bergkvist, J., Nahar, N., Walve, J., Littmann, S., Whitehouse, M.J., Lavik, G., Kuypers, M.M.M., Ploug, H., 2015. N_2-fixation, ammonium release and N-transfer to the microbial and classical food web within a plankton community. ISME J. 10, 450–459. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.126

Agawin, N.S.R., Rabouille, S., Veldhuis, M.J.W., Servatius, L., Hol, S., van Overzee, H.M.J., Huisman, J., 2007. Competition and facilitation between unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria and non-nitrogen-fixing phytoplankton species. Limnol. Oceanogr. 52, 2233–2248. https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.2233

Agbakpe, M., Ge, S., Zhang, W., Zhang, X., Kobylarz, P., 2014. Algae harvesting for biofuel production: Influences of UV irradiation and polyethylenimine (PEI) coating on bacterial biocoagulation. Bioresour. Technol. 166, 266–272. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.060

Aguilera, A., Aubriot, L., Echenique, R.O., Salerno, G.L., Brena, B.M., Pírez, M., Bonilla, S., 2017. Synergistic effects of nutrients and light favor *Nostocales* over non-heterocystous cyanobacteria. Hydrobiologia 794, 241–255. https://doi.org/10.1007/s10750-017-3099-1

Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Kupper, F.C., Sunda, W.G., Carrano, C.J., 2009. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 17071–17076. https://doi.org/10.1073/pnas.0905512106

Apel, A.C., Weuster-Botz, D., 2015. Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. Bioprocess Biosyst. Eng. 38, 995–1008. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1363-1

Azam, F., Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. Nat. Rev. Microbiol. 5, 782–791. https://doi.org/10.1038/nrmicro1747

Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L., Maršálek, B., 2007. Effects of dissolved

microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. Phycologia 46, 137–142. https://doi.org/10.2216/06-24.1

Bai, X., Lant, P., Pratt, S., 2015. The contribution of bacteria to algal growth by carbon cycling. Biotechnol. Bioeng. 112, 688–695. https://doi.org/10.1002/bit.25475

Bandyopadhyay, A., Elvitigala, T., Liberton, M., Pakrasi, H.B., 2013. Variations in the rhythms of respiration and nitrogen fixation in members of the unicellular diazotrophic cyanobacterial genus Cyanothece. PLANT Physiol. 161, 1334–1346. https://doi.org/10.1104/pp.112.208231

Barra, L., Chandrasekaran, R., Corato, F., Brunet, C., 2014. The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. Mar. Drugs 12, 1641–1675. https://doi.org/10.3390/md12031641

Béchet, Q., Chambonnière, P., Shilton, A., Guizard, G., Guieysse, B., 2015. Algal productivity modeling: a step toward accurate assessments of full-scale algal cultivation. Biotechnol. Bioeng. 112, 987–996. https://doi.org/10.1002/bit.25517

Béchet, Q., Laviale, M., Arsapin, N., Bonnefond, H., Bernard, O., 2017a. Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity. Biotechnol. Biofuels 10, 136. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0823-z

Béchet, Q., Moussion, P., Bernard, O., 2017b. Calibration of a productivity model for the microalgae *Dunaliella salina* accounting for light and temperature. Algal Res. 21, 156–160. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.001

Béchet, Q., Shilton, A., Guieysse, B., 2016. Maximizing productivity and reducing environmental impacts of full-scale algal production through optimization of open pond depth and hydraulic retention time. Environ. Sci. Technol. 50, 4102–4110. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05412

Beliaev, A.S., Romine, M.F., Serres, M., Bernstein, H.C., Linggi, B.E., Markillie, L.M., Isern, N.G., Chrisler, W.B., Kucek, L.A., Hill, E.A., Pinchuk, G.E., Bryant, D.A., Steven Wiley, H., Fredrickson, J.K., Konopka, A., 2014. Inference of interactions in cyanobacterial–heterotrophic co-cultures via transcriptome sequencing. ISME J. 8, 2243–2255. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.69

Benemann, J.R., Woertz, I., Lundquist, T., 2018. Autotrophic microalgae biomass production:

from niche markets to commodities. Ind. Biotechnol. 14, 3–10. https://doi.org/10.1089/ind.2018.29118.jrb

Bengtsson, M.M., Wagner, K., Schwab, C., Urich, T., Battin, T.J., 2018. Light availability impacts structure and function of phototrophic stream biofilms across domains and trophic levels. Mol. Ecol. 27, 2913–2925. https://doi.org/10.1111/mec.14696

Benschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. J Mar Res 11, 87–96.

Bernard, O., 2011. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO_2 mitigation and biofuel production. J. Process Control 21, 1378–1389. https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2011.07.012

Bernard, O., Mairet, F., Chachuat, B., 2015. Modelling of microalgae culture systems with applications to control and optimization, in: Posten, C., Feng Chen, S. (Eds.), Microalgae Biotechnology. Springer International Publishing, Cham, pp. 59–87. https://doi.org/10.1007/10_2014_287

Berthelot, H., Bonnet, S., Camps, M., Grosso, O., Moutin, T., 2015. Assessment of the dinitrogen released as ammonium and dissolved organic nitrogen by unicellular and filamentous marine diazotrophic cyanobacteria grown in culture. Front. Mar. Sci. 2, 80. https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00080

Berthelot, H., Bonnet, S., Grosso, O., Cornet, V., Barani, A., 2016. Transfer of diazotroph-derived nitrogen towards non-diazotrophic planktonic communities: a comparative study between *Trichodesmium erythraeum*, *Crocosphaera watsonii* and *Cyanothece* sp. Biogeosciences 13, 4005–4021. https://doi.org/10.5194/bg-13-4005-2016

Besson, A., Guiraud, P., 2013. High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. Bioresour. Technol. 147, 464–470. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.053

Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C., 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. Appl. Energy 88, 3425–3431. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.064

Biondi, N., Cheloni, G., Rodolfi, L., Viti, C., Giovannetti, L., Tredici, M.R., 2018. *Tetraselmis*

suecica F&M-M33 growth is influenced by its associated bacteria. Microb. Biotechnol. 11, 211–223. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12865

Bittencourt-Oliveira, M. do C., Chia, M.A., de Oliveira, H.S.B., Cordeiro Araújo, M.K., Molica, R.J.R., Dias, C.T.S., 2015. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: implications for microcystins production. J. Appl. Phycol. 27, 275–284. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0326-2

Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Bernard, O., Sciandra, A., 2016. Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of *Dunaliella salina*. Algal Res. 14, 72–78. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.018

Bonnefond, H., Moelants, N., Talec, A., Mayzaud, P., Bernard, O., Sciandra, A., 2017. Coupling and uncoupling of triglyceride and beta-carotene production by *Dunaliella salina* under nitrogen limitation and starvation. Biotechnol. Biofuels 10. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0713-4

Bonnet, S., Berthelot, H., Turk-Kubo, K., Fawcett, S., Rahav, E., L'Helguen, S., Berman-Frank, I., 2016. Dynamics of N_2 fixation and fate of diazotroph-derived nitrogen in a low-nutrient, low-chlorophyll ecosystem: results from the VAHINE mesocosm experiment (New Caledonia). Biogeosciences 13, 2653–2673. https://doi.org/10.5194/bg-13-2653-2016

Borowitzka, M.A., 2018. The 'stress' concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. J. Appl. Phycol. https://doi.org/10.1007/s10811-018-1399-0

Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., Kessly, D., 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. J. Appl. Phycol. 2, 111–119.

Bougaran, G., Bernard, O., Sciandra, A., 2010. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. J. Theor. Biol. 265, 443–454. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.04.018

Bronk, D.A., See, J.H., Bradley, P., Killberg, L., 2007. DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. Biogeosciences 4, 283–296. https://doi.org/10.5194/bg-4-283-2007

Burris, J.E., 1981. Effects of oxygen and inorganic carbon concentrations on the photosynthetic

quotients of marine algae. Mar. Biol. 65, 215–219. https://doi.org/10.1007/BF00397114

Burson, A., Stomp, M., Greenwell, E., Grosse, J., Huisman, J., 2018. Competition for nutrients and light: testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community. Ecology 99, 1108–1118. https://doi.org/10.1002/ecy.2187

Camacho Rubio, F., Acién Fernandez, F.G., Sanchez Perez, J.A., Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., 1999. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. Biotechnol. Bioeng. 62, 71–86. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990105)62:1<71::AID-BIT9>3.0.CO;2-T

Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M., Carpenter, E.J., 2008. Nitrogen in the marine environment, 2nd Edition. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Capone, D.G., Burns, J.A., Montoya, J.P., Subramaniam, A., Mahaffey, C., Gunderson, T., Michaels, A.F., Carpenter, E.J., 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. Glob. Biogeochem. Cycles 19, n/a-n/a. https://doi.org/10.1029/2004GB002331

Carpenter, E.J., Roenneberg, T., 1995. The marine planktonic cyanobacteria *Trichodesmium* spp.: photosynthetic rate measurements in the SW Atlantic Ocean. Mar. Ecol. Prog. Ser. 118, 267–273.

Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X., 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. Biotechnol. Prog. 22, 1490–1506. https://doi.org/10.1021/bp060065r

Chang, H.-X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q., Zhu, X., 2016. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO_2 biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. Bioresour. Technol. 206, 231–238. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.087

Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R.D., Drogui, P., Surampalli, R.Y., 2018. The potential of microalgae in biodiesel production. Renew. Sustain. Energy Rev. 90, 336–346. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.073

Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S., 2015. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. Bioresour.

Technol. 175, 578–585. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.159

Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. Biotechnol. Adv. 29, 686–702. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015

Christie-Oleza, J.A., Scanlan, D.J., Armengaud, J., 2015. "You produce while I clean up", a strategy revealed by exoproteomics during *Synechococcus* - *Roseobacter* interactions. PROTEOMICS 15, 3454–3462. https://doi.org/10.1002/pmic.201400562

Compaoré, J., Stal, L.J., 2010. Oxygen and the light–dark cycle of nitrogenase activity in two unicellular cyanobacteria. Environ. Microbiol. 12, 54–62. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02034.x

Copin-Montégut, G., 1996. Chimie de l'eau de mer. Institut océanographique.

Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., Smith, A.G., 2005. Algae acquire vitamin B_{12} through a symbiotic relationship with bacteria. Nature 438, 90–93. https://doi.org/10.1038/nature04056

Danger, M., Leflaive, J., Oumarou, C., Ten-Hage, L., Lacroix, G., 2007. Control of phytoplankton-bacteria interactions by stoichiometric constraints. Oikos 116, 1079–1086. https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15424.x

Darvehei, P., Bahri, P.A., Moheimani, N.R., 2018. Model development for the growth of microalgae: a review. Renew. Sustain. Energy Rev. 97, 233–258. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027

de-Bashan, L.E., Mayali, X., Bebout, B.M., Weber, P.K., Detweiler, A.M., Hernandez, J.-P., Prufert-Bebout, L., Bashan, Y., 2016. Establishment of stable synthetic mutualism without co-evolution between microalgae and bacteria demonstrated by mutual transfer of metabolites (NanoSIMS isotopic imaging) and persistent physical association (Fluorescent in situ hybridization). Algal Res. 15, 179–186. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.019

Dekaezemacker, J., Bonnet, S., 2011. Sensitivity of N_2 fixation to combined nitrogen forms (NO_3^- and NH_4^+) in two strains of the marine diazotroph *Crocosphaera watsonii* (Cyanobacteria). Mar. Ecol. Prog. Ser. 438, 33–46.

DellaGreca, M., Zarrelli, A., Fergola, P., Cerasuolo, M., Pollio, A., Pinto, G., 2010. Fatty acids

released by *Chlorella vulgaris* and their role in interference with *Pseudokirchneriella subcapitata*: experiments and modelling. J. Chem. Ecol. 36, 339–349. https://doi.org/10.1007/s10886-010-9753-y

Dias, F., Antunes, J.T., Ribeiro, T., Azevedo, J., Vasconcelos, V., Leão, P.N., 2017. Cyanobacterial allelochemicals but not cyanobacterial cells markedly reduce microbial community diversity. Front. Microbiol. 8, 1495. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01495

Do Nascimento, M., Sanchez Rizza, L., Arruebarrena Di Palma, A., Dublan, M. de los A., Salerno, G., Rubio, L.M., Curatti, L., 2015. Cyanobacterial biological nitrogen fixation as a sustainable nitrogen fertilizer for the production of microalgal oil. Algal Res. 12, 142–148. https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.017

Doucha, J., Lívanský, K., 2006. Productivity, CO_2/O_2 exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. J. Appl. Phycol. 18, 811–826. https://doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4

Dron, A., Rabouille, S., Claquin, P., Le Roy, B., Talec, A., Sciandra, A., 2012. Light-dark (12:12) cycle of carbon and nitrogen metabolism in *Crocosphaera watsonii* WH8501: relation to the cell cycle. Environ. Microbiol. 14, 967–981. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02675.x

Droop, M.R., 1968. Vitamin B_{12} and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 48, 689. https://doi.org/10.1017/S0025315400019238

Ducklow, H.W., Carlson, C.A., 1992. Oceanic Bacterial Production, in: Marshall, K.C. (Ed.), Advances in Microbial Ecology. Springer US, Boston, MA, pp. 113–181. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7609-5_3

Dunker, S., Althammer, J., Pohnert, G., Wilhelm, C., 2017. A fateful meeting of two phytoplankton species—chemical vs. cell-cell-interactions in co-cultures of the free algae *Oocystis marsonii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Microb. Ecol. 74, 22–32. https://doi.org/10.1007/s00248-016-0927-1

Fachet, M., Flassig, R.J., Rihko-Struckmann, L., Sundmacher, K., 2014. A dynamic growth model of *Dunaliella salina*: parameter identification and profile likelihood analysis. Bioresour. Technol. 173, 21–31. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.124

Falkowski, P.G., Barber, Richard T., Smetacek, Victor, 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. Science 281, 200–206. https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200

Fay, M.P., Proschan, M.A., 2010. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. Stat. Surv. 4, 1–39. https://doi.org/10.1214/09-SS051

Field, C.B., Behrenfeld, M., J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. Science 281, 237–240. https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237

Finkel, Z.V., Beardall, J., Flynn, K.J., Quigg, A., Rees, T.A.V., Raven, J.A., 2010. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. J. Plankton Res. 32, 119–137. https://doi.org/10.1093/plankt/fbp098

Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U., Zamir, A., 1996. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. J. Biol. Chem. 271, 17718–17723. https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17718

Flores, E., López-Lozano, A., Herrero, A., 2015. Nitrogen fixation in the oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria): the fight against oxygen, in: de Bruijn, F.J. (Ed.), Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp. 879–890. https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch86

Fouilland, E., 2012. Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 11, 1–4. https://doi.org/10.1007/s11157-012-9270-2

Fuentes, J., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M., Vílchez, C., 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. Mar. Drugs 14, 100. https://doi.org/10.3390/md14050100

Fulbright, S.P., Robbins-Pianka, A., Berg-Lyons, D., Knight, R., Reardon, K.F., Chisholm, S.T., 2018. Bacterial community changes in an industrial algae production system. Algal Res. 31, 147–156. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.010

García, F., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D., 2007. Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. Bioresour. Technol. 98, 1359–1365.

https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.051

Ghoshal, D., Goyal, A., 2001. Oxygen inhibition of dissolved inorganic carbon uptake in unicellular green algae. Phycol. Res. 49, 319–324.

Goebel, N.L., Edwards, C.A., Carter, B.J., Achilles, K.M., Zehr, J.P., 2008. Growth and carbon content of three different-sized diazotrophic cyanobacteria observed in the Subtropical North Pacific. J. Phycol. 44, 1212–1220. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00581.x

Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S., Gonzalez, M.A., 2003. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. Biol. Res. 36, 185–192.

Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2016. Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: nutrients removal, biomass and lipid production. Bioresour. Technol. 200, 279–286. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.023

Gradoville, M.R., White, A.E., Letelier, R.M., 2014. Physiological response of *Crocosphaera watsonii* to enhanced and fluctuating carbon dioxide conditions. PLoS ONE 9, e110660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110660

Grant, M.A., Kazamia, E., Cicuta, P., Smith, A.G., 2014. Direct exchange of vitamin B_{12} is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal–bacterial cocultures. ISME J. 8, 1418–1427. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.9

Grimaud, G.M., Rabouille, S., Dron, A., Sciandra, A., Bernard, O., 2014. Modelling the dynamics of carbon–nitrogen metabolism in the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501, under variable light regimes. Ecol. Model. 291, 121–133. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.07.016

Grobbelaar, J.U., Soeder, C.J., 1985. Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. J. Plankton Res. 7, 497–506. https://doi.org/10.1093/plankt/7.4.497

Großkopf, T., LaRoche, J., 2012. Direct and indirect costs of dinitrogen fixation in *Crocosphaera watsonii* WH8501 and possible implications for the nitrogen cycle. Front. Microbiol. 3, 326. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00236

Guillard, R.R., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana*

(Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8, 229–239. https://doi.org/10.1139/m62-029

Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Hewson, I., Poretsky, R.S., Beinart, R.A., White, A.E., Shi, T., Bench, S.R., Moisander, P.H., Paerl, R.W., Tripp, H.J., Montoya, J.P., Moran, M.A., Zehr, J.P., 2009. In situ transcriptomic analysis of the globally important keystone N_2-fixing taxon *Crocosphaera watsonii*. ISME J. 3, 618–639. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.8

Hocher, V., Auguy, F., Bogusz, D., Doumas, P., Franche, C., Gherbi, H., Laplaze, L., Obertello, M., Svistoonoff, S., 2009. Les symbioses actinorhiziennes fixatrices d'azote: un exemple d'adaptation aux contraintes abiotiques du sol. Agriculture 498–505. https://doi.org/10.1684/agr.2009.0341

Hu, S., Wang, You, Wang, Ying, Zhao, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Jiang, M., Tang, X., 2018. Effects of elevated pCO_2 on physiological performance of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae). J. Oceanol. Limnol. 36, 317–328. https://doi.org/10.1007/s00343-018-6278-7

Huisman, J., Jonker, R.R., Zonneveld, C., Weissing, F.J., 1999. Competition for light between phytoplankton species: experimental tests of mechanistic theory. Ecology 80, 211–222.

Hulatt, C.J., Thomas, D.N., 2010. Dissolved organic matter (DOM) in microalgal photobioreactors: a potential loss in solar energy conversion? Bioresour. Technol. 101, 8690–8697. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.086

Jiménez, C., Cossío, B.R., Niell, F.X., 2003. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. Aquaculture 221, 331–345. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00123-6

Jin, E.S., Melis, A., 2003. Microalgal biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 8, 331–337. https://doi.org/10.1007/BF02949276

Jones, B., Renaut, R.W., Rosen, M.R., 2003. Silicified microbes in a geyser mound: the enigma

of low-temperature cyanobacteria in a high-temperature setting. PALAIOS 18, 87–109. https://doi.org/10.1669/0883-1351(2003)18<87:SMIAGM>2.0.CO;2

Jonsson, P.R., Pavia, H., Toth, G., 2009. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 11177–11182. https://doi.org/10.1073/pnas.0900964106

Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. FEMS Microbiol. Ecol. 35, 1–9. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x

Karl, D.M., Church, M.J., 2017. Ecosystem Structure and Dynamics in the North Pacific Subtropical Gyre: New Views of an Old Ocean. Ecosystems 20, 433–457. https://doi.org/10.1007/s10021-017-0117-0

Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T.T.V., Croft, M.T., Sherwood, E., Sasso, S., Hodson, S.J., Warren, M.J., Smith, A.G., 2012. Mutualistic interactions between vitamin B_{12}-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation: algal-bacterial interactions for delivery of vitamin B_{12}. Environ. Microbiol. 14, 1466–1476. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02733.x

Kazamia, E., Helliwell, K.E., Purton, S., Smith, A.G., 2016. How mutualisms arise in phytoplankton communities: building eco-evolutionary principles for aquatic microbes. Ecol. Lett. 19, 810–822. https://doi.org/10.1111/ele.12615

Knapp, A., Dekaezemacker, J., Bonnet, S., Sohm, J., Capone, D., 2012. Sensitivity of *Trichodesmium erythraeum* and *Crocosphaera watsonii* abundance and N_2 fixation rates to varying NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations in batch cultures. Aquat. Microb. Ecol. 66, 223–236. https://doi.org/10.3354/ame01577

Kouzuma, A., Watanabe, K., 2015. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. Curr. Opin. Biotechnol. 33, 125–129. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.007

Lam, T.P., Lee, T.-M., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2018. Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds. Bioresour. Technol. 252, 180–187. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.088

Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H., 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. Trends

Biotechnol. 26, 631–638. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.002

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. Environ. Sci. Technol. 43, 6475–6481. https://doi.org/10.1021/es900705j

Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., Fouilland, E., Bernard, O., Cadoret, J.-P., 2013. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. Algal Res. 2, 212–222. https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.05.003

Le Chevanton, M., Garnier, M., Lukomska, E., Schreiber, N., Cadoret, J.-P., Saint-Jean, B., Bougaran, G., 2016. Effects of nitrogen limitation on *Dunaliella* sp.–*Alteromonas* sp. interactions: from mutualistic to competitive relationships. Front. Mar. Sci. 3, 123. https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00123

Lenneman, E.M., Wang, P., Barney, B.M., 2014. Potential application of algicidal bacteria for improved lipid recovery with specific algae. FEMS Microbiol. Lett. 354, 102–110. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12436

Levenspiel, O., Smith, W.K., 1957. Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing of fluids in flow. Chem. Eng. Sci. 6, 227–235. https://doi.org/10.1016/0009-2509(57)85021-0

Lian, J., Wijffels, R.H., Smidt, H., Sipkema, D., 2018. The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. Microb. Biotechnol. 11, 806–818. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13296

Liu, L., Huang, Q., Qin, B., 2018. Characteristics and roles of *Microcystis* extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacterial blooms: a short review. J. Freshw. Ecol. 33, 183–193. https://doi.org/10.1080/02705060.2017.1391722

Lutzu, G.A., Turgut, D.N., 2018. Interactions of microalgae and other microorganisms for enhanced production of high-value compounds. Front. Biosci. Landmark Ed. 23, 1487–1504.

Mairet, F., Bernard, O., Lacour, T., Sciandra, A., 2011a. Modelling microalgae growth in nitrogen limited photobiorector for estimating biomass, carbohydrate and neutral lipid productivities. IFAC Proc. Vol. 44, 10591–10596. https://doi.org/10.3182/20110828-6-IT-

1002.03165

Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., Sciandra, A., 2011b. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* under nitrogen limitation. Bioresour. Technol. 102, 142–149. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.138

Malek, A., Zullo, L.C., Daoutidis, P., 2016. Modeling and dynamic optimization of microalgae cultivation in outdoor open ponds. Ind. Eng. Chem. Res. 55, 3327–3337. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03209

Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaulot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Appl. Environ. Microbiol. 63, 186–193.

Masojídek, J., Sergejevová, M., Malapascua, J.R., Kopecký, J., 2015. Thin-layer systems for mass cultivation of microalgae: flat panels and sloping cascades, in: Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.), Algal Biorefineries. Springer International Publishing, Cham, pp. 237–261. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_7

Masuda, T., Bernát, G., Bečková, M., Kotabová, E., Lawrenz, E., Lukeš, M., Komenda, J., Prášil, O., 2018. Diel regulation of photosynthetic activity in the oceanic unicellular diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501: PSII decline in *Crocosophaera watsonii*. Environ. Microbiol. 20, 546–560. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13963

Masuda, T., Furuya, K., Kodama, T., Takeda, S., Harrison, P.J., 2013. Ammonium uptake and dinitrogen fixation by the unicellular nanocyanobacterium *Crocosphaera watsonii* in nitrogen-limited continuous cultures. Limnol. Oceanogr. 58, 2029–2036. https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.6.2029

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew. Sustain. Energy Rev. 14, 217–232. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020

Mehrabadi, A., Craggs, R., Farid, M.M., 2015. Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. Bioresour. Technol. 184, 202–214. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.004

Mendoza, J.L., Granados, M.R., de Godos, I., Acién, F.G., Molina, E., Heaven, S., Banks, C.J.,

2013. Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways. Bioresour. Technol. 137, 188–195. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.127

Meseck, S.L., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Alix, J.H., Kapareiko, D., 2007. Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. J. Appl. Phycol. 19, 229–237. https://doi.org/10.1007/s10811-006-9128-5

Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. J. Ind. Microbiol. 17, 477–489. https://doi.org/10.1007/BF01574779

Mishra, A., Kavita, K., Jha, B., 2011. Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*. Carbohydr. Polym. 83, 852–857. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.067

Mobin, S., Alam, F., 2017. Some promising microalgal species for commercial applications: a review. Energy Procedia 110, 510–517. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177

Mohr, W., Intermaggio, M.P., LaRoche, J., 2010. Diel rhythm of nitrogen and carbon metabolism in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Crocosphaera watsonii* WH8501. Environ. Microbiol. 12, 412–421. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02078.x

Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. Annu. Rev. Microbiol. 3, 371–394. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., Huner, N.P.A., 2006. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 222–252. https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006

Newby, D.T., Mathews, T.J., Pate, R.C., Huesemann, M.H., Lane, T.W., Wahlen, B.D., Mandal, S., Engler, R.K., Feris, K.P., Shurin, J.B., 2016. Assessing the potential of polyculture to accelerate algal biofuel production. Algal Res. 19, 264–277. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.004

Olguín, E.J., 2012. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. Biotechnol. Adv. 30, 1031–1046. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001

Oren, A., 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. Saline Syst. 1, 2.

Paerl, H.W., Otten, T.G., 2016. Duelling 'CyanoHABs': unravelling the environmental drivers controlling dominance and succession among diazotrophic and non-N_2 -fixing harmful cyanobacteria: environmental drivers of CyanoHABs. Environ. Microbiol. 18, 316–324. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13035

Paul, C., Mausz, M.A., Pohnert, G., 2013. A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. Metabolomics 9, 349–359. https://doi.org/10.1007/s11306-012-0453-1

Peng, L., Zhang, Z., Lan, C.Q., Basak, A., Bond, N., Ding, X., Du, J., 2017. Alleviation of oxygen stress on *Neochloris oleoabundans*: effects of bicarbonate and pH. J. Appl. Phycol. 29, 143–152. https://doi.org/10.1007/s10811-016-0931-3

Perera, I., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M., 2018. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 7351–7363. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9192-1

Pfaffinger, C.E., Schöne, D., Trunz, S., Löwe, H., Weuster-Botz, D., 2016. Model-based optimization of microalgae areal productivity in flat-plate gas-lift photobioreactors. Algal Res. 20, 153–163. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.002

Ploug, H., Bergkvist, J., 2015. Oxygen diffusion limitation and ammonium production within sinking diatom aggregates under hypoxic and anoxic conditions. Mar. Chem. 176, 142–149. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.08.012

Price, B.J., Kollman, V.H., Salzman, G.C., 1978. Light-scatter analysis of microalgae. Correlation of scatter patterns from pure and mixed asynchronous cultures. Biophys. J. 22, 29–36. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85468-X

Prieto, A., Pedro Cañavate, J., García-González, M., 2011. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. J. Biotechnol. 151, 180–185. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.11.011

Pujo-Pay, M., Raimbault, P., 1994. Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. Mar. Ecol. Prog. Ser. 105, 203–207. https://doi.org/10.3354/meps105203

Putt, R., Singh, M., Chinnasamy, S., Das, K.C., 2011. An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO_2 mass transfer. Bioresour. Technol. 102, 3240–3245. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.029

Ramanan, R., Kim, B.-H., Cho, D.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S., 2016. Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. Biotechnol. Adv. 34, 14–29. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003

Ruiz, J., Olivieri, G., de Vree, J., Bosma, R., Willems, P., Reith, J.H., Eppink, M.H.M., Kleinegris, D.M.M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2016. Towards industrial products from microalgae. Energy Environ. Sci. 9, 3036–3043. https://doi.org/10.1039/C6EE01493C

Sapp, M., Schwaderer, A.S., Wiltshire, K.H., Hoppe, H.-G., Gerdts, G., Wichels, A., 2007. Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? Microb. Ecol. 53, 683–699. https://doi.org/10.1007/s00248-006-9162-5

Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L.R., van Nes, E.H., 1997. On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. Ecology 78, 272–282. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[0272:OTDOFC]2.0.CO;2

Schmid, A.-M.M., 2003. Endobacteria in the diatom *Pinnularia* (Bacillariophyceae). I. Scattered ct-nucleoids explained: dapidna complexes stem from exoplastidial bacteria boring into the chloroplasts. J. Phycol. 39, 122–138. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02084.x

Seymour, J.R., Amin, S.A., Raina, J.-B., Stocker, R., 2017. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. Nat. Microbiol. 2, 17065. http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65

Seymour, J.R., Simó, R., Ahmed, T., Stocker, R., 2010. Chemoattraction to dimethylsulfoniopropionate throughout the marine microbial food web. Science 329, 342–345. https://doi.org/10.1126/science.1188418

Skowrońska, M., Filipek, T., 2014. Life cycle assessment of fertilizers: a review. Int. Agrophysics 28, 101–110. https://doi.org/10.2478/intag-2013-0032

Smriga, S., Fernandez, V.I., Mitchell, J.G., Stocker, R., 2016. Chemotaxis toward phytoplankton drives organic matter partitioning among marine bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci.

113, 1576–1581. https://doi.org/10.1073/pnas.1512307113

Solé, J., García-Ladona, E., Ruardij, P., Estrada, M., 2005. Modelling allelopathy among marine algae. Ecol. Model. 183, 373–384. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.08.021

Solimeno, A., García, J., 2017. Microalgae-bacteria models evolution: From microalgae steady-state to integrated microalgae-bacteria wastewater treatment models – A comparative review. Sci. Total Environ. 607–608, 1136–1150. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.114

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. 101, 87–96. https://doi.org/10.1263/jbb.101.87

Stehfest, K., Toepel, J., Wilhelm, C., 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. Plant Physiol. Biochem. 43, 717–726. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.001

Talbot, P., Gortares, M.P., Lencki, R.W., de la Noüe, J., 1991. Absorption of CO_2 in algal mass culture systems: a different characterization approach: absorption of CO_2 in algal mass culture systems. Biotechnol. Bioeng. 37, 834–842. https://doi.org/10.1002/bit.260370907

Ternon, E., Pavaux, A.-S., Marro, S., Thomas, O.P., Lemée, R., 2018. Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and a co-occurring diatom. Harmful Algae 75, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.04.003

Thompson, A.W., Foster, R.A., Krupke, A., Carter, B.J., Musat, N., Vaulot, D., Kuypers, M.M.M., Zehr, J.P., 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. Science 337, 1546–1550. https://doi.org/10.1126/science.1222700

Thompson, A.W., Zehr, J.P., 2013. Cellular interactions: lessons from the nitrogen-fixing cyanobacteria. J. Phycol. 49, 1024–1035. https://doi.org/10.1111/jpy.12117

Tilman, D., 1982. Resource competition and community structure. Princeton university press.

van Tol, H.M., Amin, S.A., Armbrust, E.V., 2017. Ubiquitous marine bacterium inhibits diatom cell division. ISME J. 11, 31–42. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.112

Vu, C.H.T., Lee, H.-G., Chang, Y.K., Oh, H.-M., 2018. Axenic cultures for microalgal biotechnology: establishment, assessment, maintenance, and applications. Biotechnol. Adv. 36, 380–396. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.018

Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO_2 bio-mitigation using microalgae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 707–718. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y

Wang, H., Laughinghouse, H.D., Anderson, M.A., Chen, F., Willliams, E., Place, A.R., Zmora, O., Zohar, Y., Zheng, T., Hill, R.T., 2012. Novel bacterial isolate from Permian groundwater, capable of aggregating potential biofuel-producing microalga *Nannochloropsis oceanica* IMET1. Appl. Environ. Microbiol. 78, 1445–1453. https://doi.org/10.1128/AEM.06474-11

Wang, H., Zhang, W., Chen, L., Wang, J., Liu, T., 2013. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. Bioresour. Technol. 128, 745–750. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.158

Waterbury, J.B., Willey, J.M., 1988. [6] Isolation and growth of marine planktonic cyanobacteria, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 100–105. https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67009-1

Webb, E.A., Ehrenreich, I.M., Brown, S.L., Valois, F.W., Waterbury, J.B., 2008. Phenotypic and genotypic characterization of multiple strains of the diazotrophic cyanobacterium, *Crocosphaera watsonii*, isolated from the open ocean. Environ. Microbiol. 11, 338–348. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01771.x

Wood, E.D., Armstrong, F.A.J., Richards, F.A., 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 47, 23–31.

Xue, L., Shang, H., Ma, P., Wang, X., He, X., Niu, J., Wu, J., 2018. Analysis of growth and lipid production characteristics of *Chlorella vulgaris* in artificially constructed consortia with symbiotic bacteria. J. Basic Microbiol. 58, 358–367. https://doi.org/10.1002/jobm.201700594

Yang, J., Gou, Y., Fang, F., Guo, J., Lu, L., Zhou, Y., Ma, H., 2018. Potential of wastewater treatment using a concentrated and suspended algal-bacterial consortium in a photo membrane bioreactor. Chem. Eng. J. 335, 154–160. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.149

Ying, K., 2014. Effects of CO_2 and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. J. Microb. Biochem. Technol. 06, 167–173. https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000138

Zambrano, J., Krustok, I., Nehrenheim, E., Carlsson, B., 2016. A simple model for algae-bacteria interaction in photo-bioreactors. Algal Res. 19, 155–161. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.022

Zanchett, G., Oliveira-Filho, E., 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. Toxins 5, 1896–1917. https://doi.org/10.3390/toxins5101896

Zeebe, R.E., Wolf-Gladrow, D.A., 2001. CO_2 in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes. Gulf Professional Publishing.

Zhang, K., Kurano, N., Miyachi, S., 2002. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. Bioprocess Biosyst. Eng. 25, 97–101. https://doi.org/10.1007/s00449-002-0284-y

Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., Gedalanga, P., 2018. Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. Microb. Biotechnol. 11, 833–847. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300

CARACTERISATION ET MODELISATION DES INTERACTIONS AU SEIN D'UN ASSEMBLAGE DE CYANOBACTERIES DIAZOTROPHES ET DE MICROALGUES

L'objectif de cette thèse est d'étudier et d'optimiser les interactions entre la microalgue d'intérêt économique *Dunaliella salina* et la cyanobactérie fixatrice de diazote *Crocosphaera watsonii.* Comme pour les plantes terrestres, la co-culture d'une microalgue et d'un organisme diazotrophe pourrait en effet conduire à limiter les apports d'engrais azoté. Une première série d'expériences compare la physiologie de *D. salina* et *C. watsonii* en mono- et co-cultures pour comprendre l'impact des interactions sur la dynamique de l'assemblage. Une forte compétition pour la lumière et des effets allélopathiques sont identifiés. Les résultats expérimentaux sont ensuite extrapolés grâce à une approche théorique de modélisation. En supposant le recyclage de l'azote dérivé de la diazotrophie par des bactéries, il est montré que la compétition pour la lumière reste contre-productive pour l'écosystème. Dans un troisième temps, une autre série d'expériences vise à co-cultiver les organismes dans des systèmes sans contact cellulaire pour s'affranchir de la compétition pour la lumière. Le modèle mathématique permet alors d'identifier les interactions complexes liées à cet assemblage artificiel.

Cette étude confirme l'importance de coupler expérimentations et modélisation pour comprendre l'ensemble des interactions au sein d'un écosystème. Nos résultats offrent des perspectives encourageantes pour la co-culture et son déploiement industriel dans un objectif de développement durable.

Mots-clés : *Dunaliella salina*, *Crocosphaera watsonii*, productivité, modélisation, interaction, compétition

CHARACTERIZATION AND MODELLING OF THE INTERACTIONS WITHIN AN ASSEMBLAGE OF MICROALGAE AND DIAZOTROPHIC CYANOBACTERIA

The aim of this thesis is to investigate and to optimize the interactions within *Dunaliella salina*, a microalga of economic interest, and the N_2-fixing cyanobacteria *Crocosphaera watsonii*. Similarly to terrestrial plants, co-culturing microalgae together with diazotrophs would indeed reduce the need of nitrogen fertilizer inputs. A first set of experiments compares *D. salina* and *C. watsonii* physiologies when mono- and co-cultured to understand the impact of interactions on the ecosystem dynamics. A strong light competition and an allelopathic effect are both detected. Results are then extrapolated using a theoretical modelling approach. Competition for light is shown to be counter-productive for the ecosystem, even when the bacteria recycle diazotroph derived nitrogen. A second set of experiments is conducted in contactless systems to avoid light competition. The mathematical model allows us to determine the interactions associated with this artificial assemblage.

This thesis shows the importance of coupling experimental and modelling approaches to further understand the network of interactions within the ecosystem. Our results highlight encouraging perspectives for industrial development of co-cultures in an objective of sustainable development.

Key words: *Dunaliella salina*, *Crocosphaera watsonii*, productivity, modelling, interaction, competition