

**PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE β - CAROTENE PAR
DUNALIELLA SALINA CULTIVEE DANS LA SALINE DE TISSA,
AU MAROC**

**Ahlam MOURADI^{1*}, Aziza MOURADI¹, Thierry GIVERNAUD²,
Rachida AKALLAL¹, Jamila RIYAH¹ et Laila BENNASSER¹**

¹ *Laboratoire de Biochimie, Biotechnologie et Environnement, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, B.P. 133, 14 090, Kénitra, Maroc.*

² *STECOF, 5, Lot. Johara, Bir Rami Est, 14 090 Kénitra, Maroc.*

(Reçu le 12 Mars 2009, accepté le 11 Juin 2009)

* Correspondance et tirés à part, e-mail: *mouradi14@gmail.com*

RÉSUMÉ

Dans le cadre du programme de recherche sur le développement de la culture de *Dunaliella salina* pour la production de β -carotène, un système pilote de production industrielle semi intensif comprenant 5 bassins totalisant 1800 L de culture a été mis en place sur la saline continentale de Tissa; il a été testé au cours de deux années successives 2002 et 2003.

Les résultats obtenus montrent la faisabilité industrielle d'une telle culture pour la production de β -carotène naturel. La grande rusticité de l'espèce et sa capacité à vivre dans des milieux hypersalés permet d'obtenir des cultures monospécifiques en bassins extérieurs. Les essais ont permis de montrer la faisabilité de la culture en milieu extérieur de la microalgue *Dunaliella salina* pendant les mois d'été. Les taux de croissance et les taux de production de β -carotène sont comparables à ceux mesurés en Israël et au sud de l'Espagne sur des systèmes de production nettement plus sophistiqués que le notre (densité cellulaire : $3,1 \cdot 10^6$ cellules. mL⁻¹ \pm 0,34 ; β -carotène : $39,0 \pm 4,0$ mg.L⁻¹, soit 484 ± 82 mg m⁻² j⁻¹)

Ces résultats ont été obtenus dans des bassins de 24cm de profondeur, avec une salinité de 15 à 25 % et une concentration en nitrates de 5mM.

La technique mise au point est suffisamment simple pour être utilisée par les exploitants de salines, avec une formation minimum est un investissement réduit.

Mots-clés : *Dunaliella salina*, pilote de culture, β -carotène.

ABSTRACT

Production of biomass and de β - carotene by *Dunaliella salina* cultured in saline of Tissa (Morocco)

In the scope of a research program concerning the development of *Dunaliella salina* culture for the production of β -carotene, a pilot scale cultivation system of five ponds has been build on Tissa continental salt exploitation. Experimental cultures have been done during 2 years (2002-2003).

The results showed the industrial feasibility of such cultivation for β -carotene production. With the local strain very resistant to extreme conditions it has been possible to obtain monospecific cultures in outdoor ponds.

During summer month the cellular density ($3.1 \cdot 10^6$ cells.mL⁻¹±0.34) of the culture is similar to the results obtain on industrial system in Israel or in the south of Spain. β -carotene production ($39,0 \pm 4,0$ mg.L⁻¹, equivalent to 484 ± 82 mg m⁻² j⁻¹) is also close to the values measured in these countries. The results have been obtained in 24cm depth ponds for a salinity of 15 to 25% and a nitrogen concentration of 5mM.

The culture system developed is very simple and can be managed with a minimum of formation.

Keywords : *Dunaliella salina*, pilot scale de culture, β -carotène.

I - INTRODUCTION

La chlorophycée *Dunaliella salina* Teodoresco est un organisme photosynthétique modèle pour sa tolérance à la salinité [1], en effet elle peut croître dans des conditions extrêmes typiques des régions désertiques, arides à semi arides, souvent dans des biotopes hostiles où elle ne risque pas de rencontrer des compétiteurs [2,3]. La microalgue biflagellée, dépourvue de paroi, se caractérise par une capacité exceptionnelle de synthèse et d'accumulation du β -carotène et en représente une source naturelle potentielle [4-7]. Ce pigment naturel, dix fois plus actif que celui de synthèse, est doué d'une activité pro vitaminique (vitamine A) [8, 9] et de propriétés anti-oxydantes [10]. Toutefois, la culture massive de *Dunaliella* en vue de la production du β -carotène qui peut atteindre jusqu'à 14% de matière sèche [11,12] est tributaire des conditions environnementales et/ou expérimentales de culture [13,14] et de sa génomique [15, 16].

L'étude des conditions de culture de *Dunaliella* pour la production du β -carotène, a fait l'objet de nombreux travaux de recherche notamment sur les paramètres les plus influents comme la salinité [17,18], la température et l'intensité lumineuse [19,20] et les nutriments [21-23].

Par ailleurs, la diversité d'application du β -carotène dans de nombreux domaines (alimentaire, cosmétique, industrie pharmaceutique et biomédicale [10, 24], a

engendré une demande sans cesse croissante sur le marché, de ce pigment. A nos jours, *Dunaliella salina* est cultivée massivement dans de nombreux pays tels que l'Australie, Israël, la Chine et récemment le Chili [25] où sa commercialisation est bien lancée. Cependant, il s'avère que la culture massive de *Dunaliella salina*, dans des bassins à ciel ouvert sous climat sec et chaud, au sein des salines, constitue le système de production commerciale du β -carotène, le plus rentable [26].

Au Maroc, les salines, qu'elles soient marines ou continentales ne sont exploitées que pour la production du sel. Bien que *Dunaliella salina* s'y développe [27- 29], l'espèce n'est pas encore exploitée, malgré la carence en vitamine A dont souffrent de nombreux habitants des différentes régions du Maroc. Le présent travail vise à étudier, dans des bassins pilotes, les effets de la salinité, de la concentration en nitrates et de la profondeur sur la dynamique de production de biomasse et du β - carotène de *D. salina* cultivée sous conditions climatiques au niveau de la saline continentale de Tissa (Maroc).

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. Milieu d'étude

La saline de Tissa est située à 50Km à l'Est de la ville de Fès (Maroc), entre les collines du moyen Atlas, au pied d'un gisement de sel gemme, couvrant une superficie de 115 hectares (

Figure 1). La région appartient à l'étage bioclimatique semi aride et jouit d'un climat méditerranéen avec une période sèche s'étendant de mai à octobre et d'une période humide de novembre à avril. Les températures varient durant l'année de 0 à 40°C et plus.

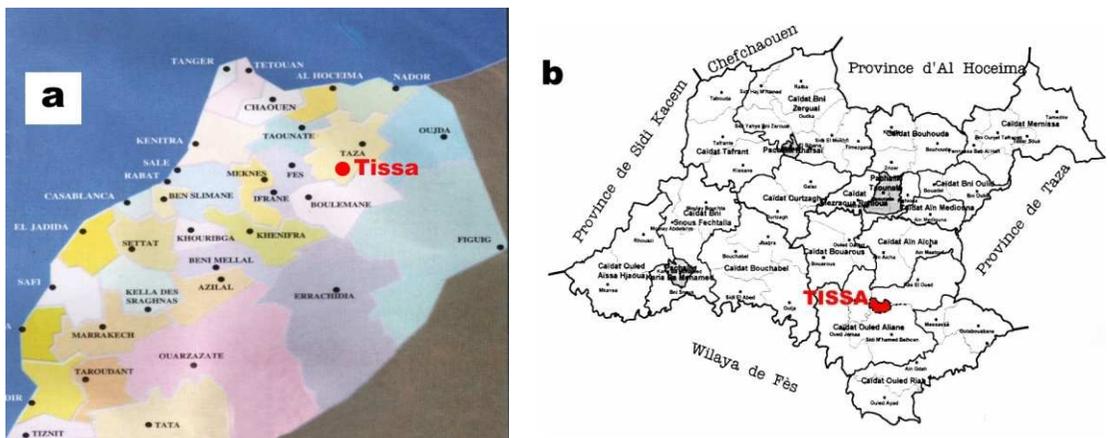


Figure 1 : Situation géographique de la saline de Tissa, (a) : Nord du Maroc, (b) : Région de Tissa.

II-2. Station pilote

Le pilote de culture comprend six bassins d'une capacité unitaire de 1875 litres, de 3 sur 2,5m de coté et 0,25m de profondeur en moyenne. Ils sont disposés en série et distants de 1m. Ils ont été creusés, compactés nivelés et recouverts d'un film en plastique transparent avec un dispositif de vidange prévu pour chaque bassin (

Figure 2). Pour l'étude de la reproductivité des résultats, 3 séries de ces bassins ont été construits.

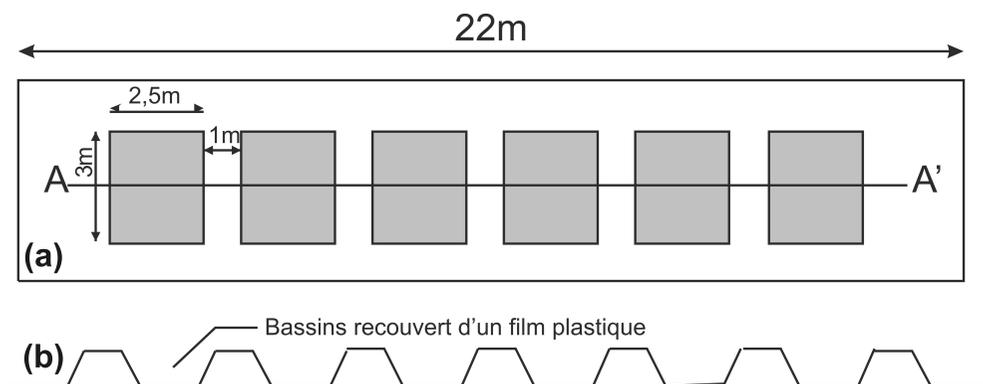


Figure 2 : Schéma des bassins de culture, (a) vue de face, (b) : vue en coupe.

II-3. Matériel biologique

La chlorophycée *Dunaliella salina* est une microalgue qui a été collectée au niveau des tables de production du sel de la saline de Tissa, la microalgue a été maintenue en culture mono algale dans un des bassins qui lui a été réservée. Cette culture sert pour ensemercer les autres bassins de culture.

II-4. Milieu de culture

Il est composé d'eau provenant d'un puits creusé au niveau de la saline, enrichi de sels nutritifs nitrates (NaNO_3) et phosphate (NaH_2PO_4 , H_2O) de façon à obtenir des concentrations finales respectives de 6 et $0,2\text{mmole.L}^{-1}$ et un rapport N/P (nitrates sur phosphate) de 10. La salinité a été ajustée par ajout de sel provenant de la production locale. La constance de la qualité physicochimique et microbiologique de l'eau de puits a été confirmée par des analyses effectuées régulièrement sur cette eau [30].

II-5. Analyse et dosage

Pour chaque expérience (5 semaines de culture) au niveau des bassins de culture, le suivi des différents paramètres suivants a été effectué:

- ⇒ **Les paramètres physicochimiques** : mesurés *in situ*, chaque jour entre 11 et 13h, il s'agit de la température, de la salinité, du pH et de l'oxygène dissous. Dans ces travaux nous ne présentons que les résultats concernant la densité cellulaire et les taux des pigments.
- ⇒ **Les pigments photosynthétiques** : Après extraction des pigments à l'acétone 90% [31] (v/v : acétone/eau), les concentrations de la chlorophylle totale et du β -carotène ont été déterminées par spectrophotométrie : Les longueurs d'ondes 663 et 645 nm, correspondent aux maxima d'absorption des chlorophylles (a et b) et 450 nm est la longueur d'onde d'absorption du β -carotène dans l'acétone.
- ⇒ **La densité cellulaire** : Le dénombrement des cellules est effectué par comptage direct sous microscope optique à l'aide d'un hématimètre (cellule de Thomas). Les prélèvements pour les comptages cellulaires et les mesures de pigments ont été réalisés tous les 3 jours pendant le cycle de culture dont la durée est de 38 jours.

II-6. Les paramètres étudiés

Les paramètres suivis dans ces travaux et jugés susceptibles d'influencer la croissance cellulaire et la caroténogénèse sont:

- 1-La salinité : cinq salinités (5, 10, 15, 20 et 25%) ont été testées ;
- 2-La teneur en nitrate : six concentrations (1; 1,5; 2; 2,5; 3 et 5mM) ont été testées
- 3-La profondeur des bassins : cinq profondeurs (8; 12; 16; 20 et 24cm) ont été testées.

La salinité a été déterminée par un densimètre en prenant soin de corriger les valeurs en fonction de la température. La précision obtenue ($\pm 0,2\%$ de salinité) est suffisante pour les expériences réalisées.

Le dosage des nitrates et des nitrites a été déterminé par spectrophotomètre à la sulfanilamide [33] à 540 nm, utilisant des cuves de 20 mm. Pour les nitrates, la méthode est fondée sur le dosage des ions NO_2^- obtenus par réduction quantitative des ions NO_3^- .

On mesure donc la somme des concentrations des ions NO_2^- et NO_3^- . Par déduction de la concentration en nitrites, déterminée sans réduction, on obtient la concentration en nitrates. La réduction est effectuée par passage de l'échantillon sur une colonne de Cadmium traité au cuivre [34].

Le taux de croissance est obtenu en utilisant la formule classique :

$$\mu = 100 \times \frac{\text{Log} \left(\frac{x_1}{x_2} \right)}{t_1 - t_2}$$

Où x_1 : nombre de cellules au temps t_1 ; x_2 : nombre de cellules au temps t_2 .

II-7. Analyse statistique

La variation des paramètres analysés est étudiée par une analyse de variance à deux facteurs. L'analyse de variance des paramètres est effectuée par la procédure GLM du logiciel SAS. La comparaison multiple des moyennes de chaque paramètre ainsi que leur classement sont réalisés par le test de Duncan chaque fois que l'analyse de variance révèle des différences significatives [35].

Chaque expérience a été refaite trois fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, de même pour les dosages.

III - RÉSULTATS

Dans le but de définir les conditions les plus favorables au développement de *D. salina* et à la production du β - carotène pour des cultures en bassins à ciel ouvert, seule la synthèse des résultats obtenus, réalisée grâce à l'analyse statistique sera présentée.

III-1. L'analyse de variance

Les résultats des analyses de variance à deux facteurs (salinité, temps), (nitrates, temps) et (profondeur, temps) sont consignés respectivement dans les **Tableau 1**, **Tableau 2** et **3**

Tableau 1 : Analyse de variance des paramètres étudiés en fonction de la salinité et du temps. (N.S), (***) : différences respectivement non significatives et significatives à 1 %. F : valeurs de la loi de Fischer.

Paramètre	Source de variation	F	Probabilité	signification
Densité Cellulaire	Salinité	7,6	0,0001	***
	Temps	3,6	0,0006	***
Température	Salinité	8,7	0,0001	***
	Temps	3,4	0,0001	***

pH	Salinité	70,4	0,0001	***
	Temps	10,1	0,0001	***
Oxygène dissous	Salinité	58,9	0,0001	***
	Temps	1,03	0,4215	NS
β-carotène	Salinité	6,8	0,0001	***
	Temps	5,6	0,0001	***
Chlorophylle	Salinité	32,1	0,0001	***
	Temps	5,2	0,0001	***

⇒ **Effet salinité, nitrates et profondeur**

Les analyses de variance révèlent des effets significatifs à hautement significatifs pour la plupart des salinités, des nitrates et des profondeurs sur les six paramètres suivis au cours de la culture ($p < 0,0001$).

Tableau 2 : Analyse de variance des paramètres étudiés en fonction de la teneur en nitrates et le temps.

Paramètre	Source de variation	F	Probabilité	signification
Densité Cellulaire	Nitrate	10,8	0,0001	***
	Temps	14,9	0,0001	***
Température	Nitrate	22,3	0,0001	***
	Temps	13,6	0,0001	***
pH	Nitrate	28,7	0,0001	***
	Temps	14,9	0,0001	***
Oxygène dissous	Nitrate	18,4	0,0001	***
	Temps	16,3	0,0001	***
β-carotène	Nitrate	14,4	0,0001	***
	Temps	44,1	0,0001	***
Chlorophylle	Nitrate	14,8	0,0001	***
	Temps	15,9	0,0001	***

Tableau 3 : Analyse de variance des paramètres étudiés en fonction de la profondeur et le temps.

Paramètre	Source de variation	F	Probabilité	signification
Densité Cellulaire	Profondeur	15,1	0,0001	***
	Temps	6,8	0,0001	***
Température	Profondeur	27,7	0,0001	***
	Temps	24,2	0,0001	***

pH	Profondeur	23,5	0,0001	***
	Temps	2,9	0,0098	**
Oxygène dissous	Profondeur	68,9	0,0001	***
	Temps	3,8	0,0019	**
β -carotène	Profondeur	15,4	0,0001	***
	Temps	61,2	0,0001	***
Chlorophylle	Profondeur	73,8	0,0001	***
	Temps	35,9	0,0001	***

$p \geq 0,05$ différences non significatives (NS), $0,01 \leq p < 0,05$ différences significatives à 5% (*), $0,001 \leq p < 0,01$ différences significatives à 1% (**), $p < 0,001$ différences significatives à 1‰ (***).

III-2. Comparaison des moyennes

La comparaison multiple des moyennes de chaque paramètre et de leur classement les unes par rapport aux autres est réalisée par le test de Duncan. Les **Figure 3**, **Figure 4**, et **Figure 5** représentent les résultats de cette analyse. Les histogrammes portant des lettres différentes (a, b, c) pour le même paramètre, montrent des différences significatives au seuil de 5 % (comparaison multiple des moyennes par le test de Duncan).

a. Effet de la salinité

⇒ La densité cellulaire

Les moyennes de densité cellulaire aux 5 salinités testées sont significativement différentes (**Figure 3A**). Leur comparaison permet de distinguer également 3 groupes :

- Le groupe (a) présente la densité cellulaire la plus élevée, observée dans les bassins à 15 et 20% de salinité.
- Le groupe (c) avec les moyennes les plus faibles dans les bassins à 5 et 25% de salinité.
- Le bassin à 10% représente le groupe (bc) avec une moyenne intermédiaire.

Le maximum de densité est obtenu à 15 et 20% de salinité, avec une concentration cellulaire moyenne de $3,90.10^5$ cellules.mL⁻¹ \pm $0,04.10^5$. Le minimum de densité est enregistré à 5% de salinité ($3,470.10^5$ cellules.mL⁻¹ \pm $0,035.10^5$).

⇒ La concentration des milieux de culture en β -carotène

La comparaison des moyennes des concentrations en β -carotène permet de distinguer trois groupes, avec des concentrations croissantes en β -carotène en fonction de la salinité (**Figure 3B**)

- Le groupe (a) représente les plus fortes concentrations en β -carotène dans les bassins à 20 et 25% de salinité.
- Le groupe (c) correspond à la concentration minimale en β -carotène dans le bassin à 5 % de salinité.
- Le groupe (bc) présente des concentrations intermédiaires entre les deux groupes précédents dans les bassins à 10 et 15% de salinité.

Le maximum de production de β -carotène est noté à 20 et 25% de salinité ($30\text{mg.L}^{-1} \pm 5$) et le minimum à 5% de salinité ($12\text{mg.L}^{-1} \pm 1,37$).

⇒ Concentration des milieux de culture en chlorophylle totale

Là aussi trois groupes ont été séparés : a, ab et c (**Figure 3C**)

- Le groupe (a) présente la plus forte concentration en chlorophylle totale avec le bassin à 15% de salinité.
- Le groupe (c) présente la plus faible concentration en chlorophylle totale avec les bassins à 20 et 25% de salinité.
- Le groupe (ab) avec une concentration intermédiaire entre les groupes (a) et (c) dans les bassins à 5 et 10% de salinité.

Le maximum de chlorophylle totale de $37,52\text{mg.L}^{-1} \pm 2,36$ est enregistré à 15% de salinité et le minimum de $27,5\text{mg.L}^{-1} \pm 1,84$ à 25% de salinité.

b. Effet de la teneur en nitrates

⇒ La densité cellulaire

La comparaison des moyennes de densité cellulaire au niveau des 6 bassins permet de distinguer deux groupes a et b (**Figure 4A**)

Pour les concentrations inférieures à 2mM, les nitrates seraient un facteur limitant à la multiplication cellulaire. En revanche, les teneurs supérieures à 2mM, ne semblent pas influencer la densité cellulaire. Le maximum de croissance de 2.10^6 cellules.mL⁻¹ $\pm 0,84.10^6$ est noté à 2 et 5mM et le minimum de $4,95.10^5$ cellules.mL⁻¹ $\pm 1,90.10^5$ à 1mM de nitrates.

⇒ La concentration des milieux de culture en β -carotène

Les moyennes des teneurs en β -carotène sont élevées au niveau des 3 concentrations les plus élevées (maximum de $25,17\text{mg.mL}^{-1} \pm 3,70$), à ce niveau la dispersion des données est importante surtout au niveau du dernier

bassin (**Figure 4B**). Les faibles teneurs (minimum de $16,15\text{mg.L}^{-1} \pm 3,85$) au niveau des bassins 1 et 2 expliquent que ces moyennes soient très rapprochées (même groupe d).

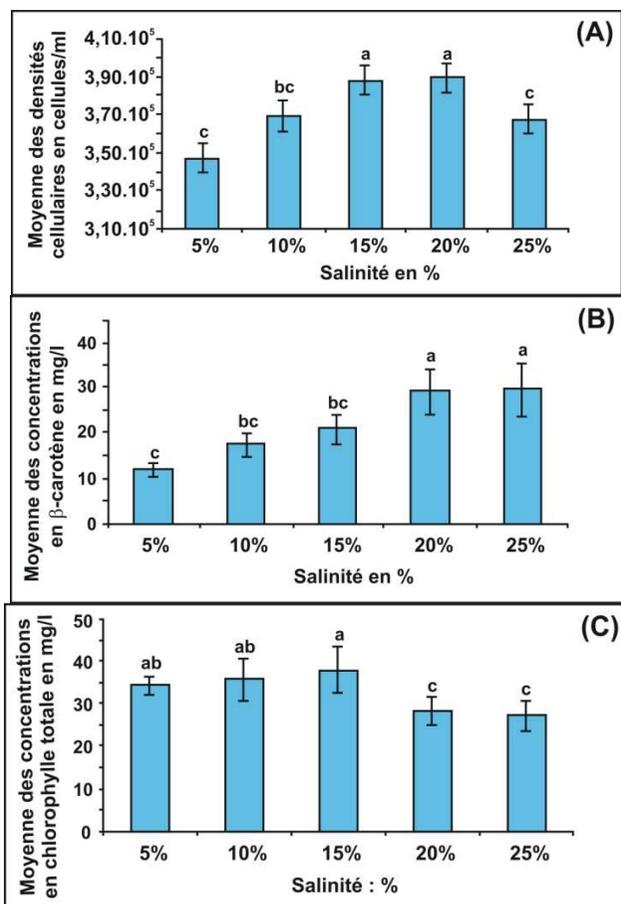


Figure 3 : Comparaison des moyennes des densités cellulaires (A), des teneurs en β -carotène (B) et en chlorophylle totale (C) en fonction de la salinité.

⇒ Concentration des milieux de culture en chlorophylle totale

Les moyennes des teneurs en chlorophylle totale (**Figure 4C**) sont élevées au niveau des 3 derniers bassins (maximum de $38,00\text{mg.L}^{-1} \pm 6,36$). Les faibles teneurs sont enregistrées au niveau du 1^{er} bassin (minimum de $25,70\text{mg.L}^{-1} \pm 7,23$). En général, il y a trois groupes (1), (2,3), (4, 5, 6) respectivement groupe (c), (b) et (a).

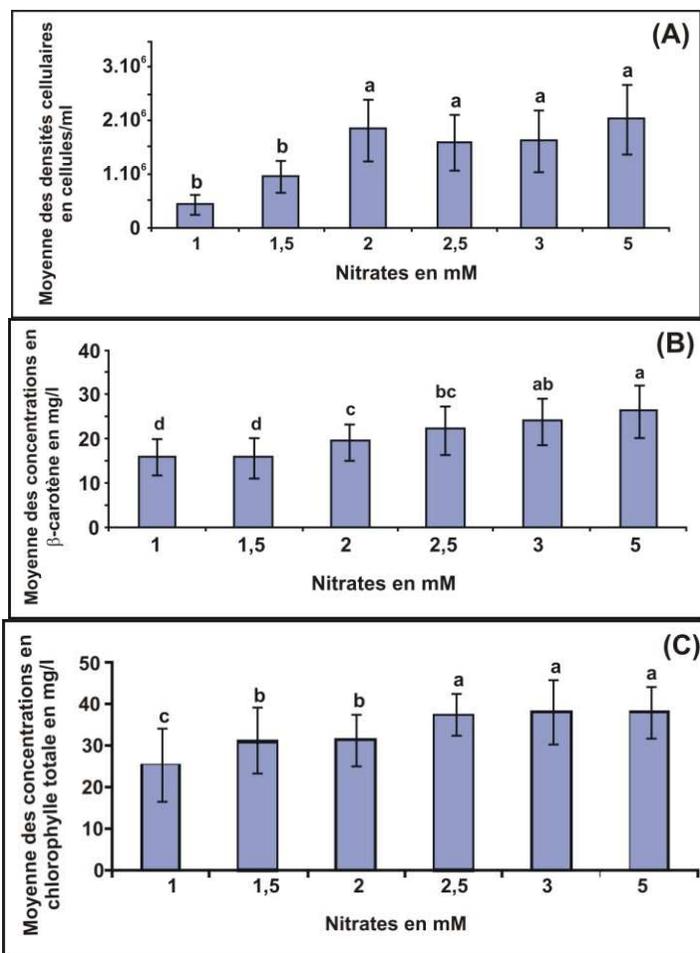


Figure 4 : Comparaison des moyennes de densité cellulaire (A), des teneurs en β -carotène (B) et en chlorophylle totale (C) en fonction de la concentration en nitrates.

c-Effet de la profondeur

⇒ La densité cellulaire

La dispersion des mesures est élevée au niveau des 2 premiers bassins (maximum de $1,95 \cdot 10^6$ cellules $\text{mL}^{-1} \pm 0,58 \cdot 10^6$). La comparaison des moyennes de densité cellulaire ne montre pas de différences importantes (**Figure 5A**), il y a trois groupes a, b et c. Les moyennes obtenues pour le 1^{er} bassin sont les plus élevées. Les faibles densités cellulaires (minimum de $4,0 \cdot 10^5$ cellules. $\text{mL}^{-1} \pm 1,85 \cdot 10^5$) sont mesurées dans les trois derniers bassins (3, 4 et 5) du groupe (c).

⇒ **Concentration des milieux de culture en β -carotène**

Les moyennes de β -carotène sont élevées (maximum de $19,45\text{g.mL}^{-1} \pm 5,45$) au niveau des deux premiers bassins (groupe a), à ce niveau la dispersion des données est élevée surtout au niveau du 1^{er} bassin (**Figure 5B**, les faibles teneurs en β -carotène (minimum de $12,85\text{g.mL}^{-1} \pm 3,00$) au niveau des bassins 3, 4 et 5 sont très proches (groupe b).

⇒ **Concentration des milieux de culture en chlorophylle totale**

Les moyennes des chlorophylles totales (**Figure 5C**) sont élevées au niveau des 3 premiers bassins (maximum de $35\text{g.mL}^{-1} \pm 2,87$). Les faibles teneurs en chlorophylles totales (minimum de $26,5\text{g.mL}^{-1} \pm 1,81$) sont observées au niveau des 2 derniers bassins. En général, il y a 5 groupes a, b, c, d et e avec des différences significatives.

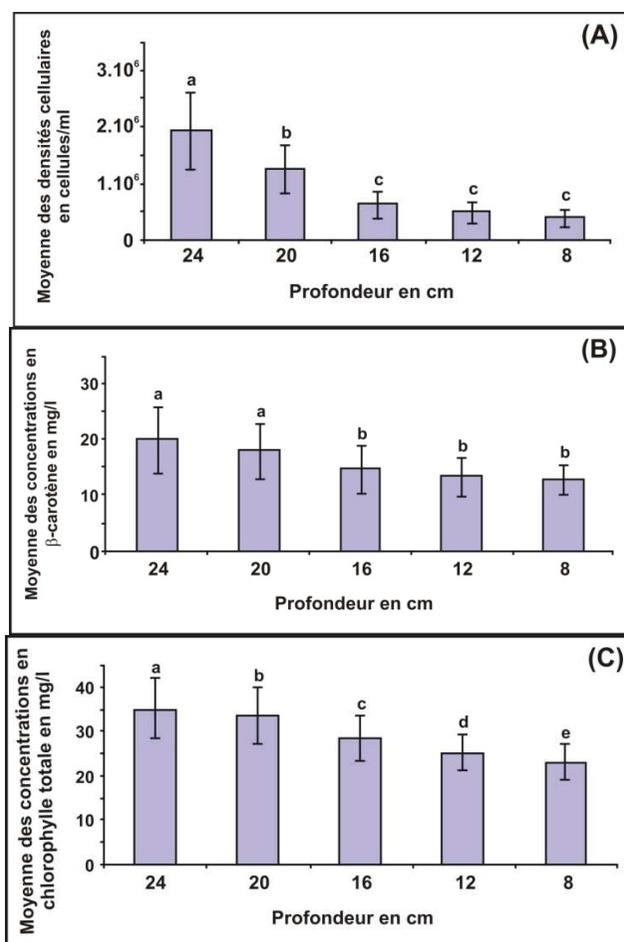


Figure 5 : Comparaison des moyennes de densité cellulaire (A), de teneurs en β -carotène (B) et en chlorophylle totale (C) en fonction de la profondeur des bassins.

IV – DISCUSSION

Les résultats des essais de culture de *D. salina* en conditions climatiques naturelles dans des bassins à ciel ouvert installés au sein de la saline de Tissa, ont confirmé la tolérance de la microalgue aux conditions extrêmes aux quelles elle a été exposée [11, 36, 37]. Récoltée *in situ* au niveau des tables de production de sel, la souche d'origine continentale a fait preuve de plus de performances que les souches d'origine marine qui ont beaucoup attiré l'attention des chercheurs. Cette microalgue a pu survivre à des températures variant entre 25 et 40°C avec des écarts journaliers dépassant souvent les 15°C, et à des pH compris entre 7 et 9. Résultats similaires à ceux rapportés dans la littérature [4,10, 14,38, 39]. Afin d'optimiser la culture de *D. salina* en bassins extérieurs et en tenant compte de l'effet des variations saisonnières sur la vitesse de croissance, mis en évidence par [40], nos expériences ont été menées pendant les mois les plus chauds (mai/août). Nos résultats se rapprochent de ceux cités (**Tableau 4** [30 40, 41]) pour des cultures menées dans les mêmes conditions au sud de l'Espagne.

Les maxima de densité cellulaire, sur des cultures en pochons extérieurs ou en conditions contrôlées réalisées au sein de notre laboratoire [27, 28, 29, 42], ont été obtenus au bout de 10 jours de culture au mois de juin.

Tableau 4 : Comparaison de nos résultats de culture de *Dunaliella Salina* à ceux de la littérature.

	Ben-Amotz (1995) [41]	Garcia-Gonzalez (2003) [40]	Mouradi (2004) [30]
Cellules (10^6 mL^{-1})	0,8±0,2	3,0±0,5	3,1±0,7
Chlorophylle (mg.L^{-1})	40,0±0,8	-	36,0±0,5
β -carotène (mg.L^{-1})	20,0±4,0	15,1±2,6	39,0±4,0
Production de β - carotène ($\text{mg m}^{-2} \text{ j}^{-1}$)	450,0±75,0	343±32,5	484,3±32,5

La dynamique de production de biomasse et de β -carotène par *Dunaliella salina* dépend intimement des conditions environnementales auxquelles l'espèce est exposée.

La salinité compte parmi les paramètres les plus influant pour la production de biomasse et du β -carotène. La modification des teneurs en sel lors d'une culture de *Dunaliella salina*, est une des stratégies utilisées pour induire la caroténogénèse et la croissance cellulaire [17, 43, 44]. L'existence d'une

relation directe entre la production de β -carotène et l'augmentation de la salinité a d'ailleurs été mise en évidence par de nombreux chercheurs [39, 38, 45, 46], pendant que d'autres ne confirment pas cette corrélation [47].

Les résultats de nos essais ont montré que les maximas sont obtenus à des salinités de 15 à 20% pour la densité cellulaire, de 20 à 25% pour la teneur en β -carotène et seulement de 15% pour celle de la chlorophylle totale. Ces résultats restent comparables à ceux rapportés par d'autres auteurs avec des valeurs qui s'insèrent bien entre celles de la littérature [40, 48 49]. Certains auteurs [18,29] ont observé une augmentation significative de la quantité de caroténoïdes par cellule à des salinités supérieures à 15%. D'autres [46, 50] ont obtenu l'optimum de croissance pour des salinités entre 18 et 22% et de production de β -carotène à des salinités supérieures à 27%. Cependant, suite à la culture de quatre espèces de *Dunaliella* à plusieurs salinités, c'est à la plus faible salinité que certains auteurs [48] ont obtenu les maximas de densité cellulaire et c'est à la plus forte salinité que l'accumulation maximale de β -carotène exprimée en quantité par cellule a été mesurée. Des résultats similaires ont rapportés par la littérature [7].

A une salinité constante de 15%, des teneurs en nitrates inférieures à 2mM seraient considérées comme facteurs limitant pour la multiplication cellulaire et au delà de cette valeur, l'augmentation semble être sans influence. Alors qu'une élévation sensible de la production de β -carotène est observée au fur et à mesure que la teneur en nitrates augmente. A la teneur maximale de nitrates testée (5mM), l'optimum de production de β -carotène n'est pas encore atteint alors que celui de la teneur en chlorophylle totale est obtenu à 3mM de nitrates. Nos résultats ne concordent pas totalement avec ceux d'autres auteurs [42, 51] dont les travaux ont montré qu'à une salinité de 30%, la faible teneur en β -carotène ne varie pas en absence de nitrates. Cependant, quelques auteurs [19] ont observé sur un milieu pauvre en nitrates une croissance de *Dunaliella salina*, accompagnée d'une importante production de β -carotène. Ces mêmes auteurs ont constaté qu'en conditions de stress (milieu pauvre en nitrate, salinité élevée, forte intensité lumineuse), le rapport des teneurs β -carotène/chlorophylle totale augmente et est inversement proportionnel à la croissance. De même, les travaux de [6] ont relaté que la diminution de la concentration en nitrates, phosphates et sulfates diminue le taux de croissance et le contenu chlorophyllien, mais augmente le taux de β -carotène.

Les résultats obtenus sur l'influence de la profondeur semblent en opposition avec le développement actuel des techniques intensives de culture qui privilégient les systèmes de culture où l'épaisseur du milieu de culture est la plus faible possible pour optimiser la capture d'énergie lumineuse par les microalgues. Dans ces conditions, l'aspect de la courbe de production de β -carotène par m² et par jour semble indiquer que l'optimum de profondeur n'a pas encore été atteint. Il sera nécessaire de tester des profondeurs supérieures pour vérifier jusqu'à quel point il est possible d'optimiser l'utilisation de l'espace. Dans les bassins de très faibles profondeurs, l'évaporation du milieu de culture

est importante ce qui modifie excessivement les conditions physicochimiques du milieu. Les gammes de tolérance de *Dunaliella salina* seraient probablement dépassées.

Le rendement de la culture de *Dunaliella salina* pour la production de β -carotène et de biomasse semble être également influencé par la variation de la profondeur des bassins de culture. Les effets mis en évidence par certains auteurs [46] ont montré que les meilleurs résultats sont obtenus en été pour des profondeurs de 6cm. Ces auteurs constatent qu'avec de faibles profondeurs, la totalité de l'énergie lumineuse est absorbée au niveau de la zone photique d'une épaisseur de 2 à 3cm. A ce niveau, se produit aussi les échanges gazeux avec l'atmosphère favorisant la production du β -carotène [52]. Lorsque les radiations lumineuse sont réduites, la valeur optimale de la profondeur résulte d'un compromis entre une bonne productivité de biomasse et une faible quantité de caroténoïdes (10cm) et inversement (6cm) [40]. Ces résultats sont différents de ceux rapportés [50] pour la culture en bassin de *D. bardawil* dans de petit réservoir où la productivité est restée constante malgré le changement de la profondeur de 5 à 30cm. En pratique, les bassins commerciaux de culture de *Dunaliella* ont des profondeurs de 10 à 20cm [39]. Dans la station expérimentale de la baie de Cadiz, les bassins de 20m² opèrent à 10 à 13cm de profondeur pendant toute l'année [40]. Dans notre cas, aussi bien pour la densité cellulaire que pour la concentration en β -carotène, le maximum est observé à 24cm mais à cette profondeur l'optimum n'est pas encore atteint dans ces bassins de 7,5m²; ceci est probablement lié aux fortes intensités lumineuses au niveau des salines de Tissa.

V - CONCLUSION

Le but principal de notre projet de recherche étaient l'étude de la conception d'un pilote de culture de *Dunaliella salina* pour la production de β -carotène dans les salines de Tissa (Maroc) au moindre coût.

Nos travaux ont montré la faisabilité de la culture en milieu extérieur pendant les mois d'été de la microalgue *Dunaliella salina*. Le maximum de production de biomasse par *D. salina* est de $3,10 \cdot 10^6$ cellules mL⁻¹ \pm 0,34 (15 % de salinité et 5mM de nitrates) et celui du β -carotène est de $39,0 \pm 4,0$ mg.L⁻¹ soit 484 ± 82 mg m⁻² j⁻¹ (15 % de salinité et 5mM de nitrates). Les cultures étant monospécifiques dans les derniers bassins de production de β -carotène où la salinité atteint la saturation, condition très favorable à la production de ce pigment précurseur de la vitamine A.

Nos travaux actuels incitent à faire cultiver l'algue tout au long de l'année, les résultats obtenus étant prometteurs.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la convention avec la société de production des salines de Tissa et le CNRST à travers le projet Protars III, que nous remercions vivement.

RÉFÉRENCES

- [1] - A. Liska, A. Shevchenko, U. Pick and A. Katz. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol.* 136 (2004) 1-12.
- [2] - U.T. Hammer, Saline Lake Ecosystems of the World. Monographiae Biologicae. Ed. W. Junk. Publishers, Dordrecht, Netherlands, (1986) 616p.
- [3] - S.J. Olmos, L. Ochoa, J. Paniagua, R. Contreras. DNA fingerprinting differentiation between β -carotene hyperproducer strains of *Dunaliella* from around the world. *Saline Systems*, (2009) 5-15.
- [4] - M.A. Borowitzka, Microalgae as a source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Applied Phycol.* 7 (1995) 3-15.
- [5] - K. Phadwal and P.K. Singh. Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. - *Bioresour. Technol.*, 90 (1) (2003) 55-58.
- [6] - P.P. Lamers, M. Janssen, R.C.H. De Vos, R.J. Bino, R.H. Wijffels. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology.* 26 (11) (2008) 631-638.
- [7] - P.I. Gomez, A. Barriga, A. Cifuentes and M.A. Gonzalez. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawill* (strain ATCC 30861). *Chlorophyta. Biol. Res.* 36 (2003) 185-192.
- [8] - M.E. Tornwall, J. Virtamo, P.A. Korhonen, M.J. Virtanen, P.R. Taylor, D. Albanes and J.K. Huttunen. Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *Eur. Heart. J.* 25 (13) (2004) 1171-1178.
- [9] - L. Dufosse, P. Galaup, A. Yaron, S.M. Arad, P. Blanc, K.N.C. Murthy, G.A. Ravishankar. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends Food Sci. Technol.* 16 (2005) 389-406.

- [10] - A. Hosseini Tafreshi and M. Shariati. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol*, 107(1) (2009) 14-35.
- [11] - A. Ben-amotz and M. Avron. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant. Physiol.* 72 (1983) 593-597
- [12] - Lers A., Biener Y. & Zmir A. Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiol* 93 (1990) 389-395.
- [13] - D.M.M. Kleinegris, M. Janssen, W.A. Brandenburg and R.H. Wijffels. The Selectivity of Milking of *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, (2009) 1-10.
- [14] - C. Jiménez, J.M. Capasso, C.L. Edelstein, C.J. Rivard, S. Lucia, S. Breusegem, T. Berl and M. Segovia, Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity devdase. *J Experim Botany*, 60 (3) (2009) 815-828.
- [15] - R. Raja, S. Hema Iswarya, D. Balasubramanyam and R. Rengasamy. PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiol Res.* 162(2) (2007) 168-176.
- [16] - M.A. Borowitzka and C.J. Siva, The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J Appl Phycol.* 19 (2007) 567-590.
- [17] - [17] L. Borowitzka, M.A. Borowitzka and D. Kessly. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Applied Phycol.* 2 (1990) 111-119.
- [18] - A. Cifuentes, M. González and O. Parra. The effect of salinity on the growth and carotene-genesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Biol. Res.* 29 (1996a) 227-236.
- [19] - A. Ben-amotz, A. Lers and M. Avron. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 86 (1988) 1286-1291.
- [20] - S. Park, J.E.W. Polle, A. Melis, T.K. Lee and E. Jin. Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *Mar Biotechnol*, 8 (2006) 120-128.
- [21] - P. Araneda, C. Jiménez and B. Gómez-Silva. Microalgae from Northern Chile III. Growth and betacarotene content of three isolates of *Dunaliella salina* from the Atacame Desert. *Revista de Biología Marina de Valparaíso* (Chile). 27 (1992) 157-162.

- [22] - A. Markovits, M. Gianelli, R. Conejeros and S. Erazo. Strain selection for β -carotene production by *Dunaliella*. *World J of Microbiol and Biotech.* 9 (1993) 534-537.
- [23] - A. Cifuentes, M. González, O. Parra and M. Zúñiga. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio. *Rev Chilena Historia Natural.* 69 (1996b) 105-112.
- [24] - R. Edge, D. McGarvey and T. Truscott. The carotenoids as antioxidants- a review. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 41 (1997) 189-200.
- [25] - M. Parra, M. Pizarro and A. Gattavara. Anais do Encontro Mercosul Europa de Agropolos, Polos e Panques *Tecnológicos Agroindustriais.* 2 (1998) 147-150.
- [26] - M.A. Borowitzka. Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermentors. *Journal of Biotechnology.* 70 (1999) 313-321.
- [27] - Y. Haouazine, N.E. Rmiki, J. Riyahi, T. Givernaud, A. Mouradi and Y. Lemoine. Massive accumulation of β -carotene green alga *Dunaliella salina* induced by variation of nitrate and salinity. - *Meded. Fac. Landbouww. Univ. Gent ?.* 64 (5b) (1999) 435-438.
- [28] - J Riyahi, Y. Haouazine, R. Akallal, Ah. Mouradi, A. Creach, T. Givernaud and Az. Mouradi. Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en β -carotène de *Dunaliella salina*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* 146 (2007) 235-250.
- [29] - J. Riyahi. Technologie de production du β -carotène par la chlorophycée *Dunaliella salina* Teodoresco. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra-Maroc. (2009) 270p.
- [30] - Ah. Mouradi. Etude préliminaire de la conception d'un pilote pour la culture de *Dunaliella salina* et la production de β -carotène. Mémoire DESS. Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra Maroc, (2004) 112p.
- [31] - C.J. Lorenzen, *Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations, Limnol. Oceanogr.* (1967) 12-16.
- [32] - J.H. Carpenter. The Chesapeake Bay Institute technique for Winkler dissolved oxygen method. *Limnol. Oceanograph.* 10 (1965) 141-143.
- [33] - K. Bendschneider and R.J. Robinson. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11 (1952) 87-96.
- [34] - R.E. Wood, W.S. Cook, J.R. Goodgame and R. W. Fink. Activation Cross Sections of Germanium for 14.4-MeV Neutrons. *Phys. Rev.* 154 (1967) 1108- 1110.

- [35] - D.B. Duncan. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11 (1955) 1-42.
- [36] - A. Ben-Amotz and M. Avron. The biotechnology of cultivating of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Tib. Tech.* 8 (1990) 121-126.
- [37] - M. Ginzburg. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.* 14 (1987) 93-183.
- [38] - H. Mendoza, M. Jiménez Del-Río, G. Garcia-Reina and Z. Ramazanov. Low-temperature-induced β -carotene and fatty acids synthesis, and ultrastructural reorganization of the chloroplast in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.*, 31 (1996) 329-331.
- [39] - A. Ben-Amotz. Production of β -carotene from *Dunaliella*. In *Chemicals from Microalga*; Cohen, Z., Ed.; Taylor and Francis: London, U.K. (1999) 196-204.
- [40] - M. Garcia-Gonzalez, J. Moreno, J.P. Canavate, V. Anguis, A. Prieto, C. Manzano, F.J. Folrencio and M.G. Guerrero. Condition for open-air outdoor of *Dunaliella salina* in southern Spain. *J. Applied Phycol.* 15 (2003) 177-184.
- [41] - A. Ben-Amotz. New mode of *Dunaliella* biotechnology: Two-phase growth for β -carotene production. *J. Applied Phycol.*, 7 (1995) 65-68.
- [42] - J. Riyahi, Y. Haouazine, Th. Givernaud, Y. Lemoine and A. Mouradi. Valorization attempt of a Moroccan salt pond: β -carotene production by the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Algological Studies*, 120 (2006) 51-62.
- [43] - A.H. Tafreshi and M. Shariati. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β -carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World journal of microbiology & biotechnology*, 22 (9) (2006) 1003-1006.
- [44] - M.J. Paniagua, W. Capa-Robles, J. Olmos-Soto and L.E. Gutierrez-Millan. The carotenogenesis pathway via the isoprenoid- β -carotene interference approach in a new strain of *Dunaliella salina* isolated from Baja California Mexico. *Mar. Drugs*. 7 (1) (2009) 45-56.
- [45] - A. Ben-Amotz, A. Katz and M. Avron. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *J Phycol.* 18 (1982) 529-537.
- [46] - M.A. Borowitzka, L. Borowitzka and T. Moulton. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant. *Hydrobiol.* 116/117 (1984) 115-121.
- [47] - S. Orset and A. Young. Low temperature induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 35 (1999) 520-527.

- [48] - J. Sarmad, M. Shariati and A.H. Tafreshi. Preliminary Assessment of β -carotene Accumulation in Four Strains of *Dunaliella salina* Cultivated under the Different Salinities and Low Light Intensity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9 (8) (2006) 1492-1496.
- [49] - M.S. Abdel hameed and O.H. Ebrahim. Biotechnological potential uses of immobilized algae. *International Journal of Agriculture & Biology*, 1 (2007) 183-192.
- [50] - A. Ben-Amotz and M. Avron. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest. In: CRESSWELL RC, REES TAV, SHAH N (eds) *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. New York: Longman Scientific and Technical Press. (1989) 91-114.
- [51] - N. Marin, F. Morales, C. Lodeiros and E. Tamigneaux. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J. Applied Phycol.*, 10 (1998) 405-411.
- [52] - A. Richmond. Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: a survey. *J. Applied Phycol.* 8 (1996) 381-387.