

Stockage intracellulaire des nutriments chez l'algue verte *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss

M. Belkoura¹
A. Dauta²

Mots clés : *Chlorella sorokiniana*, quotas cellulaires, azote, phosphore, chlorophylle.

Les réserves intracellulaires en azote et en phosphore ont été déterminées chez *Chlorella sorokiniana*. Les quotas cellulaires maximal et minimal pour les deux nutriments sont respectivement de 67,9 et 19,9 $\mu\text{g at.}10^{-9}$ cellules pour l'azote et de 5,19 et 0,51 $\mu\text{g at.}10^{-9}$ cellules pour le phosphore. Les carences azotée et phosphorée s'accompagnent d'une réduction importante (de 44 % à 83 %) des teneurs en chlorophylle des cellules.

Intracellular storage of nutrients for the green algae *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss

Keywords : *Chlorella sorokiniana*, cellular quotas, nitrogen, phosphorus, chlorophyll.

Intracellular reserves of nitrogen and phosphorus have been determined for the green algae *Chlorella sorokiniana*. The maximum and minimum quotas for the two nutrients were respectively 67,9 and 19,9 $\mu\text{g at.}10^{-9}$ cells for nitrogen and 5,19 and 0,51 $\mu\text{g at.}10^{-9}$ cells for phosphorus. The lack of nitrogen and phosphorus in the medium led to a marked reduction (44 % to 83 %) of the cellular pool of chlorophyll.

1. Introduction

Depuis l'isolement de la première souche de *Chlorella* par Beijerinck en 1890, une multitude de travaux sur les exigences nutritionnelles de ce groupe d'algues a vu le jour (Walker 1953, Krauss 1955, 1958, Eyster et al. 1958, Bowen et al. 1965, Gerloff 1968, O'Kelly 1968, McBride et al. 1971, Bruckner & Hofner 1977, Pistorius et al. 1978, Nakajima et al. 1979, Neilson & Larsson 1980, Joung & Akin 1983). Outre la source de carbone (CO_2) et l'énergie lumineuse, de nombreux éléments minéraux indispensables à la croissance de *Chlorella* spp. ont été répertoriés (N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn, Zn, Cl, ...). Parmi ces éléments minéraux, l'azote

et le phosphore peuvent être considérés comme les deux facteurs essentiels. La littérature offre d'ailleurs de multiples exemples de limitation de la croissance par ces éléments nutritifs (Al Kholy 1956, Soeder et al. 1971, Aitchison & Butt 1973, Nyholm 1977a,b, Rhee 1978, Benemann & Weissman 1985, Mostert & Grobbelaar 1987).

En conditions nutritionnelles non limitantes, le taux de croissance d'une population dépend uniquement des propriétés intrinsèques spécifiques des cellules et tend vers une valeur optimale pour une température et une intensité lumineuse bien définies (Belkoura & Dauta 1992). Lorsque les conditions nutritives s'éloignent de l'optimum, le taux de croissance diminue et devient fonction de l'élément le moins représenté dans le milieu (Loi du minimum). L'équation de Monod (1942), formulée à l'origine pour décrire la croissance bactérienne, a longtemps été utilisée pour rendre compte de la relation liant le taux de croissance (μ) à la concentration de l'élément nutritif limitant (S) :

1. Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences Semlalia, Avenue du Prince Moulay Abdellah, BP S15, Marrakech, Maroc.

2. Laboratoire d'Hydrobiologie, Université Paul-Sabatier, URA CNRS 695, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France.

$$\mu = \mu_{\max} * S / K_s + S \quad (1)$$

avec μ : taux de croissance, μ_{\max} : taux de croissance maximal, S : concentration de l'élément nutritif, K_s : constante de demi-saturation

Cette équation fut par la suite améliorée pour intégrer le phénomène de stockage intracellulaire des nutriments. En 1969, Droop proposa ainsi l'expression suivante :

$$\mu = \mu_{\max} * (1 - Q/Q_0) \quad (2)$$

avec μ : taux de croissance, μ_{\max} : taux de croissance maximal, Q : Quota cellulaire à l'instant t , Q_0 : Quota cellulaire minimal

L'introduction du facteur Q_m (quota cellulaire maximal) dans l'équation précédente (Dauta 1982), explique l'évolution asymptotique de Q vers Q_m quand la disponibilité du nutriment dans le milieu s'accroît. Elle permet une meilleure prédiction des taux de croissance:

$$\mu = \mu_{\max(T,I)} * (Q - Q_0) / (Q_m - Q_0) \quad (3)$$

avec μ : taux de croissance, T : Température, I : Intensité Lumineuse, $\mu_{\max(T,I)}$: taux de croissance maximal lié à T et I , Q : Quota cellulaire à l'instant t , Q_0 : Quota cellulaire minimal, Q_m : Quota cellulaire maximal.

La conception d'un modèle de croissance pour *Chlorella sorokiniana* est tributaire de l'acquisition d'une base de données importante. Dans cette optique, nous avons été conduit à étudier précédemment les paramètres de croissance liés à la lumière et à la température (Belkoura & Dauta 1992). Dans cet article, nous aborderons les résultats des expériences relatives au stockage intracellulaire des deux principaux nutriments, à savoir l'azote et le phosphore.

2. Matériel et méthodes

2.1. Mise en carence des cultures

Les nutriments considérés dans ces expériences sont l'azote $N(NO_3)$, apporté sous forme de KNO_3 , et le phosphore $P(PO_4)$, apporté sous forme de K_2HPO_4 .

Des cultures en phase exponentielle de croissance sont ensemencées dans un milieu riche en nutriments (200 mg/l en KNO_3 , 25 mg/l en K_2HPO_4) et placées pendant 8 heures dans des conditions de température et d'intensité lumineuse optimales (30°C, 300 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). Durant cette période d'incubation,

il est supposé que les cellules constituent des réserves proches de la limite supérieure (Q_m).

Ces cultures subissent par la suite une filtration douce sur filtre Millipore (0,45 μm) et un rinçage abondant avec du milieu de culture sans nitrate et sans phosphate, pour éliminer toute trace de N , P et de matériel excrété.

Elles sont ré-ensemencées dans un milieu privé du nutriment à étudier (N ou P) et remises à 30°C sous un éclairage de 300 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

Les cultures se développent au détriment de leurs réserves en N ou en P : elles se carencent d'autant plus que les cellules se divisent.

La densité des cultures est suivie quotidiennement jusqu'à l'annulation de leur taux de croissance : on admet alors que cet arrêt correspond à l'instant où les réserves intracellulaires tendent vers le minimum (Q_0).

$$\ln(DO_{750j+1} / DO_{750j}) = 0 \quad (4)$$

avec : DO_{750j+1} : densité optique de la culture au jour $j+1$
 DO_{750j} : densité optique de la culture au jour j

2.2. Détermination des quotas cellulaires minimum et maximum

Les cellules en phase exponentielle de croissance soumises à de très fortes concentrations en nitrate et en phosphate recèlent des quantités intracellulaires maximales de $N(NO_3)$ et de $P(PO_4)$; leurs quotas en N et en P (Q_mN et Q_mP) sont par conséquent maximums.

Privées de N ou de P , les cellules (au nombre de N_0) se multiplient en fonction de l'importance de leurs réserves (QN et QP) jusqu'à l'épuisement de celles-ci (Q_0N). Soit N' le nombre de cellules correspondantes :

$$N_0 \times Q_m = N' \times Q_0 \quad (5)$$

Q_m/Q_0 , coefficient de consommation de luxe, est défini par N'/N_0 .

Des doses connues (D_i) en $N(NO_3)$ ou en $P(PO_4)$ sont ajoutées dans le milieu et assimilées par les algues totalement carencées, autorisant celles-ci à reprendre leur croissance jusqu'à la complète disparition de leurs nouvelles réserves. Soit N_i le nombre de cellules alors obtenues :

$$N'Q_0 + D_i = N_iQ_0 \quad \text{soit } Q_0 = (D_i/N' - N_i) \quad (6)$$

La détermination chiffrée de Q_0 mènera à celle de Q_m ; celle des quotas transitoires se fera de proche en proche, en utilisant les concentrations intermédiaires.

Ce protocole, établi par Dauta et al. (1982), permet de définir exactement les valeurs de Q_m et Q_0 . Il suppose un épuisement asymptotique des réserves (on admet que, pendant le développement de la carence, la croissance suit l'évolution des quotas). Il est généralement admis que les valeurs Q_m et Q_0 sont indépendantes des températures et des intensités lumineuses appliquées (Dauta et al. 1982).

Parallèlement à l'estimation des quotas cellulaires en nutriments, l'évolution du quota en chlorophylle a été suivie sur des cultures privées d'azote ou de phosphore. Le dosage des pigments a été réalisé par la méthode de Marker et al. (1980).

3. Résultats

Les figures 1 et 2 décrivent l'évolution des cultures utilisées pour la détermination des stocks intracellulaires en azote et en phosphore.

La croissance de *Chlorella sorokiniana* est très rapidement affectée par l'absence de $N(NO_3)$ dans le milieu de culture. Les divisions cellulaires s'arrêtent complètement entre le 2^e et le 3^e jour de mise en carence (Fig. 1).

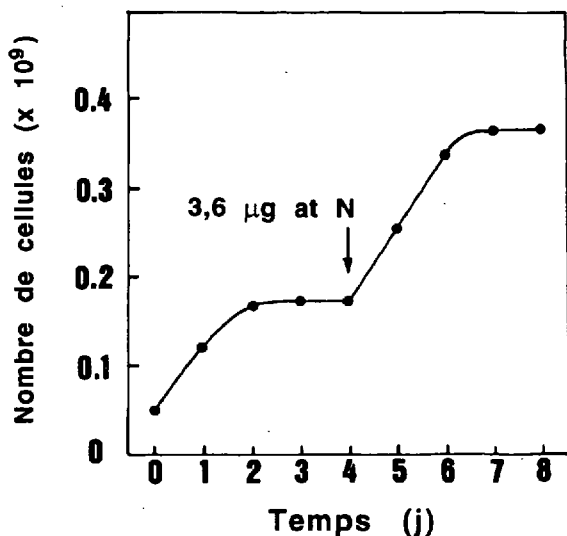


Fig. 1. Evolution temporelle d'une population de *Chlorella sorokiniana* pendant une carence en $N-NO_3$ et après ajout d'azote.

Fig. 1. Temporal changes of the *Chlorella sorokiniana* population during $N-NO_3$ deficiency and after nitrogen addition.

Les effets de l'absence de $P(PO_4)$ sur la croissance sont relativement plus tardifs. Le développement cellulaire se poursuit jusqu'aux environs du 5^e jour. Au-delà, l'arrêt de la croissance est brutal (Fig. 2).

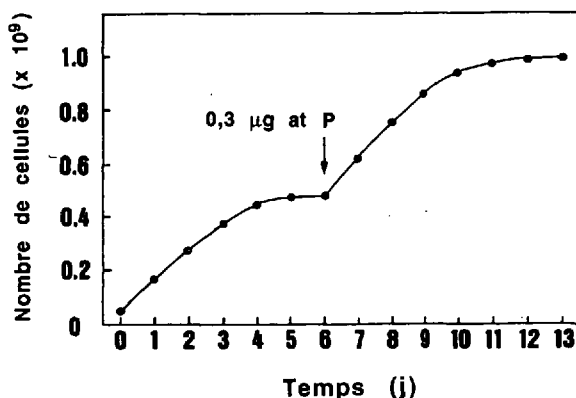


Fig. 2. Evolution temporelle d'une population de *Chlorella sorokiniana* pendant une carence en $P-PO_4$ et après ajout de phosphore.

Fig. 2. Temporal changes of the *Chlorella sorokiniana* population during $P-PO_4$ deficiency and after phosphorus addition.

L'addition dans le milieu de culture de l'élément nutritif qui fait défaut (N ou P) autorise les algues à reprendre leur croissance jusqu'à la disparition complète de leurs nouvelles réserves (Figs 1 et 2).

L'étalement des courbes dans le temps est directement lié à l'influence de l'intensité lumineuse et de la température sur le taux de croissance des cultures (Belkoura & Dauta 1992).

Le tableau 1 reporte les valeurs des quotas minimal et maximal pour l'azote et le phosphore. Les valeurs des rapports Q_m/Q_0 révèlent que les réserves en azote, capables de soutenir la croissance cellulaire en l'absence du nutriment, sont environ 3 fois moins élevées que celles en phosphore.

L'absence de $N(NO_3)$ ou de $P(PO_4)$ dans le milieu de culture oblige les cellules à se développer au détriment de leurs réserves internes en N ou en P . Cela se traduit par une diminution des valeurs de Q_N ou de Q_P au cours du temps (Figs. 3 et 4). Cette diminution, très prononcée pendant les 2 ou 3 premiers jours de mise en carence des cultures, s'atténue progressivement par la suite jusqu'à atteindre le quota cellulaire minimal (Q_0).

Parallèlement, les carences en nutriments se répercutent de manière spécifique sur l'évolution des teneurs en chlorophylle des cellules (Fig. 5). La carence en azote produit un effet à la fois intense et rapide par rapport à celle du phosphore ; dans le premier cas la teneur en chlorophylle passe de 93 à $16 \mu\text{g} \cdot 10^{-9}$ cellules, soit un rapport de 5,8, alors

Tableau 1. Réserves intracellulaires en nutriments : quota minimal (Q_0) et maximal (Q_m) pour l'azote et pour le phosphore. Quotas exprimés en $\mu\text{g-at} \cdot 10^{-9}$ cellules (\pm écart type).

Table 1. Intracellular reserves of nutrients : minimum (Q_0) and maximum (Q_m) quotas for nitrogen and phosphorus. Quotas expressed as $\mu\text{g-at} \cdot 10^{-9}$ cells (\pm standard deviation).

	AZOTE	PHOSPHORE
Q_0	$19,9 \pm 1,1$	$0,51 \pm 0,11$
Q_m	$67,9 \pm 3,9$	$5,19 \pm 1,08$
Q_m/Q_0	3,4	10,1

que la privation en phosphore correspond à une baisse dans un rapport de 1,8 seulement (Tableau 2).

L'évolution des quotas cellulaires en chlorophylle en fonction des quotas cellulaires en nutriments (N ou P) montre par ailleurs que les déficits en azote se traduisent par une chlorose quasi immédiate et brutale (Fig. 6) alors que ceux en phosphore n'altèrent, de manière significative, les quotas en chlorophylle qu'après avoir atteint des valeurs correspondants à environ 1/4 de $Q_m\text{P}$ (Fig. 7).

Discussion

Le tableau 3 regroupe les données de la littérature relatives aux quotas cellulaires en azote et en phosphore chez différentes espèces d'algues. Seules les mesures exprimées en unités comparables ($\mu\text{g at} \cdot 10^{-9}$ cellules) ont été reportées, et de ce fait la liste présentée est loin d'être exhaustive. Les résultats obtenus dans cette étude sont également rappelés. L'analyse de ce tableau met en évidence la très grande disparité des données disponibles. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette situation :

— Le développement relativement récent des recherches sur le stockage intracellulaire des

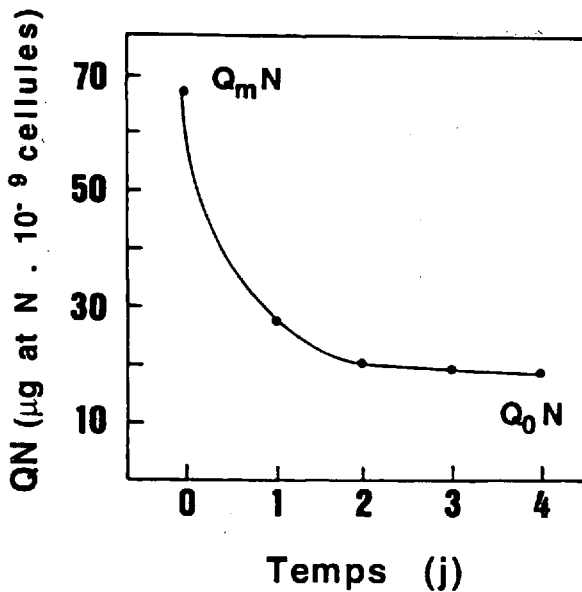


Fig. 3. Evolution du quota en azote (QN) pendant une carence en N-NO_3 .

Fig. 3. Changes in the nitrogen quota (QN) during N-NO_3 deficiency.

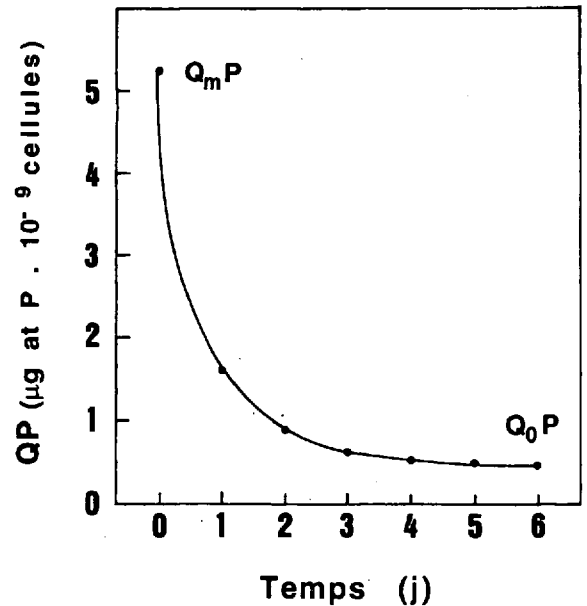


Fig. 4. Evolution du quota en phosphore (QP) pendant une carence en P-PO_4 .

Fig. 4. Changes in the phosphorus quota (QP) during P-PO_4 deficiency.

Tableau 2. Variation du quota en chlorophylle. Comparaison entre le quota de cellules non carencées et celui de cellules carencées en azote ou en phosphore.

Table 2. Variation of the chlorophyll quota. Comparison between quota of none deficient cells and nitrogen or phosphorus deficient cells.

Quota en chlorophylle ($\mu\text{g chl a} \cdot 10^{-9}$ cellules)	
Cellules non carencées ($Q_m\text{Chl}$)	93
Cellules carencées en azote ($Q_0\text{ChIN}$)	16
Cellules carencées en phosphore ($Q_0\text{ChIP}$)	52

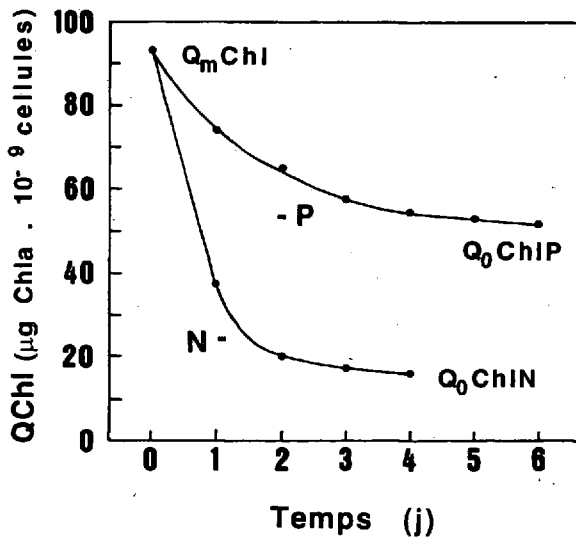


Fig. 5. Variations du quota en chlorophylle (QChl) de cultures carencées en azote (-N) ou en phosphore (-P).

Fig. 5. Variations in the chlorophyll quota (QChl) of nitrogen (-N) or phosphorus (-P) deficient cultures.

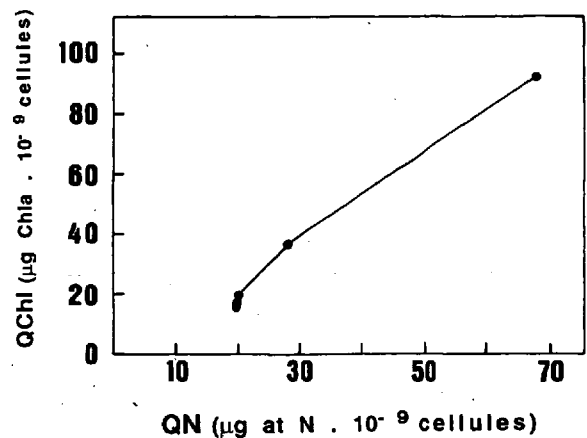


Fig. 6. Evolution du quota en chlorophylle (QChl) en fonction du quota cellulaire en azote (QN).

Fig. 6. Changes in the chlorophyll quota (QChl) in relation to the cellular quota of nitrogen (QN).

éléments nutritifs en relation avec celui des modèles de simulation de la croissance algale.

— La mise en œuvre de méthodes d'évaluation des quotas totalement différentes basées, pour certaines sur une estimation globale du phosphore ou de l'azote cellulaire, et pour d'autres sur l'annulation du taux de croissance lorsque le quota minimal (Q_0) est atteint. Cette dernière méthode présente

d'ailleurs l'avantage de correspondre exactement à la définition de stock employée en modélisation.

— L'utilisation par les algues de diverses voies métaboliques selon la nature de la source azotée ou phosphorée. En conséquence, les vitesses d'assimilation d'une part et les possibilités de stockage de ces nutriments d'autre part peuvent subir des variations considérables (Neilson & Larsson 1980, Syrett 1981).

Tableau 3. Données de la littérature relatives au stockage intracellulaire de l'azote et du phosphore.
Table 3. Literature data for the intracellular storage of nitrogen and phosphorus in different algae species.

Espèces d'algues	Azote			Phosphore			Réf.
	Q ₀	Q _m	Q _m /Q ₀	Q ₀	Q _m	Q _m /Q ₀	
Cyanophycées							
<i>Anabaena cylindrica</i> Lemm.	57	132	2,31	0,54	3,18	5,90	15
<i>Anabaena macrospora</i> Klebahn	-	-	-	4,96	25,04	5,05	17
<i>Anabaena</i> sp.	100	-	-	-	-	-	1
<i>Microcystis aeruginosa</i> Kütz	189	356	1,88	4,64	31,32	6,75	17
<i>Synechocystis minima</i> Bourr.	175	385	2,20	0,35	4,46	12,74	16
Cryptophycées							
<i>Cryptomonas ovata</i> Ehr.	360	2200	6,11	3,50	330	94,29	12
Haptophycées							
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	29-33	-	-	-	-	-	5
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	30	-	-	-	-	-	9
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	20	-	-	-	-	-	10
Bacillariophycées							
<i>Asterionella formosa</i> Hass.	600	-	-	30	-	-	1
<i>Asterionella formosa</i> Hass.	-	-	-	2	-	-	3
<i>Asterionella formosa</i> Hass.	-	-	-	1,5-3	-	-	8
<i>Asterionella japonica</i> Cleve	-	-	-	1,5	-	-	8
<i>Cyclotella nana</i> Ktz.	-	-	-	0,9	-	-	6
<i>Fragilaria bidens</i> Heib.	161	531	3,30	12	67,8	5,55	15
<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton	88	183	2,08	2,85	22,04	7,73	17
Chlorophycées							
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> Ralfs	83	315	3,80	0,26	4,24	16,31	16
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> Chick	-	-	-	3	-	-	8
<i>Chlorella sorokiniana</i> Shih. & Kraus.	20	68	3,40	0,51	5,19	10,1	-
<i>Chlorella</i> sp.	12	-	-	1,4	-	-	2
<i>Chlorella</i> sp.	-	-	-	3,3	-	-	4
<i>Chlorella</i> sp.	-	-	-	-	1,6	-	7
<i>Chlorella vulgaris</i> Beiger.	80	230	2,88	0,23	2,98	12,96	16
<i>Coelastrum cambricum</i> Archer	61	143	2,35	1,50	20,70	13,80	17
<i>Coelastrum microporum</i> Näg.	81	196	2,43	1,90	11,63	6,12	15
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i> Wood.	84	126	1,50	0,87	6,06	6,97	15
<i>Monoraphidium minutum</i> Komar.	40	93	2,33	1,73	30,62	17,70	15
<i>Pediastrum boryanum</i> Menegh.	180	260	1,42	7,56	46,87	6,20	15
<i>Scenedesmus crassus</i> Chod.	110	380	3,45	1,2	8	6,67	14
<i>Scenedesmus crassus</i> Chod.	120	393	3,28	1,24	8,33	6,72	15
<i>Scenedesmus quadricaula</i> Breb.	-	-	-	4,5	-	-	8
<i>Scenedesmus quadricaula</i> Breb.	170	378	2,20	7,33	41,41	5,65	15
<i>Scenedesmus</i> sp.	46	-	-	1,7	-	-	11
<i>Selenastrum</i> sp.	-	-	-	1,1	6,5	5,91	13
<i>Staurastrum pingue</i> Telling	176	626	3,57	3,95	24,21	6,13	17

Références : (1) Grim 1939 ; (2) Ketchum & Redfield 1949 ; (3) Mackereth 1953 ; (4) Al kholy 1956 ; (5) Caperon 1968 ; (6) Fuhs 1969 ; (7) Soeder et al. 1971 ; (8) Muller 1972 ; (9) Droop 1973 ; (10) Greeney et al. 1973 ; (11) Rhee 1973 ; (12) Cloern 1976 ; (13) Brown & Harris 1978 ; (14) Brunel & Guerri 1980 ; (15) Dauta 1982 ; (16) Piquemal 1990 ; (17) Boumnic 1992.

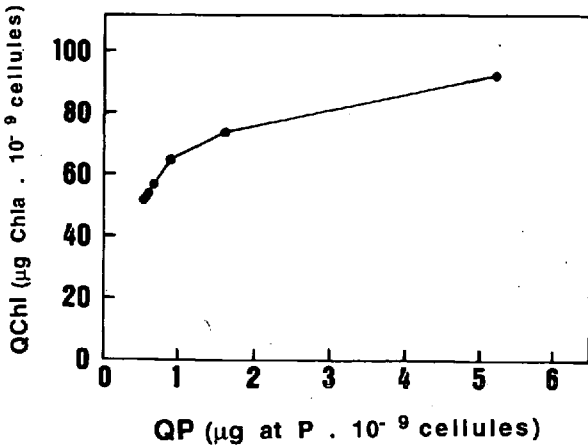


Fig. 7. Evolution du quota en chlorophylle (QChl) en fonction du quota cellulaire en phosphore (QP).

Fig. 7. Changes in the chlorophyll quota (QChl) in relation to the cellular quota of phosphorus (QP).

L'évaluation des stocks ou des surplus en azote ou en phosphore à l'aide du protocole établi par Dauta et al. (1982) donne simultanément les quotas maximal et minimal. Cette méthode, originale et relativement simple, permet d'introduire le stock maximal (Q_m) dans l'équation de croissance : $\mu = \mu_{\max} * (Q - Q_0) / (Q_m - Q_0)$. Cette équation aboutit bien à un taux de croissance nul lorsque Q atteint Q_0 ; elle permet également la prédiction d'un taux de croissance maximal lorsque Q tend vers Q_m . Les résultats obtenus dans notre étude sont très reproductibles. Les valeurs de Q_0 et de Q_m déterminées diffèrent de celles reportées pour d'autres espèces du même genre (Tableau 3) ; ces 2 paramètres représentent donc bien des constantes spécifiques de l'algue. Le quota minimal en phosphore, Q_0P , est nettement inférieur au Q_0N , ce qui est en accord avec les rapports moyens N/P de la matière vivante. Ces résultats confirment le fait, déjà souligné par Caperon & Meyer (1972), que les cellules sont capables d'absorber une forte dose de nutriments sans répercussion immédiate sur le taux de croissance.

Les cellules de *Chlorella sorokiniana* ayant subi un jeûne en nutriments paraissent relativement peu affectées, puisque leur croissance reprend aussitôt après l'addition d'éléments nutritifs (N ou P, Fig. 1 et 2). La carence en azote est cependant beaucoup

plus sévèrement ressentie par cette espèce, entraînant vraisemblablement des désordres physiologiques. Chez *Chlorella sorokiniana*, la limitation en azote, et dans une moindre mesure celle en phosphore, affecte les teneurs en chlorophylle qui deviennent très basses (Fig. 5). Ce phénomène, observé également chez d'autres espèces d'algues (Hayward 1965, Deboer & Rhyter 1977, Brunel & Guerri 1980, Dauta, 1982, Olsen et al. 1983, Piquemal 1990, Boum nich 1992), ne semble pas être spécifique à la chlorophylle mais peut s'étendre à d'autres pigments tels la phycoérythrine chez les Rhodophycées (Calabrese & Felicini 1970, Deboer & Rhyter 1977) ou la phycocyanine chez les Cyanophycées (Boussiba & Richmond 1980).

La diminution des teneurs en pigments, consécutive à la mise en carence des algues, ne paraît pas être un processus irréversible. Cette dégradation est en effet réversible tant que les quotas minimums (quotas de subsistance) ne sont pas affectés par la durée de la carence. Chapman et al. (1978), Brunel & Guerri (1980), Piquemal (1990) ainsi que Boum nich (1992) ont montré que la chlorophylle pouvait être régénérée après l'addition dans le milieu de culture de l'élément qui faisait défaut (N ou P). Selon les espèces, le quota cellulaire en chlorophylle retrouve sa valeur initiale en l'espace de 24 à 96 heures (Piquemal 1990, Boum nich 1992).

En définitive, cette étude a permis de paramétrer les quotas intracellulaires en nutriments chez *Chlorella sorokiniana*. Outre leur utilité dans la modélisation des cultures d'algues, ces paramètres permettent d'expliquer notamment la survie de ces organismes dans des milieux où un des nutriments viendrait temporairement à manquer.

Remerciements

Les auteurs remercient la Fondation Internationale pour la Science (Stockholm, Suède) pour son soutien financier (Bourse de recherche n° F/2017-1).

Travaux cités

- Aitchison P.A. & Butt V.S. 1973. — The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. *J. Eptl. Botany*, 24 (80) : 497-510.
- Al Kholy A.A. 1956. — On the assimilation of phosphorus in *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia Plantarum*, 9 : 137-143.
- Belkoura M. & Dauta A. 1992. — Interaction lumière-température et influence de la photopériode sur le taux de croissance de *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss. *Annls Limnol.*, 28 (2) : 101-107.

- Benemann J.R. & Weissman J.C. 1985. — Nitrogen limitation as a tool in microalgae mass culture. *J. Phycol.*, 21 (suppl.), p. 16.
- Boumnic L. 1992. — Etude expérimentale des paramètres écophysologiques des principales espèces phytoplanctoniques du lac d'Aydat (Puy-de-Dôme, France). Essai de modélisation des cultures d'algues. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal, Clermont II, 172 p.
- Boussiba S. & Richmond A. 1980. — C. phycocyanin as a storage protein in the blue green algae *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.*, 125 : 143-147.
- Bowen J.E., Gauch H.G., Krauss R.W. & Galloway R.A. 1965. — The nonessentiality of boron for *Chlorella*. *J. Phycol.*, 1 : 151-154.
- Brown E.J. & Harris R.F. 1978. — Kinetics of algal transient phosphate uptake and then cell quota concept. *Limnol. Oceanogr.*, 23 (1) : 35-40.
- Bruckner U. & Hofner W. 1977. — The growth rate of the unicellular green alga *Chlorella pyrenoidosa* as affected by the iron supply. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, 140 (3-4) : 441-450.
- Brunel L. & Guerri M.M. 1980. — Cinétiques d'assimilation et de croissance de *Scenedesmus crassus*. Etude expérimentale et modélisation. Thèse de Doctorat de 3^e Cycle, Toulouse III, 226 p.
- Calabrese G. & Felicini G.P. 1970. — Research on the red algae pigments. I. Pigments of *Pterocladia capillacea* cultured with some nitrogenous materials. *Giorn. Bot. Ital.*, 104 : 81-89.
- Caperon J. 1968. — Population growth in micro-organisms limited by food supply. *Ecology*, 48 : 715-722.
- Caperon J. & Meyer J. 1972. — Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton. II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep-Sea Research*, 19 : 619-632.
- Chapman A.R.O., Markham J.W. & Lüning K. 1978. — Effects of nitrate concentration on the growth and physiology of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) in culture. *J. Phycol.*, 14 : 195-198.
- Cloern J.E. 1976. — Population dynamics of *Cryptomonas ovata*. A laboratory field and computer simulation study. P.H.D. Thesis, Washington State University, 102 p.
- Dauta A. 1982. — Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. II. Rôle des nutriments : assimilation et stockage intracellulaire. *Anns Limnol.*, 18 (3) : 263-292.
- Dauta A., Brunel L. & Guerri M.M. 1982. — Détermination expérimentale des paramètres liés à l'assimilation de l'azote et du phosphore par *Scenedesmus crassus*. *Anns Limnol.*, 18 (1) : 33-40.
- Deboer J.A. & Ryther J.H. 1977. — Potential yields from a waste recycling algal mariculture system. In *The Marine Plant Biomass of the Pacific Northwest Coast*. Krauss R., Ed., Oregon State University Press, Corvallis Oregon, pp. 231-249.
- Droop M.R. 1969. — New thoughts on nutrient limitation in algae. *Br. Phycol. J.*, 4 : 212-219.
- Droop M.R. 1973. — Some thoughts of nutrient limitation in algae. *J. Phycol.*, 9 : 264-272.
- Eyster H.C., Brown T.E. & Tanner H.A. 1958. — Mineral requirements for *Chlorella pyrenoidosa* under autotrophic and heterotrophic conditions. In *Trace Elements*. Lamb C.A., Bently O.G. & Beattie J.M., Eds., New York, Academic Press, pp. 157-191.
- Fuhs G.W. 1969. — Phosphorus content and rate of growth in the diatoms *Cyclotella nana* and *Thalassiosira fluviatilis*. *J. Phycol.*, 5 : 312-321.
- Gerloff G.C. 1968. — The comparative nutrition of several green and blue algae. *Physiologia Plantarum*, 21 : 369-377.
- Greeney W.J., Bella D.A. & Curl H.C. 1973. — A mathematical model of the nutrient dynamics of phytoplankton in a nitrate-limited environment. *Biotechnol. Bioeng.*, 15 (2) : 331-358.
- Grim J. 1939. — Beobachtung am phytoplankton des Bodensees (Obersees) sowie deren rechnerische Auswertung. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.*, 39 : 193-315.
- Hayward J. 1965. — Studies on the growth of *Phaeodactylum tricoratum* (Bohlin). 1. The effect of certain organic nitrogenous substances on growth. *Physiol. Plant.*, 18 : 201-207.
- Joung J.J. & Akin C. 1983. — Growth kinetics and yield study on *Chlorella pyrenoidosa* in chemically defined media. *Dev. Ind. Microbiol.*, 24 : 361-368.
- Ketchum B.H. & Redfield A.C. 1949. — Some physical and chemical characteristics of algae grown in mass culture. *J. Cell Comp. Physiol.*, 33 : 281-299.
- Krauss R.W. 1955. — Nutritional requirements and yields of algae in mass culture. In Conference on solar energy : the scientific basis, Tucson, Arizona, October 31 and November 1.
- Krauss R.W. 1958. — Physiology of the fresh-water algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 9 : 207-244.
- Mackereth F.J. 1953. — Phosphorus utilization by *Asterionella formosa*. *J. Exp. Bot.*, 4 : 296-313.
- Marker A.F.H., Nush E.A. & Riemann B. 1980. — The measurements of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods : conclusions and considerations. *Ergeb. Limnol.*, 14 : 91-106.
- McBride L., Chorney W. & Skok J. 1971. — Growth of *Chlorella* in relation to boron supply. *Botanical Gazette*, 132 : 10-13.
- Monod J. 1942. — *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann & Cie, Paris, 211 p.
- Mostert E.S. & Grobbelaar J.U. 1987. — The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures. *Biomass*, 13 (4) : 219-233.
- Muller H. von. 1972. — Wachstum und Phosphatbedarf von *Nitzschia actinostroides* (Lemm) V. Goor. in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphat-limitierung. *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 38 : 399-484.
- Nakajima A., Horikoshi T. & Sakaguchi T. 1979. — Uptake of manganese ion by *Chlorella regularis*. *Agric. Biol. Chem.*, 43 (7) : 141-146.
- Neilson A.H. & Larsson T. 1980. — The utilization of organic nitrogen for growth of algae : physiological aspects. *Physiol. Plant.*, 48 : 542-553.
- Nyholm N. 1977a. — Kinetics of phosphate limited algal growth. *Biotechnol. Bioengineer.*, 19 : 467-492.
- Nyholm N. 1977b. — Kinetics of nitrogen limited algal growth. *Prog. Wat. Tech.*, 8 (4/5) : 347-358.

- O'Kelly J.C. 1968. — Mineral nutrition of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19 : 89-112.
- Olsen Y., Knutsen G. & Lien T. 1983. — Characteristics of phosphorus limitation in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) and its palmelloids. *J. Phycol.*, 19 : 313-319.
- Piquemal F. 1990. — Contribution à l'étude écophysiological de quelques espèces d'algues en culture. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III, 137 p.
- Pistorius E.K., Funkhouser E.A. & Voss H. 1978. — Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. *Planta*, 141 (3) : 279-282.
- Rhee G.Y. 1973. — A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.*, 9 : 495-506.
- Rhee G.Y. 1978. — Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.*, 23 : 10-25.
- Soeder C.J., Muller H., Payer H.D. & Schulle E. 1971. — Mineral nutrition of phytoplanktonic algae, some considerations, some experiments. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 19 : 39-58.
- Syrett P.J. 1981. — Nitrogen metabolism of microalgae. In *Physiological bases of Phytoplankton Ecology*. Platt T., Ed., Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210 : 182-210.
- Walker J.B. 1953. — Inorganic micronutrient requirement of *Chlorella*. I. Requirements for calcium (or strontium), copper and molybdenum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 46 : 1-11.