

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR, GÉOSCIENCES, ARCHITECTURE

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Titre : RÉCOLTE DE BIOMASSE MICROALGALE PAR FLOCCULATION NATURELLE
ET PROCÉDÉS MEMBRANAIRES

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences Pour l'Ingénieur

Spécialité : Génie des Procédés

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Thi Dong Phuong NGUYEN

Le 31 Octobre 2013, devant le jury ci-dessous

Président Abdelatif AMRANE (Professeur des universités, Université de Rennes 1)
Rapporteurs Olivier BALS (Maître de conférences HDR, Université de Technologie de Compiègne)
Lionel LIMOUSY (Maître de conférences HDR, Université de Haute Alsace)
Examineurs Pascal JAOUEN (Professeur des universités, Université de Nantes)
Patrick BOURSEAU (Professeur des universités, Université de Bretagne Sud)
Matthieu FRAPPART (Maître de conférences, Université de Nantes)

Directeur de thèse : Patrick BOURSEAU

Co-encadrant de thèse : Matthieu FRAPPART

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Olivier BALS, Maitre de Conférences HDR à l'Université de Technologie de Compiègne, et Lionel LIMOUSY, Maitre de Conférences HDR à l'Université de Haute Alsace, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi que pour leurs conseils avisés.

Je remercie Abdelatif AMRANE, Professeur des Universités à l'Université de Rennes 1, ainsi que Pascal JAOUEN, Professeur des Universités à l'Université de Nantes / Polytech' Nantes et directeur adjoint du laboratoire GEPEA, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Patrick BOURSEAU, Professeur des Universités à l'Université de Bretagne Sud, et directeur de cette thèse, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et du laboratoire GEPEA, pour sa confiance et ses encouragements au cours de ces années ainsi que de la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée.

Je voudrais maintenant remercier deux personnes pour qui j'ai une très grande estime :

Tout d'abord mon encadrant, Matthieu FRAPPART, Maitre de Conférences à l'Université de Nantes, sans lequel je n'aurais jamais fait ce travail de thèse. Merci pour ta gentillesse durant toutes ces années, ta patience et ta grande pédagogie. Merci pour tes encouragements et les discussions scientifiques. Et surtout, j'admire ta grande connaissance scientifique.

Je voudrais, ici, associer le Professeur François RESCHE pour qui j'ai le plus profond respect. Merci d'avoir accepté de me diriger au début de cette thèse. Merci pour ton humanité et tout ce que tu m'as appris.

Je voudrais remercier le programme 322 du Ministère vietnamien de l'éducation et de la formation pour votre financement pendant 36 mois.

Je voudrais également remercier le personnel technique du Laboratoire GEPEA et plus particulièrement Hélène MAREC pour son aide aux montages des photobioréacteurs.

Merci à tous les thésards du CRTT passés et présents pour leur bonne humeur, leur sympathie et les bonnes discussions pas toujours très sérieuses.

Merci aussi à tous les étudiant(e)s Vietnamiens à St Nazaire pour leur gentillesse et leur aide.

Je ne pourrais pas être digne si j'oubliais de remercier ma grande famille au Vietnam: mes grands-parents, mes grands-tantes, mes parents, ma sœur, mon beau-frère, mes oncles, mes tantes, mes cousins/cousines... qui m'ont toujours encouragée et soutenue au cours de toutes ces années. Merci aussi à tous mes amis pour vos aides et vos encouragements.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	5
INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE.....	11
1. UTILISATION DES MICROALGUES À DES FINS COMMERCIALES	12
1.1. <i>Marchés de petite ou de moyenne taille (cosmétique, pharmaceutique...)</i>	12
1.2. <i>Marchés de grande échelle : les biocarburants</i>	14
1.2.1. Biocarburants de 1 ^{ère} et 2 ^{nde} génération.....	14
1.2.2. Biocarburants de 3 ^{ème} génération.....	14
2. EXPLOITATION INDUSTRIELLE DES MICROALGUES	16
2.1. <i>Schéma global de production et problématique</i>	16
2.2. <i>La culture des microalgues</i>	18
2.2.1. Les microalgues, organismes photosynthétiques, source de biocarburant ?	18
2.2.2. La culture de microorganismes.....	21
2.2.3. Les moyens de production de microalgues	24
2.2.4. Présentation de <i>Chlorella vulgaris</i>	27
2.2.5. Les milieux de culture de <i>Chlorella vulgaris</i>	28
2.3. <i>L'extraction / fractionnement des molécules d'intérêt</i>	29
2.3.1. Les procédés d'extraction.....	29
2.3.2. Les procédés de fractionnement-purification.....	30
2.4. <i>Le recyclage</i>	31
2.5. <i>La récolte</i>	32
2.5.1. La centrifugation, procédé de récolte de référence	33
2.5.2. Coagulation / Flocculation.....	35
2.5.2.1. Flocculation chimique	36
2.5.2.2. Électrocoagulation / électrofloculation.....	38
2.5.2.3. Biofloculation	39
2.5.2.4. Flottation.....	41
2.5.2.5. Flocculation naturelle / autofloculation	42
2.5.3. Filtration et séparation membranaire	47
2.5.3.1. Filtration sur support	48
2.5.3.2. Séparation par membrane	48
2.5.3.2.1. Paramètres caractéristiques	49
2.5.3.2.2. Bases théoriques de la filtration et modèles usuels.....	51
2.5.3.2.3. Présentation des différents procédés	54
2.5.3.2.4. La séparation membranaire appliquée à la récolte de microalgue	56
3. CONCLUSIONS	62
4. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES.....	79
1. CULTURE CELLULAIRE	80
1.1. <i>Souche</i>	80
1.2. <i>Milieux de culture</i>	80
1.3. <i>Moyens de culture</i>	81
1.3.1. Photobioréacteur de type Air-lift.....	81
1.3.2. Photobioréacteur de type Scobalite	82
1.4. <i>Suivi de la culture</i>	84
1.4.1. Matière sèche (MS)	84
1.4.2. Comptage cellulaire à la cellule de Malassez.....	85
1.4.2.1. Gravage	85
1.4.2.2. Comptage.....	86
1.4.3. Dosages des pigments (Chlorophylles a et b) et facteur de stress.....	87
1.4.4. Mesure de densité optique DO.....	88
1.4.5. Courbes de corrélation	88
2. ÉTUDE DE LA RÉCOLTE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> PAR FLOCCULATION EN MILIEU MODÈLE ET RÉEL	89
2.1. <i>Procédure de remise en suspension</i>	89

2.2.	<i>Solutions / suspensions utilisées</i>	90
2.3.	<i>Protocole opératoire des essais de floculation et caractérisations associées</i>	90
2.3.1.	Détermination des concentrations minimales en sels nécessaires à la décantation en milieu modèle et réel	90
2.3.2.	Récolte par floculation associée à la remontée naturelle du pH	92
2.3.3.	Caractérisations de la décantation par floculation	92
2.3.3.1.	Caractérisation de la suspension initiale	92
2.3.3.2.	Efficacité de la séparation et concentration en cellules dans les floccs.....	92
2.3.3.3.	Caractérisation du surnageant	94
2.3.3.4.	Suivi des consommations en sels du milieu de culture lors de la floculation par chromatographie ionique	94
2.3.3.5.	Évolution de la charge superficielle des cellules par zétamétrie.....	95
2.3.3.6.	Analyse des floccs au microscope électronique à balayage (MEB) et microanalyses à rayons X (EDX)	97
3.	ÉTUDE DE LA RÉCOLTE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> PAR SÉPARATION MEMBRANAIRE.....	98
3.1.	<i>Modules membranaires</i>	98
3.1.1.	Cellule Amicon	98
3.1.2.	Module de filtration tangentielle plan Rayflow	99
3.1.3.	Module de filtration dynamique à disque rotatif	100
3.1.4.	Membranes testées	102
3.2.	<i>Protocole opératoire des essais de séparation membranaire et caractérisations associées</i>	102
3.2.1.	Récolte par séparation membranaire.....	102
3.2.2.	Dosage des sucres totaux	104
4.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	105

CHAPITRE 3 : RÉCOLTE DE MICROALGUES PAR FLOCCULATION DÉCANTATION ASSOCIÉE À LA REMONTÉE NATURELLE OU ARTIFICIELLE DU PH..... 107

1.	FLOCCULATION ARTIFICIELLE PAR REMONTÉE DU PH À LA SOUDE	108
1.1.	<i>Floculation artificielle de <i>Chlorella vulgaris</i> resuspendue en eau osmosée</i>	110
1.1.1.	Estimation des concentrations minimales en Mg^{2+} (essais 1 à 5).....	110
1.1.2.	Estimation des concentrations minimales en Ca^{2+} et PO_4^{3-} (essais 6 à 10)	111
1.2.	<i>Floculation artificielle de <i>Chlorella vulgaris</i> resuspendue en sérum physiologique</i>	112
1.2.1.	Estimation des concentrations minimales en Mg^{2+} (essais 11 à 15)	112
1.2.2.	Estimation des concentrations minimales en Ca^{2+} et PO_4^{3-} (essais 16 à 21)	113
1.3.	<i>Floculation artificielle de <i>Chlorella vulgaris</i> resuspendue en milieux de culture réels</i>	114
1.3.1.	Estimation des concentrations minimales en ions Mg^{2+} et Ca^{2+} en fonction de la concentration en cellules pour une concentration en PO_4^{3-} donnée (essais 22 à 25).....	114
1.3.2.	Caractéristiques des floccs obtenus	116
1.3.3.	Discussions et conclusions	117
2.	FLOCCULATION NATURELLE EN MILIEU DE CULTURE RÉEL.....	118
2.1.	<i>Milieu dérivé Sueoka (NH_4^+)</i>	118
2.1.1.	Montée en pH avec la photosynthèse sans modification du milieu	118
2.1.2.	Essais dans le milieu complété en ions Ca^{2+}	120
2.1.3.	Conclusions	120
2.2.	<i>Milieu dérivé BBM (NO_3^-)</i>	121
2.2.1.	Montée en pH par la photosynthèse	121
2.2.	Modification du milieu et propositions de mécanismes.....	124
2.2.2.1.	Dopage en Ca^{2+} et mécanismes de floculation.....	124
2.2.2.2.	Dopage en Mg^{2+} et mécanismes de floculation	127
2.2.3.	Conclusions	131
3.	CONCLUSIONS SUR LES POSSIBILITÉS DE FLOCCULATION NATURELLE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	133
3.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134

CHAPITRE 4 : RÉCOLTE DE MICROALGUES PAR SÉPARATION MEMBRANAIRE..... 137

1.	RÉCOLTE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> PAR FILTRATION TANGENTIELLE.....	138
1.1.	<i>Choix des membranes</i>	138
1.2.	<i>Ultrafiltration de <i>Chlorella vulgaris</i> sur membrane PAN 40 kDa</i>	138
1.3.	<i>Microfiltration de <i>Chlorella vulgaris</i> sur membrane PES 0,05 μm</i>	141
1.4.	<i>Conclusions sur la récolte de <i>Chlorella vulgaris</i> par filtration tangentielle</i>	143
2.	RÉCOLTE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> PAR FILTRATION DYNAMIQUE	144

2.1.	<i>Impact de l'hydrodynamique sur la culture</i>	144
2.2.	<i>Récolte par ultrafiltration sur PAN 40 kDa</i>	148
2.3.	<i>Conclusions sur l'ultrafiltration de Chlorella vulgaris par filtration dynamique</i>	150
3.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	152
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		155
ANNEXES.....		161
1.	ANNEXE 1 : COMPOSITION DES DIFFÉRENTES MILIEUX DE CULTURE RECENSÉS POUR <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	162
2.	ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE PRODUCTION DE LA SOLUTION DE HUTNER	163
RESUMÉ ET MOTS CLÉS.....		166

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PERSPECTIVES DU MARCHÉ MONDIAL D'EXPLOITATION DES MICROALGUES.....	12
FIGURE 2 : CLASSIFICATION DES BIOCARBURANTS (D'APRÈS NIGAM ET SINGH, 2011)	15
FIGURE 3 : SCHÉMA GLOBAL D'EXPLOITATION DE MICROALGUES À GRANDE ÉCHELLE.....	16
FIGURE 4 : SYNTHÈSE DES TECHNOLOGIES POSSIBLES POUR L'EXPLOITATION DES MICROALGUES À DES FINS ÉNERGÉTIQUES [D'APRÈS SUALI ET AL. 2012]	17
FIGURE 5 : SCHÉMA DE STRUCTURE D'UNE MICROALGUE VERTE (A) ET D'UNE CYANOBACTÉRIE (B) [D'APRÈS PIGNOLET ET AL. 2013].....	18
FIGURE 6 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE EN MODE BATCH EN FONCTION DU TEMPS (D'APRÈS DEGRÉMONT 2005).....	22
FIGURE 7 : ÉVOLUTIONS DE LA CONCENTRATION DE LA BIOMASSE (C_x) ET DE LA PRODUCTIVITÉ VOLUMIQUE (P_x) D'UNE CULTURE CONTINUE D'UNE MICROALGUE EN FONCTION DU TAUX DE DILUTION D (A), ET DE LA DISTRIBUTION DE LA LUMIÈRE AU SEIN D'UNE CULTURE (B).....	23
FIGURE 8 : EXEMPLE DE RÉACTEUR OUVERT DE TYPE CHAMP DE COURSE (RACEWAY)	24
FIGURE 9 : PHOTOBIOREACTEURS DE TYPE TUBULAIRE (SCOBALITE, MONOTUBULAIRE, MULTITUBULAIRE).....	25
FIGURE 10 : PHOTOBIOREACTEUR DE TYPE AIR-LIFT	26
FIGURE 11 : PHOTOBIOREACTEUR À ÉCOULEMENT EN FILM (ALGOFILM)	26
FIGURE 12 : <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	27
FIGURE 13 : CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DESTRUCTION CELLULAIRE [D'APRÈS MIDDELBERG 1995 ; GECIOVA ET AL. 2002].....	30
FIGURE 14 : CLASSIFICATION DES PROCÉDÉS DE RÉCOLTE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE EN SORTIE [D'APRÈS UDUMAN ET AL. 2010A]	32
FIGURE 15 : CLASSIFICATION DES PROCÉDÉS DE RÉCOLTE EN FONCTION DE LEUR CONSOMMATION ÉNERGÉTIQUE [D'APRÈS UDUMAN ET AL. 2010A].....	33
FIGURE 16 : SCHÉMA DE PRINCIPE DE LA CENTRIFUGEUSE À BOL PLEIN / PERFORÉ	34
FIGURE 17 : SCHÉMA DE PRINCIPE DE LA CENTRIFUGEUSE À ASSIETTES.....	34
FIGURE 18 : SCHÉMA DE PRINCIPE DU DÉCANTEUR CENTRIFUGE	35
FIGURE 19 : THÉORIE DE LA DOUBLE COUCHE [D'APRÈS RUSHTON ET AL. 1996].....	36
FIGURE 20 : PROCESSUS DE COAGULATION / FLOCCULATION	36
FIGURE 21 : FILTRATION DE CELLULES MICROALGALES PAR FILTRATION SUR SUPPORT.....	48
FIGURE 22 : MEMBRANE SEMI-PERMÉABLE.....	49
FIGURE 23 : POLARISATION DE CONCENTRATION.....	52
FIGURE 24 : PROFIL DE CONCENTRATION AU VOISINAGE DE LA MEMBRANE.....	53
FIGURE 25 : RÉSISTANCES DE DIFFÉRENTES MEMBRANES DE MICROFILTRATION ET D'ULTRAFILTRATION [D'APRÈS ROSSIGNOL ET AL. 1999].....	57
FIGURE 26 : FLUX DE FILTRATION À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN FONCTION DU TEMPS [D'APRÈS ZHANG ET AL. 2010].....	58
FIGURE 27 : FLUX DE FILTRATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION POUR DIFFÉRENTES VITESSES [D'APRÈS ZHANG ET AL. 2010].....	58
FIGURE 28 : ÉVOLUTION DES FLUX EN MODE CONCENTRATION LORS D'UNE FILTRATION DE DIATOMÉE DANS DES CONDITIONS SIMILAIRES DE CISAILLEMENT SUR UN MODULE TANGENTIELLE ET SUR UN MODULE ROTATIF DYNAMIQUE [D'APRÈS FRAPPART ET AL. 2011].....	59
FIGURE 29 : AUGMENTATION DE FLUX DE PERMÉATION EN FONCTION DE LA VITESSE DE ROTATION ET DU TYPE DE MEMBRANE [D'APRÈS RIOS ET AL. 2011].....	60
FIGURE 30 : SCHÉMA EXPÉRIMENTAL ET MONTAGE OPÉRATOIRE DU SYSTÈME DE CULTURE DE LA SOUCHE MICROALGALE EN PBR AIR-LIFT.....	82
FIGURE 31 : SCHÉMA EXPÉRIMENTAL DU PBR SCOBALITE	83
FIGURE 32 : SCHÉMA DE PRINCIPE DE LA MESURE DES MATIÈRES SÈCHES.....	84
FIGURE 33 : HÉMATIMÈTRE DE TYPE MALASSEZ.....	85
FIGURE 34 : REPRÉSENTATION DU GRAVAGE SUR LA CELLULE DE MALASSEZ.....	86
FIGURE 35 : SCHÉMA DE PRINCIPE DU DOSAGE DES CHLOROPHYLLES A ET B.....	87
FIGURE 36 : CONCENTRATION EN CHLOROPHYLLE A ET DO À 682 NM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE EXPRIMÉE EN $G_{MS} \cdot L^{-1}$ LORS D'UNE CULTURE EN MILIEU BBM.....	89
FIGURE 37 : SCHÉMA EXPÉRIMENTAL DES ESSAIS DE REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH.....	91
FIGURE 38 : SCHÉMA EXPÉRIMENTAL DES ESSAIS DE REMONTÉE NATURELLE DU PH.	92
FIGURE 39 : DÉFINITION DES FRACTIONS OBTENUES APRÈS DÉCANTATION	93
FIGURE 40 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN CHROMATOGRAPHE IONIQUE.....	94
FIGURE 41 : ILLUSTRATION DU ZETASIZER NANO ZS ET DES CUVES DE MESURE	96

FIGURE 42 : SCHÉMA DE PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE	97
FIGURE 43 : PHOTO ET DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL DE LA CELLULE AMICON	98
FIGURE 44 : MONTAGE EXPÉRIMENTAL DU MODULE DE FILTRATION TANGENTIELLE RAYFLOW	99
FIGURE 45 : SCHÉMA DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL.....	99
FIGURE 46 : SCHÉMA DE PRINCIPE (A) ET MONTAGE EXPÉRIMENTAL (B) DU MODULE À DISQUE ROTATIF	100
FIGURE 47: FORMULE CHIMIQUE DU POLYACRYLONITRILE (PAN) (A) ET DU POLYETHERSULFONE (PES) (B).....	102
FIGURE 48 : ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ MINIMALE EN Mg^{2+} REQUISE FLOCULER <i>CHLORELLA VULGARIS</i> RESUSPENDUE EN EAU OSMOSÉE ; SUIVI DE L'ÉCLAIRCISSEMENT APRÈS REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH À LA SOUDE	110
FIGURE 49 : ÉVALUATION DES QUANTITÉS MINIMALES EN Ca^{2+} ET PO_4^{3-} REQUISES POUR FLOCULER <i>CHLORELLA VULGARIS</i> RESUSPENDUE EN EAU OSMOSÉE ; SUIVI DE L'ÉCLAIRCISSEMENT APRÈS REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH À LA SOUDE	111
FIGURE 50 : ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ MINIMALE EN Mg^{2+} REQUISE POUR FLOCULER <i>CHLORELLA VULGARIS</i> RESUSPENDUE DANS DU SÉRUM PHYSIOLOGIQUE ; SUIVI DE L'ÉCLAIRCISSEMENT APRÈS REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH À LA SOUDE.....	113
FIGURE 51 : ÉVALUATION DES QUANTITÉS MINIMALES EN Ca^{2+} ET PO_4^{3-} REQUISES POUR FLOCULER <i>CHLORELLA VULGARIS</i> RESUSPENDUE DANS DU SÉRUM PHYSIOLOGIQUE; SUIVI DE L'ÉCLAIRCISSEMENT APRÈS REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH À LA SOUDE.....	114
FIGURE 52 : CONCENTRATION MINIMALE EN MAGNÉSIUM REQUISE POUR LA FLOCCULATION ARTIFICIELLE À LA SOUDE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN CELLULES MICROALGALES ($G_{MS} \cdot L^{-1}$) POUR LES MILIEUX DE CULTURE SUEOKA ET BBM ; $[Mg^{2+}]_0$: CONCENTRATION INITIALE EN Mg^{2+} DANS LES DEUX MILIEUX.....	115
FIGURE 53 : CONCENTRATION MINIMALE EN CALCIUM REQUISE POUR LA FLOCCULATION ARTIFICIELLE À LA SOUDE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE ($G_{MS} \cdot L^{-1}$) POUR LES DEUX MILIEUX DE CULTURE ; $[Ca^{2+}]_0$: CONCENTRATION INITIALE EN Ca^{2+} DANS LES DEUX MILIEUX	116
FIGURE 54 : ÉLEVATION NATURELLE DU PH DANS LE MILIEU SUEOKA, SANS INJECTION DE CO_2 ; ÉVOLUTION DU PH ET DU POTENTIEL ZËTA EN FONCTION DU TEMPS ; AUCUNE FLOCCULATION OBSERVÉE	119
FIGURE 55 : ÉLEVATION NATURELLE DU PH DANS LE MILIEU BBM, SANS INJECTION DE CO_2 ; ÉVOLUTION DU PH ET DU POTENTIEL ZËTA EN FONCTION DU TEMPS ; AUCUNE FLOCCULATION OBSERVÉE.....	122
FIGURE 56 : ÉLEVATION NATURELLE DU PH DANS LE MILIEU BBM, SANS INJECTION DE CO_2 ; ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN IONS CALCIUM, PHOSPHATE ET MAGNÉSIUM EN FONCTION DU TEMPS ; AUCUNE FLOCCULATION OBSERVÉE	122
FIGURE 57 : FLOCULAT OBTENU PAR LA PRÉCIPITATION DES PHOSPHATES DE CALCIUM EN MILIEU BBM DOPÉ EN CALCIUM ($120 \text{ MG} \cdot L^{-1}$); (A) PAR REMONTÉE NATURELLE DU PH ; (B) PAR REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH À LA SOUDE (CF. §1.3.1).....	125
FIGURE 58 : OBSERVATION MEB-EDX D'AGRÉGATS DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> OBTENUS PAR REMONTÉE NATURELLE DU PH EN MILIEU BBM DOPÉ EN Ca^{2+} ($120 \text{ MG} \cdot L^{-1}$) ; (A) X 5000 ; (B) X 14000	126
FIGURE 59 : AUGMENTATION NATURELLE DU PH EN MILIEU BBM DOPÉ EN Mg^{2+} , SANS INJECTION DE CO_2 ; ÉVOLUTION DU PH ET DU POTENTIEL ZËTA.....	128
FIGURE 60 : AUGMENTATION NATURELLE DU PH EN MILIEU BBM DOPÉ EN Mg^{2+} , SANS INJECTION DE CO_2 ; ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN IONS PHOSPHATE ET MAGNÉSIUM (CONCENTRATIONS EN Ca^{2+} TROP FAIBLES POUR ÊTRE QUANTIFIÉES)	128
FIGURE 61 : FLOCULAT OBTENU PAR LA PRÉCIPITATION DU MAGNÉSIUM EN MILIEU BBM DOPÉ EN MAGNÉSIUM ; (A) PAR REMONTÉE NATURELLE DU PH ; (B) PAR REMONTÉE ARTIFICIELLE DU PH À LA SOUDE CF. §1.3.1.	129
FIGURE 62 : OBSERVATION MEB-EDX D'AGRÉGATS DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> OBTENUS PAR REMONTÉE NATURELLE DU PH EN MILIEU BBM DOPÉ EN Mg^{2+} ($1000 \text{ MG} \cdot L^{-1}$) ; VUE GÉNÉRALE DES AGRÉGATS (A = ZONE OBSERVÉE SUR LA FIGURE 63).	129
FIGURE 63 : OBSERVATION MEB-EDX D'AGRÉGATS DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> OBTENUS PAR REMONTÉE NATURELLE DU PH EN MILIEU BBM DOPÉ EN Mg^{2+} ($1000 \text{ MG} \cdot L^{-1}$) ; VUE SUR LES CELLULES FLOCULÉES.....	130
FIGURE 64 : CONCENTRATIONS MINIMALES EN IONS CALCIUM NÉCESSAIRES À LA FLOCCULATION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> DANS DIFFÉRENTS MILIEUX, MODÈLES OU RÉELS ($[PO_4^{3-}] = 69,8 \text{ MG} \cdot L^{-1}$), LORS D'UNE REMONTÉE ARTIFICIELLE (A, B, C) OU NATURELLE (D) DU PH	132
FIGURE 65 : CONCENTRATIONS MINIMALES EN IONS MAGNÉSIUM NÉCESSAIRES À LA FLOCCULATION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> DANS DIFFÉRENTS MILIEUX, MODÈLES OU RÉELS, LORS D'UNE REMONTÉE ARTIFICIELLE (A, B, C) OU NATURELLE (D) DU PH.....	132
FIGURE 66 : ULTRAFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> DE CONCENTRATION CONSTANTE ($0,2 \text{ G}_{MS} \cdot L^{-1}$, RECYCLAGE TOTAL) ; ÉVOLUTION DU FLUX DE PERMÉAT EN FONCTION DE LA PTM POUR DIVERSES VITESSES DE CIRCULATION DANS LE MODULE TANGENTIEL RAYFLOW.....	139
FIGURE 67 : ULTRAFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; ÉVOLUTION DU FLUX DE PERMÉAT EN FONCTION DU LOGARITHME DU FACTEUR DE CONCENTRATION DANS LE MODULE TANGENTIEL RAYFLOW	140
FIGURE 68 : MICROFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> DE CONCENTRATION CONSTANTE ($0,12 \text{ G}_{MS} \cdot L^{-1}$, RECYCLAGE TOTAL) ; ÉVOLUTION DU FLUX DE PERMÉAT EN FONCTION DE LA PTM POUR DIVERSES VITESSES DE CIRCULATION DANS LE MODULE TANGENTIEL RAYFLOW.....	142
FIGURE 69 : MICROFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; ÉVOLUTION DU FLUX DE PERMÉAT EN FONCTION DU LOGARITHME DU FACTEUR DE CONCENTRATION DANS LE MODULE TANGENTIEL RAYFLOW	142

FIGURE 70 : ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DU NOMBRE DE CELLULES DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> , POUR DIFFÉRENTES VITESSES DE ROTATION ; MODULE DE FILTRATION DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF (DR) ÉQUIPÉ D'UN DISQUE LISSE.....	145
FIGURE 71 : ÉVOLUTION DU NOMBRE DE CELLULES DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> AVEC LA VITESSE DE ROTATION AU COURS DU TEMPS ; MODULE DE FILTRATION DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF ÉQUIPÉ D'UN DISQUE À AILETTES	146
FIGURE 72 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION NORMALISÉE EN SUCRES AVEC LA VITESSE DE ROTATION AU COURS DU TEMPS ; MODULE DE FILTRATION DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF ÉQUIPÉ D'UN DISQUE LISSE.....	147
FIGURE 73 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION NORMALISÉE EN SUCRES AVEC LA VITESSE DE ROTATION AU COURS DU TEMPS ; MODULE DE FILTRATION DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF ÉQUIPÉ D'UN DISQUE À AILETTES.	147
FIGURE 74 : ULTRAFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; ÉVOLUTION DU FLUX DE PERMÉAT EN FONCTION DU LOGARITHME DU FACTEUR DE CONCENTRATION DANS LE MODULE DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF	148
FIGURE 75 : ULTRAFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN SUCRES TOTAUX EN FONCTION DU FACTEUR DE CONCENTRATION DANS LE MODULE DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF.....	149
FIGURE 76 : ULTRAFILTRATION D'UNE SUSPENSION DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; INFLUENCE DE LA ROTATION DU DISQUE SUR LES FLUX DE PERMÉAT	150

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : APPLICATIONS POSSIBLES DE PRODUITS ISSUS DE SOURCES MICROALGALES [D'APRÈS SINGH <i>ET AL.</i> 2011]	13
TABLEAU 2 : COMPARAISON DES PRODUCTIVITÉS EN BIOCARBURANTS ISSUS DE MICROALGUES ET D'AUTRES RESSOURCES AGRICOLES [D'APRÈS MATA <i>ET AL.</i> 2010].....	16
TABLEAU 3 : COMPARAISON DES PRODUCTIVITÉS EN BIOCARBURANTS POUR DIFFÉRENTES SOUCHES MICROALGALES [D'APRÈS MATA <i>ET AL.</i> 2010].....	20
TABLEAU 4 : COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> (D'APRÈS HADJ-ROMDHANE <i>ET AL.</i> 2012).....	28
TABLEAU 5 : COMPOSITION PARTIELLE DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> (D'APRÈS BECKER 1994).....	28
TABLEAU 6 : LISTE DES COAGULANTS CHIMIQUES UTILISÉS POUR LA RÉCOLTE DE MICROALGUES.....	37
TABLEAU 7 : LISTE DES FLOCCULANTS UTILISÉS POUR LA RÉCOLTE DE MICROALGUES	37
TABLEAU 8 : PERFORMANCES DE L'ÉLECTROCOAGULATION / ÉLECTROFLOCCULATION APPLIQUÉE À LA RÉCOLTE DE MICROALGUES	39
TABLEAU 9 : PERFORMANCES DE LA BIOFLOCCULATION APPLIQUÉE À LA RÉCOLTE DE MICROALGUES	40
TABLEAU 10 : PERFORMANCES DE L'ÉLECTROFLOTTATION / FLOTTATION À L'AIR DISSOUS (DAF) / FLOTTATION À L'AIR DISPERSÉ (DIAF) APPLIQUÉE À LA RÉCOLTE DE MICROALGUES.....	42
TABLEAU 11 : COMPOSÉS SUSCEPTIBLES D'ÊTRE IMPLIQUÉS DANS LA FLOCCULATION INDUITE PAR LE PH (PRODUIT DE SOLUBILITÉ DANS L'EAU).....	43
TABLEAU 12 : PERFORMANCES DE LA FLOCCULATION PAR REMONTÉE NATURELLE OU ARTIFICIELLE DU PH	46
TABLEAU 13 : PERFORMANCES DE LA SÉPARATION MEMBRANAIRE APPLIQUÉE AUX MICROALGUES	62
TABLEAU 14 : COMPOSITION IONIQUE DES DEUX MILIEUX UTILISÉS AU COURS DE CETTE ÉTUDE (EN MG.L ⁻¹)	80
TABLEAU 15 : COMPOSITION DE LA SOLUTION DE HUTNER (G.L ⁻¹)	81
TABLEAU 16 : VARIATION DE LA VALEUR DU POTENTIEL ZÊTA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> EN FONCTION DU TYPE DE MILIEU À PH7	96
TABLEAU 17 : CARACTÉRISTIQUES DES MEMBRANES UTILISÉES.....	102
TABLEAU 18 : PLAN DES ESSAIS DE FLOCCULATION CHIMIQUE AVEC REMONTÉE RAPIDE DU PH PAR AJOUT INSTANTANÉE DE SOUDE (1N)	109
TABLEAU 19 : VOLUME DE FLOCS OBTENUS ET CONCENTRATION EN CELLULES DÉTERMINÉES POUR LES CONCENTRATIONS EN MG ²⁺ ET CA ²⁺ MINIMALES REQUISES (CONCENTRATION INITIALE EN CELLULE 0,41 G _{MS} .L ⁻¹)	117
TABLEAU 20 : RATIO MOLLAIRE CA/PO ₄ POUR DIFFÉRENTS COMPOSÉS DE PHOSPHATES DE CALCIUM POUVANT PRÉCIPITER	123
TABLEAU 21 : VARIATION DE LA PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE PAN 40 kDA APRÈS RINÇAGE À L'EAU PUIS APRÈS NETTOYAGE CHIMIQUE LORS DES ESSAIS DE CONCENTRATION	141
TABLEAU 22 : VITESSES ET TAUX DE CISAILLEMENT MOYENS ET MAXIMAUX DANS LE MODULE DYNAMIQUE À DISQUE ROTATIF POUR DIFFÉRENTES CONFIGURATIONS D'ESSAIS (VITESSE DE ROTATION; GÉOMÉTRIE DU DISQUE ; <i>CF.</i> CHAPITRE 2 § 3.1.3.).....	144

INTRODUCTION

Il est reconnu depuis plusieurs années que les microalgues sont une source intéressante de nombreux composés comme certains pigments, lipides ou polysaccharides. Jusqu'à présent, les microalgues ont été principalement utilisées en aquaculture pour l'alimentation des larves et des jeunes coquillages, ou pour la production de molécules à haute valeur ajoutée à destination des industries cosmétique et nutraceutique. Récemment, leur exploitation s'est orientée vers de nouveaux domaines tels que les industries alimentaires et de la nutrition animale (source protéique, compléments alimentaires riches en protéines et vitamines), puis plus récemment vers les marchés de masse que sont l'énergie et la chimie verte. L'intérêt s'est focalisé en particulier sur l'obtention de lipides neutres (TriAcylGlycérols TAG) pour la production de biodiesel. Il est probable que ces marchés génèrent dans les années à venir une forte demande de microalgues et, par conséquent, suscitent le développement de procédés de production complets allant de leur culture à leur raffinage.

Une des étapes cruciales et centrales de ces procédés est sans conteste la récolte. En effet, la problématique de la récolte est liée à la nature de la souche à récolter (taille, forme, métabolisme conduisant à la génération d'exsudats type polysaccharides source de perturbations possibles...), aux caractéristiques du milieu de culture inhérent à sa production (physico-chimie du milieu, pH, salinité...) ainsi qu'aux moyens de production (système ouvert ou fermé type photobioréacteur). Ces derniers permettent actuellement d'atteindre des concentrations en biomasse comprises entre 0,1 à 10 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentration de la biomasse exprimée en terme de matière sèche). Pour être exploitée, cette biomasse doit être amenée à des niveaux de concentrations compris entre 50 et 250 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ selon les étapes de traitement aval, par élimination d'une partie du milieu de culture. Cette étape est critique car les estimations montrent qu'elle représente en moyenne 20 à 30 % du coût global du procédé (et même jusqu'à 50 % dans les cas les plus défavorables). La centrifugation est reconnue comme la technologie de référence car elle est efficace dans la majorité des configurations (concentration en biomasse de la culture, taille et forme des cellules, performances de séparation...), mais son caractère énergivore (1 à 10 $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$) la réserve aux marchés de niche et l'exclue des marchés de masse. Dans ces conditions, un intérêt particulier est porté sur les procédés de séparation peu énergivores tels que la floculation, la décantation et les procédés de séparation par membrane.

L'efficacité de la séparation gravitaire est généralement supérieure à 80 % et peut atteindre 95 % pour des coûts énergétiques inférieurs au $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$ et avec des concentrations en biomasse atteignant au mieux 30 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$. La décantation simple ne semble réalisable que pour des cellules dont la taille est élevée ($> 70 \mu\text{m}$). De ce fait, une coagulation/floculation

doit être effectuée dès lors que la taille des cellules à récolter est inférieure à 50 μm . De nombreuses technologies sont disponibles comme l'utilisation d'agents chimiques tels que ceux utilisés dans le traitement des eaux, la biofloculation, l'électrocoagulation ou électrofloculation ou la floculation naturelle.

Les microalgues peuvent aussi être concentrées par une membrane semi-perméable de micro ou d'ultrafiltration, avec des efficacités proches de 100 %, et ce à des concentrations élevées allant jusqu'à 180 – 200 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ (par deux étages successifs de concentration). Pour cette technologie, le coût énergétique, essentiellement dû aux pompes de gavage et de recirculation, peut s'élever jusqu'à 2 $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$. De plus, ces pompes peuvent être source de dommages sur des cellules fragiles ce qui peut conduire à générer des fragments cellulaires et à libérer des métabolites pouvant accroître le colmatage du matériau membranaire. Si les flux de perméation sont généralement inférieurs à 80 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, le contrôle de l'hydrodynamique de l'écoulement peut limiter ce colmatage et, à défaut d'augmenter ces flux de perméation, leur éviter une décroissance trop rapide.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de la floculation – décantation d'une part, et des procédés de séparation par membrane d'autre part pour la récolte d'une microalgue d'eau douce. La souche retenue est *Chlorella vulgaris*, microalgale verte d'eau douce, unicellulaire et non flagellée et faisant partie des souches majoritairement cultivées à grande échelle de par son intérêt industriel. Sa culture est aisée, et son potentiel commercial est également intéressant tant pour des applications alimentaires du fait de ses teneurs en protéines (60%), polysaccharides (20%), acides gras non-saturés (15%), caroténoïdes (lutéine par exemple) et vitamines, mais également pour des applications biocarburants. Elle peut en effet, sous des conditions favorables, contenir jusqu'à près de 60 % de lipides neutres en matières sèches, avec une productivité de l'ordre de 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$.

La récolte de *Chlorella vulgaris* sera investiguée dans un premier chapitre par floculation naturelle. Celle-ci consiste en la précipitation de sels à partir d'ions présents dans le milieu de culture qui découle de l'élévation lente du pH résultant de la photosynthèse et du stripping du CO_2 dissous dans le milieu. Ce type de floculation est connu pour les souches marines dont les milieux de culture sont riches en sels, mais les mécanismes conduisant à la floculation restent flous, et les conditions d'application sur une souche d'eau douce restent à préciser. Cette floculation sera ainsi étudiée dans deux milieux de culture réels avec respectivement l'ion ammonium et l'ion nitrate comme source d'azote. Les milieux à base de nitrate sont les plus couramment utilisés pour cultiver les microalgues, mais les milieux à base d'ammonium sont également considérés car *Chlorella vulgaris* est capable de métaboliser

cette source d'azote. Celle-ci permet en outre d'élaborer des milieux hautement assimilables en vue d'éviter l'accumulation de composés minéraux lors du recyclage des milieux de culture après récolte (Thèse de Farid Hadj-Romdhane soutenue au laboratoire en décembre 2012). L'impact de la composition du milieu (source d'azote, concentration en magnésium, calcium et ions phosphates...) sur les performances de la floculation naturelle de *Chlorella vulgaris* (efficacité, durée de sédimentation, concentration finale en biomasse...) sera étudiée, et on cherchera à préciser les mécanismes de floculation associés.

La récolte de *Chlorella vulgaris* par séparation membranaire sera également investiguée dans un second chapitre. La filtration tangentielle, classiquement rencontrée dans le monde industriel, sera étudiée pour servir de base de comparaison avec un procédé de filtration dite dynamique. Cette technologie, à l'hydrodynamique particulière, permet de limiter le colmatage des membranes, par amélioration des vitesses tangentielles à la membrane, ainsi que limiter les effets destructeurs liés aux pompes d'alimentation, par réduction des vitesses de circulation (vitesse débitante) dans le circuit. Cette technologie peut présenter des performances plus intéressantes que la filtration tangentielle, que ce soit en termes de flux de perméation ou de concentrations finales. Elle peut en particulier être compétitive en tant que 2nde étape d'une filtration multi-étagée visant à obtenir une récolte fortement concentrée en biomasse. Au-delà d'une trentaine de grammes (en matières sèches) par litre, les suspensions de *Chlorella vulgaris* ont en effet un comportement rhéologique non newtonien qui peut induire des pertes de charge très élevées en filtration tangentielle classique, voire à une dégradation des cellules dans le cas de souches fragiles (Thèse de Antoine Souliès à soutenir au laboratoire en 2013). La filtration dynamique peut alors constituer une alternative intéressante.

CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE

1. Utilisation des microalgues à des fins commerciales

Depuis quelques années, il a été montré que les microalgues (algues microscopiques de 1 à 20 μm) peuvent être la source d'une grande variété de produits à haute valeur ajoutée comme certains pigments tels que l'Astaxanthine, la B-Phycorérythrine ou la C-Phycocyanine, pour ne citer que ces exemples.

Dernièrement, compte tenu du tarissement des ressources fossiles actuelles, l'intérêt pour les microalgues s'est orienté vers leur capacité à produire des lipides. À l'issue de leur transformation, une nouvelle source de biocarburant pourrait ainsi être développée [Williams & Laurens, 2010].

Aujourd'hui, les marchés exploitant les microalgues sont limités à des applications de niche. On peut supposer que, dans les années à venir, l'intérêt suscité par la production de biocarburants va engendrer un fort accroissement de la demande et donc une nécessité de disposer de moyens de production et de post-traitement tout aussi conséquents (Figure 1).

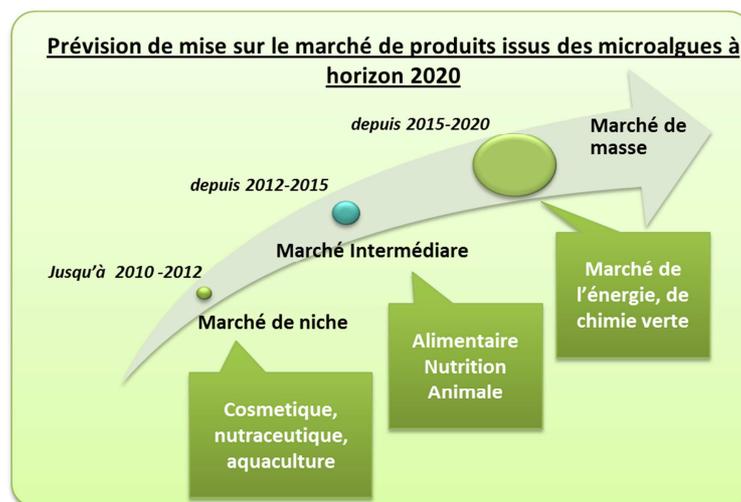


Figure 1 : Perspectives du marché mondial d'exploitation des microalgues

1.1. Marchés de petite ou de moyenne taille (cosmétique, pharmaceutique...)

Les premiers marchés des microalgues se résumaient à la production de produits à (haute) valeur ajoutée (Tableau 1) pour des domaines d'activités tels que la cosmétique, la nutraceutique, ou encore l'aquaculture.

Puis, l'exploitation des microalgues s'est orientée vers des domaines d'activités comme l'alimentaire et la nutrition animale avec en point de mire les marchés de l'énergie et de la chimie verte [Olaizola *et al.* 2003 ; Mata *et al.* 2010].

Tableau 1 : Applications possibles de produits issus de sources microalgales [d'après Singh *et al.* 2011]

Product group	Applications	Examples/producer	References
Phycobiliproteins carotenoids	Pigments, cosmetics, pro vitamins, pigmentation	Phycocyanin (<i>Spirulina platensis</i>)	Furuki <i>et al.</i> 2003; Spolaore <i>et al.</i> 2006
		Phycocyanin, phycoerythrin (<i>Porphyridium cruentum</i>)	Borowitzka 1997; Roman <i>et al.</i> 2002; Servel <i>et al.</i> 1994
		C-phycoyanin-hepatoprotective effect (<i>Spirulina platensis</i>)	Bhat and Madyastha 2000; Vadiraja <i>et al.</i> 1998
		β -carotene (<i>D. salina</i>)	Borowitzka 1991; Ben-Amotz and Avron 1990; Masjuk 1973; Olaizola 2003
Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)	Food additive, nutraceutical	Eicosapentaenoic acid (EPA) (<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Cryptocodinium</i>)	Apt and Behrens 1999; Belarbi <i>et al.</i> 2000; Cardozo <i>et al.</i> 2007; Cohen 1999; Radmer 1996
		Docosahexaenoic acid (DHA) (<i>Schizochytrium</i> sp, <i>Gymnodinium</i> , <i>Cryptocodinium</i> , <i>Ulkenia</i>)	Apt and Behrens 1999; Pulz and Gross 2004; Radmer 1996; Valencia <i>et al.</i> 2007
		Arachidonic acid (<i>Parietochlorisincise</i> , <i>Porphyridium cruentum</i>)	Borowitzka 1997; Bigogno <i>et al.</i> 2002
Vitamins	Nutrition	Biotin (<i>Euglena gracilis</i>)	Baker <i>et al.</i> 1981
		α -tocopherol (Vitamin E) (<i>Euglena gracilis</i>)	Survase <i>et al.</i> 2006
		Ascorbic acid (Vitamin C) (<i>P. moriformis</i> , <i>Chlorella</i> spp)	Bremus <i>et al.</i> 2006; Running <i>et al.</i> 2002
		Cyanovirin-N (CV-N) (<i>Nostoc ellipsosporum</i>)	Boyd 2001, 2002, 2004; Burja <i>et al.</i> 2001; Yang <i>et al.</i> 1999
Proteins/Amino acids	Anti HIV-1	Hapalysin (<i>Hapalosiphon welwitschii</i>)	Burja <i>et al.</i> 2001
	Reversing activity against multi drug resistance		
Alkaloids	Immuno-suppressive	Microcolin (<i>Lyngbya</i>)	Koehn <i>et al.</i> 1992
	Hormothamnin	<i>Harmathamnion enteromorphoides</i>	Gerwick <i>et al.</i> 1992
	Antillatoxin- ichthiotoxic	Cyclodepsipeptides	Orjala <i>et al.</i> 1995
	Acetogenin-cytotoxicity towards leukaemic cells	Curacin- inhibits tubulin polymerization	Burja <i>et al.</i> 2002; Lai <i>et al.</i> 1996
	Anti-tuberculosis Activity	(+)-8-hydroxymanzamine derivative, e.g., Ircinol A, Manzamine A, Litosterol (<i>Litophyton viridis</i>)	Donia and Hamann 2003
Protease Inhibitors	Elastase inhibiting activity	Cyclic desipeptides (<i>Scytonema hofmanni</i> pcc 7110)	Matern <i>et al.</i> 2001
	Inhibitor of platelet activating factor- induced platelet aggregation	Phosphoglyco-analog of acyl-acetylated sphingosine, glyco-analog of phosphatidyl-glycerol (<i>Scytonema julianum</i>)	Antonopoulou <i>et al.</i> 2005
	Inhibitors of serine proteases, including elastase	Micropeptins, aeruginosins, microginins, anabaenopeptins and microverdins	Grach-Pogrebinsky <i>et al.</i> 2003; Matern <i>et al.</i> 2001; Ploutno and Carmeli 2005
Microalgal Metabolites	Hypocholesterolemic effect	(<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>)	Vlad <i>et al.</i> 1995
	Anticancer effect	Diacylglycerols (<i>Spirulina fusiformis</i> , <i>Dunaliella</i> and <i>Phormidium tenue</i>)	Mathew <i>et al.</i> 1995; Schwartz and Shklar 1987; Schwartz <i>et al.</i> 1988; Tokuda <i>et al.</i> 1996
	Cytotoxicity against epidermoid and adeno carcinoma cells	Borophycin (<i>Nostoc linckia</i> and <i>Nostoc spongiaeforme</i> var. <i>tenue</i>)	Burja <i>et al.</i> 2001
	Anti-inflammatory Activity	Carotenoids (β -carotene, lycopene, lutein; C-phycoyanin)	Bhat and Madyastha 2000; Kerfeld 2004; Vadiraja <i>et al.</i> 1998
Polysaccharides	food coating, emulsifying and gelling agents, flocculants and hydrating agents; remove toxic metals	Acidic sugars (glucuronic and/or galacturonic acids) and other anionic organic (acetyl, pyruvil) and inorganic (phosphate and sulfate) substituent.	Otero and Vincenzini 2003
		Chrysolaminarin (a soluble β -1,3-polyglucan (<i>Phaeocystis pouchetii</i>))	Borowitzka 1997; Laing and Ayala 1990
	Inhibit tumor invasion and metastasis	Sulphated polysaccharide, calcium spirulans (<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>)	Mishima <i>et al.</i> 1998

Microbicides	Bactericide	<i>Spirogyra</i>	Muller-Feuga et al. 2003
	Anti-viral	Anti-HIV	Cyanoviridin-N (Lyngbya lagerheimii and Phormidium tenue) Gustafson et al. 1989; Yang et al. 1997
		Inhibits Herpes simplex, human cytomegalovirus and measles virus	Calcium spirulan (Ca-SP) (Lyngbya lagerheimii and Phormidium tenue) Ayehunie et al. 1998; Hayashi and Hayashi 1996; Hayashi et al. 1996
	Anti-helminthic	Dihydroxy tetrahydrofuran, Jaspilakinolide (brown algae- <i>Notheia anomala</i>)	Donia and Hamann 2003
	Fungicide- apoptosis of tumor cells	Cryptophycin (<i>Nothoc</i> sp. ATCC 53789)	Burja et al. 2001; Panda et al. 1998
	Anti-protozoan: Leishmaniasis treatment	Sodium stibogluconate and meglumine antimonite	Berman 1998

1.2. Marchés de grande échelle : les biocarburants

1.2.1. Biocarburants de 1^{ère} et 2^{nde} génération

Parmi les diverses sources d'énergie renouvelables possibles, les biocarburants sont de plus en plus reconnus pour l'intérêt collectif et devraient à l'avenir jouer un rôle crucial dans l'infrastructure énergétique mondiale.

La première génération des biocarburants se réfère essentiellement aux ressources issues de l'agriculture à vocation alimentaire comme l'amidon (blé, maïs), le sucre (sucre de cannes, betteraves à sucre), et l'huile végétale (colza, tournesol...). Parmi ces biocarburants, on retrouve classiquement des biodiesels, des bioalcools (bioéthanol) et du biogaz.

Malgré la continuité des recherches pour accroître la production et la consommation des biocarburants de 1^{ère} génération, leur utilisation dans le secteur des transports est restée limitée en raison de la compétition avec le secteur alimentaire pour les terres arables. Le risque d'un manque de matières premières pour les denrées alimentaires et l'augmentation consécutive du prix de celles-ci sont un frein pour une exploitation significative de cette nouvelle source énergétique. Les biocarburants de 2^{nde} génération n'utiliseront plus de denrées alimentaires (céréales, betteraves ...) pour leur fabrication, mais des ressources plus diversifiées, provenant de plantes notamment de la filière ligno-cellulosique conduisant aux mêmes types de biocarburant [Naik *et al.* 2010 ; Qureshi *et al.* 2010].

1.2.2. Biocarburants de 3^{ème} génération

En tenant compte des inconvénients majeurs issus des biocarburants de 1^{ère} et 2^{nde} génération, une filière de biocarburant de 3^{ème} génération a vu le jour et offre des perspectives d'avenir particulièrement intéressantes en termes de solutions énergétiques. Leur production est basée sur les composés (ou molécules) produits par des microalgues. En effet, ces

microorganismes photosynthétiques peuvent se développer rapidement et convertir l'énergie solaire en énergie chimique via la fixation de CO₂. Ces microalgues sont pour l'instant considérées comme une source prometteuse pour la production de biodiesel, de biokérosène, de bioéthanol voire d'hydrogène [Mata *et al.* 2010].

Les caractéristiques des différentes générations de biocarburant peuvent être résumées dans la figure suivante (Figure 2).

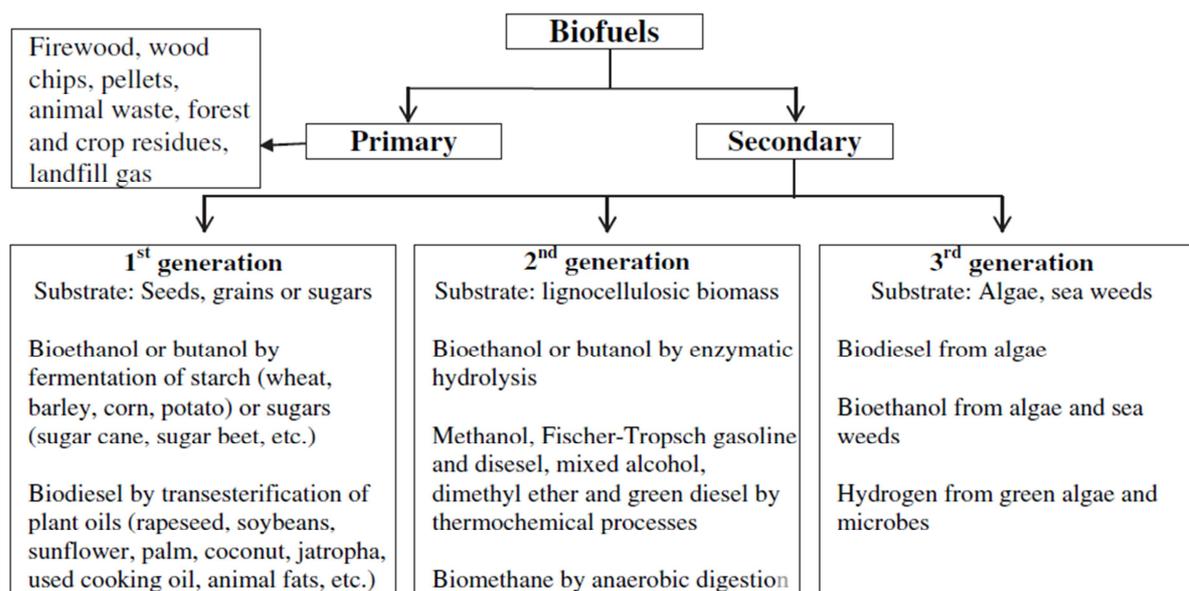


Figure 2 : Classification des biocarburants (d'après Nigam et Singh, 2011)

Ainsi, la fabrication de biocarburants à partir des microalgues semble être une alternative prometteuse pour pallier aux difficultés de production que rencontrent les deux premières générations, telles l'accès à une source d'eau. Un autre intérêt est que leur culture n'est plus en concurrence avec les cultures vivrières tant pour l'alimentation humaine qu'animale, tout en offrant une productivité supérieure, grâce à leur meilleur rendement photosynthétique, à celles des végétaux terrestres (Tableau 2) (Christi *et al.* 2008 ; Benemann *et al.* 2010).

De plus, de nombreuses souches sont extrêmement riches en huile, la fraction lipidique pouvant dépasser 70 % en poids de la biomasse sèche dans certaines conditions [Christi 2007]. D'autre part, la culture de microalgues peut s'effectuer de manière continue, et elles peuvent consommer de grandes quantités de CO₂. Cela peut devenir un atout sur le plan environnemental puisque le CO₂ pourrait être capté par exemple dans les fumées de centrales thermiques ou d'incinérateurs, entraînant une utilisation de ce CO₂ plutôt qu'un rejet atmosphérique.

Tableau 2 : Comparaison des productivités en biocarburants issus de microalgues et d'autres ressources agricoles [d'après Mata *et al.* 2010]

Plant source	Seed oil content (% oil by wt in biomass)	Oil yield (L oil/ha year)	Land use (m ² year/kg biodiesel)	Biodiesel productivity (kg biodiesel/ha year)
Corn/Maize (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soybean (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola/Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Castor (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palm oil (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgae (low oil content)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgae (medium oil content)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgae (high oil content)	70	136,900	0.1	121,104

2. Exploitation industrielle des microalgues

2.1. Schéma global de production et problématique

Les procédés intégrés d'exploitation industrielle de microalgues devront être basés sur un enchaînement optimisé d'opérations unitaires (Figure 3).

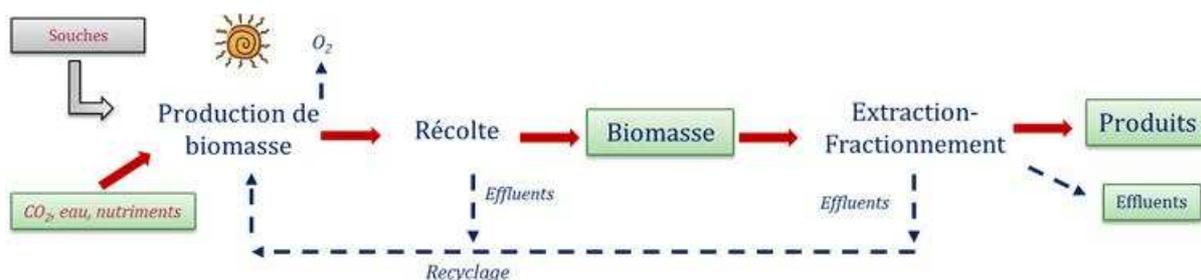


Figure 3 : Schéma global d'exploitation de microalgues à grande échelle

L'objectif majeur est de disposer d'un schéma global dont la balance énergétique soit positive (énergie produite supérieure à celle consommée durant le processus). Dans le schéma d'exploitation, trois étapes importantes peuvent conduire à des coûts énergétiques et d'exploitation élevés.

La première est celle de la production de biomasse. À l'issue de la production, la concentration en cellules microalgales dans la suspension se situera entre 0,1 et 10 g_{MS}.L⁻¹ environ selon le système de culture, nécessitant ainsi l'élimination de quantités non négligeables d'eau de culture.

La récolte de la biomasse est aussi une étape déterminante puisqu'elle peut représenter jusqu'au tiers des coûts d'exploitation de la biomasse [Gudin & Thepenier 1986 ; Molina Grima *et al.* 2003]. Les performances de l'étape de récolte, qui sont fonction des propriétés de la phase entrante (concentration en biomasse, viscosité...) et des caractéristiques de la souche (taille, forme, concentration...), auront une influence directe sur les étapes aval.

La troisième étape concerne le post-traitement : dans cette phase se retrouvent l'extraction et le fractionnement des métabolites d'intérêt préalablement synthétisés par les microorganismes.

La Figure 4 met en évidence les différentes technologies susceptibles d'être utilisées au cours des différentes étapes de la production de biocarburants à partir de microalgues.

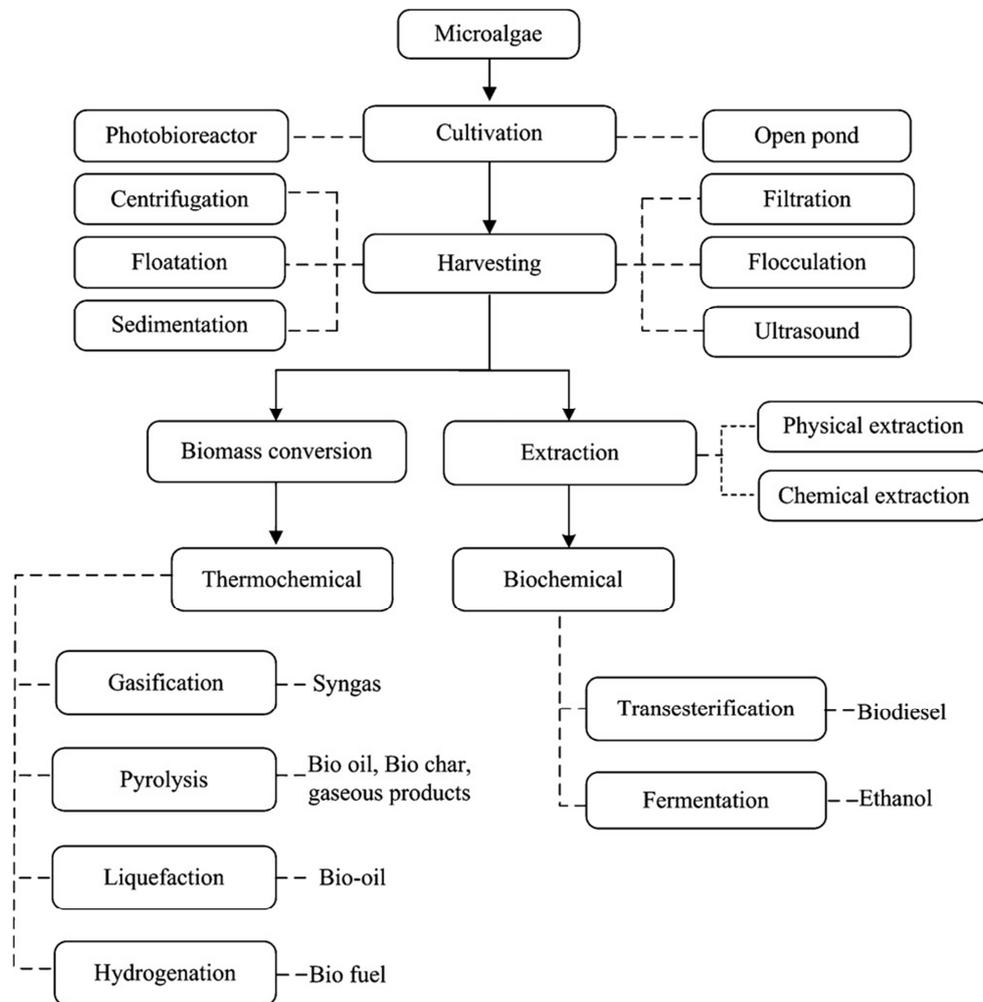


Figure 4 : Synthèse des technologies possibles pour l'exploitation des microalgues à des fins énergétiques [d'après Suali *et al.* 2012]

Dans les paragraphes suivants, nous allons présenter les différentes étapes de culture, extraction / fractionnement et de recyclage avant d'aborder en détails la récolte qui fait l'objet de l'ensemble de ce travail de thèse.

2.2. La culture des microalgues

2.2.1. Les microalgues, organismes photosynthétiques, source de biocarburant ?

Le terme microalgue désigne les algues (« plante aquatique ») dont la taille est de l'ordre du micromètre. Ce sont des organismes végétaux uni ou pluricellulaires vivant dans des milieux fortement aqueux. On estime à aujourd'hui que le nombre d'espèces varie entre 200 000 et 1 000 000 (contre 250 000 espèces végétales terrestres) et comme toute plante, ce sont des organismes photosynthétiques. Pour ce type de microorganismes, un doublement de population est observé tous les 24 h environ.

La grande majorité des espèces est eucaryote (se caractérisant par la présence d'un noyau et de mitochondries dans leurs cellules). À contrario, les « microalgues bleues » sont des organismes procaryotes (pas de noyau cellulaire ni de chloroplastes à l'instar des bactéries) sont plus généralement appelées cyanobactéries (Figure 5).

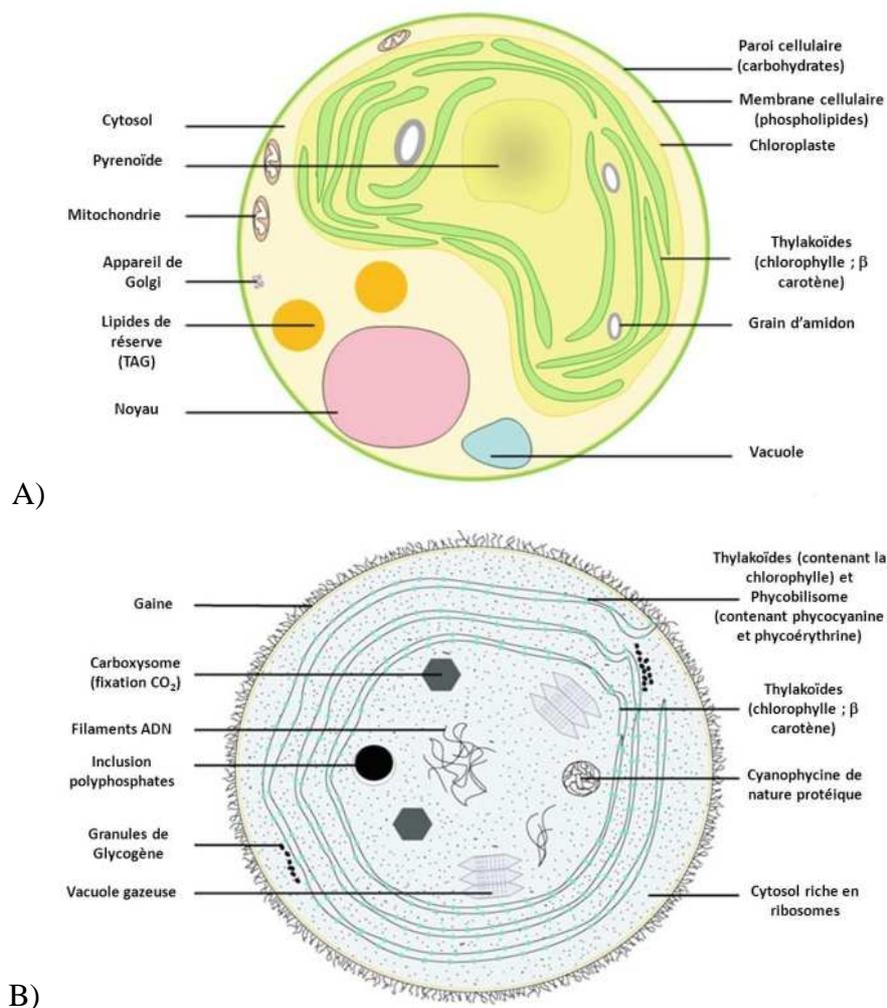
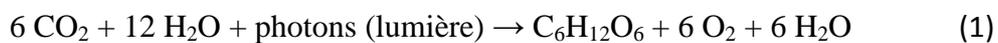


Figure 5 : Schéma de structure d'une microalgue verte (A) et d'une cyanobactérie (B) [d'après Pignolet *et al.* 2013]

Lors de la photosynthèse, les microalgues dites autotrophes génèrent leur matière organique (sucres, lipides...) à partir de substances minérales qu'elles puisent de leur milieu de culture (CO₂, sels minéraux). L'énergie requise pour cette synthèse est apportée par la lumière captée par les pigments assimilateurs (chlorophylles). En hétérotrophie, le microorganisme synthétisera sa matière organique à partir de matière organique déjà présente dans le milieu de culture.

Dans les microalgues vertes, l'énergie lumineuse est captée dans le chloroplaste et est transformée en énergie chimique par l'intermédiaire de la présence de chlorophylle dans les membranes des thylakoïdes. Un autre pigment est présent dans ces membranes. Il s'agit des caroténoïdes qui ont un rôle de collecteur de lumière (transfert à la chlorophylle de l'énergie lumineuse qu'ils absorbent dans les gammes du spectre situées entre le violet et le rouge) et un rôle photoprotecteur (récupération de l'énergie de la chlorophylle en particulier en cas d'excès de lumière et d'ombre). Le pyrénoloïde permet le stockage des enzymes nécessaires à la photosynthèse (notamment RubisCO, enzyme permettant la fixation du CO₂). La cellule va également stocker son énergie soit sous forme lipidique (TriAcylGlycérols TAG), soit sous forme glucidique (Amidon). Le processus photosynthétique peut alors être résumé par l'expression globale ci-dessous :



Il permet donc la transformation du dioxyde de carbone, en présence d'eau et de photons, en sucre (forme carbonée utile à l'organisme pour sa croissance) tout en produisant du dioxygène et de l'eau.

Parmi les différentes sources lipidiques présentes dans la structure de la microalgue (TAG de réserve, phospholipides membranaires...), seule la fraction TAG est intéressante pour la génération de biocarburant. Le mode de culture influe grandement sur la teneur de ces lipides de réserve. Ainsi, dans les objectifs de génération de biocarburant, des carences en lumière et/ou azote sont employés pour favoriser le stockage de TAG.

Plusieurs types de souches peuvent être étudiés pour la production de biocarburant. Le Tableau 3 permet une comparaison de différentes souches en termes de teneurs en lipides dans la cellule et de productivité. Ce choix demeure crucial car du choix de la souche va dépendre l'ensemble des caractéristiques du procédé d'exploitation tant pour sa culture (type de milieu, robustesse de la souche aux contaminations extérieures...) que pour les procédés

avals (facilité de déconstruction-désintégration cellulaire ; libération des métabolites ; recyclage du milieu de culture). Ainsi, le seul critère de teneur en lipides ou en productivité n'est pas suffisant pour sélectionner une souche, et cette sélection dépend de nombreux autres critères, faisant l'objet d'études parallèles à ce travail de thèse.

Tableau 3 : Comparaison des productivités en biocarburants pour différentes souches microalgales [d'après Mata et al. 2010]

Marine and freshwater microalgae species	Lipid content (% dry weight biomass)	Lipid productivity (mg/L/day)	Volumetric productivity of biomass (g/L/day)	Areal productivity of biomass (g/m ² /day)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24.0–31.0	–	–	11.5–17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0–75.0	–	0.02	3.0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8	0.07	–
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6–16.4/39.8	17.6	0.04	–
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0–63.0	10.3–50.0	0.036–0.041	0.91–0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6–57.8	1214	2.00–7.70	–
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0–22.0	44.7	0.23–1.47	–
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0–58.0	11.2–40.0	0.02–0.20	0.57–0.95
<i>Chlorella</i> sp.	10.0–48.0	42.1	0.02–2.5	1.61–16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	–	2.90–3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	18.0–57.0	18.7	–	3.50–13.90
<i>Chlorococcum</i> sp.	19.3	53.7	0.28	–
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0–51.1	–	10	–
<i>Dunaliella salina</i>	6.0–25.0	116.0	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	–	0.09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7–71.0	–	0.12	–
<i>Dunaliella</i> sp.	17.5–67.0	33.5	–	–
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27.4	47.3	0.17	–
<i>Euglena gracilis</i>	14.0–20.0	–	7.70	–
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	–	0.05–0.06	10.2–36.4
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0–40.0	–	0.32–1.60	–
<i>Isochrysis</i> sp.	7.1–33	37.8	0.08–0.17	–
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4	0.19	–
<i>Monallanthus salina</i>	20.0–22.0	–	0.08	12
<i>Nannochloris</i> sp.	20.0–56.0	60.9–76.5	0.17–0.51	–
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7–29.7	84.0–142.0	0.37–0.48	–
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0–53.0	37.6–90.0	0.17–1.43	1.9–5.3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0–65.0	90.0–134.0	–	–
<i>Nitzschia</i> sp.	16.0–47.0	–	–	8.8–21.6
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5	–	–	40.6–45.8
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16	–
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2	0.14	–
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	18.0–57.0	44.8	0.003–1.9	2.4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0–18.8/60.7	34.8	0.36–1.50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0–55.0	–	0.004–0.74	–
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9–18.4	35.1	0.19	–
<i>Scenedesmus</i> sp.	19.6–21.1	40.8–53.9	0.03–0.26	2.43–13.52
<i>Skeletonema</i> sp.	13.3–31.8	27.3	0.09	–
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5–51.3	17.4	0.08	–
<i>Spirulina platensis</i>	4.0–16.6	–	0.06–4.3	1.5–14.5/24–51
<i>Spirulina maxima</i>	4.0–9.0	–	0.21–0.25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	17.4	0.08	–
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5–23.0	27.0–36.4	0.12–0.32	19
<i>Tetraselmis</i> sp.	12.6–14.7	43.4	0.30	–

De par ces propriétés (taux de croissance et productivité élevés en lipides), ces microorganismes algaux semblent être la source actuelle la plus prometteuse pour la génération de biocarburant.

2.2.2. La culture de microorganismes

Une culture de microalgue, comme de tout microorganisme suit 5 phases bien distinctes (Figure 6) :

- la phase de latence (1) : les microorganismes s'adaptent à leur nouvel environnement.
- la phase de croissance exponentielle (2) : les microorganismes se multiplient en présence du substrat indispensable à sa croissance. Cette phase de croissance la plus forte de la culture est souvent décrite par le modèle de Monod (1949):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{avec} \quad \mu = \mu_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad (2)$$

où X est la concentration en biomasse (g.L⁻¹)

S est la concentration en substrat (g.L⁻¹)

μ est le taux de croissance spécifique (j⁻¹) (et μ_m le taux de croissance maximal)

K_S est la constante de demi-saturation. Elle traduit l'affinité du microorganisme pour le substrat, et correspond à la valeur au-dessous de laquelle le taux de croissance devient très dépendant de S

- la phase de ralentissement (3) : le substrat commence à s'épuiser, avec disparition de un ou plusieurs éléments nécessaires, du fait de la concentration élevée en microorganismes, donc la croissance est freinée.
- la phase de stabilisation (4) : les microorganismes ont atteint leur pic de concentration (X_{max}), leur croissance s'arrête. Leur activité métabolique se poursuit et consomme les réserves intracellulaires. La multiplication d'une partie des cellules est compensée par la mortalité de l'autre partie.
- la phase de décroissance (5) : les réserves intracellulaires ne sont plus suffisantes, le taux de mortalité devient plus important que les réactions de synthèse de la biomasse.

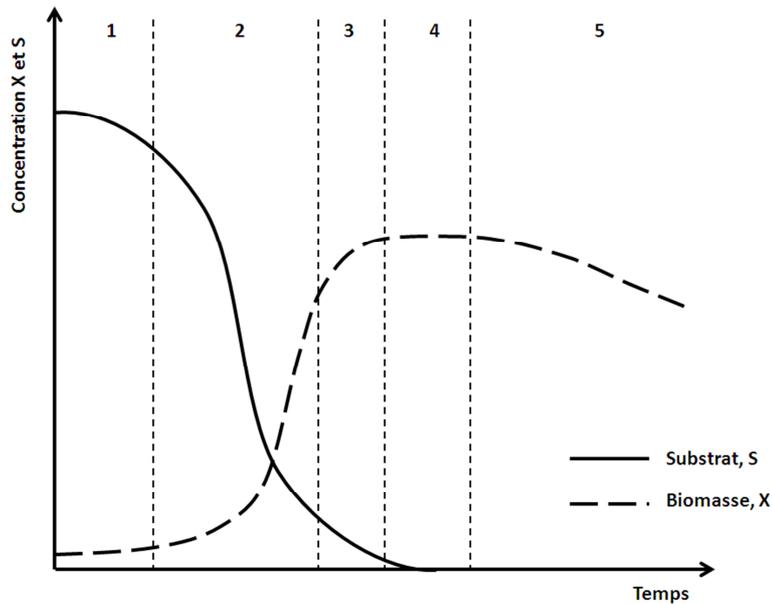


Figure 6 : Évolution de la concentration cellulaire en mode batch en fonction du temps (d'après Degrémont 2005)

En culture des microalgues, le fonctionnement en mode batch est toujours l'étape initiale. Puis, lorsque la croissance cellulaire se stabilise, le mode de fonctionnement peut éventuellement être basculé du batch vers le mode continu afin de maintenir l'activité cellulaire de la culture sur un terme plus ou moins important, et de récupérer les cellules pour les exploiter. Ce passage en mode de culture continu permet de stabiliser la culture à une concentration en biomasse souhaitée en ajustant correctement le débit d'alimentation Q ($L \cdot j^{-1}$). Le taux de dilution D (j^{-1}) du photobioréacteur (PBR) est alors la grandeur caractéristique de la culture cellulaire en mode continu :

$$D = \left[\frac{Q}{V_{\text{total réacteur}}}_{\text{continu}} \right] \quad (3)$$

Comme présenté précédemment, les microalgues sont des organismes du règne végétal. Leur survie nécessite, en plus d'un substrat adapté, d'un apport d'énergie lumineuse pour la bonne réalisation de la photosynthèse nécessaire à leur développement. Lors de ce processus (Équation 1), la consommation de CO_2 a tendance à augmenter le pH de la culture. Ainsi, pour maintenir le pH constant dans le photobioréacteur, une régulation est obligatoire. Elle peut être réalisée par exemple par injection de CO_2 gazeux, ce qui permet dans le même temps de réaliser l'apport de carbone, élément essentiel à la croissance de la microalgue et la régulation de pH.

Par ailleurs, un photobioréacteur (PBR) fonctionnant dans des conditions opératoires données (luminosité, carence) a une productivité maximale pour un taux de dilution D bien précis comme le montre schématiquement la figure suivante (Figure 7 a) [Pruvost *et al.* 2008; Cornet & Dussaps 2009; Pruvost *et al.* 2009; Pruvost *et al.* 2011a].

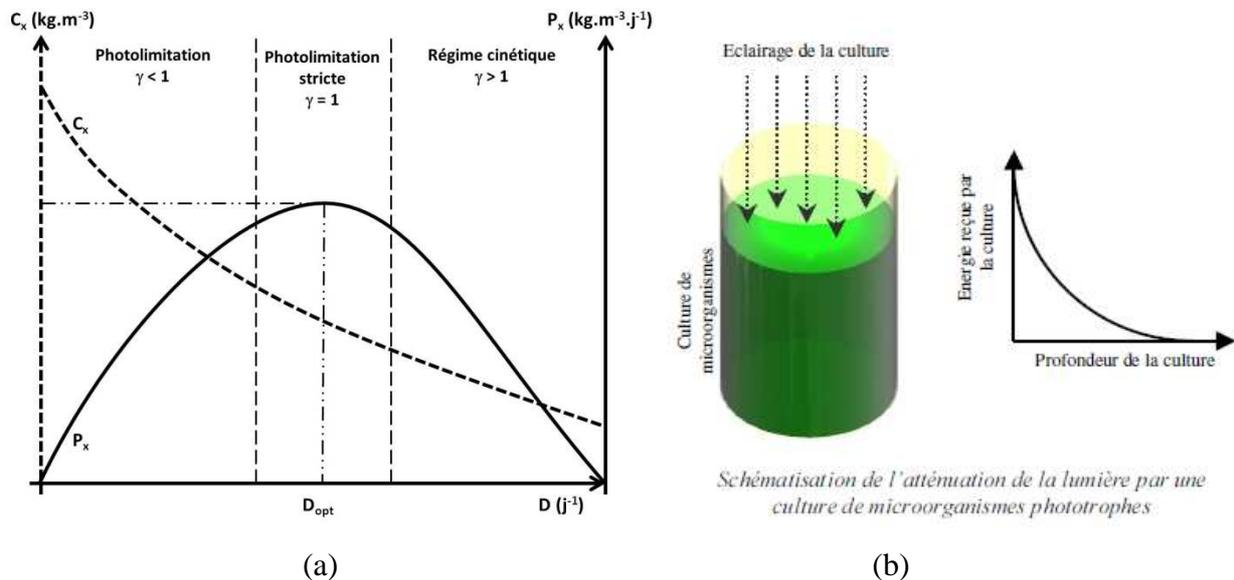


Figure 7 : Évolutions de la concentration de la biomasse (C_x) et de la productivité volumique (P_x) d'une culture continue d'une microalgue en fonction du taux de dilution D (a), et de la distribution de la lumière au sein d'une culture (b)

Le critère clef est ici l'éclairage de la culture (Figure 7 b) qui peut être caractérisé par le paramètre γ égal au rapport de la profondeur éclairée de la culture (mesurée par rapport à la face éclairée du PBR) à la profondeur totale du PBR. Selon le graphe ci-dessus, on peut constater que pour un taux de dilution trop faible par rapport à l'optimum, la concentration en cellules dans le PBR est élevée, et la culture n'est pas éclairée en totalité (régime de photolimitation, $\gamma < 1$), ce qui entraîne une perte de productivité par rapport à l'optimum. Au contraire, si le taux de dilution est trop élevé, la densité cellulaire est faible (pour un même éclairage) et une partie de la lumière traverse le PBR sans être absorbée par les cellules (régime cinétique, $\gamma > 1$). En outre, le fonctionnement du PBR est instable et il y a un risque de lessivage de la culture.

2.2.3. Les moyens de production de microalgues

Pour une exploitation industrielle, il faut produire des quantités importantes de microalgues et les deux principales méthodes de production à grande échelle sont les systèmes de culture en bassins ouverts et les systèmes clos de culture intensifiée (photobioréacteurs, ou PBR).

- Systèmes ouverts [Pruvost *et al.* 2011c]
 - o type champ de course (raceway) :

Le raceway est le système de culture en bassin ouvert de référence. Ce réacteur a une surface spécifique (surface éclairée / volume de culture = 1/épaisseur) de l'ordre de 3 à 5 $\text{m}^2.\text{m}^{-3}$ pour des volumes pouvant atteindre plusieurs centaines de m^3 . La concentration en biomasse algale dans ce type de réacteur est limitée à $0,5 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ (Figure 8).



Figure 8 : Exemple de réacteur ouvert de type champ de course (raceway)

(<http://www.biopondpaddlewheel.com/Ponds.html>)

L'avantage de ce type de réacteur est sa capacité à être rapidement opérationnel et productif. Les cultures y restent cependant difficilement contrôlables et dépendent de la concentration atmosphérique en CO_2 et de la luminosité naturelle. Le brassage y est médiocre et ils peuvent facilement être contaminés par des bactéries ou parasites. Des développements vers des technologies de raceway couvert/clos pour un meilleur contrôle sont en cours [Le Gouic 2013].

- o type plan :

Le ruissellement d'une culture sur un plan incliné, à écoulement en film de quelques mm d'épaisseurs, permet d'atteindre des surfaces spécifiques supérieures à $100 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$, et leurs fortes productivités (de l'ordre de $30 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{j}^{-1}.\text{m}^{-2}$) ont pu conduire à des concentrations comprises entre 20 et $40 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$.

- Systèmes fermés :

Il existe aujourd'hui différents PBR permettant la culture de microalgues, se différenciant généralement par leur taille et la surface spécifique qui en découle.

o Les réacteurs tubulaires :

Les colonnes à bulle (scobalite) ont une surface spécifique est de l'ordre du $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$, soit le même ordre de grandeur qu'un raceway. Ces photobioréacteurs présentent l'avantage d'être faciles à stériliser et de permettre une production de biomasse importante, mais la répartition de la lumière y est plutôt hétérogène. La concentration maximale dans ces réacteurs ne dépasse pas $2 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ [Chen *et al.* 2011]. Leur fonctionnement en semi-continu permet le soutirage d'un volume suffisamment important pour pouvoir l'utiliser comme un outil de production.



Figure 9 : Photobioréacteurs de type tubulaire (scobalite, monotubulaire, multitubulaire)

(<http://www.global-greenhouse-warming.com/biodiesel-from-algae.html>)

D'autres photobioréacteurs multitubulaires proposent des surfaces spécifiques pouvant dépasser $30 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$. Faciles à réaliser, utilisables en extérieur, ils forment des réseaux de tubes de faible diamètre, horizontaux, verticaux, obliques, coniques ou encore en forme de serpent, et assurent une bonne production de biomasse pouvant atteindre quelques $\text{g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ pour un faible coût. Cependant, des gradients de pH, de CO_2 et d' O_2 dissous peuvent apparaître dans les tubes, ainsi que des phénomènes de biofouling (formation de biofilms), affectant la productivité du système [Greenwell *et al.* 2010 ; Brennan & Owende, 2010].

Les systèmes fermés sont également plus coûteux à la construction et leur exploitation plus difficile, ce qui limite pour l'instant le nombre de systèmes commerciaux à grande échelle [Muñoz *et al.* 2006 ; Huntley & Redalje, 2007 ; Rodolfi *et al.* 2009].

- Les réacteurs de type airlift :

La surface spécifique est ici élevée, allant de quelques unités à plusieurs dizaines de $\text{m}^2.\text{m}^{-3}$, pour un volume réactionnel de quelques litres pour les pilotes de laboratoires et de plusieurs centaines de litres pour les modèles préindustriels. Ils sont utilisés dans les laboratoires de recherche pour cultiver de petits volumes dans lesquels les concentrations sont généralement limitées à quelques $\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ (Figure 10).

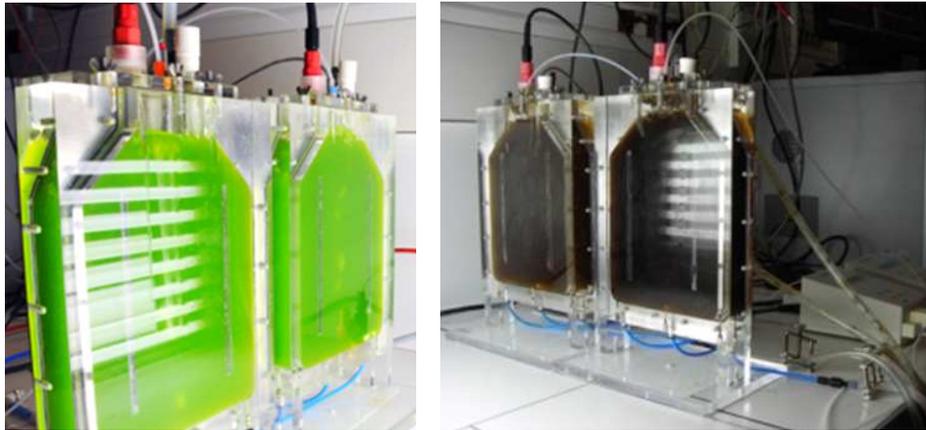


Figure 10 : Photobioréacteur de type Air-lift

- Autres types :

L'optimisation des cultures a poussé les chercheurs à mettre en place des réacteurs particuliers afin d'augmenter les surfaces spécifiques et permettre l'obtention de concentrations de plus en plus élevées. Des photobioréacteurs fermés à écoulement en film (Figure 11), de principes similaires à celui du réacteur ouvert de plan, ont permis d'atteindre des surfaces spécifiques supérieures de l'ordre de $470 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$. En fonctionnement sous lumière solaire, une forte productivité ($> 5 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{j}^{-1}.\text{m}^{-2}$) conduisant à des concentrations en biomasse supérieures à $10 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ y a été relevée [Le Borgne 2011 ; Pruvost *et al.* 2011b ; Pruvost *et al.* 2011c].



Figure 11 : Photobioréacteur à écoulement en film (AlgoFilm)

2.2.4. Présentation de *Chlorella vulgaris*

Plusieurs types de souches peuvent être étudiés pour la production de biocarburant. De plus, comme précisé auparavant, ce choix demeure crucial car du choix de la souche va dépendre l'ensemble des caractéristiques du procédé d'exploitation tant pour sa culture que pour les procédés aval. Notre choix s'est porté sur *Chlorella vulgaris*, microalgue régulièrement utilisée comme modèle d'étude au sein du laboratoire tant pour sa teneur élevée en lipides que pour sa facilité de culture (peu sensible aux perturbations extérieures de type contamination).

Chlorella vulgaris est une espèce d'algue verte d'eau douce unicellulaire microscopique autotrophe apparue il y a plus de deux milliards d'années. Elle a été identifiée en 1890 par M. W. Beyerinck [Beyerinck 1890]. Dans le cadre de cette thèse, la souche principalement utilisée fut celle de *Chlorella vulgaris* 211-19 SAG (Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany).

Elle est reconnue pour sa richesse en nutriments variés (vitamines, minéraux, phytonutriments...) et plus particulièrement pour ses teneurs élevées en chlorophylle et en fibres qui la rendent très utilisée dans les domaines des compléments alimentaires et des cosmétiques [Fulks & Main 1991; Benemann 1992; Coutteau & Sorgeloos 1992].

Malgré son rôle de microalgue modèle, elle a récemment été identifiée comme une candidate potentielle pour la production de biocarburant. Dans des conditions de culture appropriées, la teneur en lipides a pu être portée de 20 à 60 % avec une bonne productivité quotidienne [Mallick *et al.* 2011].

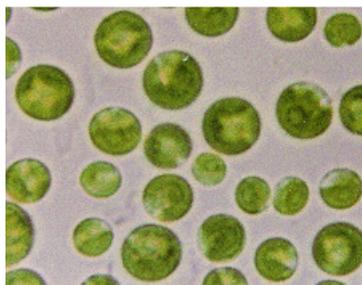


Figure 12 : *Chlorella vulgaris*

(<http://www.aquaportail.com/definition-4952-chlorelle.html>)

Morphologiquement, *Chlorella vulgaris* est sphérique et son diamètre est compris entre 2 et 10 μm (Figure 12). Ses compositions élémentaire et partielle sont données dans les tableaux suivants (Tableau 4 et Tableau 5).

Tableau 4 : Composition élémentaire de *Chlorella vulgaris* (d'après Hadj-Romdhane *et al.* 2012)

	Éléments								
	C	H	O	N	S	K	P	Ca	Mg
% massique	49,83	7,37	30,47	8,57	0,74	1,30	1,12	0,42	0,18
% molaire	29,33	52,07	13,45	4,33	0,16	0,30	0,20	0,12	0,03

Tableau 5 : Composition partielle de *Chlorella vulgaris* (d'après Becker 1994)

	Composés			
	Protéines	Carbohydrates	Lipides	Acide Nucléique
% massique	51-58	12-17	14-22	4-5

2.2.5. Les milieux de culture de *Chlorella vulgaris*

Le choix d'un milieu de culture particulier dépend des objectifs souhaités en fin de production. Plusieurs milieux de culture permettant la culture de *Chlorella vulgaris* ont pu être recensés dans la littérature (liste non exhaustive ci-dessous) et leurs compositions sont données en Annexe 1 :

- milieu de Kuhl [Kuhl & Lorensen 1964],
- milieu de Beneck [Wijanarko *et al.* 2006],
- milieu BG 11 [Allen & Stanier 1968 ; Stanier *et al.* 1971 ; Rippka *et al.* 1979],
- milieu Bristol [modification de la recette Bristol par Bold (1949)],
- milieu Bold's Basal BBM [Bold 1949 ; Bischoff & Bold 1963],
- milieu N8 et M8 [Mandalam *et al.* 1998]
- milieu Sueoka [Sueoka 1960]
- milieu WC [Guillard & Lorenzen 1972]
- milieu dit « High Assimilable Minimal Growth Medium » (HAMGM) [Hadj – Romdhane *et al.* 2012]

Les milieux dérivés des milieux SUEOKA et BBM sont régulièrement utilisés au laboratoire et leurs concentrations en nutriments permettent d'atteindre une concentration en biomasse de l'ordre de 1,7 g_{MS}.L⁻¹ en mode batch [Pruvost *et al.* 2011a ; Hadj-Romdhane *et al.* 2012]. Ce sont ces deux milieux qui seront utilisés au cours de ce travail.

2.3. L'extraction / fractionnement des molécules d'intérêt

L'extraction et le fractionnement consistent en tout post-traitement nécessaire pour libérer/extraire la (les) molécule(s) cible(s) visée(s), les fractionner et éventuellement les purifier. Il est par ailleurs de plus en plus convenu que la valorisation de plusieurs fractions issues de la culture microalgale (lipides, pigments, sucres...) est indispensable pour assurer une viabilité économique d'un procédé d'exploitation, c'est le principe du bioraffinage [Jubeau 2012 ; Li *et al.* 2008 ; Mussnug *et al.* 2010 ; Singh & Gu 2010 ; Vanthoor-Koopmans *et al.* 2013].

2.3.1. Les procédés d'extraction

De façon générale, les procédés d'extraction sont classifiés selon le degré de rupture cellulaire obtenu à l'issu du traitement :

- Extraction à travers la paroi cellulaire intacte : le procédé permet d'extraire les métabolites sans rompre la membrane cellulaire. C'est typiquement le cas de l'extraction par solvant.
- Perméation cellulaire : le procédé permet de perméabiliser la membrane cellulaire sans la rompre. Le contenu cellulaire peut rester au sein de la cellule, ce qui nécessitera un traitement complémentaire pour réaliser l'extraction. Parmi les technologies disponibles, peuvent être citées notamment les champs électriques pulsés ou les traitements enzymatiques.
- Déconstruction cellulaire : il s'agit de technologies permettant de rompre définitivement la membrane cellulaire et de libérer les différents compartiments cellulaires sans engendrer de mélange entre ces derniers. Elles pourraient ainsi permettre une libération sélective des métabolites. Les technologies pouvant être citées sont ici les ultrasons et le broyage à billes.
- Désintégration cellulaire : dans ce type de traitement, les cellules sont entièrement détruites et les énergies mises en jeu conduisent généralement à homogénéiser les fragments cellulaires ainsi que le contenu intracellulaire, rendant ces technologies peu sélectives. Peut être citée comme technologie de désintégration cellulaire, le broyeur (ou homogénéisateur) à haute pression (1000 à 2700 bar).

Il est bien évident que cette classification n'est pas unique. Le diagramme ci-dessous (Figure 13) permet de résumer les principales technologies pouvant être mises en œuvre selon leur principe de fonctionnement.

Le choix d'une technologie dépendra de ses performances, en termes d'efficacité de broyage (nombre de cellules broyées / nombre de cellules initiales), mais aussi du type de souche à traiter.

En prenant l'exemple de l'extraction d'huile à partir de microalgues pour des applications biocarburant, trois principes majeurs sont régulièrement cités dans la littérature [Harun *et al.* 2010 ; Rawat *et al.* 2013] :

- le pressage mécanique : particulièrement adapté aux huiles issues de plantes, il peut également être appliqué aux microalgues mais les contraintes sont plus importantes compte tenu de la nature des microalgues (type de souche, humidité...)
- l'extraction par solvant : elle requiert au préalable un séchage de la biomasse, mais c'est la voie d'extraction la plus souvent privilégiée. Différents solvants organiques de type n-hexane, chloroforme, benzène ou éthanol peuvent être utilisés. L'extraction par fluide supercritique est également évoquée.
- les ultrasons

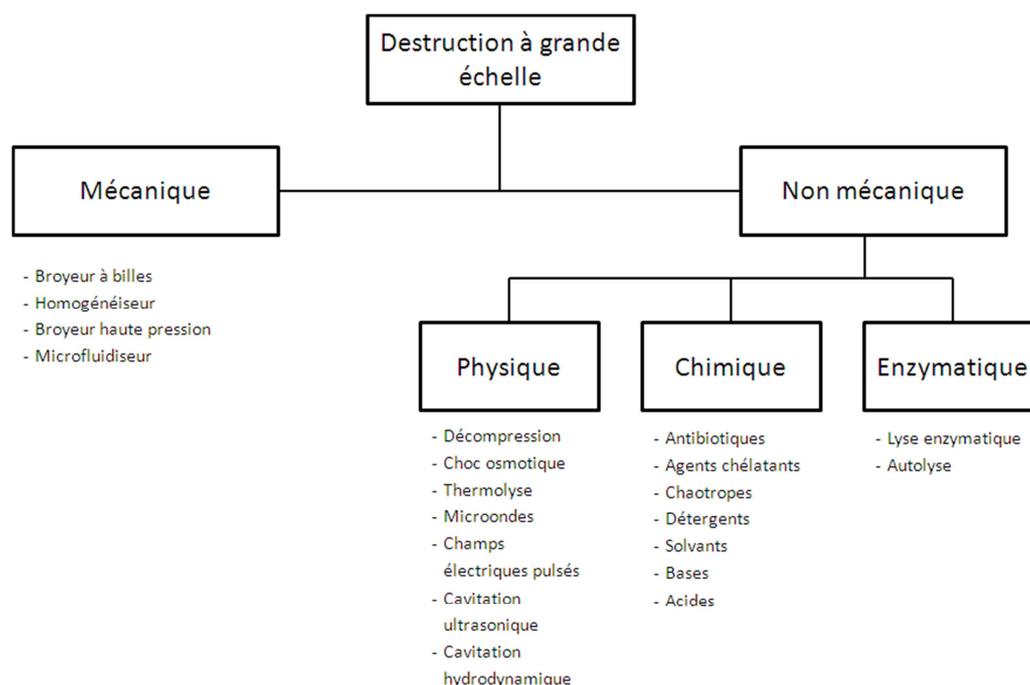


Figure 13 : Classification des différentes méthodes de destruction cellulaire [d'après Middelberg 1995 ; Geciova *et al.* 2002]

2.3.2. Les procédés de fractionnement-purification

L'objectif de ces étapes est de pouvoir faire un « tri » dans l'ensemble des métabolites ayant été libérés dans un premier temps, puis d'isoler au mieux le métabolite d'intérêt en éliminant les fractions non désirées. Compte tenu de la nature des métabolites cibles

(pigments, protéines, lipides...), les procédés de fractionnement – purification à mettre en œuvre sont extrêmement variés. Les procédés suivants peuvent être cités :

- Élimination de fragments cellulaires post-extraction : centrifugation, procédés à membranes...
- Purification des phycobiliprotéines (pigments) : chromatographie d'échange ionique, précipitation par modification de la salinité ou du pH, procédés à membranes, extraction par deux phases aqueuses non miscibles (généralement phase contenant un polymère + une phase contenant un sel tel que Polyéthylène Glycol + sels de phosphates ou de sulfates) [Jubeau 2012 ; Denis *et al.* 2009 ; Patil *et al.* 2008]...
- Séparation huile/eau post-désintégration : si la séparation par ultrasons ou la coagulation/floculation/flottation peuvent être envisagées, la coalescence par procédés à membranes est souvent mentionnée dans la littérature compte tenu de son efficacité et de ses coûts réduits [Daiminger *et al.* 1995 ; Hlavacek 1995 ; Kong *et al.* 1999 ; Hong *et al.* 2003]...

2.4. Le recyclage

Compte tenu du développement de la culture de microalgues, estimée à 10 000 tonnes.j⁻¹ [Jenck *et al.* 2011], et du fait que les systèmes de culture actuels conduisent au mieux à des concentrations de 10 – 20 g_{MS}.L⁻¹, des quantités importantes de milieux éliminés après récolte se doivent d'être traités pour limiter les consommations d'eau et de nutriments essentiels.

Les principaux éléments impactant la qualité du milieu de culture lors de son recyclage sont l'accumulation :

- de métabolites organiques exsudés par les cellules au cours de la culture en cas de carence provoquée [Granum *et al.* 2002], ou bien libérés lors des lyses cellulaires inhérentes aux conditions de culture. Ils peuvent conduire à une inhibition de la croissance cellulaire [Lívansky *et al.* 1996; Rodolfi *et al.* 2003].
- des contre-ions non consommés par les cellules microalgales (exemple Na⁺, Cl⁻...) engendrant une augmentation de la salinité.

Dans ces conditions Hadj-Romdahne *et al.* 2012 ont mis au point un milieu fortement assimilable (milieu HAMGM) dans lequel les contre-ions non (ou peu) consommés des nutriments sont remplacés en totalité (ou en partie) par des ions assimilables par la microalgue. Cela a ainsi permis de limiter l'accumulation progressive des contre-ions. Les

cations métalliques (K^+ , Na^+), en particulier, sont remplacés par des ions ammonium (NH_4^+) qui sont alors utilisés comme source d'azote. La productivité d'une culture de *Chlorella vulgaris* dans ce milieu et avec recyclage a été maintenue pendant 8 semaines en ne notant aucune accumulation significative d'ions. Toutefois, l'accumulation progressive de molécules organiques, notamment des polysaccharides, n'a pas pu être évitée et des signes de stress cellulaire ont fini par être observés.

2.5. La récolte

Dans l'estimation du coût d'exploitation des microalgues à grande échelle, selon la technologie employée et la concentration de la suspension d'algues souhaitée pour le post-traitement envisagé, les données de la littérature ont indiqué que le coût de récolte contribuerait à hauteur de 20 à 30% du coût global de la production de biocarburant [Gudin & Thepenier, 1986 ; Molina Grima *et al.* 2003 ; Benemann *et al.* 2010] et peut être même jusqu'à 50% du coût du produit final [Greenwell *et al.* 2010].

Dans tous les cas, la récolte de microalgues est une des étapes importantes dans la chaîne de production qui induit un coût global conséquent. L'optimisation de la chaîne de récolte est donc un enjeu essentiel. De nombreuses technologies sont possibles mais aucune ne semble se détacher pour devenir la meilleure méthode de récolte ou le meilleur couplage de procédés de récolte. Les procédés de récolte peuvent être classifiés selon le degré de concentration finale en sortie (Figure 14) ou bien, selon leur consommation énergétique (Figure 15). Il est à noter que le séchage n'apparaît sur la Figure 15 car sa consommation est ici hors échelle.

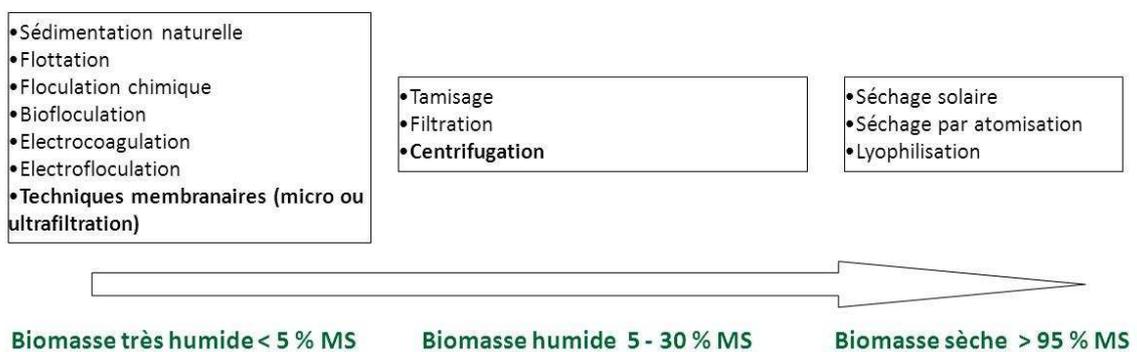


Figure 14 : Classification des procédés de récolte en fonction de la concentration de biomasse en sortie [d'après Uduman *et al.* 2010a]

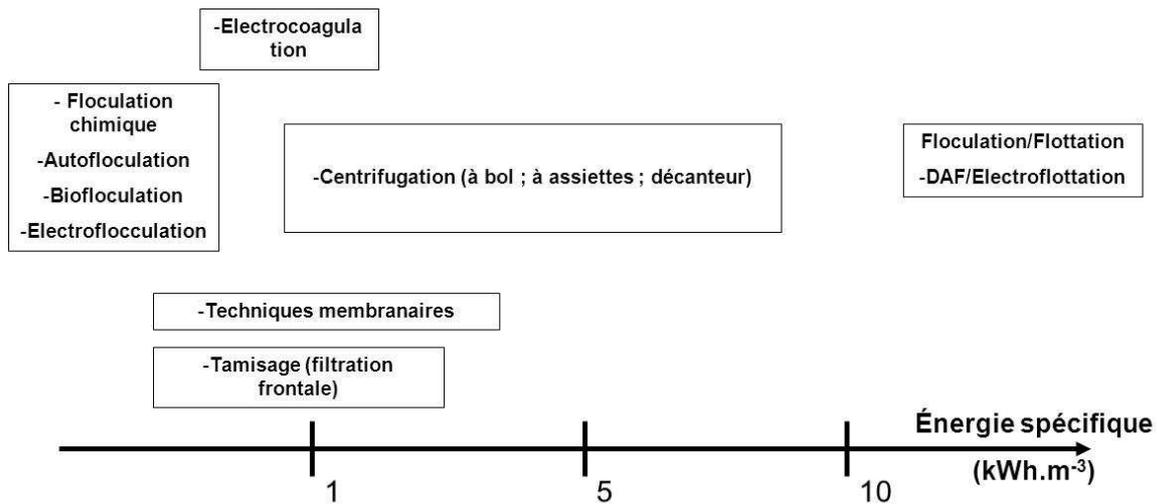


Figure 15 : Classification des procédés de récolte en fonction de leur consommation énergétique [d'après Uduman *et al.* 2010a]

2.5.1. La centrifugation, procédé de récolte de référence

La centrifugation est la méthode la plus courante pour la récolte des microalgues. Elle est applicable à une grande variété d'espèces [Price *et al.* 1976; Benemann *et al.* 1980 ; Mohn 1980]. Selon Molina Grima *et al.* 2003, malgré sa forte consommation énergétique, la centrifugation demeure le procédé de référence de par sa rapidité et son efficacité pour la récupération des cellules microalgales. Bien que ce procédé soit particulièrement efficace pour tous les types de cellules (taille, forme, mobilité ...), il demeure trop gourmand en terme de consommation énergétique pour les applications de type biocarburant.

Son principe est basé sur le remplacement de l'accélération de la pesanteur g par une accélération centrifuge supérieure, correspondant au produit $r \omega^2$ du rayon et de la vitesse angulaire de rotation au carré. Le « nombre de g » obtenu est alors égal à $r \omega^2/g$. En remplaçant g par $r \omega^2$ dans la loi de Stokes, on obtient l'expression de la vitesse de sédimentation des particules :

$$v_c = \frac{\Delta\rho \cdot d^2}{18 \cdot \mu} (r \cdot \omega^2) \quad (4)$$

Avec : $\Delta\rho$, différence de la masse volumique des particules solides et de celle du liquide ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

ω , vitesse de rotation ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$)

r , la distance du centre de rotation au centre de gravité de la particule (m)

μ , viscosité de la suspension (Pa.s)

d , diamètre des particules à séparer (m).

Plusieurs équipements peuvent être rencontrés pour la récolte de microorganismes :

- La centrifugeuse à bol (Figure 16) : tournant avec une accélération de l'ordre du millier de g (1000 – 2000 g), les cellules retenues dans le bol sont évacuées manuellement ou par l'intermédiaire de couteaux racleurs tandis que la phase liquide est évacuée par surverse via une sucette d'aspiration. Le bol plein peut également être remplacé par un bol perforé (filtration centrifuge type «essoreuse à salade») permettant ainsi des débits de traitements plus importants mais, en contrepartie, des niveaux de siccité moindres (jusqu'à 40 % MS pour le bol plein, contre un peu plus de 5% MS pour les bols perforés). Les consommations énergétiques restent voisines de 0,6 à 2 kWh.m⁻³).

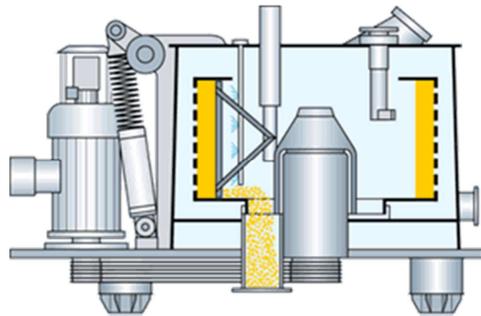


Figure 16 : Schéma de principe de la centrifugeuse à bol plein / perforé

- La centrifugeuse à assiettes (Figure 17) : ce type de centrifugeuse est le plus courant. Les accélérations γ sont très importantes (7000 – 12000 g) permettant une efficacité de séparation très élevée, pour des débits de traitements également importants (jusqu'à 100 m³.h⁻¹). Cependant la consommation énergétique va de pair avec la vitesse de rotation (0,7 à 6 kWh.m⁻³).

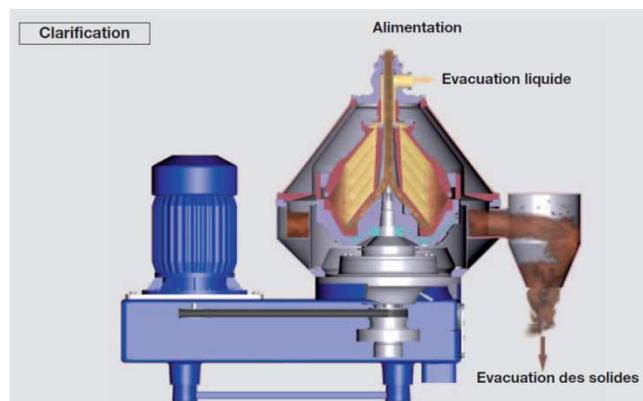


Figure 17: Schéma de principe de la centrifugeuse à assiettes

- Le décanteur centrifuge (Figure 18): c'est une technologie similaire à celle utilisée pour le traitement des boues d'épuration. Cette technologie est efficace pour des vitesses modérées (1000 – 3000 g) à la condition d'alimenter l'appareil avec une suspension déjà préconcentrée (1% MS soit $\sim 10 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$). Elle est cependant tout autant énergivore que le séparateur à assiettes (0,5 à 8 $\text{kWh}.\text{m}^{-3}$). D'après un fournisseur, la technologie permet actuellement une utilisation en couplage avec une phase de préconcentration peu énergivore (Flottation à air dissous DAF + décanteur centrifuge) [Flottweg, communication personnelle, 2011]

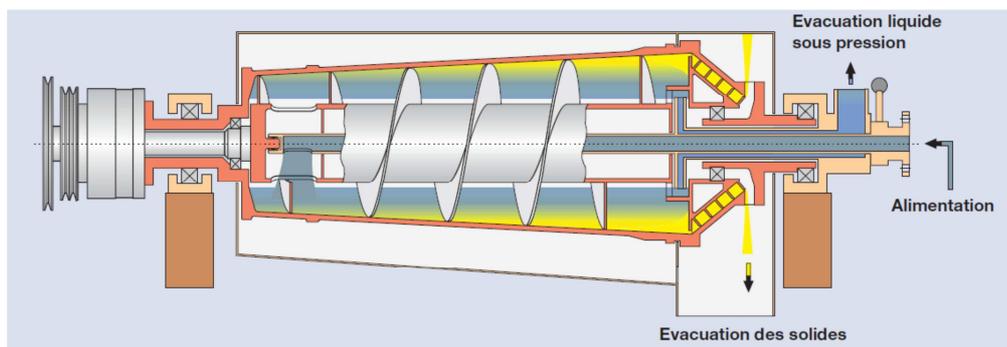


Figure 18: Schéma de principe du décanteur centrifuge

2.5.2. Coagulation / Flocculation

La coagulation a pour objectif de déstabiliser la suspension microalgale, qui se comporte comme une suspension colloïdale. La stabilité des cellules en suspension peut être rompue par l'ajout de réactifs chimiques appropriés qui réduisent ou éliminent les forces de répulsion entre cellules en neutralisant les charges de surface. Les particules déstabilisées sont ensuite mises en contact par une agitation mécanique extérieure, les collisions favorisant ainsi la formation de microflocs. Les cellules ainsi déstabilisées vont favoriser la formation de d'agrégats ou flocs.

Afin de neutraliser cette charge de surface négative, des composés chargés positivement sont introduits dans la solution et forment une couche autour du colloïde. Le comportement peut être expliqué par la théorie de la double couche de Stern (1924). Une première couche d'ions positifs, attirés par les charges négatives, se lie à la surface de la particule. Cette couche est dite couche liée. À ce stade, la structure électrique de la particule se modifie, d'autres ions viennent alors se lier, plus faiblement, générant une seconde couche dite diffuse (Figure 19). La charge globale de la particule (ou cellule) conditionne alors le potentiel électrique existant dans le plan de glissement (cisaillement) séparant la couche liée

et de la couche diffuse. Ce potentiel électrique est appelé potentiel zêta (ζ) et est très généralement négatif (charge globale négative de la particule ou cellule), ce qui est également le cas de très nombreuses souches microalgues [Henderson *et al.* 2008]. L'intérêt du potentiel zêta est qu'il peut être mesuré expérimentalement. Pour déstabiliser une suspension colloïdale, il est considéré que l'annulation du potentiel zêta doit être réalisée de manière à annuler les forces répulsives entre les particules.

La coagulation a pour objectif de déstabiliser une suspension colloïdale et de former des microflocs.

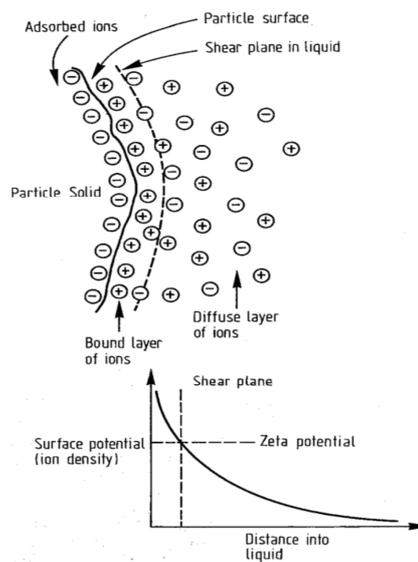


Figure 19 : Théorie de la double couche [d'après Rushton *et al.* 1996]

2.5.2.1. Flocculation chimique

Afin d'accroître l'efficacité du phénomène, un processus de formation de floccs volumineux est recherché, c'est la flocculation. Elle consiste à agglomérer les microflocs issus de la déstabilisation (coagulation) par pontage avec de longues chaînes polymériques naturelles ou synthétiques (Figure 20).

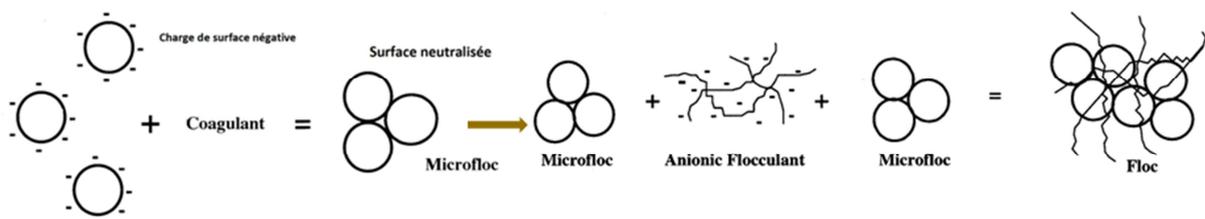


Figure 20 : Processus de coagulation / flocculation

Un bon nombre de coagulants commerciaux fréquemment utilisées dans les procédés de traitement des eaux ont d'ores et déjà été testés pour la coagulation de microalgues [Golueke & Oswald 1965], ainsi que des chaînes polymériques naturelles (amidon, chitosan...) ou synthétiques (polyacrylamide...) [Divakaram & Pillai 2002]. Toutefois, ces utilisations ont montré certaines limites, puisque ces composés peuvent s'avérer coûteux et peuvent se retrouver dans la biomasse ainsi récoltée et la contaminer [Uduman *et al.* 2010b]. En outre, le processus nécessite une bonne maîtrise et est très dépendant des conditions opératoires (pH, force ionique...) [Bilanovic *et al.* 1988].

Les tableaux suivants recensent les utilisations de coagulants et de flocculants pour la récolte de microalgues mentionnées dans la littérature :

Tableau 6 : Liste des coagulants chimiques utilisés pour la récolte de microalgues

Coagulants	Souches cibles	Dosage (mg/L)*	Références
FeCl ₃	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorococcum sp.</i>	25 - 50	de Godos <i>et al.</i> 2010
Fe ₂ (SO ₄) ₃ FeSO ₄	<i>Chlorella minutissima</i>	500 – 750	Papazi <i>et al.</i> 2010
AlCl ₃	<i>Chlorella minutissima</i>	500	Papazi <i>et al.</i> 2010
AlCl ₃ -APTES	<i>Chlorella sp. KR-1</i>	1000	Lee <i>et al.</i> 2013
Al ₂ (SO ₄) ₃	<i>Chlorella minutissima</i>	750	Papazi <i>et al.</i> 2010
KAl(SO ₄) ₂	<i>Scenedesmus Sp.</i>	160	Lavoie <i>et al.</i> 1984
Chaux (CaO ou Ca(OH) ₂)	<i>Chaetoceros calcitrans et</i> <i>Skeletonema costatum</i>	100	Millamena <i>et al.</i> 1990

* dosage pour une efficacité d'élimination supérieure à 90% évaluée par mesure de densité optique (longueur d'onde variable selon les études) sur le surnageant

Tableau 7 : Liste des flocculants utilisés pour la récolte de microalgues

Flocculants	Souches cibles	Dosage (mg/L)*	Remarques	Références
Amidon	<i>Parachlorella kessleri</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Nannochloropsis salina</i>	30	Amidon non conçu initialement pour la récolte de microalgues	Vandamme <i>et al.</i> 2010
Chitosan	<i>Spirulina</i> <i>Scillatoria</i> ,	1000	Cellules demeurent intactes et vivantes	Divakaran et Pillai 2002
	<i>Chlorella</i>	0 – 300	Teneur croissante de la paroi cellulaire en polysaccharides améliore l'efficacité	Cheng <i>et al.</i> 2011
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	10 mg / g _{MS}	Réduction de volume 20 à 50	Xu <i>et al.</i> 2013
	<i>Chlorella sp.</i>	10	Efficacité max si t _{mélange} > 20 min	Ahmad <i>et al.</i> 2011
	<i>Skeletonema costatum</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Thalassiosira nordenskoldii</i> <i>Chlorella sp.</i> <i>Thalassionela sp.</i>	80 45 20 - 40 40 90	pH ajusté à < 7 : faciliter l'action du flocculant réduire les charges de surface puis pH > 8 : favoriser l'action flocculante	Morales <i>et al.</i> 1985
Polymère cationique	<i>Chlorococcum sp.</i>	3-4	Efficacité liée aux conditions de pH et de température	Uduman <i>et al.</i> 2010b
Gomme de guar cationique	<i>Chlorella sp.</i> <i>Chlamydomonas sp.</i>	40 100	Faible dosage n'interfère pas sur la qualité de la biomasse	Banerjee <i>et al.</i> 2013
Magnafloc®		500	Rapide et peu onéreuse	Harith <i>et al.</i> 2009
Nitrate sulfate d'aluminium	<i>Nannochloropsis salina</i>	108	Floculation après préconcentration à 20 g _{MS} .L ⁻¹ Complexes d'aluminium a priori moins onéreux à grande échelle	Rwehumbiza <i>et al.</i> 2012

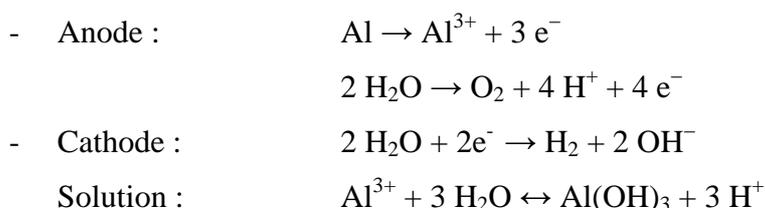
Poly (γ -glutamic) acid	<i>Chlorella protothecoides</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	20	Zheng <i>et al.</i> 2012
---------------------------------	--	----	--------------------------

* dosage pour une efficacité d'élimination supérieure à 90% évaluée par mesure de densité optique (longueur d'onde variable selon les études) sur le surnageant

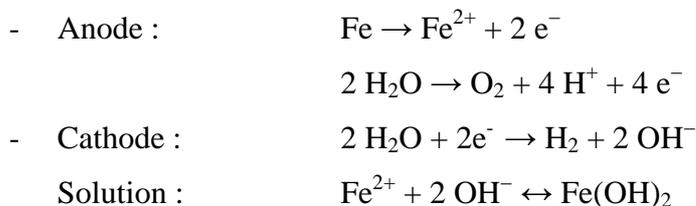
2.5.2.2. Électrocoagulation / électrofloculation

L'électrocoagulation implique les mêmes mécanismes de déstabilisation que la coagulation, à la différence que l'agent coagulant est issu de la dégradation d'électrodes métalliques, fer ou aluminium, parcourues par un courant électrique qui libère des ions métalliques par oxydo-réduction. L'intensité du courant est le levier pour libérer plus ou moins d'ions métalliques (chargés positivement). De nombreuses applications ont pu être recensées par Emamjomeh & Sivakumar (2009). Les efficacités obtenues sont du même ordre de grandeur que lors d'une coagulation chimique.

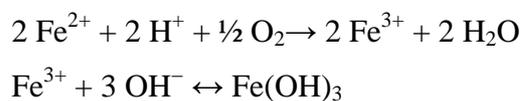
Lorsque l'aluminium est utilisé comme matériau d'électrode, les réactions mises en jeu sont les suivantes :



Lorsque le fer est utilisé comme matériau d'électrode :



En présence d'oxygène dissous dans la solution, la réaction devient:



Selon Bukhari (2008) et Mollah *et al.* (2004), le processus comporte trois étapes :

- Formation des agents coagulants en raison de la dissolution de l'anode réactive. Dans le cas du fer ou de l'aluminium, les ions s'hydrolysent immédiatement pour former des hydroxydes métalliques.
- Déstabilisation des particules ou de la suspension colloïdale

- Agrégation de la suspension déstabilisée et formation de floccs de particules.

Les recherches actuelles suggèrent que l'électrocoagulation peut être un procédé de traitement efficace [Alfajara *et al.* 2002]. Cependant, les facteurs suivants peuvent être un obstacle au développement de ce type de traitement :

- sa consommation énergétique (jusqu'à 2 kWh.kg⁻¹ de biomasse *Chlorella vulgaris* [Vandamme *et al.* 2011])
- le contrôle de la quantité de métaux libérés
- le remplacement fréquent des électrodes

Une fois encore, de nombreuses études ont été réalisées pour appliquer cette technologie à la récolte de microalgues et les performances sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Performances de l'électrocoagulation / électrofloculation appliquée à la récolte de microalgues

Souches cibles	Efficacité	Consommation énergétique, kWh.m ⁻³	Références
n.d.	99,5%	137,5	Azarian <i>et al.</i> 2007
<i>Microcystis aeruginosa</i>	100	0,29 – 0,6	Gao <i>et al.</i> 2010
<i>Coelosphaerium</i> sp. <i>Aphanizomenon</i> sp. <i>Closterium</i> sp. <i>Pediastrum</i> sp. <i>Cryptomonas</i> sp. <i>Staurastrum</i> sp. <i>Asterionella</i> sp. <i>Cyclotella</i> sp. <i>Melosira</i> sp.	95%	0,3	Poelman <i>et al.</i> 1997
<i>Chlorococcum</i> sp.	98%	0,31 kWh/kg	Uduman <i>et al.</i> 2011
<i>Tetraselmis</i> sp.	99%	0,54 kWh/kg	
<i>Chlorella vulgaris</i>	95%	2,1 kWh/kg	Vandamme <i>et al.</i> 2011
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	80%	0,2 kWh/kg	
<i>Botryococcus braunii</i>	93,6%	n.c.	Xu <i>et al.</i> 2010

n.d. : non défini

n.c. : non communiqué

Efficacité d'élimination évaluée par mesure de densité optique (longueur d'onde variable selon les études) sur le surnageant

2.5.2.3. Biofloculation

La biofloculation est un procédé de floculation engendré par l'action de microorganismes et/ou de leurs produits SPE (Substances Polymériques Extracellulaires microbiennes) généralement en co-culture avec les cellules microalgales. Ces microorganismes peuvent être des bactéries, voire même des champignons. Plusieurs modes d'action ont pu être retenus :

- Les cellules microalgales génèrent des SPE chargées négativement qui contribuent à leur stabilité en suspension, et dont des microorganismes se nourrissent conduisant à une déstabilisation des cellules qui peuvent alors flocculer ; ou bien ces SPE sont chargés positivement et neutralisent la charge de surface négative portée par les cellules [Salehizadeh & Shojaosadati 2001].
- Les microorganismes génèrent eux-mêmes des exsudats polymériques jouant un rôle flocculant par génération de ponts entre les cellules [Lee *et al.* 2009]
- On peut associer en co-culture une souche microalgale non flocculante et une souche flocculante, dans le cas où les deux souches disposent des caractéristiques proches en terme d'applications (deux souches produisant des lipides pour des applications biodiesels par exemple) [Salim *et al.* 2011].

Ces SPE, constituées de polysaccharides ou de protéines cellulaires, ont été identifiées comme l'une des principales composantes des bioflocs et biofilms. Oh *et al.* (2001) ont montré le rôle important des bactéries mises en jeu dans le processus de production des bioflocculants. Seuls, ces bioflocculants microbiens peuvent avoir des efficacités supérieures aux coagulants et/ou flocculants généraux tels que les sels d'aluminium et les polyacrylamides. Cette efficacité peut également être accrue par l'ajout d'un composé coagulant pouvant conduire à des efficacités d'élimination de l'ordre de 95 % tout en conservant un surnageant de qualité recyclable [Kim *et al.* 2011].

Tableau 9 : Performances de la bioflocculation appliquée à la récolte de microalgues

Souches cibles	Efficacité	Bioflocculant	Remarques	Références
<i>Chlorella vulgaris</i>	83%	<i>Paenibacillus</i> sp. AM49	Pas de toxicité Nécessité d'un coagulant pour obtenir une efficacité > 90%	Oh <i>et al.</i> 2001
<i>Scenedesmus</i> sp.	95%	<i>P. polymyxa</i> AM49	Nécessité d'un coagulant (FeCl ₃)	Kim <i>et al.</i> 2011
<i>Pleurochrysis carterae</i>	90%	Culture microbienne	La disparition de la source carbonée conduit à la synthèse de SPE flocculants Pas d'ions métalliques requis. Pas d'augmentation d'efficacité si augmentation de la teneur en source carbonée.	Lee <i>et al.</i> 2009
<i>Pleurochrysis carterae</i>	90%	Culture microbienne	Consommation énergétique de 0,9kWh/ton	Lee <i>et al.</i> 2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	43-94%	<i>Flavobacterium</i> <i>Terrimonas</i> <i>Sphingobacterium</i>	Efficacité accrue avec coagulant (FeCl ₃ et CaCl ₂) et pH élevé Flocculation quasi nulle si élimination du pool bactérien	Lee <i>et al.</i> 2013b
<i>Chlorella vulgaris</i> (211-11b) <i>Scenedesmus obliquus</i> (276-3a)	46 %	<i>A. falcatus</i> , <i>S. obliquus</i> , <i>T. suecica</i>	Culture commune de souche microalgale Nécessité des sédimentations dans plusieurs temps	Salim <i>et al.</i> 2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	93%	<i>Aspergillus oryzae</i>	Quantité de l'inoculum fongique et	Zhou <i>et al.</i> 2013

			pH ont des rôles clés	
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	90 %	<i>Solibacillus silvestris</i> W01	Aucun ion métallique additionnel requis Pas d'effet lié à la température Biofloculant recyclage	Wan <i>et al.</i> 2013

Efficacité d'élimination évaluée par mesure de densité optique (longueur d'onde variable selon les études) sur le surnageant

2.5.2.4. Flottation

Si la floculation n'agit que sur le diamètre d'un ensemble de cellules, la flottation, technologie également issu du traitement des eaux, va également agir sur la différence de masse volumique par l'adsorption de bulles de gaz à la surface des cellules, les ramenant ainsi vers la surface. Elle serait particulièrement efficace sur des souches dont la nature font qu'elles peuvent être susceptibles de flotter naturellement [Bruton *et al.* 2009] de par la génération / libération d'oxygène liée à la photosynthèse ou leur concentration en lipides (composés plus légers que l'eau).

La littérature recense 3 modes de mise en œuvre [Uduman *et al.* 2010a] :

- la flottation à l'air dissous (DAF = Dissolved Air Flotation), réalisée par application de la loi de Henry (la concentration en gaz dissous augmente avec la pression). Ainsi par pressurisation puis détente d'une partie de l'eau traitée, une libération de microbulles d'air (10-100 μm) est générée. C'est la technique la plus courante.
- la flottation à l'air dispersé (DiAF = Dispersed Air Flotation), où les microbulles sont générées par une injection d'air et une forte agitation (700-1500 μm).
- l'électroflottation, issue de l'électrolyse de l'eau via l'emploi d'anodes et de cathodes en métal inactif (pas de libération de composés métalliques). Elle peut être associée généralement à une électrocoagulation permettant ainsi de disposer d'une électrode assurant deux applications : la libération de cations métalliques pour la coagulation et l'électrolyse de l'eau pour la flottation.

En flottation à l'air dissous ou air dispersé, les performances sont globalement bonnes et similaires (efficacité de séparation supérieure à 95 %). Des vitesses ascensionnelles de 70 à 420 m.h^{-1} (en fonction du coagulant et/ou floculant étudié) ont pu être observées [Lee *et al.* 1992]. Toutefois, dans la grande majorité des cas, l'utilisation de coagulants/floculants est indispensable [Lee *et al.* 1992 ; Chen *et al.* 1998]. En termes de consommation énergétique, le coût lié à la compression est prédominant et peut conduire jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10 – 20 kWh.m^{-3} pour la DAF.

En électrocoagulation-flottation, les performances sont également prometteuses, allant jusqu'à 100 % d'élimination avec des consommations bien inférieures à celles évoquées pour

la DAF, de l'ordre $0,4 \text{ kWh.m}^{-3}$ [Gao *et al.* 2010] Qui plus est, cette technologie semble mieux adaptée aux espèces marines qu'aux espèces d'eau douce [Uduman *et al.* 2010a].

Tableau 10 : Performances de l'électroflottation / flottation à l'air dissous (DAF) / flottation à l'air dispersé (DiAF) appliquée à la récolte de microalgues

Souches cibles	Efficacité	Remarques	Références
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	90%	DiAF ; Utilisation de flocculant requise	Chen <i>et al.</i> 1998
<i>Chlorella vulgaris</i>	98%	Suivi d'une flottation à l'ozone dispersé	Cheng <i>et al.</i> 2010
<i>Dunaliella salina</i>	94%	Nécessité d'un coagulant: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	Hanotu <i>et al.</i> 2012
<i>Spirulina platensis</i>	80%	Ajout NaCl pour augmenter l'efficacité	Kim <i>et al.</i> 2005
<i>Chlorella sp.</i>	88%	Importance du pH sur l'efficacité	Levin <i>et al.</i> 1961
<i>Chlorella et Scenedemus</i>	80%	Nécessité d'un coagulant / flocculant	Wiley <i>et al.</i> 2009

Efficacité d'élimination évaluée par mesure de densité optique (longueur d'onde variable selon les études) sur le surnageant

2.5.2.5. Flocculation naturelle / autoflocculation

Certaines conditions opératoires peuvent entraîner la flocculation naturelle de microalgues sans aucune intervention ou du moins, limitée. Ainsi, trois phénomènes ont pu être observés :

- L'autoflocculation : les cellules s'agrègent d'elles – même à pH modéré sans précipitation de sels du milieu de culture et dont les mécanismes impliqués demeurent non identifiés [Dupré *et al.* 1995].
- La flocculation naturelle engendrée par les exopolymères (*cf.* bioflocculation) : les travaux de Tenney *et al.* 1973 ont montré que la synthèse de matière organique extracellulaire (exopolysaccharides), sur de courtes périodes de croissance, et avec un faible ratio de la concentration en nutriments rapportée à la concentration massique de microalgues (carence légère en nutriments), pouvait conduire à la formation de ponts entre les cellules, à la flocculation de ces dernières et à leur sédimentation.
- La flocculation induite par le pH : l'augmentation du pH dans le milieu de culture, qu'elle soit artificielle ou naturelle, engendre des modifications de la solubilité des sels présents et leur précipitation entraînant celle des cellules microalgales [Sukenic & Shelef 1984 ; Ayoub *et al.* 1986].

Dans notre étude, c'est essentiellement ce dernier type de flocculation qui va retenir notre attention. La flocculation naturelle par la lente élévation naturelle du pH associée à la photosynthèse est connue depuis plusieurs décennies [Sukenic & Shelef 1984]. Elle peut être observée, dans des conditions favorables, lorsque la croissance microalgale s'effectue sans

apport de CO₂, conduisant dès lors à une augmentation du pH qui peut faire atteindre la limite de solubilité de certains sels. Selon la composition du milieu de culture, la floculation naturelle par augmentation du pH a été associée à la précipitation de composés de calcium, principalement des phosphates ou des carbonates, ou bien de composés magnésiens tels que l'hydroxyde de magnésium. Dans ces conditions, avec un taux de récupération supérieur à 80%, la concentration maximale des cellules est généralement de l'ordre de 20 g_{MS}.L⁻¹ et parfois jusqu'à 30 à 35 g_{MS}.L⁻¹ [Sukenik & Shelef 1984; Ayoub *et al.* 1986; Wu *et al.* 2012; Vandamme *et al.* 2012; Smith & Davis 2012]. Les mécanismes invoqués comprennent la neutralisation des charges de surface négatives des cellules par des précipités chargés positivement, la floculation par entraînement (« sweep flocculation ») et les effets de lestage (« weighting effects »).

Le Tableau 11 ci-dessous présente quelques composés susceptibles d'être impliqués dans les précipitations induites par l'augmentation du pH. On peut rappeler que plus le produit de solubilité est faible, moins le composé est soluble dans l'eau. Sa valeur est également fortement dépendante de la température.

Tableau 11 : Composés susceptibles d'être impliqués dans la floculation induite par le pH (produit de solubilité dans l'eau)

Composés	Formule chimique	K _s *	Température (°C)	Références
Dihydrogénophosphate de calcium	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	10 ^{-3.6}	25	Bushinsky <i>et al.</i> 2000 Moore J.W. 2010
Hydrogénophosphate de calcium	CaHPO ₄	10 ^{-6.9}	25	Chow <i>et al.</i> 2001
Phosphate tricalcique	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10 ^{-25.2}	25	Junginger <i>et al.</i> 2010 Moore J.W. 2010
Hydroxyapatite	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	10 ⁻³⁶	25	Diaz <i>et al.</i> 1994 Wopenka <i>et al.</i> 2005
Céramique de phosphate de calcium	Ca ₃ (PO ₄) ₂ .CaO	10 ⁻³⁸	25	Chow <i>et al.</i> 2001 Predoi <i>et al.</i> 2008
Hydroxyde de calcium	Ca(OH) ₂	10 ⁻⁶	25	Sillen & Martell 1964
Carbonate de calcium	CaCO ₃	10 ⁻⁹	24	Moore <i>et al.</i> 1985
Phosphate de magnésium monobasique	Mg(H ₂ PO ₄) ₂	3.10 ⁻⁷	25	Zemel <i>et al.</i> 1990
Phosphate de magnésium dibasique	MgHPO ₄	2.10 ⁻⁶	25	Abrams <i>et al.</i> 2013 Türker & Çelen 2010
Phosphate de magnésium tribasique	Mg ₃ (PO ₄) ₂	10 ⁻²⁴	25	Lee <i>et al.</i> 2007
Struvite	MgNH ₄ PO ₄ .6 H ₂ O	10 ⁻¹⁰ – 10 ^{-13.3}	25	Çelen & Türker 2001 Moore J.W. 2010
Magnésite	MgCO ₃	10 ⁻⁸	25	Tzanakis <i>et al.</i> 2008
Artinite	Mg ₂ (CO ₃)(OH) ₂ .3 H ₂ O	10 ⁻³	19	Livingston <i>et al.</i> 1987
Hydro(xy)magnésite	Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ .4 H ₂ O	10 ⁻⁵	25	Botha <i>et al.</i> 2001
Brucite / Hydroxyde de magnésium	Mg(OH) ₂	2.10 ⁻¹³	25	Lee <i>et al.</i> 2009b

*K_s : produit de solubilité (sans dimension)

Les principes de base régissant la coagulation des particules colloïdales par des hydroxydes métalliques de métal trivalent Al³⁺ ou Fe³⁺ consécutifs à leur hydrolyse sont assez

bien compris, même si certaines incertitudes demeurent concernant les mécanismes [Duan & Gregory, 2003]. Bien que certaines caractéristiques soient probablement spécifiques des métaux trivalents (comme par exemple, la formation de polymères chargés de type $Al_n(OH)_p^{(3n-p)}$ générés dans les stades préliminaires de la précipitation de l'hydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$), ce contexte offre probablement une compréhension globale de la déstabilisation des suspensions colloïdales par l'hydroxyde de magnésium $Mg(OH)_2$.

À faible dose de coagulant, la neutralisation de charges est suffisante pour déstabiliser des suspensions colloïdales. Le dosage de coagulant optimal est celui qui conduit à une valeur du potentiel zêta des particules colloïdales proche de zéro, et cette dose optimale ne peut pas être dépassée, sous peine de voir la charge superficielle des cellules s'inverser et la suspension microalgale redevenir stable. On suppose que la neutralisation des charges de surface peut résulter de l'adsorption d'ions métalliques (Al^{3+}) ou d'espèces cationiques hydrolysées telles que $Al(OH)^{2+}$, connues pour s'adsorber plus fortement sur les charges de surface négatives. Cependant, à pH neutre (pour l'aluminium), toutes ces sous-espèces sont présentes en faibles concentrations et la forme dominante est l'ion aluminate $Al(OH)_4^-$ qui est chargé négativement. Dans ce cas, les espèces neutralisantes sont probablement des particules colloïdales d'hydroxyde qui sont chargées positivement à un pH inférieur au point isoélectrique (pI) de l'hydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$, dont la valeur est de l'ordre de 8 à 9. En effet, même si la solubilité d' $Al(OH)_3$ n'est pas atteinte, une sorte de précipitation de surface peut se produire et générer une couche d'hydroxyde amorphe autour de la surface de la particule colloïdale. La neutralisation de charges pourrait également résulter du dépôt de particules colloïdales déjà formées dans la suspension initiale (hétérocoagulation). La neutralisation de composés chargés négativement ne peut alors être réalisée que pour des valeurs de pH inférieures au point isoélectrique (pI) de l'hydroxyde précipitant (pour lesquels les particules restent chargées positivement). Ce n'est pas un problème quand une suspension de microalgues est déstabilisée par la précipitation de l'hydroxyde de magnésium $Mg(OH)_2$ puisque que son pI est supérieur à 11,5 (différentes valeurs ont été rapportées dans la littérature: 11,5 [Li & Somasundaran 1991]; 11,9 [Liu *et al.* 2008], 12,4 [Parcs 1967]; il est reconnu par ailleurs que le pI varie en fonction des conditions de précipitation et des anions présents, et peut-être aussi avec l'âge du précipité comme Luo *et al.* (2004) l'ont rapporté avec un pI autour de pH 10 pour de l'hydroxyde de magnésium âgé).

Si le dosage de coagulant est plus élevé, la déstabilisation des suspensions colloïdales se fait par un mécanisme différent. L'hydroxyde métallique peut précipiter en grandes quantités dans la suspension si le pH est suffisamment élevé ou éventuellement à la surface

des particules, en produisant des floccs qui peuvent entraîner les particules de la suspension (floculation par entraînement, « sweep flocculation »). L'efficacité de la floculation par entraînement pour l'élimination des particules est beaucoup plus élevée que celle uniquement liée à la neutralisation des charges (en contrepartie, elle implique une quantité d'ions beaucoup plus importante). En effet, les floccs obtenus sont assez larges et offrent une structure ouverte, permettant à une faible quantité d'hydroxyde précipitant d'entraîner une grande quantité de particules. Smith & Davis (2012) ont d'ailleurs suspecté que la floculation de microalgues par des composés magnésiens issue de l'augmentation du pH commence par une neutralisation de la charge avant de se poursuivre par la précipitation d'hydroxyde de magnésium $Mg(OH)_2$, tendant ainsi vers une floculation par entraînement.

La floculation des microalgues peut également être obtenue par la précipitation du carbonate ou de phosphates de calcium lorsque les concentrations en ions correspondant dans le milieu de culture sont assez élevées [Sukenic & Shelef 1984 ; Ayoub *et al.* 1986]. Par rapport à la floculation issue d'une coagulation consécutive à l'hydrolyse des sels de magnésium, les précipitations se produisent à des valeurs de pH modérées, typiquement 8,5 - 9,0 pour le phosphate de calcium et 9,1 – 9,5 pour le carbonate de calcium, mais avec des efficacités d'élimination par sédimentation moindres [Smith & Davis 2012 ; Schlesinger *et al.* 2012]. Les principaux mécanismes présentés précédemment ont également été proposés (neutralisation de charges par les composés de phosphate de calcium chargés positivement, floculation par entraînement et effets de lestage) par Sukenic & Shelef (1984). Les effets de lestage sont liés au dépôt d'un précipité dense sur la surface des particules qui agit comme un agent lestant en augmentant la masse volumique apparente des cellules, conduisant ainsi à leur décantation [Leentvar & Rebhun 1982 ; Semerjian & Ayoub 2003 ; Smith & Davis 2012]. Dans le cas où des polymères chimiques ou des biopolymères (tels que exopolysaccharides) sont impliqués, des effets de pontage (génération de « liens » entre les cellules) peuvent également se produire [Lertsutthiwong *et al.* 2009 ; Uduman *et al.* 2010a ; Schlesinger *et al.* 2012].

D'un point de vue opérationnel, les taux de décantation et la résistance des floccs, ainsi que la consommation des ions, sont d'une grande importance d'un point de vue économique. Ils peuvent avoir un grand impact sur les dépenses d'investissement (CAPEX) et/ou de fonctionnement (OPEX). La consommation en ions est grandement liée à la composition du milieu de culture. En se basant sur les travaux de Folkman & Wachs (1973) sur la floculation de microalgues par addition de chaux en présence de magnésium, Smith & Davis (2012) ont montré que le dosage molaire de magnésium pour la floculation est similaire à celui des

cations trivalents (Al^{3+} ou Fe^{3+}). En outre, les coûts des phosphates augmentant en raison de la diminution des réserves mondiales, la précipitation par des composés contenant des phosphates pour les cultures à grande échelle pourrait rapidement devenir non viable économiquement [Vandamme *et al.* 2013]. Toutefois, cette consommation serait difficile à éviter car le milieu doit contenir des ions phosphates PO_4^{3-} et calcium Ca^{2+} comme apports de nutriments pour les cellules microalgales et parce que ces composés précipitent à des niveaux de pH plus faibles que ceux rencontrés lors de la précipitation de $Mg(OH)_2$.

Tableau 12 : Performances de la floculation par remontée naturelle ou artificielle du pH

Souches cibles	Remontée du pH	Efficacité ; Concentration finale	Remarques	Références
<i>Chlorella</i> sp. <i>Synechocystis</i> sp.	9 – 11,5 (NaOH)	80% >95%	Au pH de 10,5 et 5 – 10% eau de mer Au pH de 11 et 10 – 15% eau de mer	Ayoub <i>et al.</i> 1986
<i>Skeletonema costatum</i>	10,2 (NaOH)	$2,8 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{ms}}^{-1}$	<i>Skeletonema costatum</i> cultivée en eau de mer enrichie	Blanchemain et Grizeau 1999
<i>Scenedesmus obliquus</i> et <i>Chlorella vulgaris</i>	10 – 12 (NaOH et $Ca(OH)_2$)	92%	Réduction d'efficacité importante en présence d'exopolysaccharides	Castrillo <i>et al.</i> 2013
n.d.	11,5 (NaOH)	95%, 20 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$	Viable si l'eau de mer est utilisée comme source de magnésium	Elmaleh <i>et al.</i> 1991
<i>Dunaliella tertiofecta</i>	8,6 – 10,5 (NaOH)	90%	Floculation observée entre pH 8.6 et 10.5 Surnageant réutilisable par simple neutralisation à l'acide	Horiuchi <i>et al.</i> 2003
<i>Scenedesmus obliquus</i>	> 11 (NaOH)	80%	Concentration ionique initiale et/ou production d'exopolymères durant la culture insuffisante pour provoquer la floculation. L'ajout de calcium rend la biomasse récoltée impropre aux finalités d'alimentation animale.	Lavoie et de la Noüe, 1987
<i>Chlorella vulgaris</i>	9,5 (solution alcaline)	40%	Deux étages d'agrégation pendant 4 jours	Malis-Arad <i>et al.</i> 1980
n.d.	11,5 (solution alcaline)	99%	Magnésium apporté par l'intermédiaire de 10 à 15% d'eau de mer	Semerjian and Ayoub 2003
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	9,7 – 10,25 (NaOH)	89%	Concentrations Mg^{2+} et Ca^{2+} élevées (souche marine) À pH > 10.25, efficacité à 0.	Sirin <i>et al.</i> 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	10,5 (NaOH)	>90%	Souche resuspendue en milieu enrichi en Mg^{2+}	Smith et Davis 2012
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10,8 (naturelle par régulation de CO_2)	85%	Montée du pH : par addition de NaOH, ou bullage N_2 (coût supplémentaire)	Spilling <i>et al.</i> 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,3 (NaOH)	70%		
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8,9	96%	Milieu de culture enrichi en $CaCl_2$ et $MgSO_4$	Sukenik <i>et al.</i> 1984
<i>Chlorella vulgaris</i>	11 11,5 – 12 (NaOH)	75% 95%	EDTA diminue l'efficacité de la floculation	Vandamme <i>et al.</i> 2012
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Chlorococcum</i> sp <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	>10,5 (NaOH)	>90%	Procédé peu énergivore Soude peu coûteuse et non contaminante pour le milieu de culture.	Wu <i>et al.</i> 2012

n.d. : non défini

De façon générale, la plupart des études citées en référence dans les exemples précédents sont réalisées en simulant l'augmentation du pH par l'ajout d'une base (NaOH, Ca(OH)₂...), mais peu d'entre elles évaluent la possibilité d'une élévation du pH sans ajout de solution alcaline, ni les performances de l'opération dans ces conditions précises (temps d'élévation du pH, performances obtenues telles que vitesse de sédimentation ou concentration finale en biomasse...). Les performances actuelles, qu'elles soient obtenues par la montée naturelle ou artificielle du pH, sont résumées dans le Tableau 12.

2.5.3. Filtration et séparation membranaire

La centrifugation et les technologies de coagulation/floculation reposent sur une séparation gravitaire basée sur la loi de Stokes. La récolte de microorganismes peut aussi se réaliser par une séparation d'exclusion stérique dont la loi de base est la loi de Darcy :

$$Q_v = \frac{\Delta P}{\mu \cdot (R_s + R_g)} \quad (5)$$

Où Q_v : densité de flux volumique (débit surfacique) de filtration ($m^3 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, ou $m \cdot s^{-1}$)

ΔP : différence de pression appliquée (Pa)

μ : viscosité de la phase liquide (Pa.s)

R_s et R_g : résistance spécifique du support et du gâteau de filtration (m^{-1})

Un media filtrant (milieu poreux type sable, tamis, membranes semi-perméables...) permet de retenir les particules en suspension et de laisser passer la phase liquide à travers.

On peut distinguer :

- la filtration par gravité : le mélange est soumis uniquement à la pression atmosphérique. Le liquide passe à travers le support filtrant, tandis que le solide est récupéré sur le support filtrant,
- la filtration par surpression : la suspension arrive sous pression dans le filtre,
- la filtration sous vide : le mélange est soumis d'un côté du filtre à la pression atmosphérique, et de l'autre côté, où sort le filtrat, à une dépression réalisée grâce à une pompe à vide.

2.5.3.1. Filtration sur support

Afin de distinguer filtration et séparation membranaire, nous considérerons que la filtration est une séparation dont le seuil de coupure (taille des pores) permettant la séparation est supérieur au micromètre.

Dans le domaine de la filtration sur support, la filtration sur lit de sable a montré une certaine efficacité de rétention de microalgues lors du pré-traitement d'eau de mer en présence de blooms algaux (Plantier *et al.* 2013). Cependant, elle ne semble pas pouvoir être appliquée à la récolte de microalgues puisque la rétention est à la fois dépendante de la concentration initiale en cellule et du temps, et limitée à des cellules de taille relativement élevée ($> 20 \mu\text{m}$).

Ainsi, la filtration sur support se limite au tamisage de cellules dont la taille est supérieure à $40 \mu\text{m}$. Le procédé demeure relativement simple et ne fait appel qu'à l'exploitation de toiles tamis pour réaliser la séparation sous de faibles gradients de pression (légère surpression ou mise sous vide) à l'aide de tables d'égouttage ou de tambours rotatifs (Figure 21). Toutefois, afin de maintenir les débits de filtration, il est nécessaire de mettre en œuvre un raclage du gâteau pour limiter l'accroissement dans le temps de la résistance spécifique du gâteau (Équation 5). Il peut être également nécessaire de prévoir une pré-couche filtrante pour améliorer l'opération [Gudin & Thepenier 1986]. En terme de performances, il semble possible d'atteindre des concentrations en matières sèches de l'ordre de 50 à $300 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ (~ 5 à 30% MS) pour des coûts énergétiques compris entre 0,3 et $2 \text{ kWh} \cdot \text{m}^{-3}$ [Molina Grima *et al.* 2003]

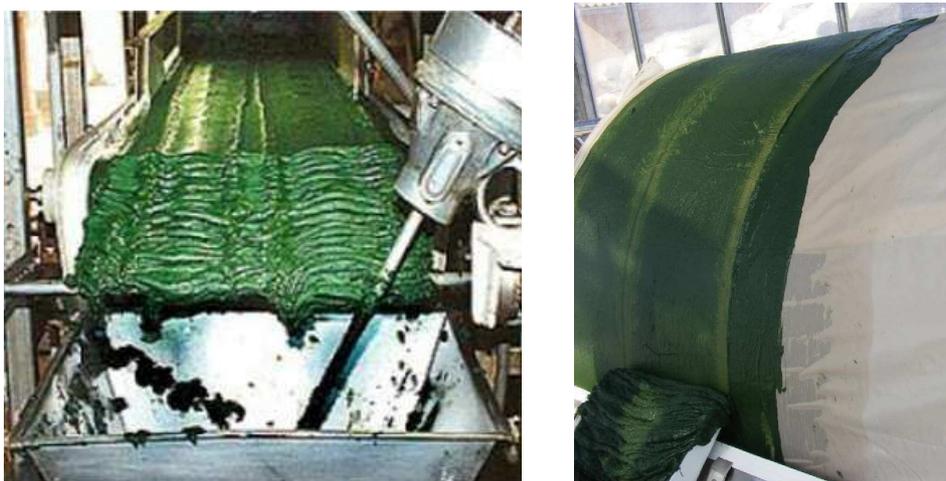


Figure 21 : Filtration de cellules microalgales par filtration sur support

2.5.3.2. Séparation par membrane

Contrairement au cas précédent, la séparation membranaire concerne des médias filtrants dont le seuil de coupure sera inférieur au micromètre.

Les procédés à membranes sont utilisés essentiellement pour séparer des molécules ou des espèces ioniques en solution : c'est le cas de l'ultrafiltration, de la nanofiltration, de l'osmose inverse ou de l'électrodialyse. Toutefois, ils peuvent également permettre la séparation des particules ou des micro-organismes en suspension dans un liquide, par l'utilisation de membranes de microfiltration (taille de pores légèrement inférieure au micromètre).

Ces procédés sont basés sur la mise en œuvre de membranes semi-perméables. Une membrane semi-perméable est une barrière mince permettant, sous l'effet d'une force agissante, le passage de certaines substances entre les deux milieux qu'elle sépare et la rétention d'autres (Figure 22). Les substances en question peuvent être des ions, des molécules ou des particules, ou encore le solvant. Les substances arrêtées constituent une phase appelée rétentat (concentrat), tandis que la phase ayant traversée la membrane est appelée perméat (filtrat).

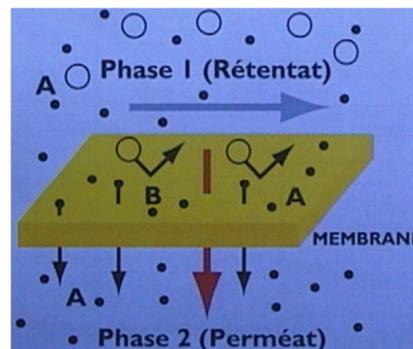


Figure 22 : Membrane semi-perméable

La force agissante peut-être :

- Un gradient de pression : osmose inverse (OI), ultrafiltration (UF), microfiltration (MF), perméation gazeuse (PG), pervaporation (PV)
- Un gradient de potentiel électrique : électrodialyse (ED)
- Un gradient de concentration : dialyse (D)

2.5.3.2.1. Paramètres caractéristiques

Les critères de sélection dépendent des caractéristiques des substances à séparer et de celles de la membrane (dimensions, forme, nature chimique, état physique, charge électrique...) ainsi que des conditions hydrodynamiques de travail. Suivant ces caractéristiques, le transfert sélectif des espèces repose soit sur leur capacité à diffuser à travers le matériau membranaire, soit sur leur taille par rapport à celle des pores de la

membrane (effets tamis), soit sur une exclusion ionique (effet électrique ou effet de Donnan entre espèces et membrane disposant de charges électriques opposées), ou encore sur les différences de solvation de certains solutés, ionisés en particulier, entre la solution et dans les pores (effets diélectriques). Une combinaison de ces différents mécanismes n'est évidemment pas exclue.

Généralement, les membranes de microfiltration sont caractérisées par la taille de leurs pores (ex : μm). En ultrafiltration et en nanofiltration, on utilise la notion de seuil de coupure (SC) défini par la masse de la plus petite molécule ou ion retenu à 90 % (ou 95 %) par la membrane dans des conditions normalisées (le SC s'exprime en Dalton = g/mol). En osmose inverse et en nanofiltration, les membranes sont caractérisées par la rétention en certains sels (NaCl, CaCl₂ ...).

Il existe deux types de perturbations possibles des procédés membranaires :

- le colmatage réversible :

Les phénomènes « limitants » réversibles sont essentiellement dus au dépôt de matière et au phénomène de polarisation de concentration. Les entités présentes dans la solution à filtrer sont entraînées sous l'action de la force motrice au voisinage de la membrane où se développe un gradient de concentration. L'équilibre entre le flux de convection qui provoque l'accumulation de matière à la surface de la membrane et le flux de rétrodiffusion des entités de la membrane vers la veine liquide est nommé phénomène de « polarisation de concentration ».

- le colmatage irréversible :

Le colmatage irréversible (*i.e.* qui nécessite de procéder à un nettoyage chimique ou mécanique de la membrane pour être éliminé) résulte de phénomènes de natures diverses modifiant les propriétés filtrantes de la membrane :

- Physico-chimique : adsorption, sous l'effet d'interactions entre certains constituants du fluide et le matériau membranaire ; gélification, agrégation, insolubilisation qui peuvent provenir de modifications physico-chimiques locales (concentration, pH, force ionique) à l'interface fluide – membrane.
- Mécanique : dépôt de particules, blocage des pores. Dans ce cas, les couches déposées peuvent être déstabilisées par la mise en œuvre d'écoulements secondaires (filtration dynamique, promoteurs de turbulence, écoulement de Dean,...) ou instationnaires (débits pulsés, jets intermittents, ...) qui induisent des variations significatives de la contrainte de cisaillement à la membrane.

2.5.3.2.2. Bases théoriques de la filtration et modèles usuels

La densité de flux volumique de perméat (J) instantanée à la température T , souvent appelé simplement flux de perméat, est exprimée en m.s^{-1} ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}.\text{m}^2$ ou plus régulièrement en $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) et est défini comme le débit de perméat (Q_p) par unité de surface de filtration de la membrane (S_f), soit :

$$J = \frac{Q_p}{S_f} \quad (6)$$

La perméabilité (L_p) d'une membrane est définie comme étant le rapport entre le flux de perméat et la pression transmembranaire (PTM). Cette perméabilité est également l'inverse du produit de la viscosité dynamique (μ) et de la résistance intrinsèque de la membrane étudiée (R_m).

$$L_p = \frac{J}{\text{PTM}} = \frac{1}{\mu \cdot R_m} \quad (7)$$

Avec L_p , perméabilité exprimée en $\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ (ou $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$)

μ , viscosité dynamique du fluide en Pa.s

R_m , résistance intrinsèque de la membrane en m^{-1}

La PTM moyenne sur la longueur de la membrane est en général calculée selon l'Équation 8 :

$$\text{PTM} = \frac{P_e + P_s}{2} - P_f \quad (8)$$

Avec P_e, P_s , les pressions en entrée et en sortie de module côté rétentat (Pa ou bar)

P_f la pression côté perméat (Pa ou bar), supposée constante

Jusqu'à présent, il a été admis que la pression osmotique $\Delta\pi$ due à la concentration de solutés et inversement proportionnelle à leur poids moléculaire était négligeable. Cette pression osmotique s'écrit sous la forme suivante pour un soluté unique :

$$\Delta\pi = i \cdot R \cdot T \cdot \Delta C \quad (9)$$

où R est la constante molaire des gaz parfaits ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$),

T la température absolue (K),

i, nombre de particules par entité formulaire

ΔC la différence de concentration du soluté (en mol.m^{-3}) de part et d'autre de la membrane.

Lorsque le fluide à filtrer contient des solutés de faibles poids moléculaires et que ces derniers s'accumulent à la membrane de par leur rétention totale ou partielle, la pression osmotique de part et d'autre de la membrane devient non négligeable. Elle agit alors comme une véritable contre-pression et diminue la pression transmembranaire efficace. Cette diminution s'accroît au cours d'une filtration en mode batch puisque $\Delta\pi$ est une fonction croissante de ΔC .

Afin de tenir compte de cette pression osmotique, certains auteurs [Cheryan 1986, Clifton *et al.* 1984, Aïmar 1987] l'introduisent dans l'Équation 7 :

$$J = \frac{PTM - \Delta\pi}{\mu \cdot R_m} \quad (10)$$

Si au cours de la filtration des résistances additionnelles liées au colmatage réversible (R_r) ou irréversible (R_{ir}) apparaissent, l'équation doit être modifiée de la façon suivante (modèle des résistances en série):

$$J = \frac{PTM - \Delta\pi}{\mu \cdot (R_m + R_r + R_{ir})} \quad (11)$$

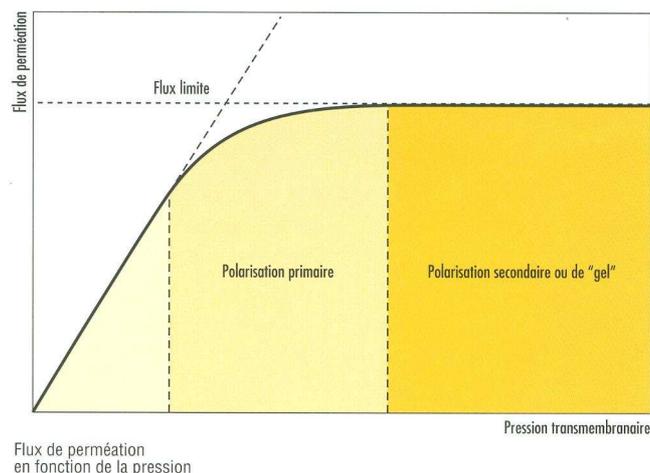


Figure 23 : Polarisation de concentration

Lors de la séparation de mélanges homogènes, et du fait de la perméation du solvant, il s'établit dans la couche limite au voisinage de la membrane un gradient de concentration du

soluté retenu. Ce phénomène de polarisation de concentration est souvent à l'origine de la limitation du flux de perméat. Ainsi le flux de perméat J n'est plus proportionnel à la pression transmembranaire appliquée lorsque ce phénomène se produit. Lorsque le colmatage irréversible se met en place, le flux peut même devenir indépendant de la pression transmembranaire PTM à partir d'une certaine valeur de la pression (Figure 23).

La première interprétation proposée pour rendre compte de ce phénomène repose sur le modèle du film, encore appelé « théorie du gel » [Blatt *et al.* 1970].

Le profil de concentration C du soluté au voisinage de la membrane peut-être représenté par la Figure 24.

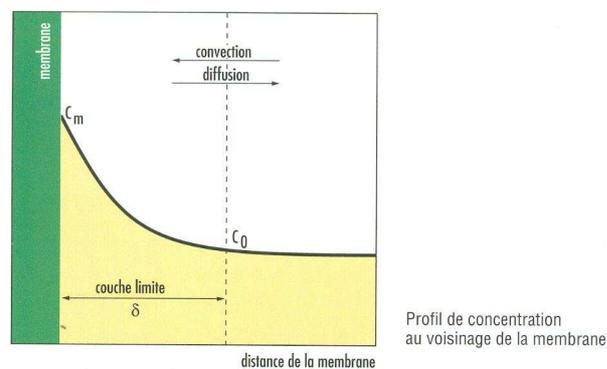


Figure 24 : Profil de concentration au voisinage de la membrane

Le soluté près de la membrane rétrodiffuse au sein de la solution. Cependant, le coefficient de diffusion D en phase liquide est très faible, et la concentration C_m au voisinage de la membrane est généralement plus élevée que la concentration au sein du fluide (C_0). En outre, C_m augmente avec la pression appliquée. Elle peut ainsi atteindre la limite de solubilité des macromolécules et un gel peut se former. Ce gel agit comme une seconde membrane qui crée une résistance additionnelle au flux transmembranaire. On parle alors de polarisation secondaire ou de polarisation de gel. Une augmentation supplémentaire de la pression au-dessus de la membrane ne fera qu'accroître l'épaisseur de la couche de gel sans avoir d'influence sur le débit de perméat.

En régime stationnaire, on peut écrire le bilan suivant :

$$(J.C) - (D \cdot \frac{dC}{dx}) = J.C_p \quad (12)$$

où $C(x)$ est la concentration en soluté à une côte x à l'intérieur de la couche limite de transfert de matière. Si on considère l'épaisseur de la couche limite δ et si on admet que le coefficient

de diffusion D est constant, l'intégration de l'équation précédente sur l'épaisseur de la couche limite donne :

$$J = \frac{D}{\delta} \cdot \ln \frac{C_m - C_p}{C_o - C_p} \quad (13)$$

où C_o , C_m et C_p représentent les concentrations en soluté, respectivement au sein de la solution, à la paroi et dans le perméat, et D/δ le coefficient de transfert de masse k du soluté.

Si C_p est très faible devant C_o et C_m , et si par ailleurs il se forme un gel ($C_m = C_g$), la relation devient [Michaels 1968] :

$$J_{\text{lim}} = k \cdot \ln \frac{C_g}{C_o} \quad (14)$$

Si k est constant, la valeur du flux limite dépend de C_o et la courbe $J_{\text{lim}} = f(\ln C_o)$ est une droite dont la pente est égale au coefficient de transfert de matière à travers la membrane. L'abscisse du point obtenu par extrapolation à l'origine correspond à C_g .

Les valeurs du coefficient k peuvent par ailleurs être exprimées en fonction des paramètres physico-chimiques de la solution (viscosité dynamique μ , coefficient de diffusion D ...) et des paramètres hydrodynamiques du système (diamètre hydraulique d_h , vitesse de circulation tangentielle u ...).

Le coefficient k est d'autant plus élevé que le nombre de Reynolds et le cisaillement à la membrane sont élevés. L'augmentation de la vitesse tangentielle de circulation aura donc pour effet, en augmentant k et en limitant l'accumulation de soluté dans la couche limite, d'améliorer le transfert du solvant à travers la membrane. On peut également améliorer le transfert en plaçant parallèlement à la membrane des promoteurs de turbulence. Par ailleurs, l'élévation de la température, lorsque la nature du produit à traiter et la tenue des membranes le permettent, réduit la viscosité du solvant et a également un effet bénéfique sur le flux de perméation.

2.5.3.2.3. *Présentation des différents procédés*

On peut classer sommairement les différents procédés de séparation par membrane en fonction de la force qui provoque le transfert de matière à travers la membrane et en fonction de la taille des substances que l'on cherche à séparer [Huchon, Mietton-Peuchot, Quéméneur, 1987].

- La microfiltration

Cette technique se distingue essentiellement des autres par la nature des espèces à arrêter : on traite en effet des suspensions au lieu de solutions. La taille des particules arrêtées se situe généralement entre 0,2 et 10 μm .

Les applications principales concernent la clarification et la stérilisation des eaux et des liquides alimentaires et biologiques.

- L'ultrafiltration

L'ultrafiltration permet de concentrer des solutions macromoléculaires en ne laissant passer à travers la membrane que le solvant et les solutés de faible masse molaire. La pression appliquée en amont de la membrane est de l'ordre de 1 à 10 bars.

Les principales applications industrielles sont la concentration des protéines de lactosérum et de lait, la séparation d'émulsions eau – huile, le traitement de bains de peinture par électrophorèse.

- La nanofiltration et l'osmose inverse

La nanofiltration permet de séparer les ions monovalents et les solutés organiques neutres de petite taille (< 200-300 Da environ) des ions multivalents et des composants organiques de taille plus élevée. La séparation des solutés chargés ne se fait pas sur le seul critère de taille mais aussi en fonction de leur charge. Les mécanismes de la séparation solvant / soluté sont basés sur des interactions de type stérique, ionique ou diélectrique entre la membrane et le soluté d'une part, et entre les solutés d'autres part.

Enfin, l'osmose inverse met en œuvre des membranes denses semi-perméables pour concentrer les petites molécules organiques et les ions monovalents. Seul le solvant passe librement à travers la membrane, les ions et petites molécules étant au moins partiellement retenus, leur transfert s'effectuant par un mécanisme de solubilisation-diffusion. La séparation nécessite d'appliquer une pression suffisante, supérieure à la différence de pression osmotique créée de part et d'autre de la membrane par la rétention des solutés.

Ces techniques n'étant pas utilisées dans ce travail, nous ne les présenterons pas davantage.

2.5.3.2.4. La séparation membranaire appliquée à la récolte de microalgue

Le GEPEA a une expérience déjà longue dans le domaine de la récolte de microalgues par des procédés membranaires de micro- ou ultrafiltration, puisque les premiers travaux remontent à la fin des années 1980.

Pour la filtration tangentielle, il existe plusieurs types de membranes permettant la séparation des microalgues. En premier lieu, compte tenu de la taille des cellules (1 à quelques μm pour les plus petites), la microfiltration semble a priori la plus appropriée. Cependant, plusieurs auteurs ont mis en évidence des chutes de flux importantes lors de la microfiltration de microalgues entre le flux initial et le flux stabilisé à recyclage total : 75 %, de 600 à 140 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ pour une membrane de 0,1 μm en Polyfluorure de Vinylidène (PVDF) [Rossignol *et al.* 1999] ; 75 et 80 % pour une membrane de 0,22 μm de même nature [Hung *et al.* 2006]. Cette perte de flux est souvent caractéristique de la microfiltration, la membrane subissant un colmatage lié au bouchage mécanique des pores. Les travaux de Danquah *et al.* (2009) ont également mis en évidence sur une membrane de 0,22 μm (Pellicon 2) qu'il était préférable de réaliser la récolte lors des phases de croissance modérée, notamment en cas de souches ayant des propriétés coalescentes (culture conjointe de *Tetraselmis suecica* / *Chlorococum* sp.) afin de favoriser le soutirage de l'eau et atteindre des concentrations plus élevées (passage de 25 à 56 $\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$) malgré des flux restant faibles à 20 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

Rossignol *et al.* (1999) et Rossi *et al.* (2004) ont comparé les performances de membranes d'UF et de MF pour la récolte de microalgues de diverses natures (deux diatomées marines *Haslea ostrearia*, *Skeletonema costatum* et une cyanobactérie *Arthrospira platensis*) dans des conditions similaires de filtration et pour le même temps de stabilisation. Ils ont observé qu'une membrane d'ultrafiltration en polyacrylonitrile (PAN) de seuil de coupure 40 kDa offrait un flux de départ certes limité à 270 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, mais un flux stabilisé s'élevant à 120 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, proche des valeurs obtenues avec une membrane PVDF 0,1 μm .

Cela rejoint les résultats de la Figure 25 quant aux différences résistances des membranes :

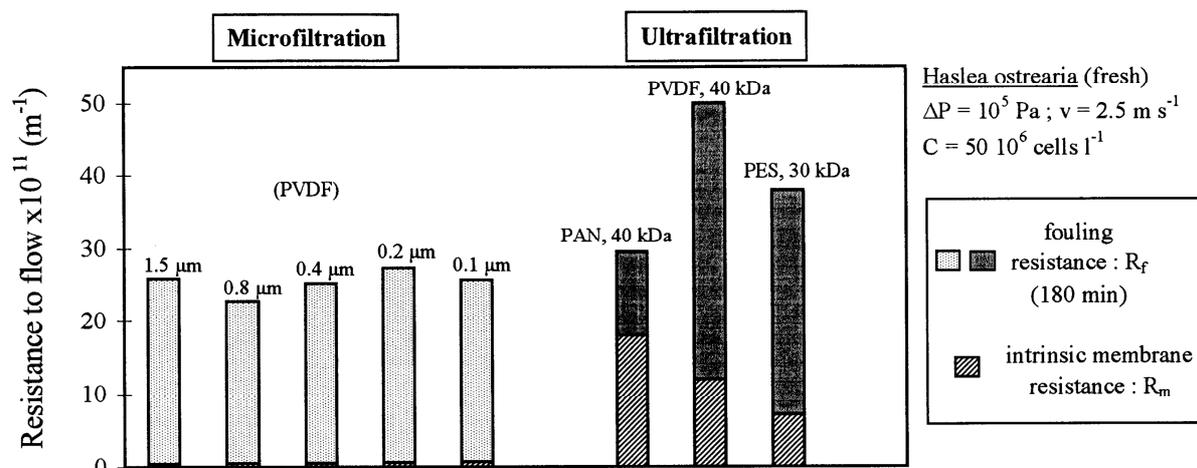


Figure 25 : Résistances de différentes membranes de microfiltration et d'ultrafiltration [d'après Rossignol et al. 1999]

On constate que les résistances intrinsèques R_m des membranes de microfiltration sont très faibles comparées aux membranes d'ultrafiltration d'où les flux plus élevés en début d'expérience. Mais les résistances dues au colmatage ($R_f = R_r + R_{ir}$) en ultrafiltration sont plus faibles, ce qui peut être déterminant pour l'étape de nettoyage.

Il peut donc être conclu que la microfiltration de souches de tailles relativement importantes ($> 40 \mu\text{m}$) et de formes différentes admet certes des flux de départ plus élevés que l'ultrafiltration, mais que son colmatage peut être plus important. Il est très probable qu'avec des cellules de taille plus faible, comme avec la souche qui sera utilisée au cours de ces travaux de thèse, que ces résultats ne soient pas infirmés. Ainsi, compte tenu de la mise en évidence du rôle des agents colmatants autres que les cellules microalgales, et décrits ultérieurement, l'utilisation de l'ultrafiltration fût privilégiée par la suite.

- Influence de la concentration

Plus la concentration en microalgues est élevée et plus le colmatage est important et les flux de perméation faibles. Cela a été montré pour des séparations de *Scenedesmus quadricauda* effectuées à recyclage total et à vitesse constante, en faisant varier la concentration (Figure 26) [Zhang et al. 2010]. En effet, selon l'Équation 13, on remarque bien que si C_0 augmente, la valeur de J diminue. Ainsi, lorsqu'on travaillera en mode concentration ce phénomène va entrer en jeu et réduire la valeur des flux de perméation.

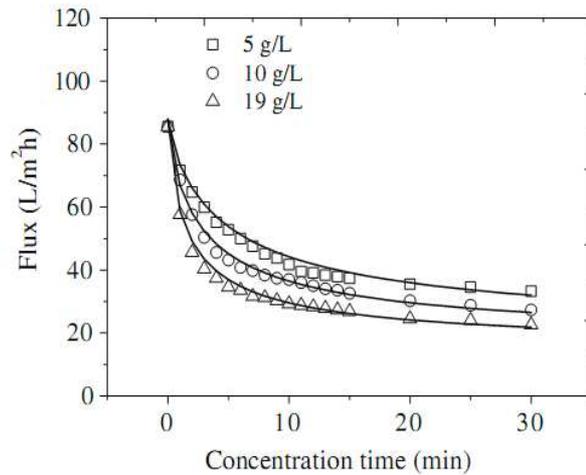


Figure 26 : Flux de filtration à différentes concentrations en fonction du temps [d'après Zhang *et al.* 2010]

Par ailleurs, différents auteurs ont montré la possibilité de concentrer des cellules microalgales avec des facteurs de concentration compris entre 10 et 150, pour des concentrations initiales au mieux de $1 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ [Rossignol *et al.* 1999 ; Vandanjon *et al.* 1999 ; Rossi *et al.* 2004, Danquah *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010].

- Influence de la vitesse tangentielle et/ou de l'hydrodynamique

Tant qu'elle permet d'éroder la couche limite de matière, une augmentation de la vitesse permet une augmentation du flux de filtration parfois importante. Ainsi, pour des filtrations effectuées dans des conditions similaires, Zhang *et al.* [2010] ont rapporté un triplement du flux, de $10 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ à $30 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ lorsque la vitesse tangentielle augmente de 0,01 de $0,17 \text{ m.s}^{-1}$ (Figure 27). Des observations similaires ont été rapportées par d'autres auteurs [Rossignol *et al.* 1999 ; Rossi *et al.* 2005].

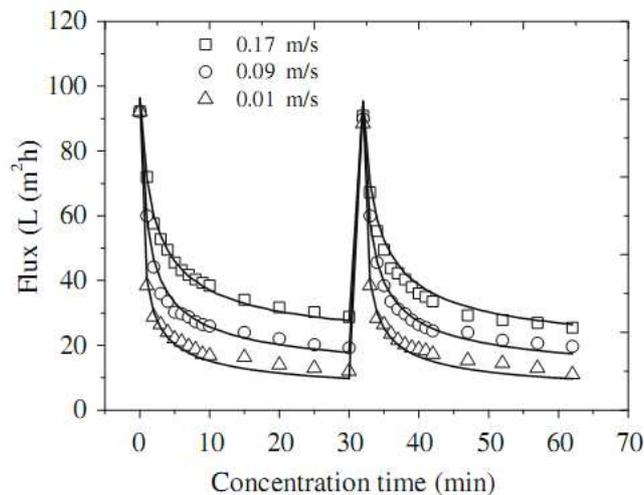


Figure 27 : Flux de filtration en fonction de la concentration pour différentes vitesses [d'après Zhang *et al.* 2010]

Par ailleurs, différents moyens peuvent être mis en œuvre pour limiter le colmatage des membranes de filtration, notamment les modifications de l'écoulement comme :

- l'utilisation d'écoulements tourbillonnaires, qui a permis d'augmenter de 20 % à 45% les flux limites de membranes d'ultrafiltration [Morineau-Thomas *et al.* 2011 et 2002]
- l'utilisation de membranes immergées balayées par un bullage d'air, semblable à ce que l'on peut retrouver en photobioréacteur à membrane [Bilad *et al.* 2012]

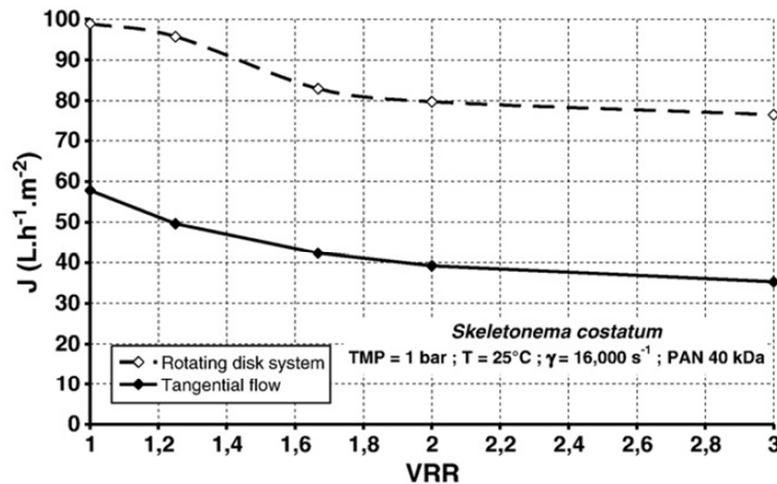


Figure 28 : Évolution des flux en mode concentration lors d'une filtration de diatomée dans des conditions similaires de cisaillement sur un module tangentielle et sur un module rotatif dynamique [d'après Frappart *et al.* 2011]

- la filtration tangentielle dynamique où le taux de cisaillement, obtenu par rotation ou vibration des membranes, peut être augmenté sans changer le débit d'alimentation, à la différence de la filtration tangentielle « classique » type module tubulaire, plan etc. Frappart *et al.* (2011) ont montré que ce type de filtration permettait de passer d'un flux de 35 L.h⁻¹.m⁻² pour une filtration tangentielle classique à un flux de 75 L.h⁻¹.m⁻² sur la diatomée *Skeletonema costatum*, et ce pour des cisaillements équivalents (Figure 28). La cause principale pourrait être la réduction des débits de pompage dans ce type de module, source de stress cellulaire et génération d'exopolysaccharides [Morineau-Thomas *et al.* 2002]
- Toujours en filtration dynamique mais avec une rotation de membranes céramiques ou polymériques, Rios *et al.* 2011 ont également obtenu une augmentation des flux non négligeables (Figure 29). À titre d'exemple, des flux jusqu'à 4 fois supérieurs sont obtenus par la mise en rotation des membranes céramiques ou polymériques de 0 à 1110 tr.min⁻¹, quelles que soient les diamètres de pores ou la PTM.

TMP	membrane	flux L/h/m ²			
		initial	plateau at 1110 rpm	plateau at 550 rpm	plateau at 0 rpm
2 bar	ceramic, 2 μm	2520 \pm 73	460 \pm 73	222 \pm 59	130 \pm 18
	ceramic, 0.5 μm	1830 \pm 47	431 \pm 44	268 \pm 28	105 \pm 33
	polymeric, 1 μm	1227 \pm 16	200 \pm 62	67 \pm 16	69 \pm 30
	polymeric, 0.5 μm	3629 \pm 298	207 \pm 45	99 \pm 17	75 \pm 40
1 bar	ceramic, 2 μm	1286 \pm 96	403 \pm 64	211 \pm 35	130 \pm 15
	ceramic, 0.5 μm	943 \pm 21	370 \pm 25	265 \pm 38	127 \pm 23
	polymeric, 1 μm	867 \pm 180	127 \pm 19	44 \pm 4	33 \pm 15
	polymeric, 0.5 μm	1154 \pm 162	195 \pm 66	99 \pm 14	54 \pm 27

Figure 29 : Augmentation de flux de perméation en fonction de la vitesse de rotation et du type de membrane [d'après Rios *et al.* 2011]

- Influence de la pompe d'alimentation

Les pompes induisent un cisaillement au sein de la suspension, et cette contrainte n'est pas toujours sans conséquences sur les microalgues [Vandanjon *et al.* 1999 et Jaouen *et al.* 1999]. Le cisaillement peut ainsi induire un stress mécanique chez les micro-organismes filtrés qui peuvent alors sécréter des éléments colmatants tels que des exopolysaccharides (EPS) limitant alors le flux de filtrat. Par ailleurs, les microalgues peuvent être partiellement ou totalement endommagées, ce qui peut nuire à l'utilisation de la biomasse pour la suite du procédé. Le choix d'un type de pompe doit donc prendre en compte les effets éventuels du cisaillement induit.

- Principaux agents colmatants

L'étude d'une filtration membranaire passe également par la compréhension des mécanismes de colmatage en cours de filtration. La majorité des études s'accordent à dire, comme cela a déjà pu être évoqué dans les points précédents, que les entités colmatantes ne sont pas uniquement les cellules microalgues en elles-mêmes mais également la matière organique issue du métabolisme de la microalgue. Ainsi, protéines ou exopolysaccharides sont régulièrement mis en avant comme induisant autant d'effets colmatants que les cellules microalgales, voire plus. Toutefois, les parts respectives des deux populations semblent varier selon les cas rapportés, avec probablement un effet important de la souche étudiée, mais peut-être aussi des conditions de culture et de récolte :

- ainsi, sur *Tetraselmis suecica*, souche flagellée de taille comprise entre 1 et 10 μm , les cellules seraient responsables à 70 % du colmatage contre 30 % pour les matières organiques excrétées, essentiellement exopolysaccharides [Morineau-Thomas *et al.* 2001]

- le rôle des exopolysaccharides est particulièrement mis en avant pour *Arthrospira platensis*, cellule de plus grande taille (environ 100 μm) et connue pour ses excréments abondants d'exopolysaccharides. La concentration cellulaire, la présence de fragments cellulaires ainsi que de protéines (ici la phycobiliprotéine C-Phycocyanine), ne semblent contribuer que peu au colmatage [Rossi *et al.* 2004, 2005 et 2008]. Rickman *et al.* (2012) parviennent à des conclusions proches sur des cellules plus petites (*Chlamydomonas* sp., 3 μm environ). Les auteurs soulignent l'importance des composés de type protéines, acides humiques ou molécules à haut poids moléculaires.
- Qu *et al.* 2012 confirment également le rôle colmatant de manière irréversible de la matière organique extracellulaire, par adsorption à la surface de la membrane, mais également celui tenu par les cellules et les fragments potentiels générant un gâteau réversible en premier lieu, puis irréversible lorsqu'il se comprime au cours de la filtration.
- la contribution minérale peut également être non négligeable. Bilad *et al.* (2012) ont montré, qu'outre la présence des composés organiques, des cristaux minéraux de carbonate de calcium pouvaient se former à la surface de la membrane et contribuer au blocage de pores lors de la filtration de suspension de *Phaeodactylum tricornutum* ou *Chlorella vulgaris*.

- Développement industriel

Certains industriels proposent des systèmes de récolte par membranes à plusieurs étages pour pouvoir atteindre des concentrations importantes. Ainsi, la société Pall propose un premier étage par membranes fibres creuses pour atteindre 60 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ en matières sèches, puis un second étage par membranes tubulaires minérales pour atteindre 180 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ [DiLillo 2012], pour un coût énergétique de 0,5 $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$ pour le premier étage et de 0,7 $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$ pour l'ensemble du procédé.

Le tableau ci-dessous permet de récapituler les principaux résultats obtenus en séparation membranaire appliquée aux microalgues.

Tableau 13 : Performances de la séparation membranaire appliquée aux microalgues

Souches cibles	Membrane	PTM Vitesse	Concentration initiale (gms.L ⁻¹)	FC atteint	Flux de perméation (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	Consommation énergétique kWh.m ⁻³	Références
Phytoplankton	0,45 µm	0,55 à 0,85 bar		5 à 40	194 - 225 (flux imposé)		Petrusevski <i>et al.</i> 1995
<i>Haslea o.</i>	PAN 40 kDa	2 bar 1 à 2.5 m/s		11	20 - 50		Rossignol <i>et al.</i> 1999
<i>Chlorella sp.</i>	PVDF 0,22 µm (hydrophobe)	0,4 à 0,6 bar	0,0139		216 à 36		Hung <i>et al.</i> 2006
	Ester Cellulose 0,22 µm (hydrophile)	0,43 à 0,84 m/s					
<i>Arthrospira p.</i>	ATZ 50 kDa	0 – 2 bar 1 à 3 m/s	1		40 – 90		Rossi <i>et al.</i> 2008
<i>Tetraselmis suecica</i> + <i>Chlorococum sp.</i>	0,22 µm	2,07 bar	1.05 (croissance élevée)	23	20	0.51	Danquah <i>et al.</i> 2009
			1.15 (croissance faible)	48	20	0.38	
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	PVC 50 kDa	0,345 bar 0,17 m/s	1.04	154	45.5 (avec rétrolavage à l'air)		Zhang <i>et al.</i> 2010
<i>Phaeodactylum t.</i>	Céramique 0,5-2 µm	1 – 2 bar (dyn.)	0.06		127 – 460		Rios <i>et al.</i> 2011
	Polymérique 0,5-1 µm				54 – 200		
<i>Skeletonema c.</i>	PAN 40 kDa	1 bar		3	100-80 (dyn.) 60-30 (tang.)		Frappart <i>et al.</i> 2011
<i>Chlorella v.</i>	PVDF	0 – 0,35 bar	0,41		17 – 38,3	0,27 – 0,48	Bilad <i>et al.</i> 2012
<i>Phaeodactylum t.</i>	(% variable)	(Subm.)	0,23		29,8 – 42,5	0,25 – 0,31	

Tang. Filtration tangentielle classique (par défaut si non précisée)

Dyn. : Filtration dynamique

Subm : Membranes immergées

3. Conclusions

L'étude bibliographique a permis de choisir la souche considérée dans cette étude et de sélectionner deux procédés de récolte méritant d'être investigués. Ainsi, *Chlorella vulgaris* est une souche facile à cultiver, bien connue au laboratoire et qui présente un intérêt potentiel en terme de production de biocarburants.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence la capacité de certaines microalgues à flocculer « naturellement », en privant la culture de l'apport en CO₂ et en laissant le pH remonter naturellement par épuisement du milieu en CO₂ jusqu'à la co-précipitation de certains sels inorganiques et des cellules. Cette méthode de récolte semble intéressante dans le cadre d'applications énergétiques (biodiesel), d'une part à cause de sa faible consommation énergétique, et d'autre part parce que les faibles concentrations cellulaires obtenues (~ 20 –

30 g_{MS}.L⁻¹) ne sont pas pénalisantes si la récupération et le fractionnement des métabolites d'intérêt (lipides, pigments ...) peuvent être effectués en voie humide.

Cette floculation naturelle a été rapportée pour des souches marines, ainsi que pour des souches d'eau douce dans des milieux riches en magnésium. La première partie de ce travail portera en conséquence sur la détermination des conditions dans lesquelles la souche d'eau douce *Chorella vulgaris* peut floculer naturellement.

Pour la simple récolte, ou bien même dans certaines applications de niche (récupération de pigments, oméga-3 ou polysaccharides pour la cosmétique ou la nutraceutique par exemple), on souhaite pouvoir disposer d'une biomasse concentrée dans laquelle une partie du milieu de culture a d'ores et déjà été retiré pour limiter les volumes à traiter. Les techniques membranaires peuvent alors être plus compétitives, sur le plan énergétique, vis-à-vis de la centrifugation (d'autant plus si la souche à traiter est de faible taille, nécessitant ainsi des accélérations importantes). Il est cependant délicat d'atteindre des niveaux de concentration élevés (> 60 g_{MS}.L⁻¹ environ) en une seule étape. De plus, le pompage est généralement le coût d'exploitation principal. Dans cette optique, l'utilisation de la filtration dynamique, où le taux de cisaillement est indépendant du débit d'alimentation, peut être une alternative intéressante à la filtration tangentielle classique pour limiter le colmatage et atteindre des flux et/ou des concentrations finales élevées, et/ou pour réduire les coûts énergétiques de pompage, et même participer à améliorer la nettoyabilité des membranes. Son utilisation peut ainsi s'envisager en 2nd étage pour l'obtention de concentrations plus élevées allant jusqu'à 180 g_{MS}.L⁻¹.

La seconde partie de ce travail portera donc sur la comparaison des performances de la filtration tangentielle et de la filtration dynamique pour la récolte de *Chlorella vulgaris*.

4. Références bibliographiques

- Abrams S.A, Chen Z, Hawthorne K.M. J, Magnesium metabolism in 4 to 8 year old children, *Journal of Bone and Mineral Research* (2013), DOI 10.1002/jbmr.2021
- Ahmad A.L., Mat Yasin N.H., Derek C.J.C., Lim J.K., Optimization of microalgae coagulation process using chitosan, *Chemical Engineering Journal* 173 (2011) 879– 882.
- Aimar P., Mécanismes de transfert de matières en ultrafiltration, Thèse d'état (1987), Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Alfajara C.G., Nakano K., Nomura N., Igarashi T., Matsumura M., Operating and scale-up factors for the electrolytic removal of algae from eutrophied lakewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77 (2002) 871–876.
- Allen M. M. & Stanier R. Y., Growth and division of some unicellular blue-green algae. *Journal of General Microbiology* 51 (1968) 199-202.
- Ayoub G. M., Lee S.-I., Koopman B., Seawater induced algal flocculation, *Water Research* 20 (1986) 1265-1271.
- Azarian G.H., Mesdaghinia A.R., Vaezi F., Nabizadeh R., Nematollahi D., Algae Removal by Electro-coagulation Process, Application for Treatment of the Effluent from an Industrial Wastewater Treatment Plant, *Iranian Journal of Public Health* 36 (2007) 57-64.
- Banerjee C., Ghosh S., Sen G., Mishra S., Shukla P., Bandopadhyay R., Study of algal biomass harvesting using cationic guar gum from the natural plant source as flocculant, *Carbohydrate Polymers* 92 (2013) 675– 681.
- Becker, E.W., In "Microalgae: biotechnology and microbiology" Ed. Baddiley, J. et al., 178 (1994) Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York.
- Benemann J.R., Kopman B.L., Weissman D.E., Eisenberg D.E., Goebel R.P., Development of microalgae harvesting and high rate pond technologies in California, *Algal biomass* (1980) p. 457.
- Benemann J. R., Microalgae aquaculture feeds, *Journal of Applied Phycology* 4 (1992) 233-245.
- Benemann J. R., *Microalgal biofuels: a brief introduction*, 2010.
- Beyerinck M. W., Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen, *Botanische Zeitung* 47 (1890).
- Bilad M.R., Vandamme D., Foubert I., Muylaert K., Vankelecom I. F.J., Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes, *Bioresource Technology* 111 (2012) 343–352.

- Bilanovic D., Shelef G., Sukenik A., Flocculation of microalgae with cationic polymers—effects of medium salinity, *Biomass* 17 (1988) 65–76.
- Bischoff, H.W. and Bold, H.C., *Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*, University of Texas Publications 6318 (1963) 1-95.
- Blanchemain A. and Grizeau D., Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature, *Biotechnology Techniques* 13 (1999) 497–501.
- Blatt W. F. Dravid A., Michaels A. S., Nelson L., Solute polarization and cake formation in membrane ultrafiltration: causes, consequences, and control techniques, *Membrane Science Technology* (1970) J.E. Flinn Editions, NY.
- Botha A., Strydom C.A., Preparation of a magnesium hydroxy carbonate from magnesium hydroxide, *Hydrometallurgy* 62 (2001) 175– 183.
- Brennan L., Owende P., Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 557-577.
- Bruton T., Lyons H., Lerat Y., Stanley M., Rasmussen M. B., A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland (2009).
- Bold, H.C, The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov., *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 76 (1949) 101-108.
- Bukhari A.A., Investigation of the electro-coagulation treatment process for the removal of total suspended solids and turbidity from municipal wastewater, *Bioresource Technology* 99 (2008) 914-921.
- Bushinsky D.A., Parker W.R., Asplin J.R., Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats, *Kidney International* 57 (2000), 550-60.
- Castrillo M., Lucas-Salas L.M., Rodríguez-Gil C., Martínez D., High pH-induced flocculation–sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology* 128 (2013) 324–329.
- Çelen I., Türker M., Recovery of ammonia as struvite from anaerobic digester effluents, *Environmental Technology* 22 (2001) 1263-1272.
- Chen Y.M., Liu J.C., Ju Y.-H., Flotation removal of algae from water, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12 (1998) 49–55.

- Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J., Chang J.-S., Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review, *Bioresource Technology* 102 (2011) 71–81.
- Cheng Y.-S., Zheng Y., Labavitch J. M., VanderGheynst J. S., The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*, *Process Biochemistry* (2010), doi:10.1016/j.procbio.2011.06.021
- Cheng Y.-L., Juang Y.-C., Liao G.-Y., Ho S.-H., Yeh K.-L., Chen C.-Y., Chang J.-S., Liu J.-C., Lee D.-J., Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology* 101 (2010) 9092–9096..
- Cheryan M., *Ultrafiltration Handbook* (1986).
- Chow, L.C., and E. D. Eanes, *Octacalcium Phosphate* (2001) 98, Karger Publishers, Basel.
- Christi Y., Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25 (2007) 294–306.
- Christi Y., Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends in Biotechnology* 26 (2008) 126–131.
- Clifton M. J., Abidine N., Aptel P., Sanchez V., Growth of the polarization layer in ultrafiltration with hollow-fiber membranes, *Journal of Membrane Science* 21 (1984) 233-245.
- Cornet J. F., Dussap C. G., A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors, *Biotechnology Progress* 25 (2009) 424–435.
- Coutteau P., Sorgeloos P., The uses of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey, *Journal of Shellfish Research* 11 (1992) 467-476.
- Daiminger U., Nitsch W., Plucinski P., Hoffmann S., Novel techniques for oil/water separation, *Journal of Membrane Science* 99 (1995) 197-203.
- Danquah M. K., Gladman B., Moheimani N., Forde G. M., Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency, *Chemical Engineering Journal* 151 (2009) 73–78.
- de Godos I., Guzman H. O., Soto R., García-Encina P. A., Becares E., Muñoz R., Vargas V. A., Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial biomass from piggery wastewater treatment, *Bioresource Technology* 102 (2011) 923–927.
- Degrémont SA, *Mémento technique de l'eau - Tomes 1 et 2, 10^{ème} Édition* (2005), Ed. Degrémont
- Denis C., Massé A., Fleurence J., Jaouen P., Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia*

- turuturu*: Process definition and up-scaling, Separation and Purification Technology 69 (2009) 37–42.
- Diaz O.A., Reddy K.R., Morre P.A., Solubility of inorganic phosphorus in stream water as influenced by pH and Calcium concentration, Water Resource 28 (1994) 1755 – 1763.
- DiLillo D., 2012, 4th Algae World Europe. Munich.
- Divakaran R. and Pillai V.N.S., Flocculation of algae using chitosan, Journal of Applied Phycology 14 (2002) 419–422.
- Duan J. & Gregory J., Coagulation by hydrolysing metal salts, Advances in Colloid and Interface Science 100 –102 (2003) 475–502.
- Dupré C., Guary J.C. and Grizeau D., Culture of an autoflocculant microalga in a vertical tubular photobioreactor for phycoerythrin production, Biotechnology Techniques 9 (1995) 185-190.
- Elmaleh S., Coma J., Grasmick A. and Bourgade L., Magnesium induced algal flocculation in a fluidized bed, Water Science and Technology 23 (1991) 1695-1702.
- Emamjomeh M. M., Sivakumar M., Review of pollutants removed by electrocoagulation and electrocoagulation/flotation processes, Journal of Environmental Management 90 (2009) 1663–1679.
- Folkman Y., Wachs A.M., Removal of algae from stabilization pond effluents by lime treatment, Water Research 7 (1973) 419–435.
- Frappart M., Massé A., Jaffrin M. Y., Pruvost J., Jaouen P., Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation, Desalination 265 (2011) 279–283.
- Fulks W., Main K.L., Rotifer and Microalgae Culture Systems (1991). The Oceanic Institute, Honolulu, 364 pp.
- Gao S., Yang J., Tian J., Ma F., Tu G., Du M., Electro-coagulation–flotation process for algae removal, Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 336–343.
- Geciova, J., D. Bury, and P. Jelen, Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review, International Dairy Journal 12 (2002) 541 - 553.
- Golueke C.G., Oswald W.J., Harvesting and processing sewage grown planktonic algae, Journal of the Water Pollution Control Federation 37 (1965) 471– 498.
- Granum, E., Kirkvold, S., Myklestad, S.M., Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. Marine Ecology Progress Series 242 (2002) 83–94.

- Greenwell H. C., Laurens L. M. L., Shields R. J., Lovitt R. W., Flynn K. J., Placing microalgae on the biofuel priority list: a review of the technological challenges, *Journal of The Royal Society Interface* 7 (2010) 703-726.
- Gudin C., Thepenier C., Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Advance Biotechnology Processes* 6 (1986) 73-110.
- Guillard R.R.L., Lorenzen, C.L., Yellow-green algae with chlorophyllide c, *Journal of Phycology* 8 (1972) 1-14.
- Gurtler, J.L., Biocarburants : développement et perspectives, *Oléagineux Corps Gras Lipides* 15 (2008) 235-239.
- Hadj-Romdhane F., Jaouen P., Pruvost J., Van Vooren G., Bourseau P., Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture, *Bioresource Technology* 123 (2012) 366-374.
- Hanotu J., Hemaka Bandulasena H.C., Zimmerman W. B., Microflotation Performance for Algal Separation, *Biotechnology and Bioengineering* 109 (2012) 1663-1673.
- Harith Z.T., Yusoff F.M., Mohamed M.S., Din M.S.M. and Ariff A.B., Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells, *African Journal of Biotechnology* 8 (2009), 5971-5978.
- Harun R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K., Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 1037-1047.
- Henderson R., Parsons S. A., Jefferson B., The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae, *Water Research* 42 (2008) 1827-1845.
- Hlavacek M., Break-up of oil-in-water emulsions induced by permeation through a microfiltration membrane, *Journal of Membrane Science* 102 (1995) 1-7.
- Hong A., Fane A.G., Burford R., Factors affecting membrane coalescence of stable oil-in-water emulsions, *Journal of Membrane Science* 222 (2003) 19-39.
- Horiuchi J.-I., Ohba I., Tada K., Kobayashi M., Kanno T. and Kishimoto M., Effective Cell Harvesting of the Halotolerant Microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH Control, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95 (2003) 412-415.
- Huchon J., Mietton-Peuchot M., Quéméneur F., Séparation par membrane, *Procédés électriques de séparation* (1987) 19-73, *Dopée* 85.
- Huntley M. E. and Redalje D. G., CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12 (2007) 573-608.

- Hung M.T., Liu J.C., Microfiltration for separation of green algae from water, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 51 (2006) 157–164.
- Iijima M., Formation octacalcium Phosphate in vitro, *Octacalcium Phosphate*, Karger Ed., Monographs in Oral Science 18 (2001) 17-49
- Jaouen P., Vandanjon L., Quéméneur F., The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps, *Bioresource Technology* 68 (1999) 149-154.
- Jenck, J., Lépine, O., Legrand, J., Dreno, P., Grizeau, D., Dupré, C., Valorisation industrielle des microalgues photosynthétiques. *Techniques de l'ingénieur IN 201* (2011).
- Jubeau S., Application du concept de bioraffinerie à la valorisation de la microalgue *Porphyridium cruentum*, Thèse de Doctorat Université de Nantes (2012).
- Junginger M., Bleek K., Kita-Tokarczyk K., Reiche J., Shkilnyy A., Schacher F., Müller A. H. E. and Taubert A., Calcium phosphate growth beneath a polycationic monolayer at the air–water interface: effects of oscillating surface pressure on mineralization, *Nanoscale* 2 (2010) 2440-2446.
- Kim S.-G., Choi A., Ahn C.-Y., Park C.-S., Park Y.-H. and Oh H.-M., Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination, *Letters in Applied Microbiology* 40 (2005) 190–194.
- Kim D.-G., La H.-J., Ahn C.-Y., Park Y.-H., Oh H.-M., Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures, *Bioresource Technology* 102 (2011) 3163–3168.
- Knocke C., Vogt J., Biofuels – challenges & chances: How biofuel development can benefit from advanced process technology, *Engineering in Life Sciences* 9 (2009) 96–99.
- Kong J., Li. K., Oil removal from oil-in-water emulsions using PVDF membranes, *Separation and Purification Technology* 16 (1999) 83–93.
- Kuhl A. and Lorenzen H., Handling and culturing of *Chlorella*, *Methods in cell physiology* I (1964) p 152-187.
- Lavoie A. & De La Noüe J., Récupération de microalgues en eaux usées: étude comparative de divers agents flocculants, *Canadian Journal of Civil Engineering* 11 (1984) 266-272.
- Lavoie A. & De La Noüe J., Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in Wastewaters: Auto- or Bioflocculation?, *Biotechnology and Bioengineering* 30 (1987) 852-859.
- Levin G. V., Clendenning J.R., Gibor A., Bogar F. D., Harvesting of Algae by Froth Flotation, *Resources Research* 10 (1961) 169-175.

- Le Borgne F., Développement d'un photobioréacteur solaire à captation directe en couche mince, Thèse de Doctorat Université de Nantes, 2013.
- Le Gouic B., Analyse et optimisation de l'apport de carbone en photobioréacteur, Thèse de Doctorat Université de Nantes, 2013.
- Lee S.-I., Koopman B., Lincoln E.P., Effect of physicochemical variables on algal autoflotation, *Water Science and Technology* 26 (1992) 1769-1778.
- Lee J. and Pardi A., Thermodynamics and kinetics for base-pair opening in the P1 duplex of the Tetrahymena, *Nucleic Acids Research* 35 (2007) 2965–2974.
- Lee A. K., Lewis D. M., Ashman P. J., Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel, *Journal of Applied Phycology* 21 (2009) 559–567.
- Lee H., Cody R.D., Cody A.M., Spry P.G., Observations on brucite formation and the role of brucite in Iowa highway concrete deterioration, *Environmental and Engineering Geoscience* 8 (2009b) 137–145.
- Lee A. K., Lewis D. M., Ashman P. J., Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting, *Chemical Engineering Research and Design* 88 (2010) 988–996.
- Lee Y.-C., Kim B., Farooq W., Chung J., Han J.-I., Shin H.-J., Jeong S. H., Park J.-Y., Lee J.-S., Ohb Y.-K., Harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by organoclays, *Bioresource Technology* 132 (2013) 440–445.
- Lee J., Cho D.-H., Ramanan R., Kim B.-H., Oh H.-M., Kim H.-S., Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology* 131 (2013b) 195–201.
- Leentvar J. and Rebhun M., Effects of magnesium and calcium precipitation on coagulation-flocculation with lime, *Water Research* 16 (1982) 655-662.
- Lertsutthiwong P., Sutti S., Powtongsook S., Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds, *Aquacultural Engineering* 41 (2009) 188–193.
- Li C. and Somasundaran P., Reversal of bubble charge in multivalent inorganic salt solutions – Effect of magnesium, *Journal of Colloid and Interface Science* 146 (1) (1991) 215-218.
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C. Q., Dubois-Calero N., Biofuels from Microalgae, *Biotechnology Progress* 24 (2008) 815-820.
- Lívanský K., Dědič K., Bínová J., Tichý V., Novotný P., Doucha J., Influence of the nutrient solution recycling on the productivity of *Scenedesmus obliquus*, utilization of nutrients and

- water in outdoor cultures. *Algological Studies/ Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes 81* (1996) 105–113.
- Livingstone A., A basic magnesium carbonate, a possible dimorph of artinite, *Mineralogical Magazine* 51 (1987) 459-462.
- Liu W., Huang F., Liao Y., Zhang J., Ren G., Treatment of CrVI - Containing Mg(OH)₂ Nanowaste, *Angewandte Chemie International Edition* 47(30) (2008) 5619–5622
- Luo H., Shih W.Y., Shih W.H., Comparison in the Coating of Mg(OH)₂ on Micron-Sized and Nanometer-Sized Nb₂O₅ Particles, *International Journal of Applied Ceramic Technology* 1(2) (2004) 146-154.
- Malis-Arad S., Friedlander M., Ben-Arie R. and Richmond A.E., Alkalinity-induced aggregation in *Chlorella vulgaris* I. Changes in cell volume and cell-wall structure, *Plant and Cell Physiology* 21 (1980) 27-35.
- Mallick N., Mandal S., Singh A. K., Bishai M. and Dash A., Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87 (2012) 137–145.
- Mandalam R. K., Palsson B., Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures, *Biotechnology and Bioengineering* 59 (1998) 605-611.
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 217–232.
- Michaels A.S., New separation techniques for the CPI, *Chemical Engineering and Processing* 64 (1968) 31-42.
- Middelberg A.P.J., Process-Scale Disruption of Microorganisms, *Biotechnology Advances* 13 (1995) 491-551.
- Millamena O. M., Aujero E. J., Borlongan I. G., Techniques on Algae Harvesting and Preservation for Use in Culture and as Larval Food, *Aquacultural Engineering* 9 (1990) 295-304.
- Mohn F.H., Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae, *Algae biomass* (1980) 547– 571.
- Molina Grima E., Belarbi E.-H., Ación Fernández F.G., Robles Medina A., Christi Y., Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnology Advances* 20 (2003) 491-515.

- Mollah M.Y.A., Morkovsky P., Gomes J. A.G., Kesmez M., Parga J., Cocke D. L., Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation, *Journal of Hazardous Materials B* 114 (2004) 199–210.
- Monod J., The Growth of Bacterial Cultures, *Annual Review of Microbiology* 3 (1949) 371.
- Moore E.W, Vérine H.J., Pathogenesis of pancreatic and biliary CaCO₃ lithiasis: the solubility product (K'sp) of calcite determined with the Ca⁺⁺ electrode, *Journal of Laboratory and clinical Medicine* 106 (1985) 611-618.
- Moore J.W., Stanitski C.L., Jurs P.C, *Principles of Chemistry : The Molecular Science* (2010) Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Morales J., de la Noüe J., Picard G., Harvesting Marine Microalgae Species by Chitosan Flocculation, *Aquacultural Engineering* 4 (1985) 257-270.
- Morineau-Thomas O., Legentilhomme P., Jaouen P., Lepine B. & Rince Y., Influence of a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*, *Biotechnology Letters* 23 (2001) 1539–1545.
- Morineau-Thomas O., Jaouen P., Legentilhomme P., The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella* sp. and *Porphyridium purpureum*): Advantage of a swirling decaying flow, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2002) 35–42.
- Muñoz R., Guieyssea B., Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review, *Water Research* 40 (2006) 2799-2815.
- Mussnug J.H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O., Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, *Journal of Biotechnology* 150 (2010) 51–56.
- Naik S.N., Goud V. V., Rout P. K., Dalai A. K., Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 578–597.
- Nigam P. S., Singh A., Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in Energy and Combustion Science* 37 (2011) 52-68.
- Oh H.-M., Lee S. J., Park M.-H., Kim H.-S., Kim H.-C., Yoon J.-H., Kwon G.-S. & Yoon B.-D., Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49, *Biotechnology Letters* 23 (2001) 1229–1234.
- Olaizola M., Commercial development of microbial biotechnology: from the test tube to the market place, *Biomolecular Engineering* 20 (2003) 459-466.

- Parks G.A., Equilibrium concepts in natural water systems. *Advances in Chemistry Series 67* (1967) Chapter 6, 121-160.
- Patil G., Chethana S., Madhusudhan M.C., Raghavarao K.S.M.S., Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*, *Bioresource Technology* 99 (2008) 7393–7396.
- Papazi A., Makridis P. & Divanach P., Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants, *Journal of Applied Phycology* 22 (2010) 349–355.
- Pignolet O., Jubeau S., Vaca-Garcia C., Michaud P., Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 40 (2013) 781–796.
- Plantier S., Castaing J.-B., Sabiri N.-E., Massé A., Jaouen P., Pontié M., Performance of a sand filter in removal of algal bloom for SWRO pre-treatment, *Desalination and Water Treatment* 51 (2013) 1838-1846.
- Poelman E., De Pauw N., Jeurissen B., Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae, *Resources, Conservation and Recycling* 19 (1997) 1-10.
- Predoi D., Vatasescu-Balcan R.A., Pasuk I., Trusca R., Costache M., Calcium phosphate ceramics for biomedical applications, *Journal of Optoelectronic and Advanced Materials* 8 (2008) 2151 – 2155.
- Price C. A., Mendiola-Morgenthaler L. R., Goldstein M., Breden E. N. and Guillard R. R. L., Harvest of planktonic marine algae by centrifugation into gradients of silica in the CF-6 continuous-flow zonal rotor, *The Biological Bulletin* 147 (1976) 136-145.
- Pruvost J., Cornet J.F., Legrand J., Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis, *Chemical Engineering Science* 63 (2008) 3679–3694.
- Pruvost J., Van Vooren G., Cogne G., Legrand J., Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor, *Bioresource Technology* 100 (2009) 5988–5995.
- Pruvost J., Van Vooren G., Le Gouic B., Couzinet-Mossion A., Legrand J., Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application, *Bioresource Technology* 102 (2011a) 150–158.
- Pruvost J., Cornet J.F., Goetz V., Legrand J., Modeling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions, *AIChE Journal* 57 (2011b) 1947-1960.
- Pruvost J., Cornet J.F., Le Borgne F., Jenck J., Production industrielle de microalgues et cyanobactéries, *Techniques de l'ingénieur IN 200* (2011).

- Qu F., Liang H., Tian J., Yu H., Chen Z., Li G., Ultrafiltration (UF) membrane fouling caused by cyanobacteria: Fouling effects of cells and extracellular organics matter (EOM), *Desalination* 293 (2012) 30–37.
- Qureshi N., Saha B. C., Dien B., Hector R. E., Cotta M. A., Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate, *Biomass and Bioenergy* 34 (2010) 559–565.
- Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F., Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production, *Applied Energy* 103 (2013) 444–467.
- Rickman M., Pellegrino J., Davis R., Fouling phenomena during membrane filtration of microalgae, *Journal of Membrane Science* 423 – 424 (2012) 33 – 42.
- Rios S. D., Clavero E., Salvadó J., Farriol X., Torras C., Dynamic Microfiltration in Microalgae Harvesting for Biodiesel Production, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 50 (2011) 2455-2460.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M. and Stanier R., Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Journal of General Microbiology* 111 (1979) 1-61.
- Rodolfi L., Zittelli G.C., Barsanti L., Rosati G., Tredici M.R., Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering* 20 (2003) 243–248.
- Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M. R., Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering* 102 (2009) 100–112.
- Rossi N., Jaouen P., Legentilhomme P., Petit I., Harvesting of cyanobacterium *Arthrospira platensis* using organic filtration membranes, *Food and Bioproducts Processing* 82 (2004) 244-250.
- Rossi N., Petit I., Jaouen P., Legentilhomme P., Derouiniot M., Harvesting of cyanobacterium *Arthrospira platensis* using inorganic filtration membranes, *Separation Science and Technology* 40 (2005) 3033-3050.
- Rossi N., Derouiniot-Chaplain M., Jaouen P., Legentilhomme P., Petit I., *Arthrospira platensis* harvesting with membranes: Fouling phenomenon with limiting and critical flux, *Bioresource Technology* 99 (2008) 6162–6167.
- Rossignol N., Vandanjon L., Jaouen P., Quémeneur F., Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration, *Aquacultural Engineering* 20 (1999) 191-208.

- Rushton A., Ward A.S., Holdich R.G., Solid-Liquid Filtration And Separation Technology, Chap. 5 (1996) 153-175, VCH Ed.
- Rwehumbiza V. M., Harrison R., Thomsen L., Alum-induced flocculation of pre-concentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling, Chemical Engineering Journal 200–202 (2012) 168–175.
- Salehizadeh H., Shojaosadati S.A., Extracellular biopolymeric flocculants Recent trends and biotechnological importance, Biotechnology Advances 19 (2001) 371–385.
- Salim S., Bosma R., Vermuë M. H., Wijffels R. H., Harvesting of microalgae by bio-flocculation, Journal of Applied Phycology 23 (2011) 849-855.
- Schlesinger A., Eisenstadt D., Bar-Gil A., Carmely H., Einbinder S., Gressel J., Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production, Biotechnology Advances 30 (2012) 1023-1030.
- Semerjian L., Ayoub G.M., High-pH–magnesium coagulation–flocculation in wastewater treatment, Advances in Environmental Research 7 (2003) 389–403.
- Sigg L. Berha P. Stumm W., Chimie des milieux aquatiques (2006), Dunod Ed.
- Sillen L.G. and Martell A.E., Stability Constants of Metal-Ion Complexes, The Chemical Society 17 (1964) 8-11.
- Sims R. E. H., Mabee W., Saddler J. N. and Taylor M., An overview of second generation biofuel technologies, Bioresource Technology 101 (2010) 1570-1580.
- Singh J., Gu S., Commercialization potential of microalgae for biofuels production, Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (2010) 2596–2610
- Singh N. K., Dhar D. W., Microalgae as second generation biofuel. A review, Agronomy for Sustainable Development 31 (2011) 605–629.
- Sema S., Clavero E., Salvadó J., Potential pre-concentration methods for *Nannochloropsis gaditana* and a comparative study of pre-concentrated sample properties, Bioresource Technology 132 (2013) 293–304.
- Smith B. T., Davis R. H., Sedimentation of algae flocculated using naturally-available, magnesium-based flocculants, Algal Research 1 (2012) 32–39.
- Spilling K., Seppälä J., Tamminen T., Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* through CO₂ regulation, Journal of Applied Phycology 23 (6) (2011) 959-966.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G., Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*), Bacteriological Review 35 (1971) 171-205.

- Suali E., Sarbatly R., Conversion of microalgae to biofuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (2012) 4316–4342.
- Sueoka N., Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America* 46 (1960) 83–91.
- Sukenik A. & Shelef G., Algal autoflocculation – Verification and proposed mechanisms, *Biotechnology and Bioengineering* XXVI (1984) 142-147.
- Tenney M. W., Verhoff F. H., Chemical and autoflocculation of microorganisms in biological wastewater treatment, *Biotechnology and Bioengineering* XV (1973) 1045-1073.
- Türker M and Çelen I., Chemical equilibrium model of struvite precipitation from anaerobic digester effluents, *Turkish Journal of Engineering and Environmental Science* 34 (2010) 39-48.
- Tzanakis I.P. , Papadaki A.N. , Wei M. , Kagia S., Spadidakis V.V. , Kallivretakis N.E. and Oreopoulos D.G., Magnesium carbonate for phosphate control in patients on hemodialysis. A randomized controlled trial, *International Urology and Nephrology* 40 (2008) 193–201.
- Uduman N., Qi Y., Danquah M. K., Forde G. M., Hoadley A., Dewatering of microalgal cultures : A major bottleneck to algal-based fuels, *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2, 012701 (2010a).
- Uduman N., Qi Y., Danquah M. K., Hoadley A. F. A., Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement, *Chemical Engineering Journal* 162 (2010b) 935–940.
- Uduman N., Bourniquel V., Danquah M. K., Hoadley A. F. A., A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production, *Chemical Engineering Journal* 174 (2011) 249– 257.
- Vandamme D., Foubert I., Meesschaert B., Muylaert K., Flocculation of microalgae using cationic starch, *Journal of Applied Phycology* 22 (2010) 525–530
- Vandamme D., Pontes S.C.V., Goiris K., Foubert I., Pinoy L. J. J., Muylaert K., Evaluation of Electro-Coagulation-Flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae, *Biotechnology and Bioengineering* 108 (2011) 2320-2329.
- Vandamme D., Foubert I., Fraeye I., Meesschaert B., Muylaert K., Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications, *Bioresource Technology* 105 (2012) 114–119.
- Vandamme D., Foubert I., Muylaert K., Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production, *Trends in Biotechnology* 31(4) (2013) 233-239.

- Vandanjon L., Rossignol N., Jaouen P., Robert J. M., Quéméneur F., Effects of Shear on Two Microalgae Species. Contribution of Pumps and Valves in Tangential Flow Filtration Systems, *Biotechnology and Bioengineering* 63 (1999) 1-9.
- Vanthoor-Koopmans M., Wijffels R. H., Barbosa M. J., Eppink M. H.M., Biorefinery of microalgae for food and fuel, *Bioresource Technology* 135 (2013) 142–149.
- Wan C., Zhao X.-Q., Guo S.-L., Asraful Alam Md., Bai F.-W., Biofloculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation, *Bioresource Technology* 135 (2013) 207–212.
- Wijanarko A., Dianursanti M., Heidi, Soemantojo R. W., Ohtaguchi K., Effects of light illumination alteration on *Chlorella vulgaris* Buitenzorg's CO₂ fixation in bubble column photobioreactor, *International Journal on Algae* 8 (2006) 53-60
- Williams P. J. le B. & Laurence L. M. L., Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics, *Energy & Environmental Science* 3 (2010) 554-590.
- Wopenka B. and Pasteris J.D., A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Materials Science and Engineering C* 25 (2005) 131-143.
- Wu Z., Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y., Li A., Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium, *Bioresource Technology* 110 (2012) 496–502.
- Xu L., wang F., Li H.-Z., Hu Z.-M., Guo C., Liu C.-Z., Development of an efficient electroflocculation technology integrated with dispersed-air flotation for harvesting microalgae, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85 (2010) 1504-1507.
- Xu Y., Purton S., Baganz F., Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*, *Bioresource Technology* 129 (2013) 296–301.
- Zemel P.C., Zemel M.B., Urberg M., Douglas F.L., Geiser R., Sowers J.R., Metabolic and hemodynamic effects of magnesium supplementation in patients with essential hypertension, *American Journal of Nutrition* 51 (1990), 665–669.
- Zhang X., Hua Q., Sommerfeld M., Puruhito E., Chen Y., Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes, *Bioresource Technology* 101 (2010) 5297–5304.
- Zheng H., Gao Z., Yin J., Tang X., Ji X., Huang H., Harvesting of microalgae by flocculation with poly (γ -glutamic acid), *Bioresource Technology* 112 (2012) 212-220.
- Zhou W., Min M., Hu B., Ma X., Liu Y., Wang Q., Shi J., Chen P., Ruan R., Filamentous fungi assisted bio-flocculation: A novel alternative technique for harvesting heterotrophic

and autotrophic microalgal cells, *Separation and Purification Technology* 107 (2013) 158–165.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Souche

La souche utilisée dans cette étude est *Chlorella vulgaris* 211/19 (SAG). De plus amples informations sur cette espèce ont été apportées dans le Chapitre 1 Bibliographie.

1.2. Milieux de culture

Pour les essais réalisés, deux milieux ayant des sources d'azote différentes ont été utilisés.

Le premier est dérivé du milieu de Sueoka, dont la source d'azote est constituée d'ions ammonium NH_4^+ , et le second du milieu Bold's Basal Medium BBM, dont la source d'azote est constituée d'ions nitrates NO_3^- . Par la suite, pour simplifier la compréhension, les milieux seront identifiés par la terminologie milieu Sueoka et milieu BBM.

Les sels utilisés pour élaborer ces milieux sont :

- NH_4Cl ou NaNO_3 (source d'azote) : 725 mg.L^{-1} ou 1152 mg.L^{-1}
- KH_2PO_4 (source de potassium et de phosphore) : 100 mg.L^{-1}
- $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ (source de magnésium) : 140 mg.L^{-1}
- $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ (source de calcium) : 25 mg.L^{-1}
- NaHCO_3 (source de carbone inorganique) : 840 mg.L^{-1}

Le Tableau 14 résume la composition ionique de chacun de ces deux milieux.

Tableau 14 : Composition ionique des deux milieux utilisés au cours de cette étude (en mg.L^{-1}).

Éléments	Concentration en mg.L^{-1} (mM)			
	Milieu Sueoka		Milieu BBM	
Na^+	230	(10)	541,5	(23,5)
K^+	28,7	(0,73)	28,7	(0,73)
NH_4^+	243,9	(13,55)	-	
Mg^{2+}	13,8	(0,57)	13,8	(0,57)
Ca^{2+}	6,8	(0,17)	6,8	(0,17)
Cl^-	493,1	(13,89)	28,7	(0,81)
NO_3^-	-		840,4	(13,55)
HCO_3^-	610	(10)	610	(10)
SO_4^{2-}	54,6	(0,57)	54,6	(0,57)
PO_4^{3-}	69,8	(0,73)	69,8	(0,73)

Les compositions de ces milieux ont été établies à partir de la composition massique élémentaire de *Chlorella vulgaris* (Tableau 4) de façon à pouvoir atteindre une concentration en biomasse de 2 g_{MS}.L⁻¹ pour une culture menée en mode batch. Dans les deux cas, la conductivité des milieux est inférieure à 1 mS.cm⁻¹.

De plus, les cellules microalgales requièrent des microéléments, tous apportés par l'ajout de 0,5 mL.L⁻¹ de solution de Hutner [Hutner *et al.* 1950]. La composition de cette solution est donnée à titre indicatif par le Tableau 15, et la procédure de fabrication en Annexe 2.

Tableau 15 : Composition de la solution de Hutner (g.L⁻¹)

Éléments	Concentration (g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	50
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	22
H ₃ BO ₃	11,4
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	5,06
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	1,61
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	1,57
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	4,99
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	1,1
KOH	~16

1.3. Moyens de culture

1.3.1. Photobioréacteur de type Air-lift

La souche a été cultivée dans un photobioréacteur (PBR) de type air-lift d'un volume de 1 L. Sa surface spécifique (surface éclairée / volume) est de 33 m².m⁻³. Après stérilisation à l'acide peroxyacétique, le PBR est alimenté en milieu de culture stérile puis inoculé avec la souche. Placée en face d'un panneau lumineux de LED blanches permettant un apport constant en luminosité (150 μmol_{photons}.m⁻².s⁻¹), la culture est démarrée en mode batch pour permettre à la souche de s'adapter à son milieu et de commencer à croître. La régulation du pH à 7,5 est réalisée par injection de CO₂ et l'agitation par injection d'air stérile (Figure 30). La température de la culture est de 25°C.

Dès lors que le palier de concentration semble être atteint, la culture continue est initiée en alimentant le PBR avec un débit de milieu de culture de 720 mL.j⁻¹ (0,5 mL.min⁻¹). Ce mode de fonctionnement permet de stabiliser le PBR et de récolter par surverse de la biomasse à la concentration de 0,8 g_{MS}.L⁻¹ environ.

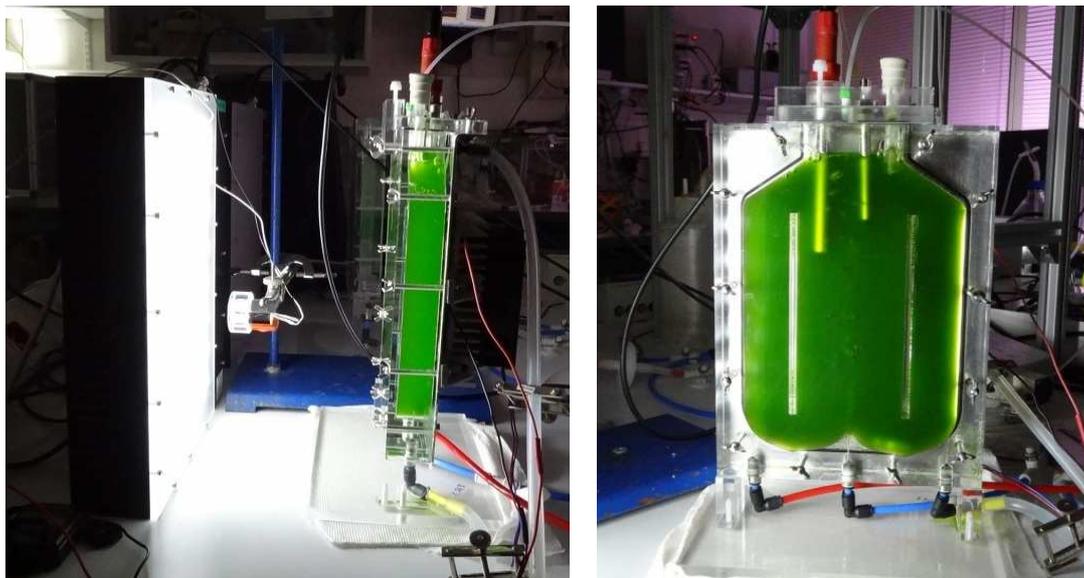
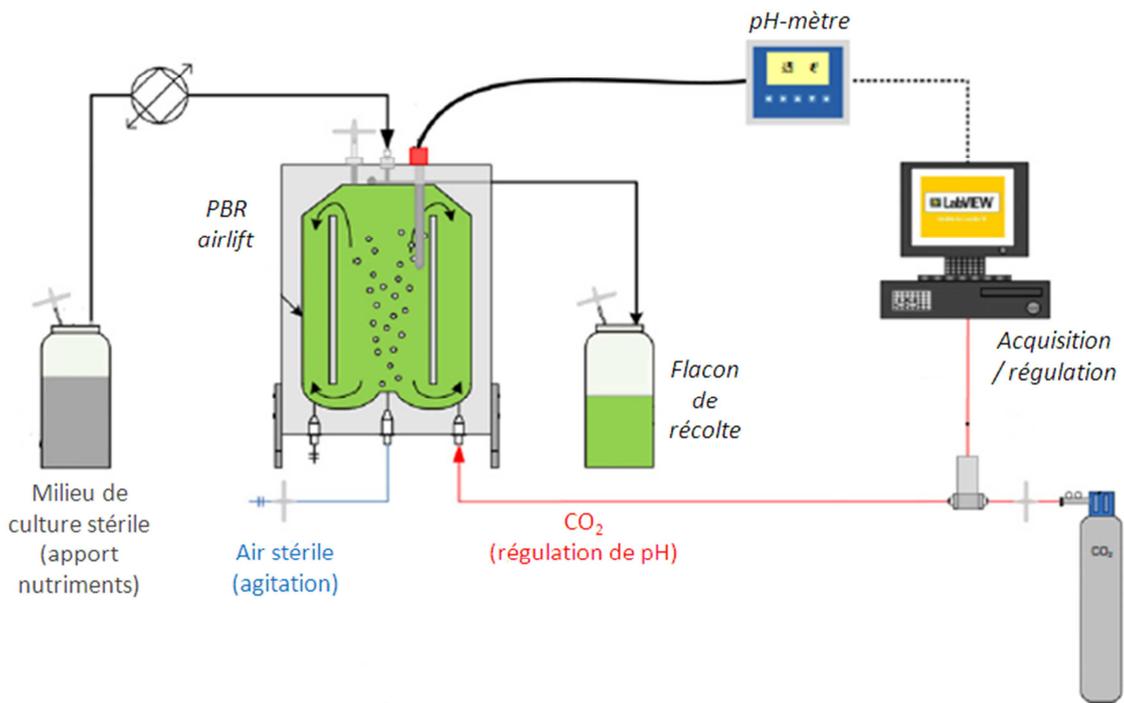


Figure 30 : Schéma expérimental et montage opératoire du système de culture de la souche microalgale en PBR air-lift

1.3.2. Photobioréacteur de type Scobalite

Pour les essais de séparation membranaire, des volumes importants de biomasse sont nécessaires et un système de production de plus grande capacité, de type scobalite, a été utilisé (Figure 31).

Ce type de PBR est moins adapté à la culture contrôlée (pas de contrôle de la température par exemple) mais permet une production de masse.

Le PBR « scobalite » utilisé, de forme cylindrique et d'un diamètre de 30 cm pour une hauteur de 175 cm, offre un volume réactionnel de 115 litres pour une surface spécifique de $7,5 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$.



Figure 31 : Schéma expérimental du PBR scobalite

Il est constitué des différents éléments suivants :

- Un couvercle percé de plusieurs orifices permettant l'alimentation en éléments nécessaires à la croissance des microalgues (1),
- Une sonde pH (2) (Inpro 3100, Mettler-Toledo, Suisse),
- Un système d'injection de CO_2 (3) piloté par un régulateur (pH 2050e, Mettler-Toledo) relié à la sonde pH,
- Une couronne d'injection d'air filtré sous pression (4) qui a pour but d'homogénéiser le mélange réactionnel et de limiter l'encrassement des parois du réacteur (présence éventuelle de biofilm limitant la pénétration des photons lumineux).
- Une cage d'éclairage constituée de 12 néons de 120 cm (5) ; on peut régler l'intensité lumineuse en modifiant le nombre de néons allumés (l'intensité moyenne reçue par le PBR avec la totalité des néons est de $160 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Le principe de fonctionnement est un peu différent de celui de l'air-lift car le scobalite ne peut fonctionner en mode strictement continu. Ainsi un mode semi-continu a été mis en place en prélevant quotidiennement, et à heure fixe, un volume donné de la suspension microalgale (compris entre $\frac{1}{3}$ à $\frac{1}{4}$ du volume total de la culture). L'éclairage a été limité à 80

$\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (la moitié des néons allumés) pour limiter la hausse de température et la maintenir à environ 25°C. Dans ces conditions, la culture a pu être stabilisée à une concentration de 0,2 – 0,3 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$, ce qui a permis de produire 25 à 35 litres de culture, soit environ 9 g de biomasse, par jour.

1.4. Suivi de la culture

1.4.1. Matières sèches (MS)

L'estimation des matières sèches s'effectue par filtration grâce à des filtres de 0,45 μm GF/F Whatman (Figure 32). Préalablement séchés à l'étuve, ces filtres sont pesés puis utilisés pour filtrer un volume connu de suspension (V). Pour une précision optimale, ce volume doit être tel que la masse de biomasse déposée sur le filtre soit approximativement égale à 8 mg. Les filtres contenant la biomasse sont ensuite séchés à l'étuve (105°C pendant 24 heures) puis refroidis au dessiccateur pendant 10 minutes et enfin pesés.

La différence de masse entre le filtre seul et le filtre séché contenant la biomasse permet de déterminer la concentration en biomasse selon :

$$C (\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{m_f - m_i}{V} \quad (15)$$

Avec : m_i : masse initiale du filtre + support (g)

m_f : masse finale du filtre + support après séchage 24h (g)

V : volume de suspension filtrée (L)

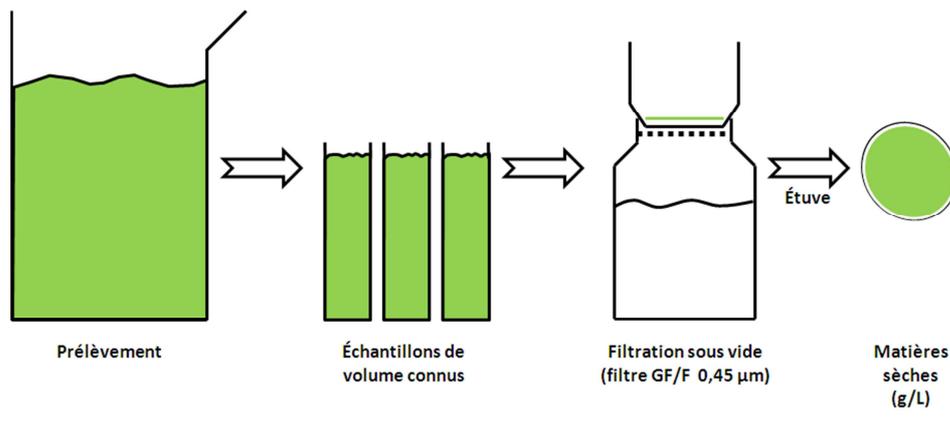


Figure 32 : Schéma de principe de la mesure des matières sèches

Dans le cas de culture en milieu fortement salin (jusqu'à 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl), un rinçage complémentaire du filtre, avec une solution de formiate d'ammonium [Geffard 2001], est nécessaire pour éliminer les sels présents dans le milieu de culture et pouvant très largement interférer sur le résultat final.

1.4.2. Comptage cellulaire à la cellule de Malassez

1.4.2.1. Gravage

La concentration cellulaire des cultures est déterminée au microscope optique (objectif x40) par comptage sur hématicimètre de type Malassez (Figure 33).

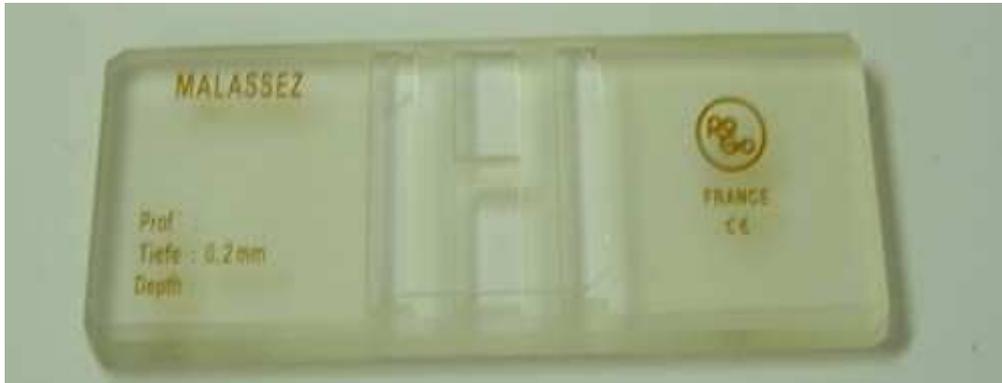


Figure 33 : Hématimètre de type Malassez

La cellule de Malassez est une lame spéciale que l'on place sous un microscope pour le comptage de diverses cellules animales et végétales. Le principe est simple : un gravage très précis trace un quadrillage de surfaces connues. Une seconde lamelle en délimite une profondeur définie. Ainsi, le volume de comptage de la cellule est donc parfaitement connu. La densité cellulaire de la culture peut ainsi être estimée grâce au calcul sur cette cellule de Malassez.

Le gravage vertical de la cellule de Malassez est composé d'une ligne isolée suivie de 5 groupes de 6 lignes. Les groupes de lignes sont espacés de 0,25 mm, et les lignes des groupes de 0,05 mm. Le gravage horizontal est constitué d'une ligne isolée suivie 5 groupes de 5 lignes. Les groupes de lignes sont espacés de 0,2 mm, et les lignes des groupes de 0,05 mm. La profondeur de la cellule est de 0,2 mm. L'ensemble du gravage est présenté en Figure 34.

On utilise pour compter :

- 25 périmètres de comptage de $0,2 * 0,25$ mm divisés en 20 carrés de 0,05 mm de côté, chaque périmètre ayant donc un volume de : $0,2 * 0,25 * 0,2 = 0,01 \text{ mm}^3$ soit 10^{-5} mL.
- La totalité de la cellule, soit 100 périmètres de comptage de $0,2 * 0,25$ mm, dont certains sont divisés horizontalement et/ou verticalement, d'autres non. Le volume total de la cellule est donc de $2 * 2,5 * 0,2 = 1 \text{ mm}^3$ soit 10^{-3} mL.

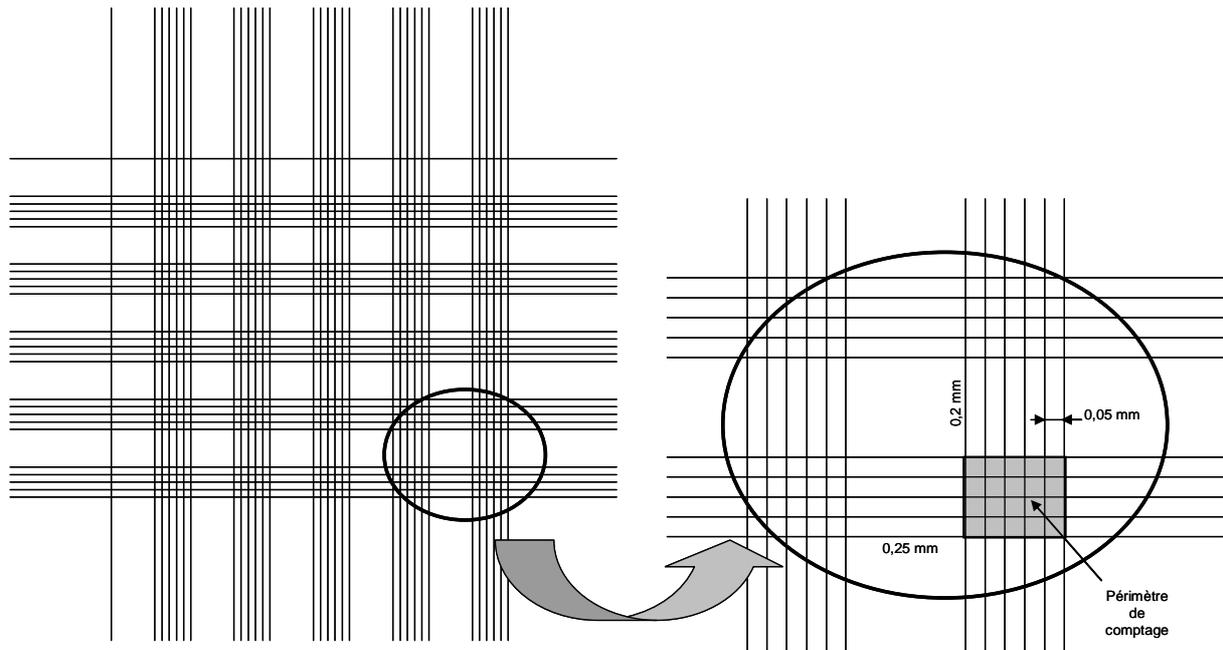


Figure 34 : Représentation du gravage sur la cellule de Malassez

1.4.2.2. Comptage

Selon la concentration et la taille des cellules, on choisit la surface sur laquelle on va dénombrer. Dans notre cas, on choisira un périmètre de comptage divisé en 20 petits carrés.

Afin de s'assurer d'un dénombrement efficace, un échantillon de 1 mL de suspension est prélevé. Une goutte de la suspension est alors déposée sur la cellule. Une lamelle est alors apposée et une attente de 15 – 20 minutes est nécessaire pour que toutes les cellules biologiques se retrouvent sur un même plan horizontal. Afin d'assurer une précision optimale, la suspension peut être diluée pour ne disposer que de 5 à 10 cellules microalgales par petit carré (soit 100 à 200 cellules microalgales par périmètre de comptage).

Le comptage s'effectue sur x périmètres (au minimum 5). Il permet de déterminer un nombre n de cellules microalgales, dont le nombre N de cellules par mL dans la suspension de départ est alors déduit par l'expression suivante :

$$N = \frac{n}{x} \times f \times 10^5 \quad (16)$$

- Où :
- N = le nombre de cellules par ml dans la suspension de départ
 - n = le nombre de cellules comptées dans les x périmètres de comptage
 - x = le nombre de périmètres de comptage utilisé
 - f = le facteur de dilution éventuel = V_f/V_i

1.4.3. Dosages des pigments (Chlorophylles a et b) et facteur de stress

Le dosage des pigments est réalisé par lecture spectrophotométrique après une extraction au méthanol. Un schéma de principe est proposé sur la Figure 35.

Un volume V_1 de culture est centrifugé pendant 5 minutes à 13400 tr.min⁻¹ (Minispin, Eppendorf). Le milieu est éliminé par aspiration à la pipette pasteur, puis un volume V_2 de méthanol est ajouté pour l'extraction des pigments. L'ensemble est ensuite isolé de la lumière pendant une durée d'une heure dans une étuve à 44°C.

À l'issue de l'incubation, les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 13400 rpm pour éliminer les débris cellulaires. La lecture au spectrophotomètre (Lambda 2S, Perkin Elmer) des absorbances du surnageant, après extraction au méthanol, aux longueurs d'onde suivantes est alors effectuée : 480 (pic d'absorption des caroténoïdes), 652 (chlorophylle b), 665 (chlorophylle a) et 750 nm (~ turbidité de la suspension).

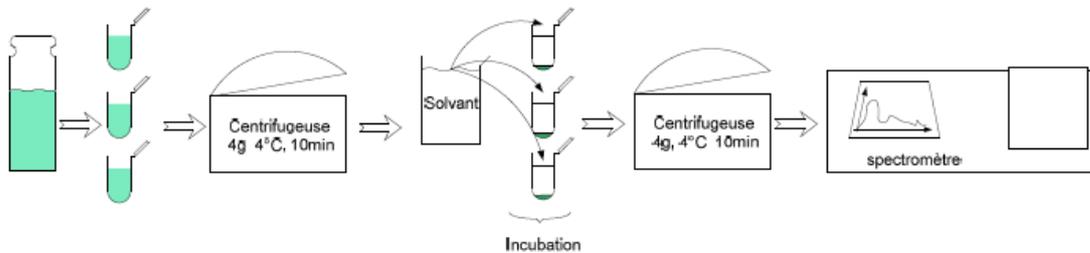


Figure 35 : Schéma de principe du dosage des chlorophylles A et B

Les concentrations en chlorophylles a et b, exprimées en mg.L⁻¹, sont déduites des absorbances mesurées par les relations suivantes [Ritchie 2006]:

Avec $V_1 = 0,5$ mL, $V_2 = 1,5$ mL et ℓ (trajet optique) = 1 cm

$$C_{\text{Chl}_A} = \left[-8,0962 \cdot (DO_{652} - DO_{750}) + 16,5169 \cdot (DO_{665} - DO_{750}) \right] \frac{V_2}{V_1 \cdot \ell} \quad (17, 18)$$

$$C_{\text{Chl}_B} = \left[27,4405 \cdot (DO_{652} - DO_{750}) - 12,1688 \cdot (DO_{665} - DO_{750}) \right] \frac{V_2}{V_1 \cdot \ell}$$

Pour des concentrations élevées en chlorophylles (>10 mg.L⁻¹), le protocole peut être simplifié en prélevant 0,25 mL (V_1) de suspension et en ajoutant directement 1,25 mL de méthanol (V_2) avant incubation, le reste de la procédure restant identique. On doit alors remplacer le facteur V_2/V_1 par $(V_1+V_2)/V_1$ dans les Équations 17 et 18.

Le rapport entre la DO_{480} et DO_{665} permet de définir un facteur de stress de la culture correspondant au rapport de production, par la cellule, de caroténoïdes ou de chlorophylles. En conditions normales, *Chlorella vulgaris* produit plus de chlorophylles que de caroténoïdes

et son facteur de stress (propre à cette souche) est inférieur à 0,75. Cela permet de suivre le bon déroulement de la culture cellulaire au cours du temps. Toute modification des conditions cultures optimales (carence en nutriments, contamination...) induit une hausse du facteur de stress.

1.4.4. Mesure de densité optique DO

Des mesures de densité optique (absorbance) ont été réalisées, sur la suspension microalgale directement et sans prétraitement, pour un suivi rapide de l'évolution de la culture. En effet, les chlorophylles absorbent majoritairement à 682 ± 4 nm et la turbidité relative de la suspension peut être estimée à 750 nm. Ainsi un spectrophotomètre (Lambda 2S, Perkin Elmer) a permis ces déterminations. Connaissant l'absorbance A_λ d'une suspension à une longueur d'ondes λ donnée, on en déduit la concentration par la loi de Beer – Lambert :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot \ell \cdot c \quad (19)$$

Avec ϵ = coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

ℓ = épaisseur de la cellule (cm)

c = concentration du soluté ($mol \cdot L^{-1}$)

L'absorbance est donc proportionnelle à la concentration. Cependant dès que la concentration est trop importante, l'absorbance ne lui est plus proportionnelle et des dilutions sont alors requises.

1.4.5. Courbes de corrélation

Afin de faciliter les essais et ne pas être contraint d'attendre certains résultats (la valeur en MS est obtenue 24 h après le début de la mesure), des courbes d'étalonnage ont été réalisées au fur et à mesure des cultures en reportant la valeur des mesures en pigments et de la DO_{682} en fonction de la valeur de MS. En effet compte tenu de la structure de la cellule, la teneur en chlorophylle contenue dans les membranes des thylakoïdes est globalement constante. Ainsi, plus la concentration en cellules est élevée, plus celle des chlorophylles a et b l'est également en proportion. Cela a permis de déterminer les coefficients de proportionnalité entre ces différents paramètres.

Ces corrélations ont été établies dans différentes situations, en particulier lors des remises en suspension des cellules dans les milieux modèles (paragraphe suivant). Ces corrélations ne sont valables que pour des concentrations en cellules inférieures à 0,4 g_{MS}/L car au-delà, une saturation de l'absorption à 682 nm apparaît.

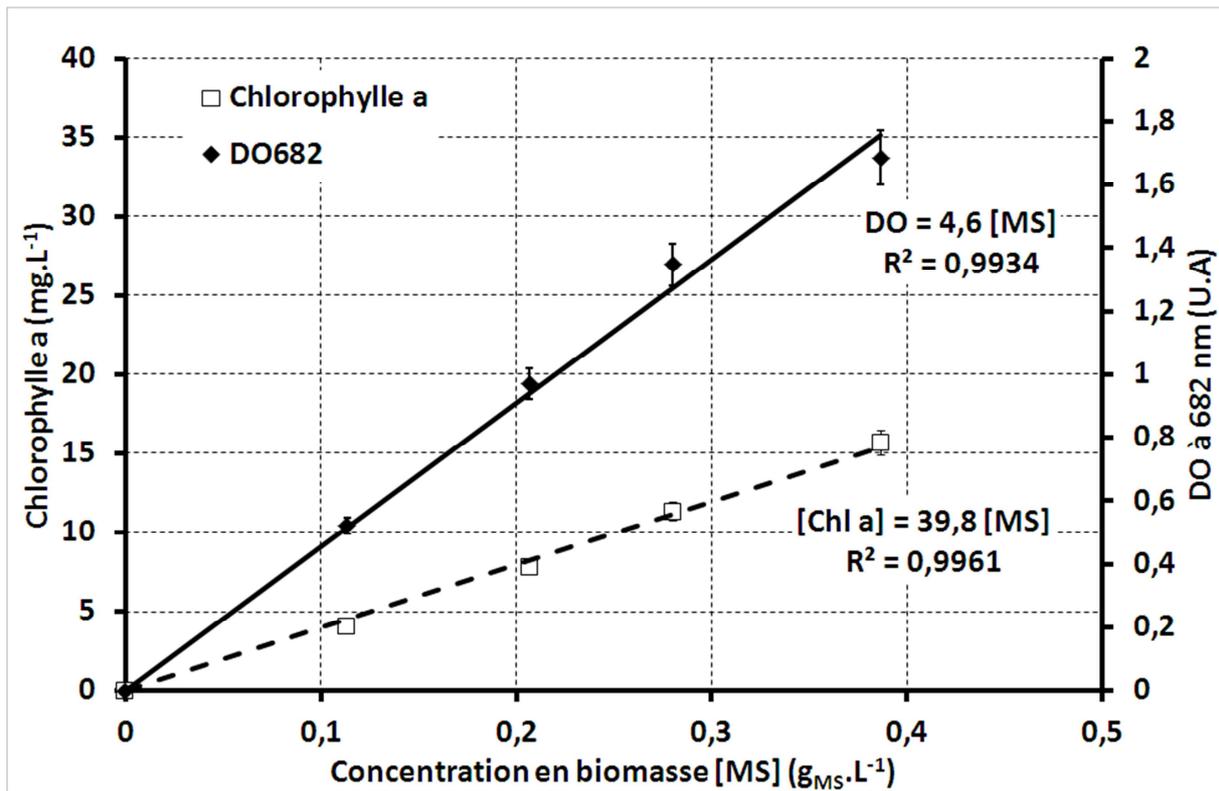


Figure 36 : Concentration en chlorophylle a et DO à 682 nm en fonction de la concentration en biomasse exprimée en $g_{MS} \cdot L^{-1}$ lors d'une culture en milieu BBM

2. Étude de la récolte de *Chlorella vulgaris* par floculation en milieu modèle et réel

2.1. Procédure de remise en suspension

Des milieux modèles élaborés à partir d'eau osmosée ou de sérum physiologique ont été utilisés pour déterminer les concentrations minimales requises pour faire flocculer *Chlorella vulgaris* dans des conditions de salinité différentes. Afin de s'affranchir de toute présence d'ions parasites en provenance du milieu de culture source, les cellules ont été récupérées par centrifugation et filtration, lavées, puis remises en suspension dans le milieu modèle devant être étudié suivant la procédure suivante :

- Prélèvement de 50 mL de suspension.
- Récupération des cellules par centrifugation ($6000 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 minutes, 10°C , centrifugeuse MIKRO 22R).
- Filtration sur cellule Amicon équipée d'un filtre Sartorius en Nitrate de Cellulose de seuil de coupure $1,2 \mu\text{m}$, à 1 bar. Afin d'éviter un colmatage trop rapide, la majeure partie du surnageant est filtré dans un premier temps. Puis, le culot est remis en

suspension dans le volume de surnageant restant et est ensuite versé dans la cellule de filtration.

- Rinçage avec soit de l'eau osmosée, soit du sérum physiologique selon que le milieu final sera de l'eau osmosée ou du sérum physiologique (3 rinçages consécutifs)
- Remise en suspension par trempage du filtre dans un volume de milieu récepteur identique au volume initial traité (50 mL), afin de conserver une concentration massique en cellules voisine de la concentration initiale en cellule. En cas de dilution, les cellules sont remises en suspension dans un volume plus important.

L'opération est renouvelée autant de fois que nécessaire pour disposer d'un volume de suspension suffisant pour les essais.

2.2. Solutions / suspensions utilisées

Les solutions suivantes ont été utilisées dans les différents essais effectués en milieux modèles ou réels :

- Sérum physiologique, NaCl : 8,5 g.L⁻¹
- Solution mère de MgSO₄, 7 H₂O : 50 g.L⁻¹ apport en Mg²⁺
- Solution mère de CaCl₂ : 50 g.L⁻¹ apport en Ca²⁺
- Solution mère de KH₂PO₄ : 50 g.L⁻¹ apport en PO₄³⁻
- Soude NaOH : 40 g.L⁻¹ (1N)

2.3. Protocole opératoire des essais de floculation et caractérisations associées

2.3.1. Détermination des concentrations minimales en sels nécessaires à la décantation en milieu modèle et réel

Ces essais ont pour objectif d'estimer les concentrations minimales en ions (Mg²⁺, ou Ca²⁺ et PO₄³⁻) nécessaires à une floculation efficace. Ils sont effectués dans un premier temps dans des solutions modèles contenant un ou deux sels, puis dans les milieux de culture réels. Dans toutes les situations, la température est comprise entre 23 et 25°C.

En milieu modèle, les cellules sont récoltées à l'issue de la culture continue puis remises en suspension dans le milieu souhaité (eau osmosée, sérum physiologique...) selon le protocole établi précédemment (cf. § 2.1.). Puis, un volume de solution mères de sels (cf. § 2.2.) est ajouté afin d'atteindre la concentration en sels souhaitée. Après un temps d'homogénéisation d'environ 10 minutes, le pH est alors augmenté par ajout de soude 1 N jusqu'à une valeur de 11,8 sous agitation constante. Cette valeur a été choisie pour s'assurer

que la totalité des composés de phosphates de calcium et/ou de magnésium ait précipité. La suspension est alors disposée dans une éprouvette pour suivre la décantation.

La qualité de la floculation est évaluée en déterminant son efficacité (cf. § 2.3.3.2) ainsi que la cinétique de sédimentation. La quantité minimale en sels jugée nécessaire est celle correspondant à une efficacité de séparation supérieure à 80 %.

En milieu réel, les cellules microalgales sont récupérées à l'issue de la culture continue et les concentrations en sels sont directement ajustées dans les volumes d'essai à l'aide des solutions mères avant la remontée artificielle du pH à la soude.

Dans les deux situations, l'éclaircissement de la suspension (e) en cours de décantation est suivi par un capteur photovoltaïque placé à 5 cm sous la surface (Figure 37), et permet d'évaluer en temps réel la cinétique de décantation. L'éprouvette contenant la suspension microalgale en cours de décantation est disposée face à un panneau lumineux identique à celui permettant la culture (LED blanches). Lorsque les cellules décantent dans l'éprouvette, la solution s'éclaircit et l'intensité lumineuse reçue par le capteur augmente. Ainsi, la mesure régulière de la tension aux bornes du capteur permet de suivre, de manière qualitative, cette vitesse de décantation des cellules pour une position donnée du capteur et de détecter des différences selon les conditions opératoires.

Toutefois, elle ne renseigne pas sur la qualité et la quantité des floes formés ni sur leur densité. Il ne faudra donc pas confondre l'efficacité de la décantation E , mesure finale après décantation, et l'éclaircissement de la suspension e , mesure en temps réel.

La durée des expériences est limitée à 20 minutes, durée qui semble suffisante pour atteindre un état quasi stable dans l'éprouvette, pour toutes les expériences. La valeur de e en fin d'essai est notée $e_{20 \text{ min}}$.

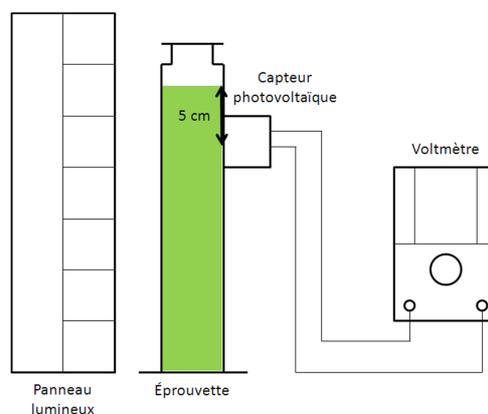


Figure 37 : Schéma expérimental des essais de remontée artificielle du pH.

2.3.2. Récolte par floculation associée à la remontée naturelle du pH

Ces essais ont pour but de déterminer les conditions requises pour réaliser une bonne floculation par remontée naturelle du pH résultant de la photosynthèse et du strippage du CO₂ par l'air de bullage. Les essais ont porté sur l'influence de la source azote dans le milieu et sur la concentration en ions Ca²⁺ ou Mg²⁺.

Dans un premier temps, les cellules sont récoltées puis laissées sous une intensité lumineuse importante (500 μmol_{photons}.m⁻².s⁻¹) afin de vérifier si la montée naturelle du pH et la floculation sont possibles dans le milieu de culture étudié (Figure 38). Lorsqu'il a été constaté que la floculation ne pouvait avoir lieu avec les concentrations en Ca²⁺ ou en Mg²⁺ initiales, des apports ont été effectués en ajoutant un certain volume de la solution-mère de l'ion considéré. La suspension est ensuite fortement agitée (agitateur magnétique) pendant 10 minutes et l'éprouvette exposée à la lumière pour permettre l'élévation de pH.

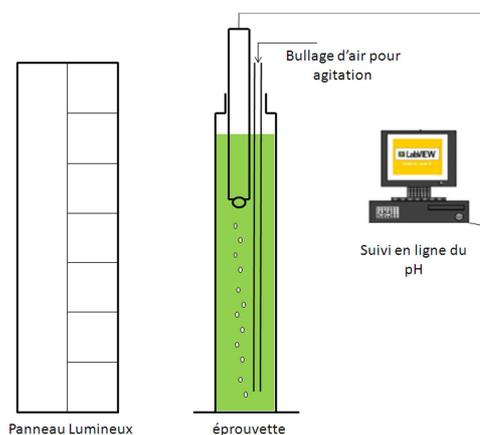


Figure 38 : Schéma expérimental des essais de remontée naturelle du pH.

2.3.3. Caractérisations de la décantation par floculation

2.3.3.1. Caractérisation de la suspension initiale

À chaque essai, les valeurs de la chlorophylle a, les densités optiques (DO) à 682 nm (pic absorption des chlorophylles) et à 750 nm (~ turbidité de la suspension), le nombre de cellules et la concentration en matières sèches sont mesurés selon les procédures décrites précédemment.

Les valeurs de pH et DO sont mesurées simplement à l'aide d'une sonde pH-métrique et d'un spectrophotomètre.

2.3.3.2. Efficacité de la séparation et concentration en cellules dans les floccs

Après manipulation, la fraction flocculée est récupérée par l'intermédiaire d'une ampoule à décanter et son volume est mesuré dans une éprouvette graduée de faible volume.

Les performances de la floculation sont évaluées par l'intermédiaire d'un critère qualitatif, l'efficacité de la séparation E, et d'un critère quantitatif, la concentration estimée des cellules dans les floccs C_f .

L'efficacité de la séparation E est évaluée par le biais du pourcentage de cellules éliminées après 20 minutes et déterminée par mesure de la DO à 682 nm (ou 750 nm) sur le surnageant homogénéisé après la récupération de la fraction flocculée :

$$E_{682\text{nm}} = \frac{DO_{682i} - DO_{682s}}{DO_{682i}} \quad (20)$$

Où DO_{682i} et DO_{682s} sont respectivement les absorbances de la suspension initiale et du surnageant après décantation.

Étant donné que dans la gamme de concentration en cellules étudiée la densité optique est proportionnelle à la concentration en matières sèches (cf. § 1.4.5), l'Équation 20 devient :

$$E = \frac{C_i - C_s}{C_i} \quad (21)$$

Ensuite, en considérant qu'une fraction importante de cellules se retrouvent dans la zone de volume V_f , la concentration en cellules dans les floccs C_f ($\text{g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$) peut être estimée à partir de l'efficacité par bilan matière entre la suspension initiale d'une part et les agrégats et le surnageant obtenus à l'issue de la floculation d'autre part (Figure 39) :

$$C_f = C_i + \frac{(V_i - V_f)}{V_f} \cdot C_i \cdot E \quad (22)$$

Où V_i est le volume initial de la suspension (mL)

V_f est le volume occupée par les floccs (mL) (généralement $V_f \ll V_i$)

C_i est la concentration initiale en $\text{g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$

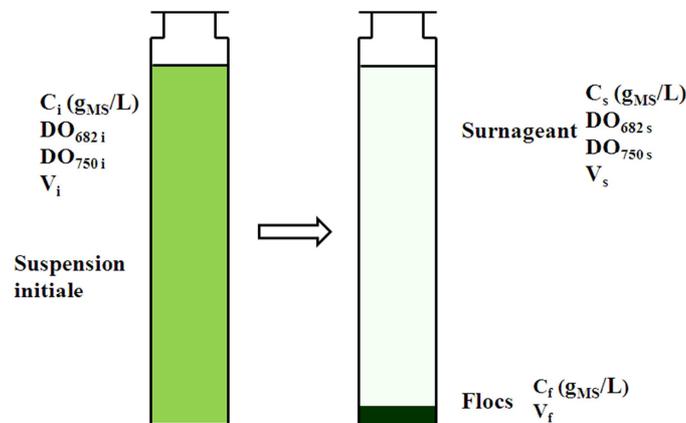


Figure 39 : Définition des fractions obtenues après décantation

2.3.3.3. Caractérisation du surnageant

Le surnageant sera caractérisé par des mesures de DO, par le comptage du nombre de cellules et par son pH. Compte tenu de leur faible teneur, la mesure des pigments dans les surnageants est impossible.

2.3.3.4. Suivi des consommations en sels du milieu de culture lors de la floculation par chromatographie ionique

La chromatographie ionique est basée sur l'échange d'ions pour la partie séparative et sur la conductimétrie pour la détection. La solution à analyser contenant divers anions et cations est injectée dans une colonne de chromatographie contenant une phase stationnaire constituée soit d'une résine chargée positivement (pour retarder et échelonner la sortie des anions) soit d'une résine chargée négativement (pour les cations). Un suppresseur chimique est utilisé pour éliminer la contribution liée à l'éluant et optimiser le signal des ions étudiés (Figure 40).

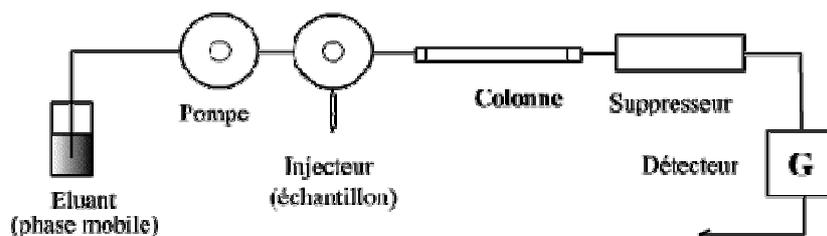


Figure 40 : Principe de fonctionnement d'un chromatographe ionique

Dans cette étude, les cations ont été analysés par un équipement Dionex ICS 1100 équipé d'une pré-colonne CG16 (5 x 50 mm) et d'une colonne de séparation CS16 (5 x 250 mm). L'éluant cationique est une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 à 18 mM d'un débit égal à 1,25 mL/min. Pour les anions, l'équipement utilisé est un Dionex ICS 900 équipé d'une pré-colonne AG9-HC (4 x 50 mm) et d'une colonne de séparation AS9-HC (4 x 250 mm). La solution éluante est un mélange de carbonate et de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3 ; $NaHCO_3$), respectivement à 7,2 mM et 1 mM, et d'un débit égal à $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Les ions sont ensuite détectés par conductimétrie et le suivi est géré par un logiciel informatique dédié (Chromoléon).

Les dérives éventuelles dans la précision des mesures sont détectées en injectant chaque jour une solution contenant tous les ions dosés avec une concentration située au milieu des gammes d'étalonnage. Lorsque la déviation est trop importante, l'appareil est ré-étalonné. La déviation mesurée pour chaque ion le jour des dosages est prise comme estimation de l'incertitude expérimentale.

2.3.3.5. Évolution de la charge superficielle des cellules par zêtamétrie

La mesure de ce paramètre permet de caractériser la stabilité d'une suspension de particules et en particulier en floculation. Généralement, les particules en suspension, notamment d'origine biologique, sont chargées négativement (sauf en milieu très acide) du fait de leur composition membranaire et de l'ionisation de certains de leurs groupements fonctionnels qui confèrent à la suspension sa stabilité du fait des répulsions électrostatiques. La suspension prend alors des caractéristiques similaires à celles des suspensions colloïdales.

Le potentiel zêta est généralement utilisé pour caractériser cette charge globale de surface portée par les cellules. La détermination de ce potentiel est basée sur la mesure de la mobilité électrophorétique μ_e des particules. Quand une particule est soumise à un champ électrique, elle atteint presque instantanément une vitesse de déplacement telle qu'il y ait un équilibre entre la force électrique motrice et le frottement résistant dû à la viscosité du milieu. Expérimentalement, il a été montré que cette vitesse v des particules est proportionnelle au champ électrique E appliqué (Hunter, 2001), le coefficient de proportionnalité correspondant à la mobilité électrophorétique μ_e .

Dans le cas de particules sphériques, les valeurs de μ_e et de ζ sont reliées via la formule de Henry (1931) :

$$\mu_e = \frac{2}{3} \cdot \frac{\varepsilon_m \cdot \zeta}{\mu} \cdot f(\kappa a) \quad (23)$$

Où : μ_e est la mobilité électrophorétique ($m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)

ε_m est la permittivité relative (= constante diélectrique) du milieu (sans dimension)

μ est la viscosité dynamique du milieu (Pa.s)

ζ est le potentiel zêta (V)

κa est le rapport entre le rayon de la particule et l'épaisseur de la double couche

$f(\kappa a)$ est une fonction dépendant de la forme de la particule, comprise entre 1 et 1,5.

Si l'on considère que le rayon de la particule est grand devant l'épaisseur de la double couche (ce qui est le cas pour les cellules microalgales), $\kappa a \gg 1$, $f(\kappa a)$ vaut 1,5 et μ_e s'exprime selon l'expression de Smoluchowski (1921) :

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_m \cdot \zeta}{\mu} \quad \text{d'où} \quad \zeta = \frac{\mu \cdot \mu_e}{\varepsilon_m} \quad (24)$$

Dans le cas inverse où l'épaisseur de la double couche est nettement supérieure au rayon de la particule, μ_e est donnée par la relation de Hückel (1924) :

$$\mu_e = \frac{2}{3} \cdot \frac{\epsilon_m \cdot \zeta}{\mu} \quad \text{d'où} \quad \zeta = \frac{3}{2} \cdot \frac{\mu \cdot \mu_e}{\epsilon_m} \quad (25)$$

L'équipement utilisé pour effectuer ces mesures est un Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA). Un mL de suspension est introduit dans une cuvette spéciale pour la mesure (Figure 41). La mesure de la mobilité est effectuée 30 fois afin d'accroître la fiabilité du résultat calculé par le logiciel. Chaque évaluation pour un échantillon donné est répétée trois fois.



Figure 41 : Illustration du Zetasizer Nano ZS et des cuvettes de mesure

Le Tableau 16 permet d'évaluer les différentes valeurs de ce potentiel dans les différents milieux modèles ou réels à pH 7. Il a également pu être observé en variant le pH de 2 à 12, que le potentiel zêta de *Chlorella vulgaris*, lié aux groupements fonctionnels (-COOH ; -NH₂ ; -HPO₄...) présents à la surface des cellules, s'annulait pour un pH compris entre 2 et 3.

Tableau 16 : Variation de la valeur du potentiel zêta de *Chlorella vulgaris* en fonction du type de milieu à pH7

	Conductivité (mS.cm ⁻¹)	ζ (mV)
Milieu Sueoka	0,949	-26,6
Sérum physiologique	15,7	-14,4
Eau osmosée	0,111*	-34,3

* bien qu'une eau osmosée doit avoir une conductivité quasiment nulle, cette valeur de conductivité est liée à la légère présence de NaOH pour assurer la valeur de pH à 7.

La triple répétition d'un point de mesure, lors des évolutions du potentiel zêta en fonction du pH pour les différents milieux modèles testés, a mis en évidence une incertitude expérimentale maximale de 11 %. Ainsi, cette incertitude sera conservée pour l'ensemble des mesures de ce potentiel.

2.3.3.6. Analyse des floccs au microscope électronique à balayage (MEB) et microanalyses à rayons X (EDX)

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie utilisant le principe des interactions électron-matière. Le faisceau du microscope est ici un faisceau d'électrons (et non un faisceau lumineux comme dans le cas d'un microscope optique) qui vient impacter la matière que l'on cherche à observer. Cette interaction provoque une réémission de particules ou de rayonnement (électrons secondaires, rétrodiffusés, Auger ou rayons X) qui permet d'identifier les éléments chimiques de la matière constituant l'échantillon analysé et d'en établir une image. Un schéma de principe est proposé ci-dessus (Figure 42).

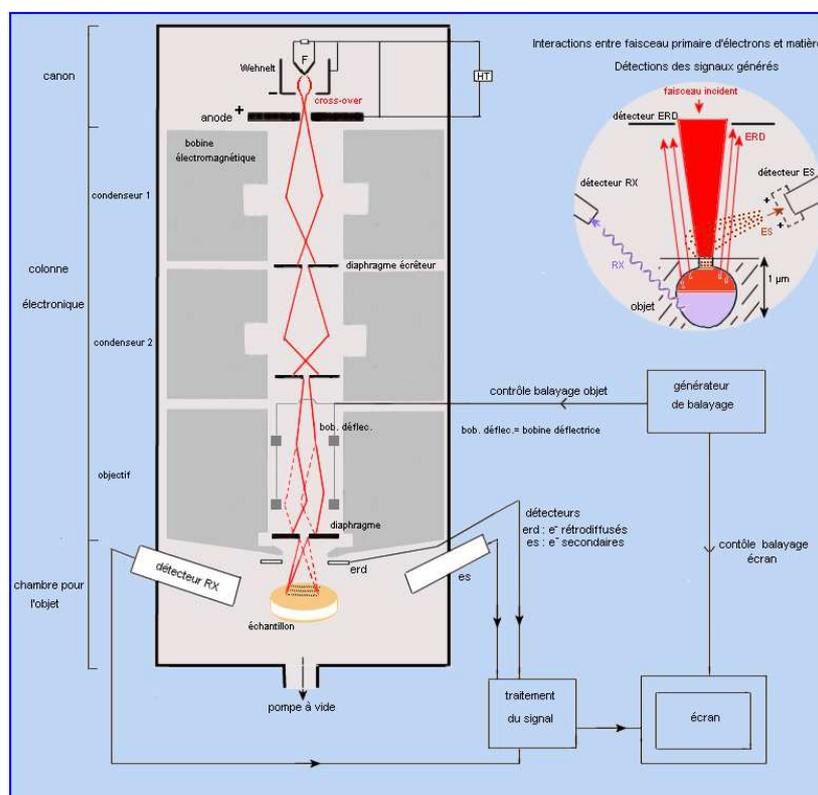


Figure 42 : Schéma de principe de la microscopie électronique à balayage

(<http://jean-jacques.auclair.pagesperso-orange.fr/meb/meb.htm>)

Le modèle utilisé au cours de cet étude est le Carl Zeiss AG - EVO® 40 Series. Il dispose d'une précision de 3 à 4,5 nm en fonction du mode de balayage et peut permettre un grossissement jusqu'à 1 000 000x.

Cette technique a été mise en œuvre pour observer les floccs obtenus après décantation dans les différentes configurations d'essais. Les échantillons sont produits juste avant

l'observation. Un traitement par microdépôt d'or est réalisé pour rendre l'échantillon conducteur avant une observation sous vide très élevé (10^{-3} Pa) permettant ainsi la microanalyse à rayons X et l'obtention de meilleures résolutions d'images jusqu'à des grossissements de 20 000 x.

Compte tenu de la forte teneur en eau, les échantillons ont également pu être observé sous vide modéré (10 Pa) en mode environnemental (ESEM). Les images obtenues sont ici de moins bonne facture et ce type d'observation a rapidement été abandonné.

3. Étude de la récolte de *Chlorella vulgaris* par séparation membranaire

3.1. Modules membranaires

Une cellule agitée (Millipore), un module de filtration tangentielle (Rayflow) et un module de filtration dynamique (prototype Université de Technologie de Compiègne – Durussel Montage Industriel, France) ont été utilisés dans cette étude.

3.1.1. Cellule Amicon

Pour les essais nécessitant une remise en suspension des cellules microalgales, une séparation par membrane a été réalisée en cellule Amicon agitée (Modèle 8050, référence 5122, Millipore, France), de volume 50 mL, dans laquelle la filtration est majoritairement frontale (bien que cette cellule soit munie d'une agitation douce par barreau aimanté, minimisant les dépôts).

Des membranes de nitrate de cellulose de $1,2 \mu\text{m}$ de taille de pores (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Allemagne) circulaires, de surface égale à 16 cm^2 ont été utilisées pour récupérer les cellules. Un rinçage des cellules (3 fois le volume filtré) est effectué avant de disposer les filtres dans le milieu testé pour resuspendre les cellules.

Un schéma du dispositif est présenté ci-dessous (Figure 43):

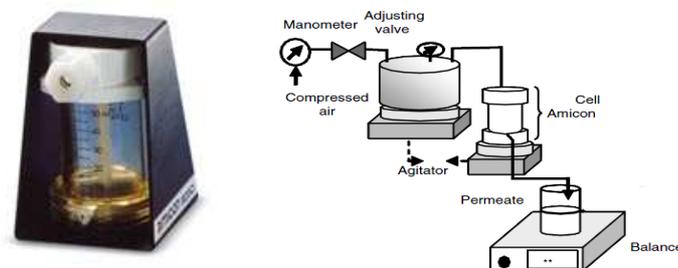


Figure 43 : Photo et dispositif expérimental de la cellule Amicon

3.1.2. Module de filtration tangentielle plan Rayflow

Le module de filtration tangentielle utilisé dans les tests de filtration est un module Rayflow 100 (Pleiade Rayflow 100, Orelis Environnement, France).



Figure 44 : Montage expérimental du module de filtration tangentielle Rayflow

La membrane est disposée à l'intérieur de ce module et un joint en caoutchouc permet l'étanchéité. Elle a pour dimension 17,2 cm de longueur et 7,7 cm de largeur, soit une surface totale de 133 cm².

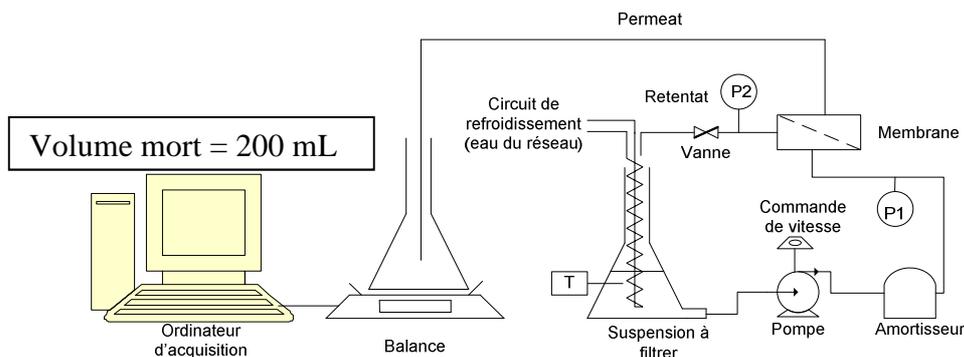


Figure 45 : Schéma du montage expérimental

La vitesse de circulation du fluide à l'intérieur du module est contrôlée par une pompe péristaltique (Masterflex 77600-62 équipée d'un tuyau Masterflex silicone Platinum T70, Cole Parmer Instrument Company, USA). De par la surface offerte à l'écoulement, une relation entre le débit et la vitesse existe telle que pour un débit de 150 L.h⁻¹, la vitesse interne vaut 1 m.s⁻¹. La relation générale reliant v à Q est donc :

$$v \text{ (m.s}^{-1}\text{)} = \frac{Q \text{ (L.h}^{-1}\text{)}}{150} \quad (26)$$

La vitesse maximale atteignable dans ce module est de 3 m.s⁻¹. Toutefois, à cette vitesse, la perte de charge engendrée devient non négligeable (> 0,2 bar), limitant ainsi les vitesses opératoires en deçà de 2 m.s⁻¹.

Le taux de cisaillement moyen est alors obtenu par la relation suivante [Delaunay *et al.* 2008]:

$$\dot{\gamma} (s^{-1}) = \frac{8.v}{e} \quad (27)$$

Où v est la vitesse débitante dans le module ($m.s^{-1}$)
 e est l'épaisseur interne du module (m ; ici $e = 0,5 \text{ mm}$)

La vanne de régulation de pression permet d'ajuster la pression transmembranaire (PTM). La PTM est donnée par :

$$PTM = \frac{P_1 + P_2}{2} - P_f \quad (28)$$

Où P_1 et P_2 sont les pressions mesurées en entrée et sortie du module (bar)
 P_f est la pression côté filtrat (bar ; considérée égale à la pression atmosphérique)

Un serpentin en verre alimenté par de l'eau froide permet de réguler la température dans le circuit.

3.1.3. Module de filtration dynamique à disque rotatif

Le module à disque rotatif (prototype Université de Technologie de Compiègne – Durussel Montage Industriel, France) utilisé dans ce travail, représenté sur la Figure 46, a été décrit en détails par Bouzerar *et al.* (2000).

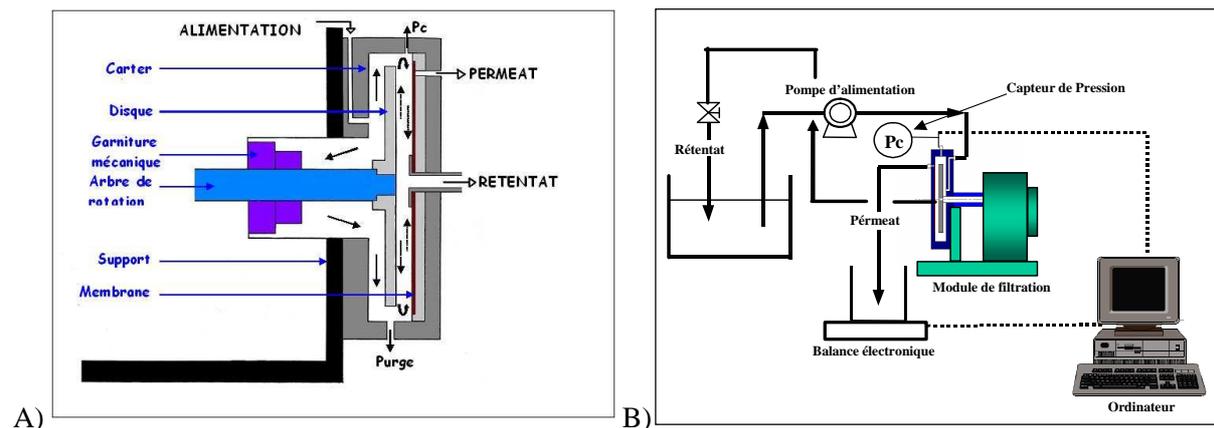


Figure 46 : Schéma de principe (A) et montage expérimental (B) du module à disque rotatif

Il est équipé d'une membrane circulaire unique ayant une surface de 188 cm^2 (rayon extérieur = $7,75 \text{ cm}$; rayon intérieur = $0,5 \text{ cm}$). La membrane est montée sur le couvercle du

boîtier cylindrique en face du disque. L'écart axial entre la membrane et le disque est d'environ 8 mm.

Le disque est fixé sur un arbre rotatif qui est relié par une courroie à un moteur électrique. Sa vitesse de rotation est réglable et peut aller de 100 à 2500 tr.min⁻¹. Le disque peut être lisse ou équipé de huit ailettes de 6 mm afin d'augmenter le facteur de vitesse (k) du disque. Ce paramètre traduit la capacité du disque à entraîner la rotation du fluide, *i.e.* plus ce facteur est élevé et plus la vitesse angulaire du fluide se rapproche de celle du disque. Les valeurs de facteur de vitesse k ont été obtenues à partir des mesures de pression périphérique P_c à des vitesses différentes. Des valeurs de 0,42 et 0,89 ont été trouvées respectivement pour un disque lisse et pour un disque équipé d'ailettes [Frappart *et al.* 2006].

Compte tenu de la géométrie cylindrique du module, de la vitesse de rotation disque et de sa capacité d'entraînement, les vitesses tangentielles maximales pouvant être atteintes à la surface de la membrane sont de l'ordre de 25 m.s⁻¹. Il est à noter qu'en filtration dynamique, la vitesse tangentielle peut être réglée indépendamment du débit, contrairement à la filtration tangentielle classique.

Le taux de cisaillement sur la membrane fixe dans l'écoulement turbulent est donné par [Frappart *et al.* 2006]:

$$\dot{\gamma}(r) = 0,0296 \cdot r^{8/5} \cdot (k\omega)^{9/5} \cdot \nu^{-4/5} \quad (29)$$

Où, $\dot{\gamma}$, taux de cisaillement (s⁻¹),

r, rayon (m),

k, facteur de vitesse,

ω , vitesse angulaire (rad.s⁻¹) du disque rotatif,

ν , viscosité cinématique (m².s⁻¹) du fluide ou de la suspension traitée.

Lorsque le rayon du disque est maximal (r = R = 7,25 cm), le taux de cisaillement est maximum et l'intégration de l'équation 29, sur la surface de la membrane, donne accès à la valeur du taux de cisaillement moyen [Bouzerar *et al.* 2000 ; Brou *et al.* 2002] :

$$\begin{aligned} \dot{\gamma}_{\max} &= 0,0296 \cdot R^{8/5} \cdot (k\omega)^{9/5} \cdot \nu^{-4/5} \\ \dot{\gamma}_{\text{moy}} &= 0,0164 \cdot R^{8/5} \cdot (k\omega)^{9/5} \cdot \nu^{-4/5} \end{aligned} \quad (30)$$

Les vitesses maximale et moyenne (moyenne sur la surface de la membrane) du fluide à la membrane sont déduites par :

$$v_{\max} = (k\omega) \cdot R$$

$$v_{\text{moy}} = \frac{2}{3} \cdot v_{\max} \quad (31)$$

La PTM est ajustée en agissant sur une vanne de contre-pression située sur le tube de sortie rétentat. La valeur de la PTM est déterminée par l'équation 30, avec R_c , rayon maximal du carter (7,75 cm), où P_c (Pa) correspond à la pression mesurée à la périphérie du disque.

$$PTM = P_c - \frac{1}{4} \cdot \rho \cdot (k \cdot \omega \cdot R_c)^2 \quad (32)$$

3.1.4. Membranes testées

Lors des essais de séparation par membranes, deux types de matériaux ont été utilisés et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 17: Caractéristiques des membranes utilisées

Référence Commerciale	Seuil de coupure	Matériau	Lp (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)
IRIS 3038 (Novasep, Orelis Environnement, France)	40 kDa	PAN	400
MP005 (Microdyn Nadir®, Allemagne)	0,05 µm	PES	1200

La figure suivante montre la structure chimique des membranes utilisées :

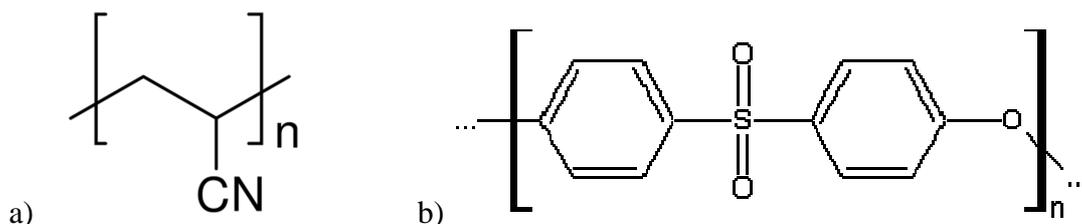


Figure 47: Formule chimique du PolyAcryloNitrile (PAN) (a) et du PolyEtherSulfone (PES) (b)

3.2. Protocole opératoire des essais de séparation membranaire et caractérisations associées

3.2.1. Récolte par séparation membranaire

Pour ces essais, les cultures utilisées furent celles issues du scobalite. Les procédures d'essai étaient similaires sur les deux modules (Rayflow et filtration dynamique), avec en particulier un contrôle permanent de la température :

- Installation de la membrane, et rinçage à l'eau déminéralisée pendant une heure en légère filtration (PTM = 0,05 - 0,1 bar).
- Après vidange du circuit, mesure de la perméabilité à l'eau osmosée.
- Vidange du circuit et alimentation de la suspension à filtrer au débit souhaité (notamment pour le module Rayflow puisque le débit conditionne la vitesse tangentielle à la membrane).

Pour les essais de détermination des conditions optimales de filtration, chaque membrane est testée par une montée en pression par palier de 0,1 bar.

- Après mise sous une pression donnée, attente de la stabilisation du flux avec recyclage total du perméat.
- Au flux stabilisé, augmentation de la pression d'un palier.
- Dès que le flux limite est atteint, la manipulation s'achève.

Ce type d'essai permet de définir la pression optimale de fonctionnement. Cette pression correspond à la pression maximale pour laquelle l'évolution du flux de perméat demeure linéaire avec la pression imposée.

Pour les essais de montée en concentration :

- Après montée à la pression optimale déterminée précédemment par action sur la vanne de contre-pression présente sur les deux circuits, attente de la stabilisation du flux avec recyclage total du perméat.
- Dès que le flux est stable, le facteur de concentration augmente par soutirage du perméat.
- À l'issue de la manipulation, rinçage à l'eau du réseau et mesure de la perméabilité.

À l'issue des expérimentations, un nettoyage chimique à la soude 1 N, 50°C, sans pression, est réalisé pendant une heure. Après rinçage du circuit, et retour à un niveau de pH normal (~ 7), le circuit est de nouveau alimenté par de l'eau déminéralisée afin mesurer pour évaluer la capacité de la membrane à être nettoyée.

3.2.2. Dosage des sucres totaux

La production d'exopolysaccharides est un indicateur de stress cellulaire. Ainsi, pour évaluer l'impact du module de filtration dynamique sur les cellules, la teneur en polysaccharides dans les divers échantillons est estimée par la méthode de Dubois (1956). C'est une méthode colorimétrique qui permet la détermination de la teneur en glucides totaux après hydrolyse acide. Le principe de la méthode repose sur la réaction des sucres et de leurs dérivés, qui forment du furfural ou de l'hydroxyméthylfurfural en présence d'acide sulfurique concentré et de phénol. L'intensité de la coloration jaune, qui en résulte, est ensuite quantifiée par spectrophotométrie à 485 nm.

Une gamme étalon est préalablement établie avec une solution de glucose à 1 g.L⁻¹ (concentration allant de 0 à 0,08 g.L⁻¹; au-delà, la linéarité entre l'absorbance et la concentration en sucre n'est plus respectée)

4. Références bibliographiques

- Bouzerar R., Ding L., Jaffrin M.Y., Local permeate flux–shear–pressure relationships in a rotating disk microfiltration module: implications for global performance, *Journal of Membrane Science* 170 (2000) 127–141.
- Delaunay D., Rabiller-Baudry M., Gozalvez-Zafrilla J.M., Balannec B., Frappart M., Paugam L., Mapping of protein fouling by FTIR-ATR as experimental tool to study membrane fouling and fluid velocity profile in various geometries and validation by CFD simulation, *Chemical Engineering and Processing* 47 (2008) 1106–1117.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry* 28 (1956) 350-356
- Frappart M., Akoum O., Ding L. H., Jaffrin M. Y., Treatment of dairy process waters modelled by diluted milk using dynamic nanofiltration with a rotating disk module, *Journal of Membrane Science* 282 (2006) 465–472.
- Geffard O. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires, Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 1, 2001.
- Hunter R. J., Measuring zeta potential in concentrated industrial slurries, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 195 (2001) 205–214.
- Hutner S.H., Provasoli L., Schatz A., Haskins C.P., Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms, *Proceedings of the American Philosophical Society* 94 (1950), 152–170.
- Ritchie R. J., Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents, *Photosynthetic Research* 89 (2006) 27–41.

**CHAPITRE 3 : RÉCOLTE DE
MICROALGUES PAR
FLOCCULATION DÉCANTATION
ASSOCIÉE À LA REMONTÉE
NATURELLE OU ARTIFICIELLE DU
pH**

Ce chapitre est consacré à l'étude de la récolte de *Chlorella vulgaris* par floculation naturelle sans ajout de coagulant/floculant. Pour rappel, la floculation par la remontée naturelle du pH liée à la photosynthèse et / ou du strippage du carbone inorganique dissous par le bullage est un phénomène connu pour les souches marines. Cette floculation résulte de la précipitation de composés salins à partir des ions présents dans le milieu de culture en quantités importantes, Mg^{2+} en particulier, par sursaturation liée à l'élévation du pH. L'objectif ici est de s'intéresser à ce phénomène pour cette souche d'eau douce, d'en déterminer les conditions requises pour réaliser cette floculation et d'évaluer son efficacité en tant que procédé de récolte.

1. Floculation artificielle par remontée du pH à la soude

La littérature met en évidence l'importance de la composition du milieu sur sa capacité et son efficacité à flocculer des microalgues. Ainsi, Cao *et al.* (2007) ont montré que la précipitation de composés de phosphates de calcium (notamment l'hydroxyapatite HAP $Ca_5(PO_4)_3OH$) était inhibée par la présence de plusieurs types de composés, notamment l'ion magnésium Mg^{2+} ou les acides humiques, et dans une moindre mesure, les ions sulfates SO_4^{2-} ou la silice. En effet, soit leur incorporation dans le précipité des HAP empêche la formation d'une structure cristalline propre, soit ces composés (acide humique surtout) s'adsorbent sur les noyaux cristallins en formation et donc limitent ensuite leur croissance.

De façon similaire, Duan & Gregory (2003) ont discuté les effets des anions sur la coagulation par les sels d'aluminium trivalent. Ces auteurs ont montré que les ions nitrate NO_3^- ont peu d'influence mais que les ions sulfate SO_4^{2-} , bicarbonate HCO_3^- ou chlorure Cl^- ont des effets considérables. À l'instar de l'aluminium, le calcium et le magnésium ont également la propriété de s'hydrolyser, bien qu'en plus faible proportion que l'aluminium, et des effets similaires pour la floculation dans les milieux de culture de microalgues ne peuvent être exclus.

La bibliographie a particulièrement mis en évidence les rôles du magnésium Mg^{2+} , du calcium Ca^{2+} et des phosphates PO_4^{3-} . Ce sont donc ces entités qui vont être investiguées dans la suite de ces travaux.

Dans un premier temps, la floculation va être réalisée dans des milieux modèles afin de vérifier quels types d'ions peuvent permettre d'engendrer la floculation, et en quelle concentration. Le premier milieu modèle sera l'eau osmosée (force ionique FI nulle) et le second du sérum physiologique (FI = 0,35 mol/L) afin de tester l'influence de la force ionique du milieu.

Dans un deuxième temps, les essais seront réalisés sur les milieux de culture réels afin d'évaluer l'effet de la présence des éléments et microéléments nécessaires à la croissance des microalgues en plus des composés pouvant précipiter.

Tableau 18 : Plan des essais de floculation chimique avec remontée rapide du pH par ajout instantanée de soude (1N)

§	Milieu	N° essai	Concentration (mg.L ⁻¹)			Ratio molaire Ca ²⁺ / PO ₄ ³⁻	Floculation (e _{20 min}) ⁽⁷⁾	E (%)	
			Mg ²⁺	Ca ²⁺	PO ₄ ³⁻			682 nm	750 nm
1.1.1	EO ⁽⁵⁾	1	11,84				-	-	22
		2	13,82				oui (70 %)	-	80
		3	19,73				oui (78 %)	-	82
		4	29,60				oui (81 %)	-	92
		5	49,35				oui (100 %)	-	94
1.1.2	<i>id.</i>	6		54,4	34,9	3,70	oui (66 %)	-	79
		7		27,2	69,8	0,93	-	-	-
		8		54,4	<i>id.</i>	1,85	-	-	12
		9		136,1	<i>id.</i>	4,63	oui (77 %)	-	88
		10		<i>id.</i>	209,4	1,54	oui (80 %)	-	99
1.2.1	SP ⁽⁶⁾	11	4,93				-	-	-
		12	9,86				oui (71 %)	80	78
		13	14,79				oui (72 %)	90	89
		14	19,72				oui (80 %)	91	90
		15	24,66				oui (91 %)	92	91
1.2.2	<i>id.</i>	16		40,8	17,5	5,54	faible (21 %)	-	-
		17		<i>id.</i>	39,4	2,46	oui (70 %)	81	80
		18		54,4	7	18,46	faible (32 %)	-	-
		19		<i>id.</i>	8,7	14,85	oui (61 %)	81	79
		20		<i>id.</i>	17,5	7,38	oui (69 %)	81	80
		21		<i>id.</i>	34,9	3,70	oui (81 %)	91	88
1.3.1	Sueoka	22	14 - 48				oui ⁽⁴⁾	86-89	84-86
	BBM ⁽¹⁾	23	32 - 68				oui ⁽⁴⁾	87-90	86-89
	Sueoka	24		6,8-102			oui ⁽⁴⁾	83-97	82-97
	BBM ⁽²⁾	25		25-72 ⁽³⁾			oui ⁽⁴⁾	82-90	82-91

⁽¹⁾ milieu de culture réel complétement en ions Mg²⁺ ; [Ca²⁺]₀ = 6,8 mg.L⁻¹ et [PO₄³⁻]₀ = 69,8 mg.L⁻¹

⁽²⁾ milieu de culture réel complétement en ions Ca²⁺ ; [Mg²⁺]₀ = 13,8 mg.L⁻¹ et [PO₄³⁻]₀ = 69,8 mg.L⁻¹

⁽³⁾ pour une concentration en cellules microalgales variant de 0,2 à 0,8 g_{MS}.L⁻¹

⁽⁴⁾ les efficacités de la floculation pour les différentes concentrations testées sont données plus en détails dans le Tableau 19

⁽⁵⁾ eau osmosée

⁽⁶⁾ sérum physiologique

⁽⁷⁾ e_{20 min} est l'éclaircissement de la solution mesurée au bout de 20 minutes (cf. Chapitre 2 § 2.3.1)

1.1. Flocculation artificielle de *Chlorella vulgaris* resuspendue en eau osmosée

1.1.1. Estimation des concentrations minimales en Mg^{2+} (essais 1 à 5)

Afin d'établir la concentration minimale requise pour permettre la flocculation avec le magnésium, les cellules sont récoltées après culture à $0,8 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$, et resuspendues dans un volume d'eau osmosée telle que la concentration finale soit de $0,4 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$. Le contrôle de la concentration est effectué par mesure des pigments et des courbes d'étalonnage pigments / concentration en cellules.

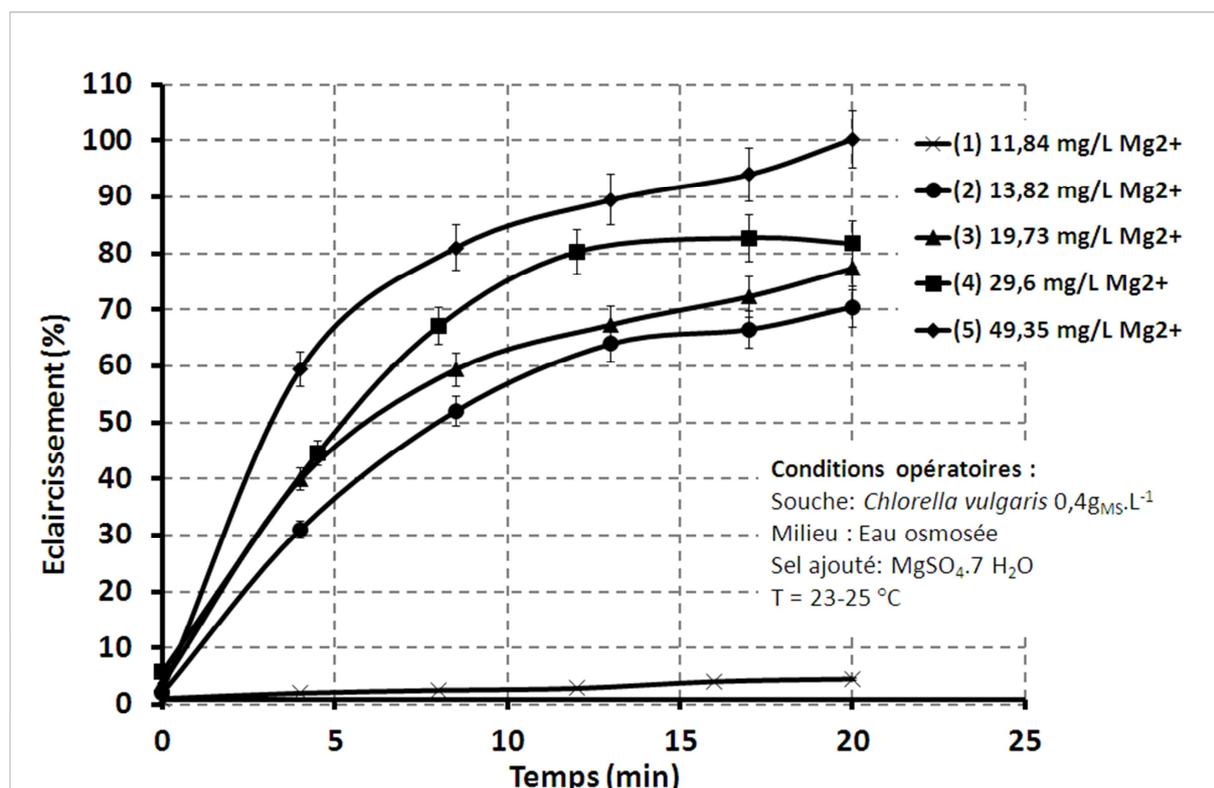


Figure 48 : Évaluation de la quantité minimale en Mg^{2+} requise flocculer *Chlorella vulgaris* resuspendue en eau osmosée ; suivi de l'éclaircissement après remontée artificielle du pH à la soude

Des volumes de solution mère de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ de plus en plus élevés sont ajoutés dans des éprouvettes tests contenant la suspension de microalgues pour visualiser la décantation (Figure 37). Les courbes de décantation obtenues, après ajout de soude 1 N jusqu'à pH 11,8, sont présentés sur la Figure 48.

On observe qu'il est possible d'obtenir un éclaircissement proche de 100 % dans le surnageant situé au-dessus des floccs pour une concentration en Mg^{2+} de l'ordre de $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ (l'efficacité, ici mesurée à 750 nm, est de 94 % ; essai 5). La quantité minimale de Mg^{2+} nécessaire pour obtenir une efficacité E supérieure à 80 % au bout de 20 minutes, valeur que nous avons choisie comme critère de comparaison entre les différentes expériences, est

d'environ 14 mg.L^{-1} ($0,58 \text{ mM}$; essai 2). L'éclaircissement maximal, dans les différentes conditions testées, est atteint au bout d'une vingtaine de minutes.

1.1.2. Estimation des concentrations minimales en Ca^{2+} et PO_4^{3-} (essais 6 à 10)

De façon similaire, les concentrations minimales en Ca^{2+} et PO_4^{3-} requises pour permettre une précipitation par des composés de type phosphate de calcium ont été évaluées. Les essais ont été réalisés pour 3 concentrations différentes à la fois en Ca^{2+} et en PO_4^{3-} . Dans un premier temps il peut être noté que, contrairement à la floculation induite par le magnésium, un éclaircissement total de la suspension n'a pas été atteint, et ce même pour des concentrations élevées en Ca^{2+} (Figure 49 ; essai 10).

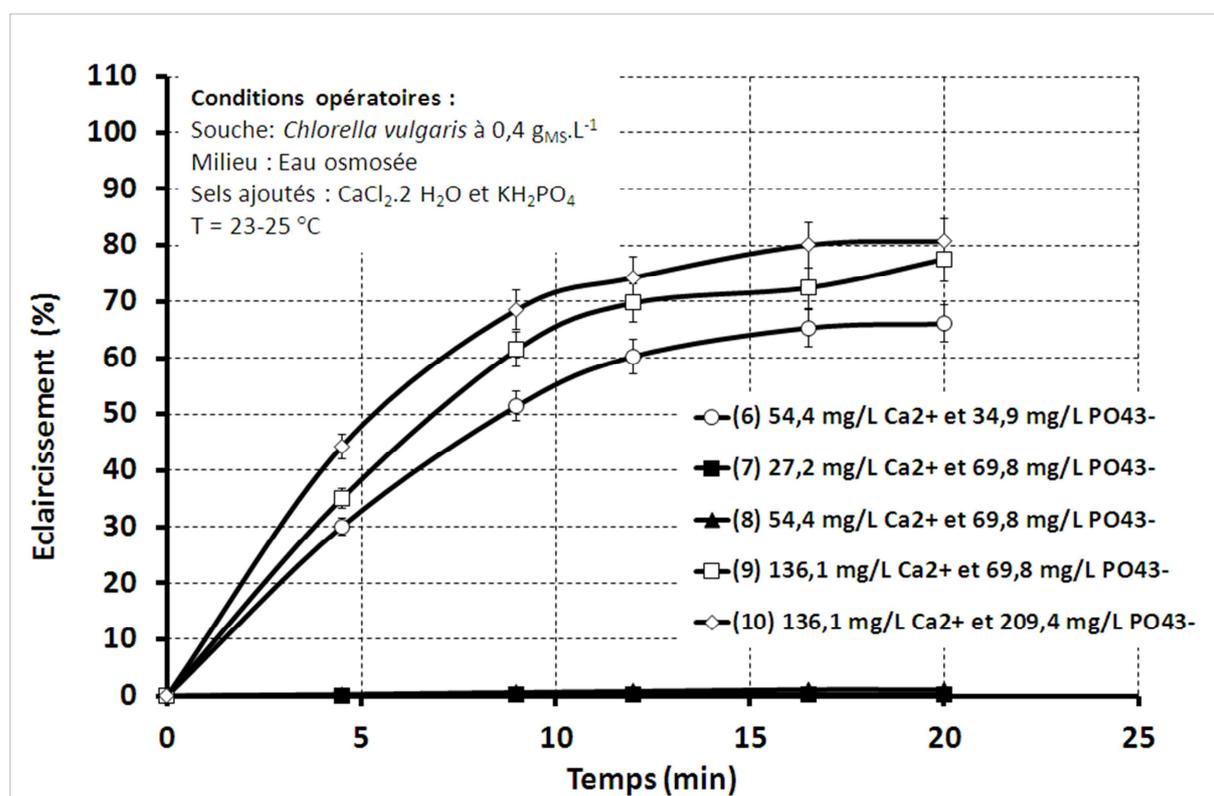


Figure 49 : Évaluation des quantités minimales en Ca^{2+} et PO_4^{3-} requises pour floculer *Chlorella vulgaris* resuspendue en eau osmosée ; suivi de l'éclaircissement après remontée artificielle du pH à la soude

Des concentrations de $54,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ($1,36 \text{ mM}$) en Ca^{2+} et de $34,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ($0,37 \text{ mM}$) en PO_4^{3-} sont suffisantes pour parvenir à une floculation efficace ($E = 79 \%$; essai 6). En doublant la concentration en ion phosphate ($69,8 \text{ mg.L}^{-1}$), il faut augmenter la concentration en Ca^{2+} à $136,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ($3,4 \text{ mM}$) pour obtenir une floculation des cellules aussi efficace, soit un ratio molaire Ca/PO_4 plus élevé que le cas précédent (4,6 contre 3,7). Puis, comme semble le montrer l'essai 10 à $136,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ($3,4 \text{ mM}$) de Ca^{2+} et $209,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ($2,2 \text{ mM}$) de PO_4^{3-} , au-

delà d'un certain niveau de concentrations, ce ratio diminue fortement à 1,55. Dans les deux premiers cas, cela pourrait être expliqué par des différences de composés précipitants, puisque, comme montré dans le Tableau 11 (*cf.* Chapitre 1 § 2.5.2.4.), ils existent de nombreuses formes de phosphate de calcium. Ainsi les ratios molaires modifieraient les équilibres entre les deux espèces et permettraient la précipitation des composés de nature chimique différente. Dans le dernier cas (essai 10), les concentrations sont telles que quel que soit le composé impliqué, sa précipitation soit telle qu'elle entraîne très rapidement les cellules microalgales.

1.2. Flocculation artificielle de *Chlorella vulgaris* resuspendue en sérum physiologique

Afin d'évaluer l'influence de la force ionique, des essais similaires ont été réalisés en resuspendant les cellules dans du sérum physiologique. De nouveau, les concentrations minimales requises pour permettre la flocculation ont été déterminées.

1.2.1. Estimation des concentrations minimales en Mg^{2+} (essais 11 à 15)

On constate très logiquement que la concentration d'ions Mg^{2+} nécessaire à la flocculation est plus faible dans le sérum physiologique que dans l'eau osmosée, soit 10 mg.L^{-1} (0,41 mM ; essai 12) au lieu de 14 mg.L^{-1} . Cela peut s'expliquer dans le cadre de la théorie de la stabilité des suspensions colloïdales par la compaction de la double couche de charges portée par les cellules lorsque la force ionique du milieu augmente, facilitant ainsi la neutralisation de la charge de surface [Carneiro-da-Cunha *et al.* 2011]. Une confirmation peut être apportée par la mesure du potentiel zêta dont la valeur diminue largement quand les cellules sont resuspendues dans le sérum physiologique, soit $\zeta = -14 \text{ mV}$ environ contre -34 mV en eau osmosée (Tableau 16). Une nouvelle fois, il peut être noté que l'éclaircissement peut être quasiment total avec le magnésium bien qu'un temps de latence est observable en début d'expérimentation (Figure 50).

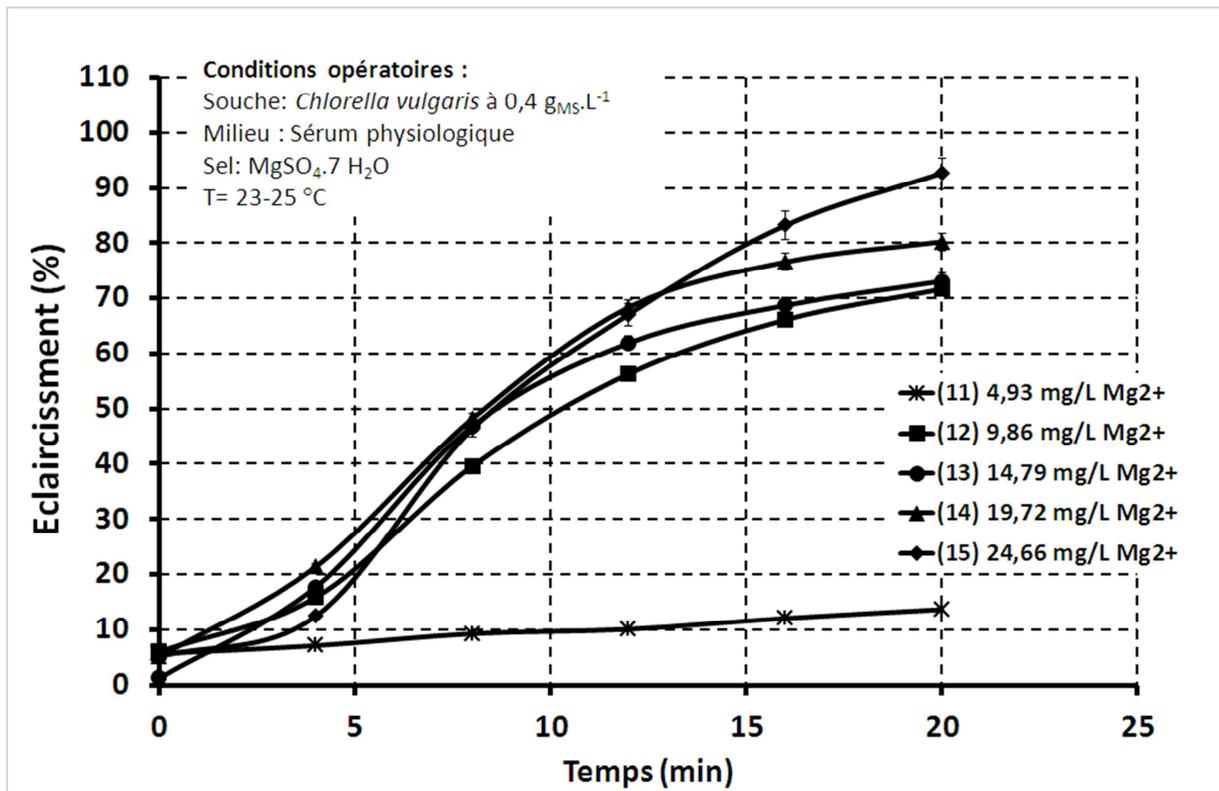


Figure 50 : Évaluation de la quantité minimale en Mg²⁺ requise pour flocculer *Chlorella vulgaris* resuspendue dans du sérum physiologique ; suivi de l'éclaircissement après remontée artificielle du pH à la soude

1.2.2. Estimation des concentrations minimales en Ca²⁺ et PO₄³⁻ (essais 16 à 21)

Concernant la floculation induite par Ca²⁺ et PO₄³⁻, les comportements dans le sérum physiologique semblent légèrement différents puisqu'une quantité moindre en PO₄³⁻ est nécessaire (8,7 mg.L⁻¹ ; 0,09 mM) pour parvenir à la floculation par rapport à celle déterminée dans l'eau osmosée (34,9 mg.L⁻¹ ; 0,37 mM) pour une concentration en Ca²⁺ identique (54,4 mg.L⁻¹ ; 1,36 mM) (Figure 51).

Un essai complémentaire (non numéroté) a été réalisé avec une concentration en PO₄³⁻ identique à celle existante dans les milieux de culture réels (69,8 mg.L⁻¹ ; 0,73 mM). La concentration minimale requise en Ca²⁺ reste égale à 54,4 mg.L⁻¹, ce qui laisse supposer que la concentration en calcium nécessaire demeure à peu près la même quelle que soit la concentration en PO₄³⁻ (pourvu qu'elle soit supérieure à 8,7 mg.L⁻¹ ; 0,09 mM).

Une fois encore, un temps de latence est observé au cours des 4 premières minutes avant que la décantation ne devienne très active.

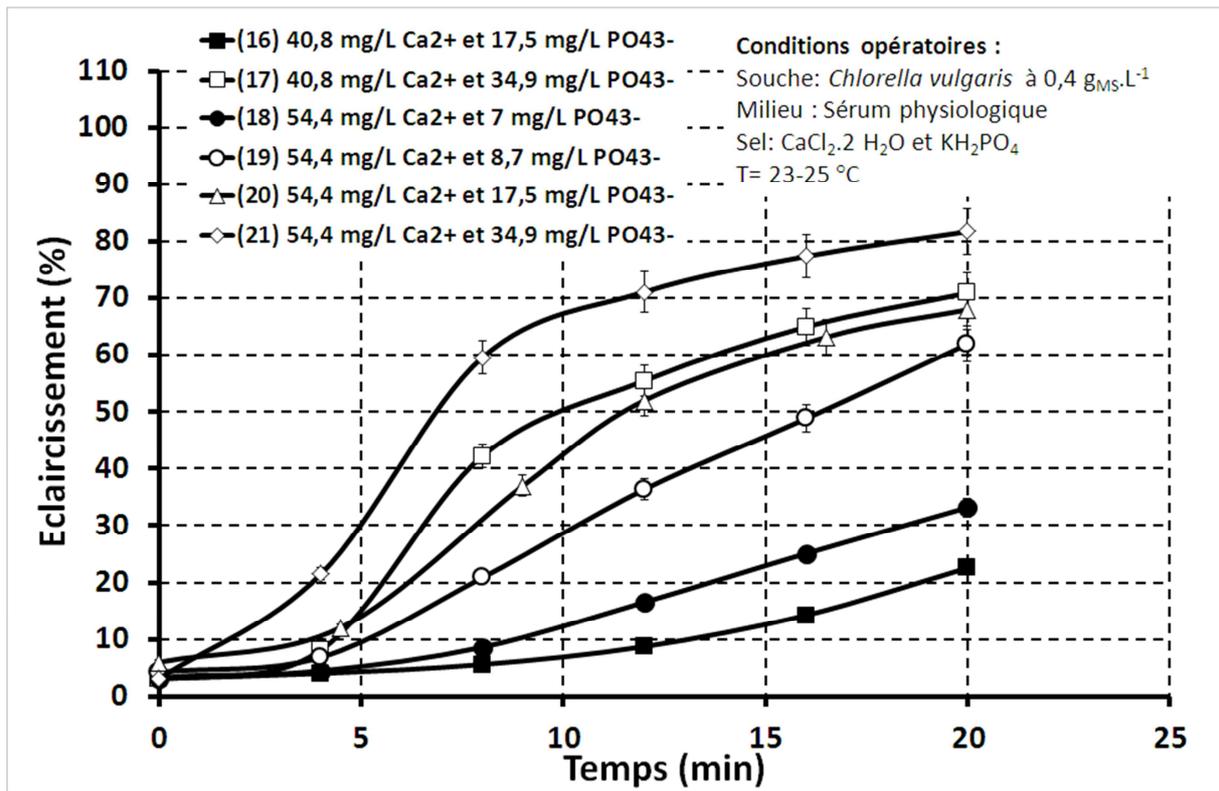


Figure 51 : Évaluation des quantités minimales en Ca^{2+} et PO_4^{3-} requises pour flocculer *Chlorella vulgaris* resuspendue dans du sérum physiologique; suivi de l'éclaircissement après remontée artificielle du pH à la soude

1.3. Flocculation artificielle de *Chlorella vulgaris* resuspendue en milieux de culture réels

Les essais précédents confirment l'influence de la force ionique du milieu sur les concentrations nécessaires en ions pour flocculer les microalgues, ainsi que sur l'efficacité de cette flocculation induite par les ions magnésium ou par les ions calcium et phosphate. Nous examinons maintenant dans ce paragraphe ce qu'il en est dans les deux milieux de culture réels, dans lesquels sont présents les éléments et microéléments nécessaires à la croissance des microalgues en plus des composés pouvant précipiter.

1.3.1. Estimation des concentrations minimales en ions Mg^{2+} et Ca^{2+} en fonction de la concentration en cellules pour une concentration en PO_4^{3-} donnée (essais 22 à 25)

Les Figures 52 et 53 reportent les concentrations minimales en Mg^{2+} et Ca^{2+} requises pour précipiter les cellules dans les deux milieux de culture réels. Il est à noter que dans les deux milieux la concentration en PO_4^{3-} est identique et vaut $69,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ($0,735 \text{ mM}$).

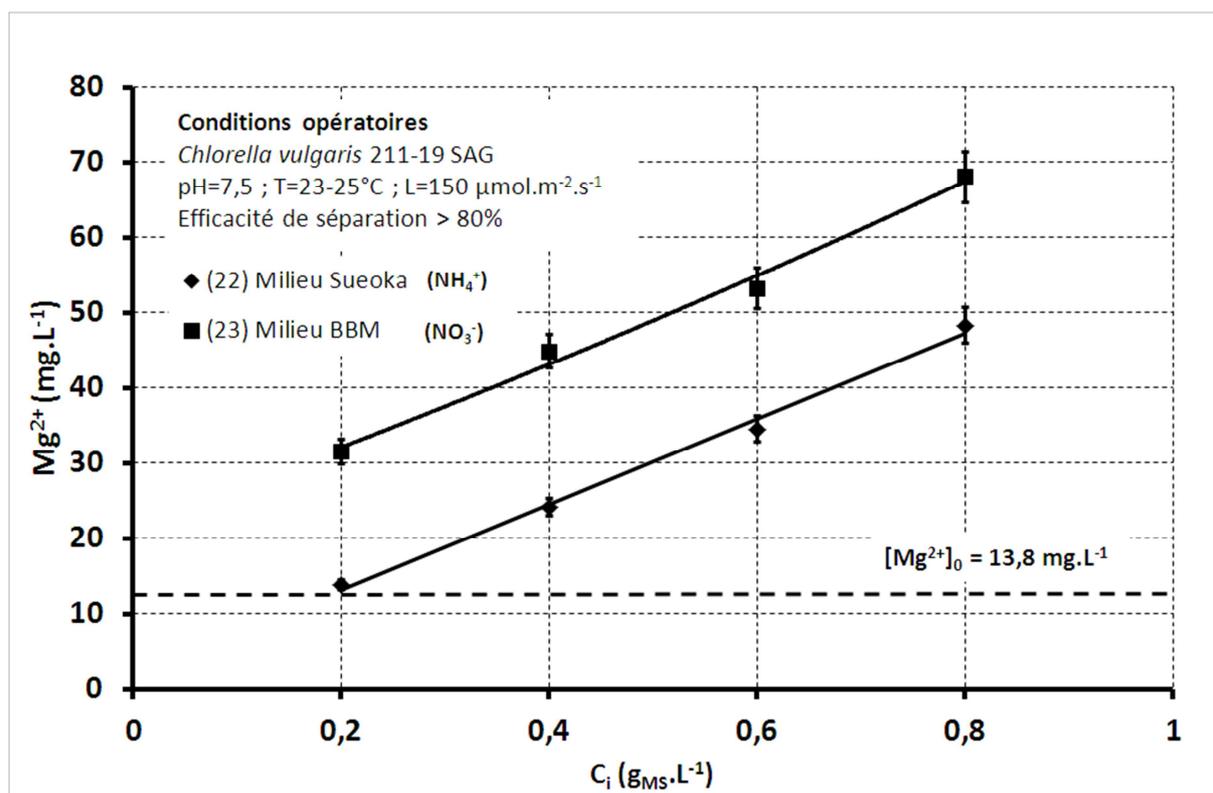


Figure 52 : Concentration minimale en magnésium requise pour la floculation artificielle à la soude en fonction de la concentration initiale en cellules microalgales ($g_{MS}.L^{-1}$) pour les milieux de culture Sueoka et BBM ; $[Mg^{2+}]_0$: concentration initiale en Mg^{2+} dans les deux milieux

Comme indiqué sur la Figure 52, les concentrations requises en magnésium augmentent linéairement avec la concentration en cellules, avec une pente similaire dans les deux milieux. Ces concentrations minimales sont plus élevées pour le milieu BBM passant de 32 à 68 $mg.L^{-1}$ (1,3 à 2,8 mM) que pour le milieu Sueoka où elles passent de 14 à 48 $mg.L^{-1}$ (0,6 à 2 mM). Ces concentrations semblent en accord avec celles rencontrées dans la littérature. En effet, Smith & Davis (2012) ont relevé une consommation de 43,7 à 58,3 $mg.L^{-1}$ (1,8 à 2,4 mM) dans un milieu BG-11 pour une culture de *Chlorella vulgaris* à 0,8 $g_{MS}.L^{-1}$. Toutefois, nos valeurs paraissent élevées en comparaison des travaux de Vandamme *et al.* (2012) qui ont trouvé que leur milieu de culture WC, de composition initiale différente mais comportant les mêmes types d'éléments et dont la conductivité de 0,8 $mS.cm^{-1}$ est similaire à celle de nos milieux, devait comporter un minimum de 3,6 $mg.L^{-1}$ (0,15 mM) de Mg^{2+} pour faire floculer une culture de *Chlorella vulgaris* (souche 211-11b) à 0,5 $g_{MS}.L^{-1}$.

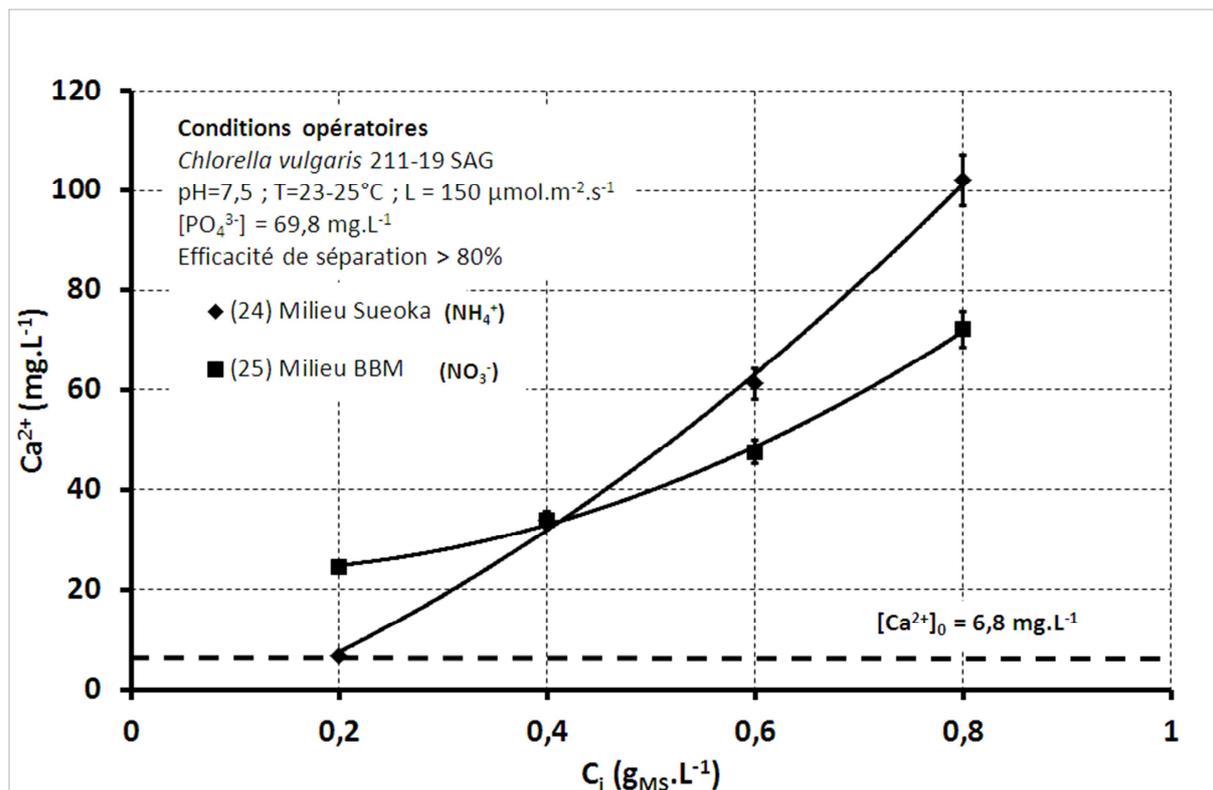


Figure 53 : Concentration minimale en calcium requise pour la floculation artificielle à la soude en fonction de la concentration initiale (g_{MS}.L⁻¹) pour les deux milieux de culture ; [Ca²⁺]₀ : concentration initiale en Ca²⁺ dans les deux milieux

Concernant les concentrations nécessaires en calcium Ca²⁺, un comportement différent est observé (Figure 53). Les besoins ne semblent plus augmenter linéairement avec la concentration en cellules, en particulier dans le milieu BBM. En outre dans le milieu BBM, la demande en ions Ca²⁺ croît modérément de 25 à 72 mg.L⁻¹ (0,63 à 1,8 mM) alors que la croissance est bien plus marquée dans le milieu Sueoka, la demande passant de 6,8 à 102 mg.L⁻¹ (0,2 à 2,6 mM). En conséquence, on observe qu'au-delà de 0,4 g_{MS}.L⁻¹, c'est dans le milieu BBM qui requiert les concentrations minimales les plus élevées. Ces concentrations semblent en accord avec les travaux de Sukenik & Shelef (1984) qui rapportent des besoins en calcium compris entre 1,5 et 2,5 mM pour floculer *Chlorella vulgaris* dans un milieu BBM non modifié malgré une concentration en phosphates inférieure à la nôtre (0,1 à 0,2 mM contre 0,74 mM soit 69,8 mg.L⁻¹ dans nos milieux testés).

1.3.2. Caractéristiques des floccs obtenus

Les concentrations en cellules dans les floccs ont également été estimées par mesure du volume des floccs selon l'Équation 22. Les résultats sont résumés dans le Tableau 19.

La floculation par la précipitation de composés magnésiens semble moins aisée dans le milieu BBM puisque, outre des concentrations minimales requises plus élevées, les concentrations finales en cellules dans les floccs demeurent plus faibles que celles obtenues dans le milieu Sueoka ($C_{est} = 3,2$ contre $10,3 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$). Dans tous les cas, ces concentrations ne sont pas très élevées par rapport aux valeurs maximales qui peuvent être rencontrées dans la littérature (jusqu'à $30 - 35 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$).

Inversement, la floculation par les composés de phosphates de calcium semble plus efficace dans le milieu BBM ($7,2 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$ contre $5,5 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$ dans le milieu Sueoka).

Les valeurs de C_{est} calculées pour la floculation doivent être considérées avec prudence, car le pH est élevé à 11,8 de manière à s'assurer de la précipitation des composés minéraux et ce très rapidement. Cela amène probablement à précipiter la plupart du temps plus de composés minéraux que nécessaire pour flocculer les microalgues, et à abaisser ainsi la valeur de C_{est} par rapport à une floculation optimisée.

Tableau 19 : Volume de floccs obtenus et concentration en cellules déterminées pour les concentrations en Mg^{2+} et Ca^{2+} minimales requises (concentration initiale en cellule $0,41 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$)

	Milieu SUEOKA (NH_4^+)		Milieu BBM (NO_3^-)	
	$[Mg^{2+}]_{min} :$ $24,2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 1 mM	$[Ca^{2+}]_{min} :$ $34 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 0,85 mM	$[Mg^{2+}]_{min} :$ $44,9 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 1,85 mM	$[Ca^{2+}]_{min} :$ $34 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 0,85 mM
Volume de la zone flocculée, V_f (mL)	$3,5 \pm 0,5$	$6 \pm 0,5$	$13 \pm 0,5$	$5 \pm 0,5$
Efficacité de la floculation, E (%)	84	74	87	83
Concentration en cellules estimée dans les floccs, C_{est} ($g_{MS} \cdot L^{-1}$)	$10,3 \pm 1,6$	$5,5 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,8$

1.3.3. Discussions et conclusions

Ces essais ont donné une première tendance sur le comportement de *Chlorella vulgaris* en vue de sa récolte par floculation, celle-ci pouvant être induite soit par les ions magnésium, soit par le couple ion calcium / ion phosphate. Toutefois, des différences sont observées suite aux essais tant entre les deux milieux modèles (eau osmosée et sérum physiologique), dans lesquels des différences de dosages en ions nécessaires et des vitesses de sédimentation ont été relevés, qu'entre les milieux réels (Sueoka et BBM).

Ces différences de comportement, observées entre les deux milieux réels, sont probablement liées aux modes d'actions de chacune des entités précipitantes sur les cellules

(cf. Chapitre 1 § 2.5.2.5.). Comme cela a pu être rapporté par Stumm & O'Melia (1968), il doit exister une relation linéaire entre un dosage de coagulant et la concentration en cellules quand la neutralisation de charges est le phénomène prédominant dans le processus de coagulation/floculation. Cette relation linéaire n'est plus valable si les précipités engendrent des agrégats imposants par pontage entre les cellules [Schlesinger *et al.* 2012]. Ces observations semblent confirmer que les précipités issus de la présence du magnésium et ceux issus de la présence simultanée de phosphates et de calcium agissent selon des mécanismes différents sur les cellules microalgales.

Concernant la qualité et la densité des floes obtenus, les résultats montrent bien le rôle de la composition du milieu de culture puisque des différences importantes sont observées malgré le fait que ces deux milieux ont une force ionique et un pH similaires, ainsi qu'un potentiel zêta des cellules (~ -25 mV à pH 7,5).

2. Floculation naturelle en milieu de culture réel

Les essais en milieux modèles et réels par remontée artificielle du pH à la soude ont confirmé l'influence du milieu sur sa capacité et son efficacité à floculer les microalgues. Les essais effectués dans cette deuxième partie visent à évaluer la capacité des deux milieux à permettre la floculation naturelle par la remontée naturelle du pH.

2.1. Milieu dérivé Sueoka (NH_4^+)

2.1.1. Montée en pH avec la photosynthèse sans modification du milieu

Les microalgues utilisées pour ce test sont cultivées dans le milieu de Sueoka (azote apportée par les ions ammonium NH_4^+), et leur concentration après récolte est ajustée à $0,4 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ par ajout de milieu de culture frais. L'éprouvette contenant la suspension est ensuite disposée sous une intensité lumineuse de $500 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, avec un bullage d'air léger, mais sans régulation CO_2 afin de permettre, par photosynthèse et stripage du carbone dissous, la montée naturelle du pH.

Dans ces conditions, une légère augmentation du pH de 7 à 9 au cours des 5 premières heures est observée (Figure 54). Dans le même temps, le potentiel zêta augmente de -30 à -10 mV (la charge de surface négative des cellules diminue donc en valeur absolue). Comme le pH ne va pas au-delà de pH 9, la précipitation des composés magnésiens peut d'ores et déjà être exclue puisque celle-ci n'intervient qu'à partir d'un pH voisin de 9,5 à 10. Toutefois, celle des composés de phosphates de calcium ne peut l'être, même si les analyses de chromatographie ionique ne montrent aucune variation de concentration sur les ions calcium

ou phosphates lors de cette légère élévation de pH. Cette montée limitée du pH peut s'expliquer par le fait que l'assimilation d'ions NH_4^+ par des cellules biologiques conduit à la libération de protons H^+ [Goldman & Brewer 1980], ce qui limite l'augmentation de l'alcalinité du milieu (par la photosynthèse). De plus, ce type de milieu peut également générer de l'ammoniac (NH_3) en concentration suffisante pour inhiber la photosynthèse [Abeliovitch *et al.* 1976]. En effet, dans les milieux où NH_4^+ est la principale source d'azote, l'inhibition de la photosynthèse est quasi-totale à pH 9,5, par dissociation NH_4^+ en NH_3 pour des concentrations en NH_3 de 2 à 3 mM [Azov & Goldman 1982].

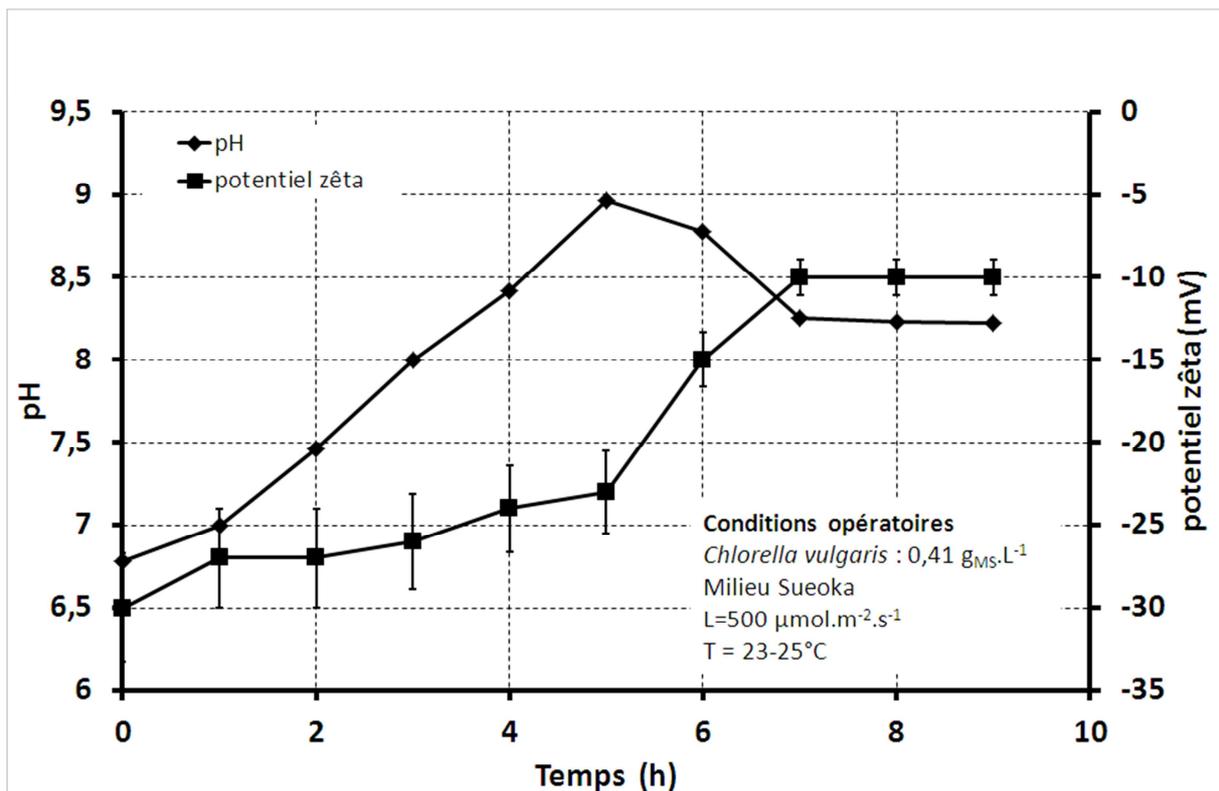


Figure 54 : Élévation naturelle du pH dans le milieu Sueoka, sans injection de CO_2 ; évolution du pH et du potentiel zêta en fonction du temps ; aucune floculation observée

Le pH atteint sa valeur maximale (9) au bout de 5 heures, puis il redescend à 8,25 environ sur une durée de 1 heure avant de se stabiliser. Une explication possible de cette évolution consiste en un stripage du CO_2 dissous (lié au bullage d'air et conduisant à une hausse du pH) plus rapide que la génération d' H^+ liée à l'assimilation de NH_4^+ pouvant ainsi conduire à la modification progressive de l'équilibre existant entre NH_4^+ et NH_3 ($\text{pK}_a = 9,2$) favorisant la génération de NH_3 libre [Azov & Goldman 1982]. La compétition stripage et génération H^+ justifierait la lente croissance du pH entre $t = 1\text{h}$ et $t = 5\text{h}$ (en comparaison à la Figure 55), puis la génération NH_3 consécutive à cette légère augmentation conduirait à

l'inhibition de la photosynthèse stoppant la croissance du pH à $t = 5$ heures. La diminution du pH entre 5 et 7 heures pouvant elle résulter du stripage de l'ammoniac par le bullage d'air.

Cette libération de H^+ , au niveau cellulaire, pourrait également être à l'origine des modifications du potentiel zêta des cellules. En effet, de nombreux auteurs montrent que l'acidité globale du milieu permet d'augmenter la valeur du potentiel zêta de cellules microalgales jusqu'à des valeurs positives [Stumm & Morgan, 1996 ; Hadjoudja *et al.* 2010]. Nos résultats suggèrent que cette modification de charge de surface peut également être due à des conditions locales au niveau de la paroi cellulaire puisque c'est à ce niveau que l'échange NH_4^+/H^+ a lieu. Une autre cause potentielle réside dans le rôle de la matière organique naturellement excrétée par les microalgues, dont on sait qu'elle peut résulter en une augmentation forte de la consommation en agent flocculant [Henderson *et al.* 2008]. Cette cause doit être d'autant plus considérée pour le milieu Sueoka que la génération de NH_3 , lorsque le pH s'élève, est source de stress pour les cellules.

Par ailleurs, l'élévation de pH constatée, même très modérée, de 6,8 à 9, n'exclut pas la possibilité d'une précipitation de phosphates de calcium. Cela supposerait cependant que la concentration en calcium dans le milieu soit augmentée puisque celle-ci ($6,8 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,17 \text{ mM}$) est très inférieure à la concentration minimale requise déterminée lors des essais préliminaires (ajout de soude), à savoir 34 mg.L^{-1} ($0,85 \text{ mM}$) (cf. § 1.3.1.).

2.1.2. Essais dans le milieu complétement en ions Ca^{2+}

L'essai précédent a donc été réitéré après avoir porté la concentration en calcium à 70 mg.L^{-1} , les autres conditions restant inchangées. Malgré cet apport en calcium, la floculation n'a pas pu être obtenue, le pH n'ayant pas augmenté au-delà de 8, alors qu'un essai témoin, où le pH a été augmenté par ajout rapide de soude, a confirmé que la floculation pouvait avoir lieu.

2.1.3. Conclusions

Les essais précédents montrent que la souche d'eau douce *Chlorella vulgaris* ne peut être floculée naturellement dans le milieu Sueoka où la source d'azote est l'ion ammonium. Cela peut avoir des conséquences en regard d'un procédé global. En effet, Hadj-Romdhane *et al.* (2012) ont récemment mis au point un milieu de culture (HAMGM) dans lequel la majorité des ions sont consommés par la microalgue (*Chlorella vulgaris*), permettant ainsi son recyclage en limitant l'accumulation de contre-ions. Ce milieu disposant d'une source azotée composée d'ions ammonium, il paraît donc inadapté à une récolte par floculation naturelle. Toutefois, la forte augmentation du potentiel zêta (jusqu'à -10 mV), et

donc de la charge de surface des microalgues, observée à $t \approx 7$ h est intéressante. Elle pourrait en effet ouvrir une voie de traitement combiné où, après le laps de temps nécessaire à l'augmentation du pH et à celle du potentiel zêta des cellules, une floculation chimique pourrait être réalisée avec, probablement, des taux de traitements en coagulant plus faibles que pour un traitement direct.

L'objectif étant de faire floculer naturellement *Chlorella vulgaris*, il est nécessaire d'employer un milieu différent. C'est ainsi que le choix du milieu BBM, régulièrement utilisé au laboratoire et dont la source d'azote est l'ion nitrate, s'est imposé.

2.2. Milieu dérivé BBM (NO_3^-)

2.2.1. Montée en pH par la photosynthèse

Dans un premier temps, la capacité du milieu BBM à autoriser une montée naturelle en pH importante a été testée. Les résultats, montrés sur la Figure 55, mettent en évidence que le pH a augmenté jusqu'à une valeur voisine de 11 au bout de 9 heures. Toutefois, à l'instar du milieu Sueoka, les concentrations en calcium et magnésium, respectivement égales à $6,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (0,17 mM) et à $13,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (0,57 mM), sont inférieures aux concentrations minimales estimées par ajout de soude. Un essai témoin par ajout rapide de soude confirme que les cellules ne peuvent floculer. Il n'est donc pas surprenant qu'aucune floculation naturelle ne soit observée dans ces conditions.

On observe ici une évolution du potentiel zêta très différente de celle constatée pour le milieu Sueoka, qui diminuait de -30 à -10 mV avant de se stabiliser. Ici, il semble qu'il y ait deux phases distinctes. En effet, le potentiel zêta diminue dans un premier temps de -20 à -25 mV quand le pH passe de 7,7 à 10,4 (phase 1) avant de remonter à sa valeur initiale (phase 2).

Lors de la phase 1, l'assimilation de NO_3^- conduit au relargage d' OH^- qui localement peut modifier la charge de surface (phénomène inverse de celui observé dans le milieu Sueoka). De plus, cette basicité peut conduire à une augmentation de la dissociation des groupes carboxyliques, sites ionisables majeurs présent sur les parois des cellules microalgales [de Lima & Mansini 1999 ; Liu *et al.* 2013] et ainsi participer à l'accroissement de la quantité de charges négatives en surface de paroi cellulaires.

Puis, la précipitation des composés magnésiens, chargés positivement, reprendrait le dessus (phase 2), expliquant la diminution progressive de la charge de surface des cellules [Das *et al.* 2013].

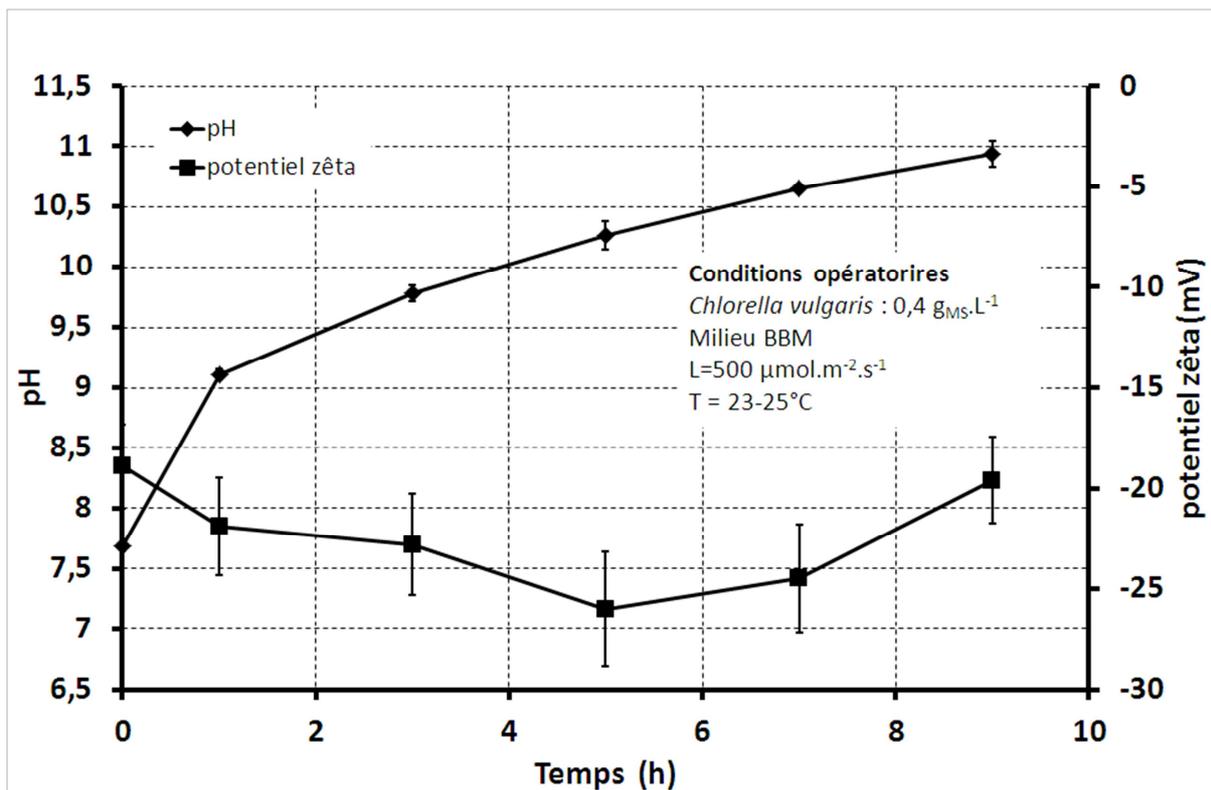


Figure 55 : Élévation naturelle du pH dans le milieu BBM, sans injection de CO₂ ; évolution du pH et du potentiel zêta en fonction du temps ; aucune floculation observée

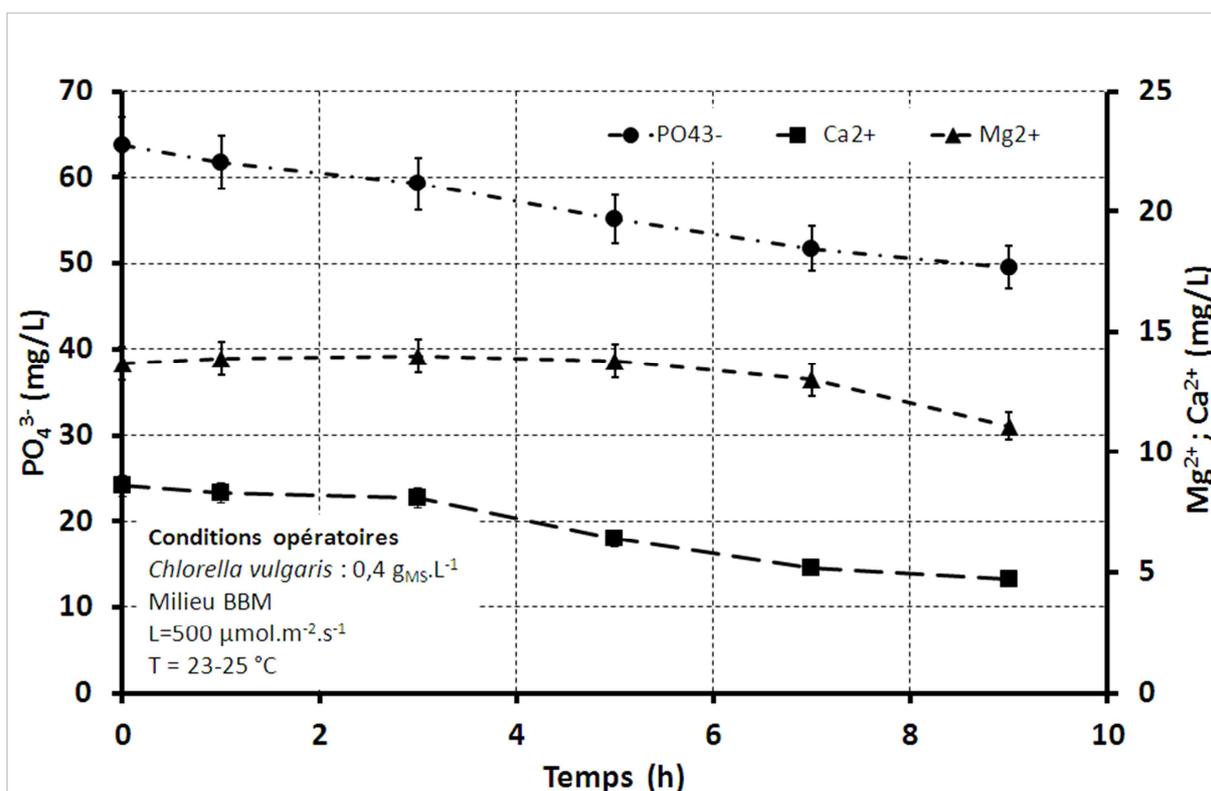


Figure 56 : Élévation naturelle du pH dans le milieu BBM, sans injection de CO₂ ; évolution des concentrations en ions calcium, phosphate et magnésium en fonction du temps ; aucune floculation observée

Une précipitation progressive de sels est en effet probable, car, comme le montre la Figure 56, une consommation d'ions est observée au cours temps avec l'élévation du pH, tant en ions calcium et phosphate en début de l'expérience jusqu'à pH 10,4 (au bout de 5 heures environ), que pour le magnésium ensuite. Cela n'est toutefois pas suffisant pour engendrer la floculation des cellules microalgales. À cause de la densité optique élevée de la culture, aucune précipitation ni trouble caractéristique n'ont pu être observés.

Les diminutions des concentrations molaires des ions calcium et phosphates dans le milieu sont calculées à partir de leur évolution rapportée sur la Figure 56, afin d'en déduire le rapport molaire Ca/PO₄ qui est susceptible d'apporter une information sur la stœchiométrie et la nature du ou des phosphates de calcium ayant précipité(s). Des simulations effectuées par le programme Vmintech [Gustafsson 2011] prédisent que, dans les conditions de l'essai, les composés susceptibles de précipiter sont l'hydroxyapatite HAP (Ca₅(PO₄)₃OH) et les phosphates tricalciques amorphes (Ca₃(PO₄)₂). Le ratio molaire Ca/PO₄ de l'HAP et du phosphate tricalcique valent respectivement 1,67 et 1,5 (Tableau 20).

L'estimation est effectuée sur les 5 premières heures seulement, car on ne peut exclure qu'au-delà les ions phosphates ne précipitent avec les ions magnésium. Sur cette durée, on note des variations de concentration de $2,2 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$, soit $0,055 \pm 0,018 \text{ mM}$, en calcium, et de $8,6 \pm 5,8 \text{ mg.L}^{-1}$, soit $0,091 \pm 0,061 \text{ mM}$ en phosphate. Cela correspond à un rapport molaire Ca/PO₄ de $0,608 \pm 1,871$. L'incertitude très importante sur ce rapport s'explique par celles existant sur le dosage par chromatographie ionique de la teneur en chacun de ces ions (de l'ordre de 5 %), et également par les faibles différences de concentrations observées. Compte tenu de cette forte incertitude, on constate que l'information est inexploitable, puisque que le ratio molaire déterminé expérimentalement est compatible non seulement avec ceux de l'HAP et du phosphate tricalcique, mais également avec celui des autres composés donnés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Ratio molaire Ca/PO₄ pour différents composés de phosphates de calcium pouvant précipiter

	Ratio molaire Ca ²⁺ /PO ₄ ³⁻
Dihydrogénophosphate de calcium, Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,5
Hydrogénophosphate de calcium, CaHPO ₄	1
Phosphates tricalciques, Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5
Hydroxyapatite HAP, Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	1,67
Ca ₃ (PO ₄) ₂ .CaO	2

2.2.2 Modification du milieu et propositions de mécanismes

2.2.2.1 Dopage en Ca^{2+} et mécanismes de floculation

Comme montré précédemment, la concentration en calcium dans le milieu de culture est inférieure à la concentration minimale permettant la précipitation par une remontée du pH artificielle à la soude (cf. 1.3.1.). Par conséquent, un ajout de Ca^{2+} est effectué avant le début de l'expérimentation afin d'atteindre cette concentration minimale de 34 mg.L^{-1} (0,85 mM). Cette addition permet toujours l'augmentation du pH jusqu'à une valeur de 10,9. Malgré ces conditions supposées favorables à la précipitation de phosphate de calcium, aucune floculation n'intervient.

Afin d'évaluer la concentration minimale en calcium nécessaire à la floculation naturelle dans le milieu BBM, une première expérience est réalisée en augmentant très fortement sa concentration jusqu'à 272 mg.L^{-1} (6,8 mM), valeur proche de celles qui rencontrées dans un milieu d'eau de mer synthétique pour les souches marines. Dans ces conditions, dès l'ajout de calcium et après agitation, la floculation débute quasi instantanément au pH du milieu de culture (pH 7,7). Les mesures de chromatographie ionique effectuées montrent la disparition également instantanée des ions phosphates ainsi qu'une diminution de $93,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (2,34 mM) en ions calcium. Un second essai est alors réalisé après avoir ajouté cette concentration en calcium, en complément de la concentration initialement présente dans le milieu, pour le porter finalement à une valeur de $6,8 + 93,5 = 100,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Dans ces conditions, la floculation a lieu mais son efficacité n'est que de 72 %. Finalement, pour atteindre 90% d'efficacité, la concentration totale en calcium a dû être portée à 120 mg.L^{-1} (3 mM), soit un facteur 3,5 par rapport à la concentration minimale déterminée par remontée artificielle du pH.

Ces conditions ont également permis d'engendrer des floes plus denses que ceux observés par ajout rapide de soude (Figure 57), avec une concentration finale en cellules dans les floes estimée à $19 \pm 4 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$. Cette floculation à pH 7,7, due à la précipitation de composés de phosphates de calcium, est cohérente avec les travaux de Sukenik & Shelef (1984), qui ont montré que la co-précipitation calcium/phosphate, pour des concentrations similaires aux nôtres, avait lieu pour un pH compris entre 7,2 et 8.

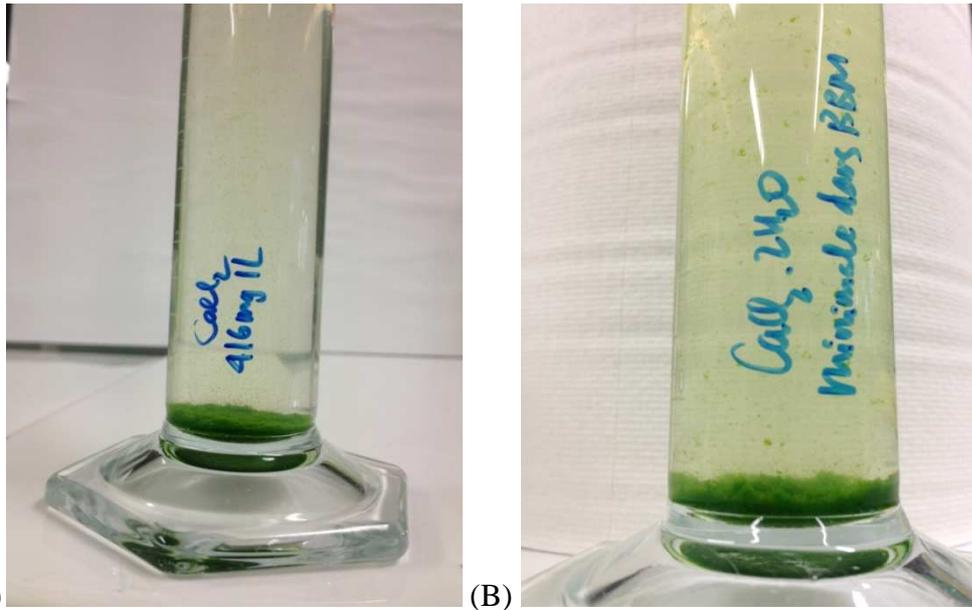


Figure 57 : Floculat obtenu par la précipitation des phosphates de calcium en milieu BBM dopé en calcium ($120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); (A) par remontée naturelle du pH ; (B) par remontée artificielle du pH à la soude (cf. §1.3.1).

Les présences communes de calcium (Ca) et de phosphore (P) sur les agrégats de cellule sont confirmées par observation en Microscopie Électronique à Balayage et Microanalyses par Rayons X (Figure 58). Ces images montrent une importante structure minérale majoritairement composée de Ca et P à la fois sur et entre des cellules laissant supposer un mécanisme de floculation basé sur le lestage et l'entraînement des cellules. En effet la forte présence de composé minéral entre les cellules peut être synonyme soit de piégeage des cellules dans la structure, soit d'un lestage de ces dernières. Sous l'effet de son poids, la structure minérale décante en entraînant les cellules dans son mouvement.

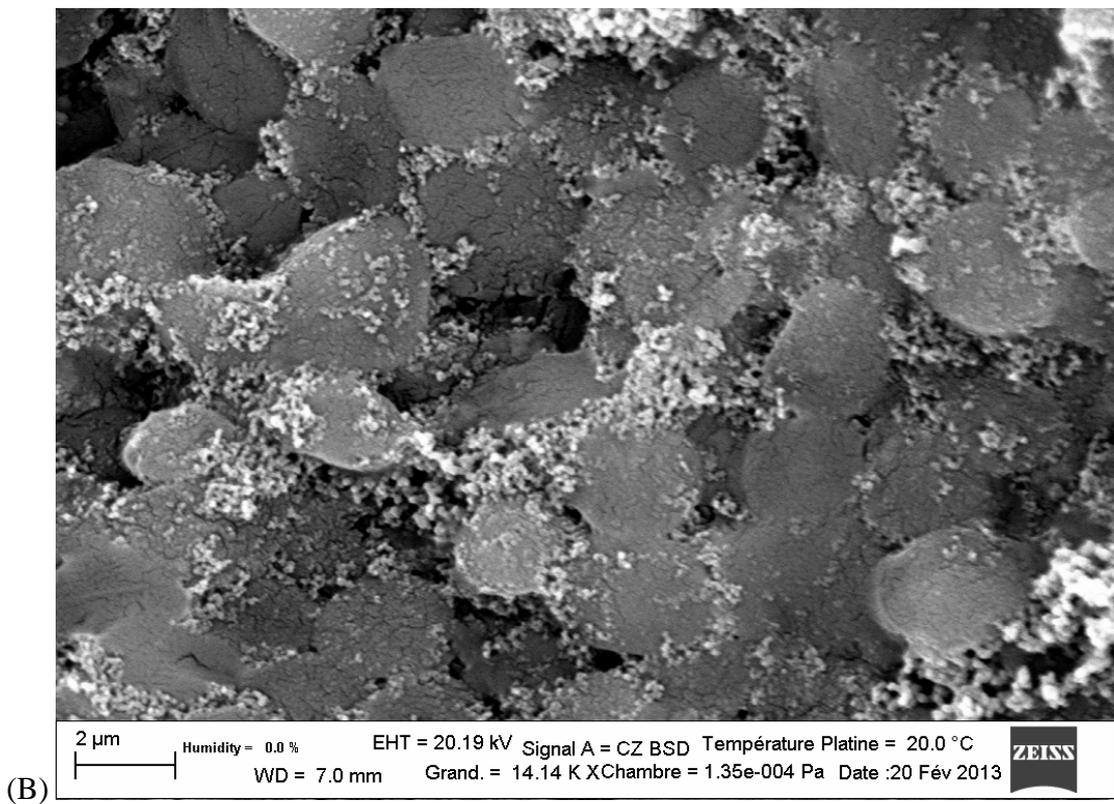
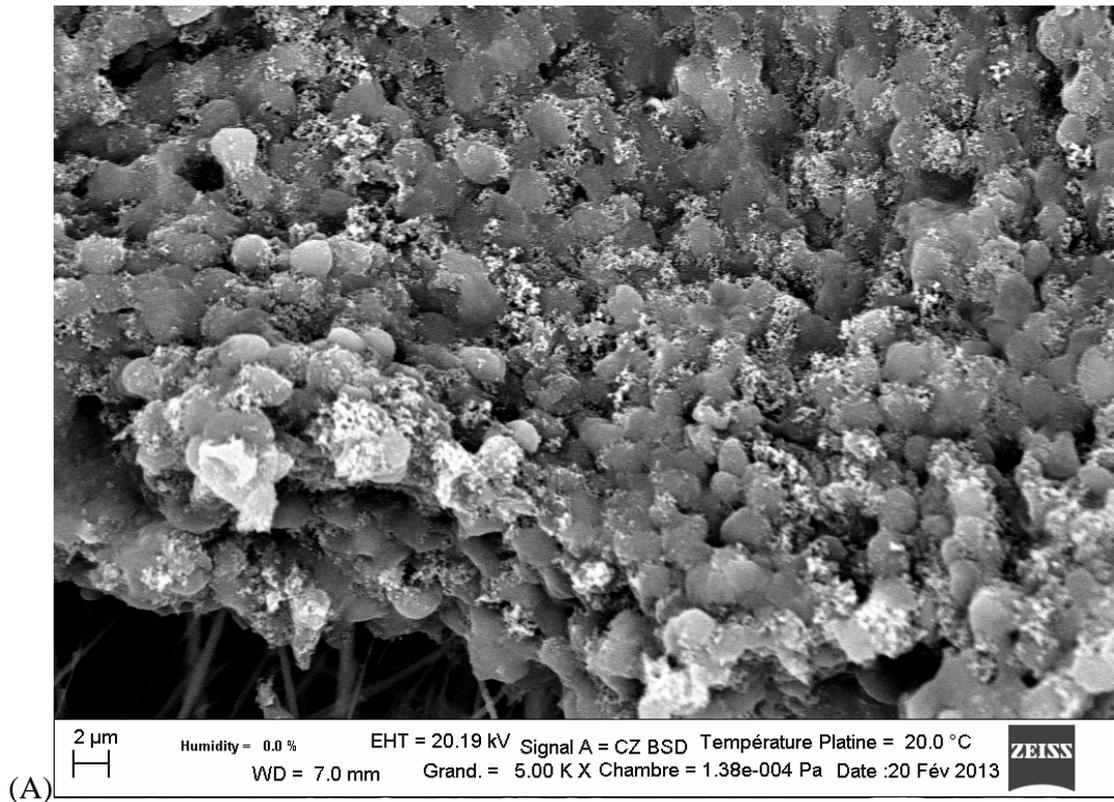


Figure 58 : Observation MEB-EDX d'agrégats de *Chlorella vulgaris* obtenus par remontée naturelle du pH en milieu BBM dopé en Ca^{2+} (120 mg.L^{-1}) ; (A) x 5000 ; (B) x 14000

2.2.2.2 Dopage en Mg^{2+} et mécanismes de floculation

Des résultats similaires sont observés pour la floculation induite par le magnésium. Un premier essai de floculation est réalisé en ajustant la concentration en magnésium à $44,9 \text{ mg.L}^{-1}$ (1,85 mM), valeur minimale estimée par la remontée artificielle du pH à la soude. Dans ces conditions, le pH augmente en 8 heures à une valeur de 10,8 puis demeure stable pendant 16 heures sans entraîner de floculation.

Il s'avère que pour observer la floculation, la concentration en magnésium a dû être augmentée à une valeur proche de celle qui serait rencontrée dans un milieu marin, soit 1000 mg.L^{-1} (41,15 mM), ce qui est bien supérieur à ce qui avait été déterminé par ajout de soude. Après cet ajustement, le pH atteint un plateau à une valeur de 10,2 après 14 heures (Figure 59). En comparaison avec la Figure 55 (augmentation naturelle du pH dans le milieu BBM non dopé), l'augmentation du pH est moins rapide. Une explication éventuelle est la force ionique relativement élevée du milieu (près de 10 g.L^{-1} de sulfate de magnésium hydraté) nécessaires pour atteindre une concentration en magnésium de 1000 mg.L^{-1} qui peut entraîner une baisse du métabolisme de *Chlorella vulgaris*, comme cela a été observé par Alyabyev *et al.* (2007) avec une concentration en NaCl supérieure à 30 g.L^{-1} sur la même espèce.

Par ailleurs, la présence du plateau de pH peut être expliquée par le fait que les ions hydroxyles participent à la formation du précipité. À l'équilibre, le flux d'ions hydroxyle impliqués dans la précipitation de $Mg(OH)_2$ compense juste celui des ions relargués en compensation des ions négatifs (carbonate, nitrate et phosphates) assimilés par la cellule. Un arrêt de la photosynthèse n'est également pas exclu.

La floculation débute à partir de $t = 11$ heures, soit juste avant d'atteindre le plateau de pH. Il peut être noté une importante baisse de la concentration en phosphates entre $t = 9$ h et $t = 10$ h jusqu'à sa disparition totale (Figure 60). De façon similaire à ce qui avait pu être observé sur la Figure 55 lors de la montée naturelle du pH dans le milieu BBM natif (sans dopage ni en Mg^{2+} , ni en Ca^{2+}), la baisse de la concentration en ions magnésium s'initie quand le pH devient supérieur à 10.

Une fois encore, la concentration finale en cellules est également plus élevée que celle observée lors de la floculation au magnésium par remontée artificielle du pH à la soude (Figure 61). La concentration est ici estimée à $33 \pm 5 \text{ g}_{MS}.\text{L}^{-1}$, ce qui correspond à des flocs très concentrés en cellules, avec une efficacité de 91 %.

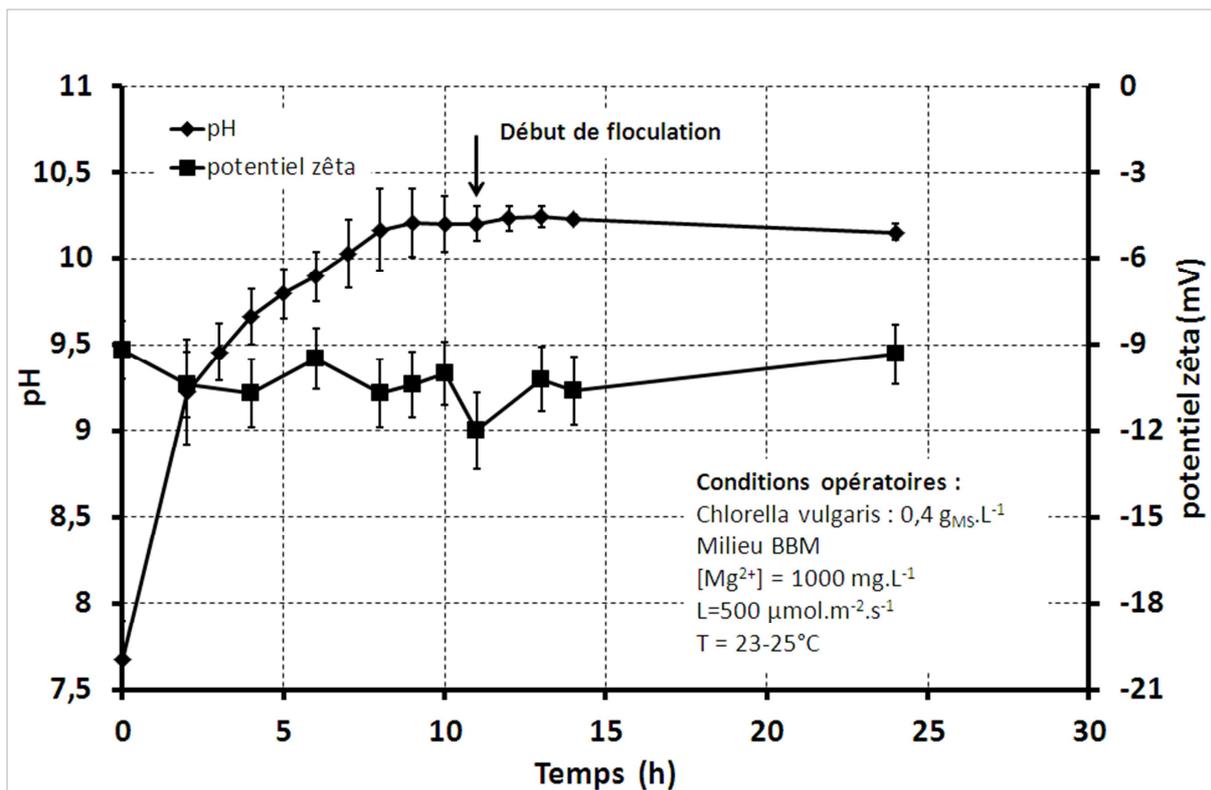


Figure 59 : Augmentation naturelle du pH en milieu BBM dopé en Mg^{2+} , sans injection de CO_2 ; évolution du pH et du potentiel zêta

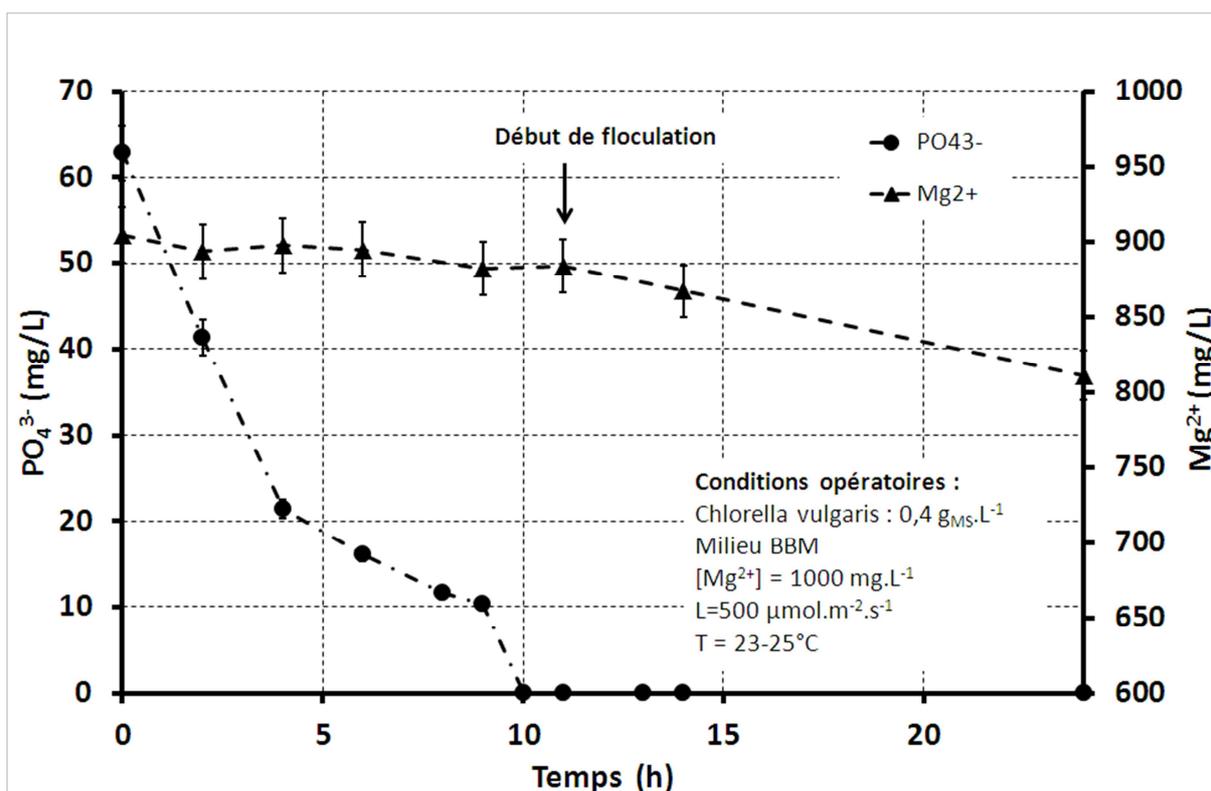


Figure 60 : Augmentation naturelle du pH en milieu BBM dopé en Mg^{2+} , sans injection de CO_2 ; évolution des concentrations en ions phosphate et magnésium (concentrations en Ca^{2+} trop faibles pour être quantifiées)

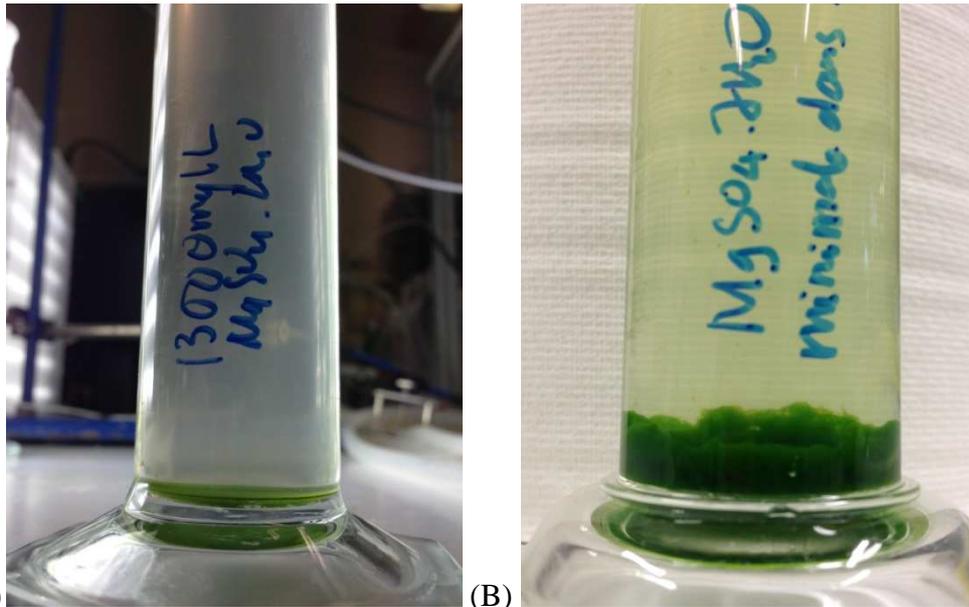


Figure 61 : Floculat obtenu par la précipitation du magnésium en milieu BBM dopé en magnésium ; (A) par remontée naturelle du pH ; (B) par remontée artificielle du pH à la soude cf. §1.3.1.

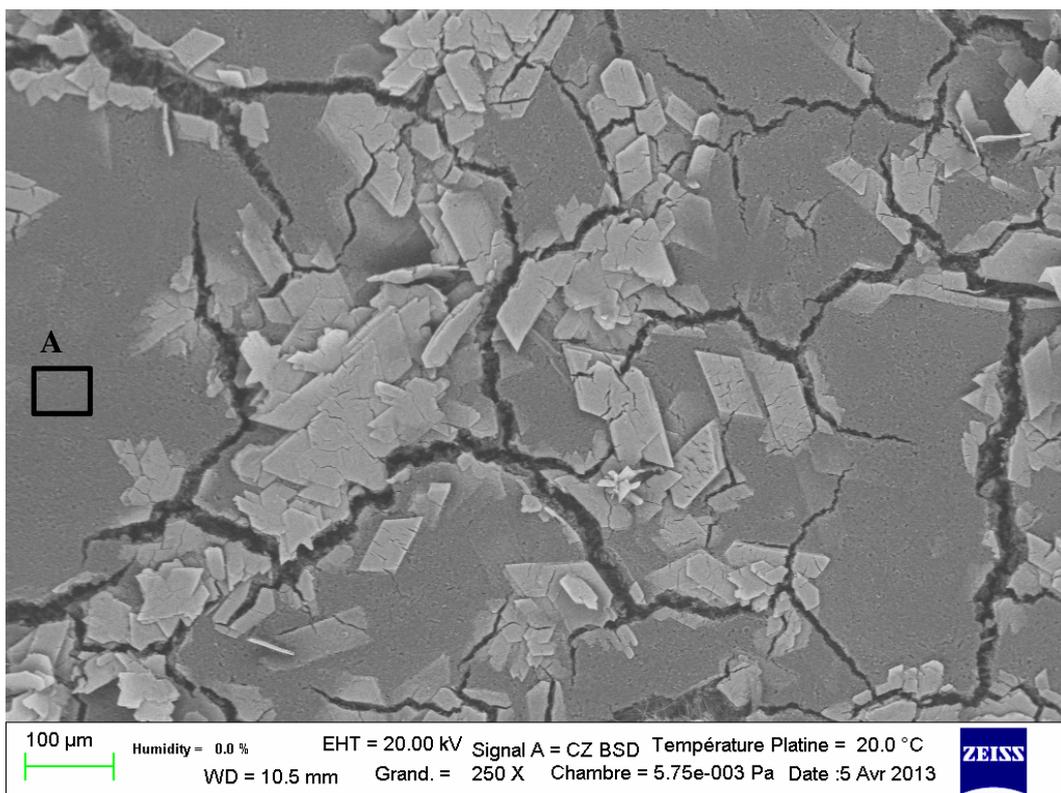


Figure 62 : Observation MEB-EDX d'agrégats de *Chlorella vulgaris* obtenus par remontée naturelle du pH en milieu BBM dopé en Mg^{2+} (1000 mg.L^{-1}) ; vue générale des agrégats (A = zone observée sur la Figure 63).

Cette floculation au magnésium conduit également à la formation d'une quantité importante de structures minérales de phosphates de magnésium (Figure 62). En effet, les microanalyses à rayon X du MEB indiquent, en valeur moyenne sur ces structures, un pourcentage massique de 26,4, 22,5 et 51,1% (soit en pourcentage molaire 21,8, 14,6 et 63,6 %) respectivement pour Mg, P et O, sans présence d'autres éléments. Cette composition moyenne est très proche des pourcentages molaires théoriques de $Mg_3(PO_4)_2$ (23,1, 15,4 et 61,5). Toutefois, on ne peut être totalement affirmatif sur leur rôle dans la floculation puisque en zoomant sur les cellules, ces structures n'apparaissent plus (Figure 63). De plus, les cellules semblent comme « engluées » dans une masse de précipité même si, contrairement aux clichés réalisés pour la floculation induite par les phosphates de calcium, aucune structure minérale évidente n'est visible à la surface des cellules. Le mécanisme associé semble donc être plus particulièrement la floculation par entrainement.

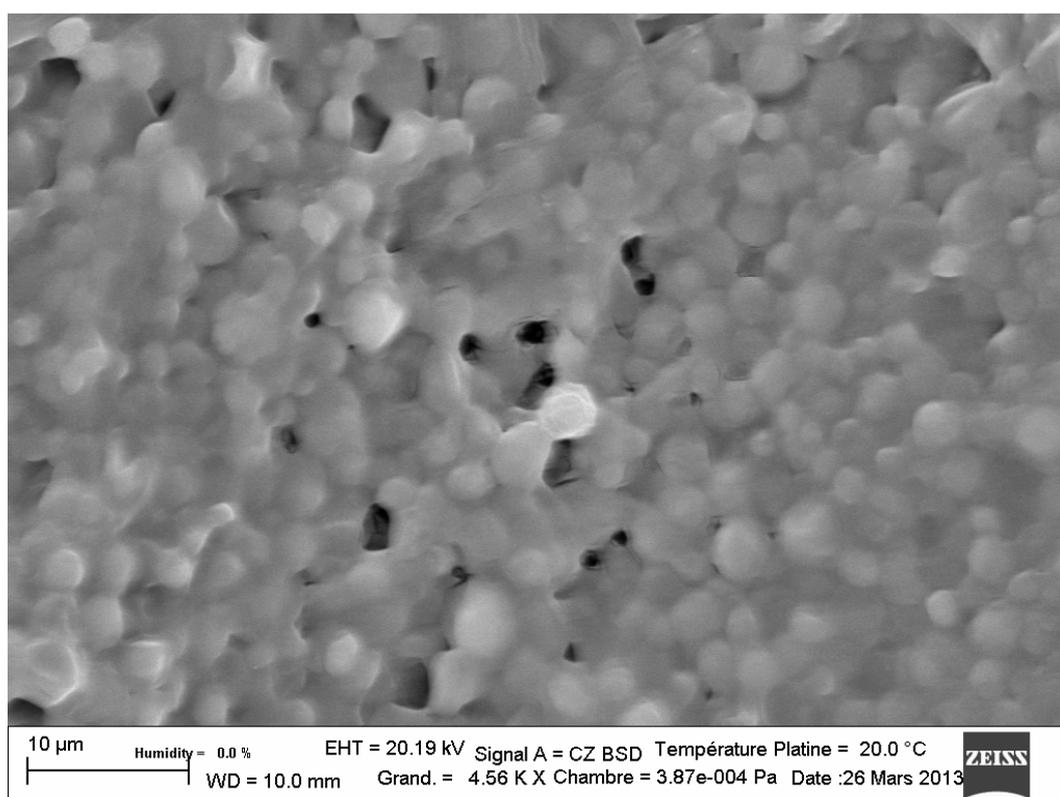


Figure 63 : Observation MEB-EDX d'agrégats de *Chlorella vulgaris* obtenus par remontée naturelle du pH en milieu BBM dopé en Mg^{2+} ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ; vue sur les cellules flocuées

Les analyses EDX montrent que cette masse entourant les cellules est essentiellement composé des éléments Mg, S et P. Compte tenu de la présence de soufre et de phosphore, la floculation par le magnésium ne semble pas être due uniquement à la précipitation de $Mg(OH)_2$, bien que cette dernière doit être majoritaire. En effet, en considérant que seuls Mg

et P participent à la floculation sous forme $Mg_3(PO_4)_2$ (S étant lié à la présence de SO_4^{2-} en forte concentration dans le milieu), la consommation de 63 mg.L^{-1} ($0,66 \text{ mM}$) de phosphates, nécessiterait 1 mM ($24,3 \text{ mg.L}^{-1}$) de magnésium. Or, la quantité totale de magnésium consommé étant de l'ordre de 100 mg.L^{-1} , $75,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de magnésium resteraient ainsi disponibles pour former $Mg(OH)_2$.

2.2.3 Conclusions

Deux faits importants peuvent être notés. Tout d'abord, ces résultats mettent en lumière la différence entre une floculation par une montée rapide du pH par adjonction de soude et celle où le pH remonte naturellement et lentement du fait de la photosynthèse et/ou du dégazage du CO_2 dissous. En effet, il a été montré que les concentrations minimales, tant en calcium et magnésium, déterminées par remontée artificielle du pH ne permettaient pas d'obtenir de floculation dès lors que la remontée du pH se faisait naturellement. Ces concentrations minimales ont dû être multipliées par 3,5 pour le calcium (120 contre 34 mg.L^{-1}), et par 70 pour le magnésium, l'amenant à des niveaux similaires à ce qui peut exister en eau de mer (1000 contre $44,9 \text{ mg.L}^{-1}$).

Ainsi, la floculation naturelle ne peut être correctement modélisée par ajout rapide de soude comme cela est souvent effectué dans la littérature [Smith & Davis 2012, Spilling *et al.* 2010 ; Vandamme *et al.* 2012 ; Wu *et al.* 2012], à moins peut-être de respecter la cinétique d'élévation de pH en ajustant très progressivement la soude. De plus, il est indispensable de réaliser les essais sur les milieux réels et non pas sur des milieux simplifiés ne contenant que les ions susceptibles de précipiter. Les Figures 64 et 65 permettent de faire un bilan sur les différences observées en termes de concentrations minimales en fonction des milieux modèles ou réels et du type de remontée du pH.

Plusieurs causes peuvent être envisagées pour expliquer ces constats : d'une part les cinétiques physiques et physico-chimiques sont différentes dans les deux cas et en particulier celui de la précipitation des composés inorganiques, ce qui peut conduire à des précipités de structure et de composition chimique différentes ; d'autre part le fait qu'en remontée lente du pH des phénomènes biologiques peuvent se manifester (comme des modifications de la paroi des microalgues et le relargage de matière de matière organique) alors qu'en remontée rapide, cela ne semble pas pouvoir être le cas.

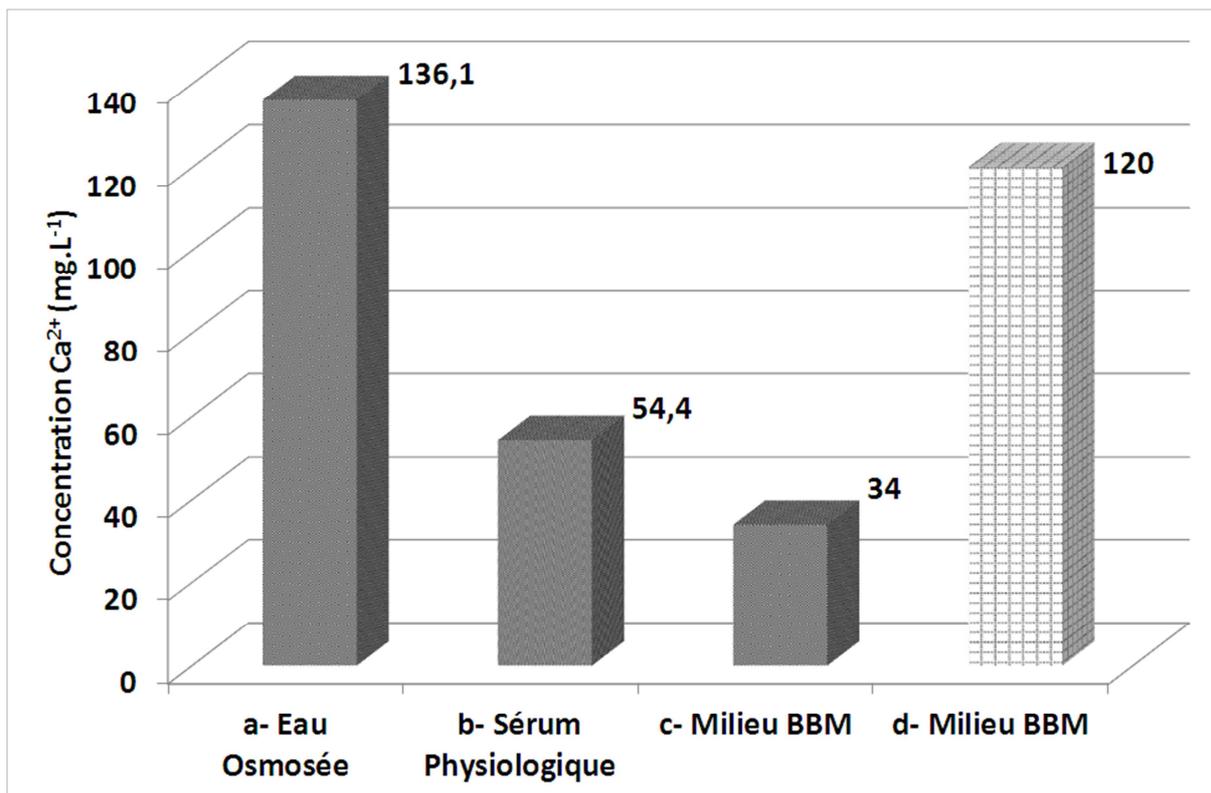


Figure 64 : Concentrations minimales en ions calcium nécessaires à la floculation de *Chlorella vulgaris* dans différents milieux, modèles ou réels ($[PO_4^{3-}] = 69,8 \text{ mg.L}^{-1}$), lors d'une remontée artificielle (a, b, c) ou naturelle (d) du pH

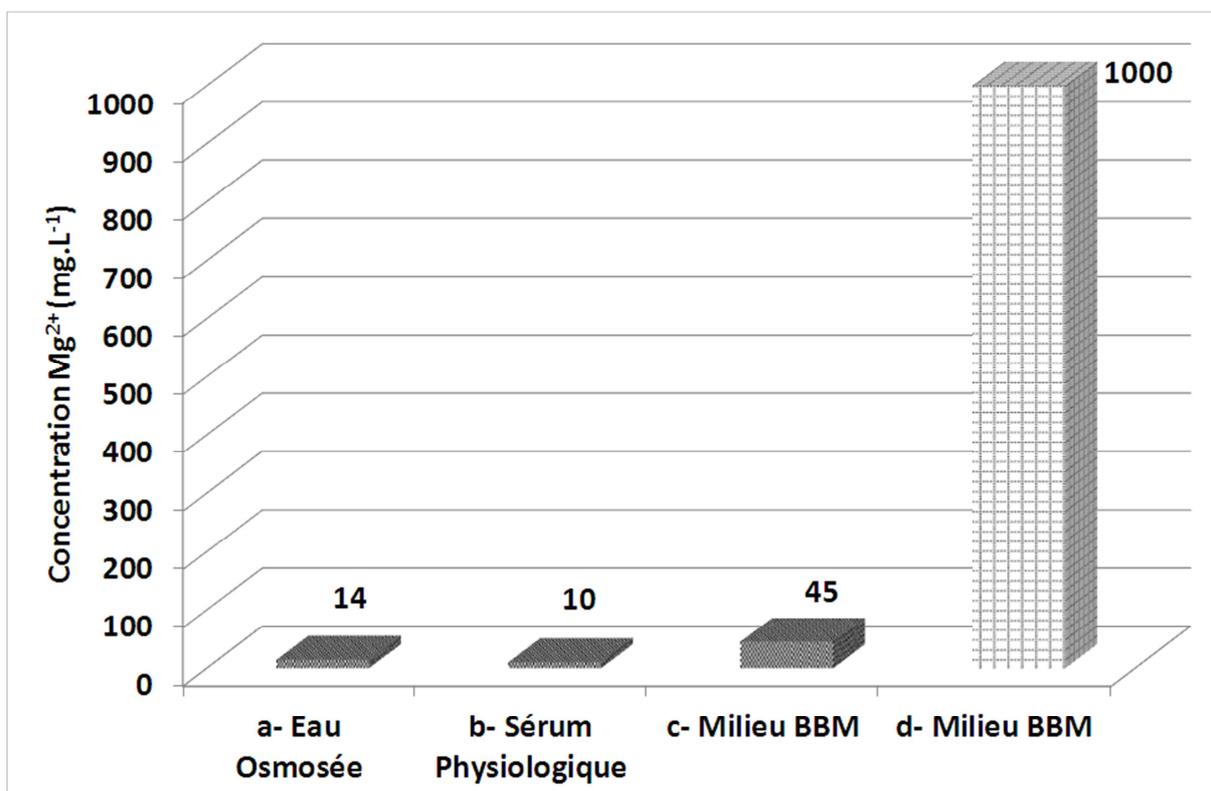


Figure 65 : Concentrations minimales en ions magnésium nécessaires à la floculation de *Chlorella vulgaris* dans différents milieux, modèles ou réels, lors d'une remontée artificielle (a, b, c) ou naturelle (d) du pH

3 Conclusions sur les possibilités de floculation naturelle de *Chlorella vulgaris*

Les concentrations minimales en magnésium et calcium déterminées dans ce travail pour la floculation par remontée artificielle du pH à la soude étaient conformes à celles déjà publiées pour des souches similaires ou différentes. Cependant, elles sont bien en deçà des concentrations minimales nécessaires pour induire une floculation naturelle efficace. En outre, les mécanismes associés et les précipités obtenus semblent être de natures différentes dans les deux cas.

Cette floculation naturelle ne peut avoir lieu que sous certaines conditions. En particulier, le milieu de culture doit avoir l'ion nitrate comme source d'azote, et les concentrations en ions précipitants (Mg^{2+} ou Ca^{2+} et PO_4^{3-}) doivent être suffisantes. Cet apport en ions peut s'effectuer dès la phase de culture cellulaire, à la condition que la salinité ne perturbe pas la souche ce qui semble devoir être le cas ici avec *Chlorella vulgaris* 211-19. L'apport peut également s'effectuer après culture cellulaire, comme dans cette étude, ce qui s'apparenterait à une floculation chimique.

Les objectifs initiaux étaient d'évaluer la possibilité de récolter une souche d'eau douce par floculation naturelle. Compte tenu des quantités de sels à ajouter pour y parvenir, les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que la floculation naturelle par augmentation lente du pH sans apport de floculant n'est envisageable que pour les souches marines, dont les milieux contiennent seuls des concentrations en ions calcium, phosphates, et/ou magnésium supérieures aux minima requis.

Cela vaut pour une culture pour laquelle le surnageant du milieu de culture après récolte n'est pas réutilisé (soit qu'il est rejeté, soit qu'il est vendu pour sa teneur en polysaccharides par exemple). La situation est différente si on met en place un recyclage du surnageant après la récolte. Dans ce cas, il faudra en effet compléter le milieu en ions consommés par la culture, non seulement au cours de sa croissance mais aussi lors de sa récolte. L'analyse doit alors porter sur le flux des ions consommés lors de la récolte et non sur la concentration des ions. Dans ce cas, les cultures en eau de mer bénéficieront toujours de l'avantage procuré par une force ionique plus élevée qui facilite la neutralisation des charges portées par les cellules, mais cet avantage sera probablement moins net.

3. Références bibliographiques

- Abeliovich A. and Azov Y., Toxicity of Ammonia to Algae in Sewage Oxidation Ponds, *Applied And Environmental Microbiology* 31 (6) (1976) 801-806.
- Azov Y. & Glodman J.C., Free NH₃ inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures, *Applied and Environmental Microbiology* 43 (1982) 735-739.
- Cao X., Harris W. G., Josan M. S., Nair V. D., Inhibition of calcium phosphate precipitation under environmentally-relevant conditions, *Science of The Total Environment* 383 (2007) 205-215.
- Carneiro-da-Cunha M. G., Cerqueira M. A., Souza B. W. S., Teixeira J. A., Vicente A. A., Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production, *Carbohydrate Polymers* 85 (2011) 522–528.
- Das S., Thundat T., Mitra S. K., Analytical model for zeta potential of asphaltene, *Fuel* 108 (2013) 543-549.
- de Lima E.C., Masini J.C., Acid base characterization of the surface of mixed species of algae Spirulin by potentiometric titration and discrete site distribution model, *Quimica Nova* 22 (1999) 679-683.
- Duan J. and Gregory J., Coagulation by hydrolysing metal salts, *Advances in Colloid and Interface Science* 100 –102 (2003) 475–502.
- Goldman J. C. and Brewer P. G., Effect of nitrogen source and growth rate on phytoplankton-mediated changes in alkalinity, *Limnology and Oceanography* 25 (1980) 352-357.
- Gustafsson J.P. (2011), Visual MINTEQ ver. 3.0 website.
- Hadjoudja S., Deluchat V., Baudu M., Cell surface characterisation of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*, *Journal of Colloid and Interface Science* 342 (2010) 293–299.
- Henderson R., Parsons S. A., Jefferson B., The impact of algal properties and pre-oxidation on solid–liquid separation of algae, *Water Research* 42 (2008) 1827–1845.
- Liu J., Zhu Y., Tao Y., Zhang Y., Li A., Li T., Sang M. and Zhang C., Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease, *Biotechnology for Biofuels* 6 (2013) 1-11
- Schlesinger A., Eisenstadt D., Bar-Gil A., Carmely H., Einbinder S., Gressel J., Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production, *Biotechnology Advances* 30 (2012) 1023-1030.
- Smith B. T., Davis R. H., Sedimentation of algae flocculated using naturally-available, magnesium-based flocculants, *Algal Research* 1 (2012) 32–39.

- Spilling K., Seppälä J., Tamminen T., Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation, *Journal of Applied Phycology* 23 (6) (2010) 959-966.
- Stumm W. and O'Melia C.R., Stoichiometry of coagulation, *Journal of the American Water Works Association* 60 (1968) 514-539.
- Stumm, W., Morgan, J.J., *Aquatic chemistry, chemical equilibria and rates in natural waters.* John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. Third Edition (1996).
- Sukenik A. & Shelef G., Algal autoflocculation – Verification and proposed mechanisms, *Biotechnology and Bioengineering* XXVI (1984) 142-147.
- Vandamme D., Foubert I., Fraeye I., Meesschaert B., Muylaert K., Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications, *Bioresource Technology* 105 (2012) 114–119.
- Wu Z., Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y., Li A., Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium, *Bioresource Technology* 110 (2012) 496–502.

CHAPITRE 4 : RÉCOLTE DE MICROALGUES PAR SÉPARATION MEMBRANAIRE

Ce chapitre est consacré à la comparaison de la filtration tangentielle classique et de la filtration dynamique pour la récolte de *Chlorella vulgaris* par séparation membranaire. La filtration dynamique permet de disposer d'écoulements hydrodynamiques particuliers (augmentation des vitesses et cisaillements) qui réduisent les effets négatifs liés aux pompes et aux vannes par réduction des débits d'alimentation tout en limitant le colmatage des membranes. Elle doit autoriser l'accès à des flux de perméation et des concentrations finales plus élevées, et se révéler compétitive aux concentrations élevées en biomasse. À l'instar des problématiques rencontrées lors des circulations de biomasse microalgale dans les pompes et vannes (source de cisaillement destructeur), son impact sur la biomasse se devra d'être également évalué.

1. Récolte de *Chlorella vulgaris* par filtration tangentielle

1.1. Choix des membranes

La bibliographie sur la récolte de microalgues a mis en évidence que, pour de nombreuses souches, l'utilisation de membranes d'ultrafiltration (UF) hydrophiles, en polyacrylonitrile (PAN) par exemple, devait être privilégiée car cela limitait l'adhésion des agents colmatants et donnait des flux stabilisés comparables à ceux des membranes de microfiltration (MF) [Rossignol *et al.* 1999]. Cependant les membranes de MF présentant des flux initiaux bien plus élevés, une membrane de MF tangentielle 0,05 μm sera été testée. Aucune membrane en PAN n'étant disponible, le choix s'est orienté vers une membrane en polyéthersulfone (PES), relativement hydrophile, et amplement répandu à l'échelle industrielle. Finalement, les deux membranes testées sont :

- Une membrane d'UF en PAN à 40 kDa (IRIS 3038, Orelis Environnement – Novasep)
- Une membrane de MF en PES à 0,05 μm (Nadir MP005, Alting)

De plus amples informations sont fournies dans le Chapitre 2 (§ 3.1.4)

1.2. Ultrafiltration de *Chlorella vulgaris* sur membrane PAN 40 kDa

Avant tout essai de récolte, il est nécessaire de définir préalablement des conditions opératoires convenables, qui donneront des flux de perméation relativement élevés et un colmatage limité des membranes. À cet effet, des essais de montée en pression transmembranaire (PTM) sont réalisés à différentes vitesses dans le but de choisir une vitesse et une pression de travail. Les résultats obtenus sont donnés sur la Figure 66. Pour des vitesses de circulation inférieures à 1 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, le flux limite reste relativement faible, inférieur à

60 L.h⁻¹.m⁻². En revanche, le flux limite pour une vitesse de 2 m.s⁻¹ est nettement plus important et s'élève à 100 L.h⁻¹.m⁻², et les variations du flux avec la PTM s'écartent peu de la linéarité jusqu'à une valeur de 0,3 bar ce qui dénote un colmatage modéré. Dans ces conditions, on retient comme conditions opératoires une vitesse de 2 m.s⁻¹, vitesse maximale acceptable pour le module Rayflow, et une pression de 0,3 bar.

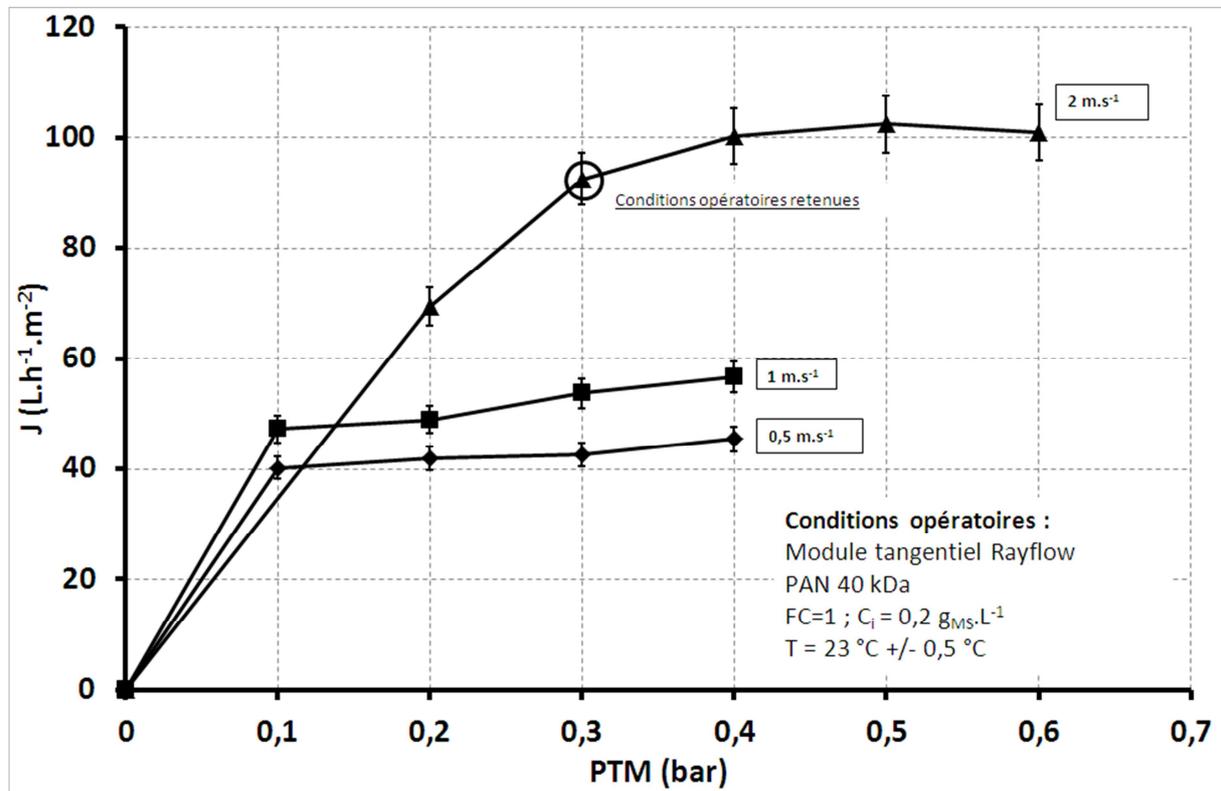


Figure 66 : Ultrafiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris* de concentration constante (0,2 g_{MS}.L⁻¹, recyclage total) ; évolution du flux de perméat en fonction de la PTM pour diverses vitesses de circulation dans le module tangentiel Rayflow

En première estimation, ces valeurs sont en accord avec la théorie de la séparation membranaire puisque la pression de travail retenue doit correspondre à un flux critique. Ce flux critique est, par définition, la valeur du flux ne générant aucune surpression pour être maintenu constant [Field *et al.* 1995], donc ne générant aucun colmatage irréversible. Expérimentalement, il correspond généralement à une valeur de flux observé en fin de zone linéaire (régime limité par la pression). S'il peut également être déduit par modélisation mathématique par la connaissance du flux limite ($2/3 J_{\text{limite}}$) [Bacchin 2004], des valeurs comprises entre $2/3 J_{\text{limite}}$ et J_{limite} ont été rapportées pour la filtration de cellules [Defrance & Jaffrin 1999, Rossi *et al.* 2008].

Ainsi, en retenant ces paramètres, divers essais ont été réalisés pour concentrer la souche *Chlorella vulgaris*. Afin d'évaluer les performances de cette membrane dans des conditions de concentrations proches de celles qui pourraient être obtenues en PBR à haute

concentration, la suspension de *Chlorella vulgaris* a été cultivée en mode batch à des niveaux de concentrations variant de 0,32 à 0,55 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ (valeur maximale ayant pu être atteinte sur le PBR Scobalite en mode batch). À l'issue de ces cultures, un volume de 100 L a été soutiré du réacteur puis centrifugé (3600 g, DRA 20 VX, Rousselet Robatel) afin de récupérer un volume de 10 L de récolte concentrée (FC = 10). Le suivi de la surverse a permis de vérifier l'absence de cellules. Ainsi, trois essais ont pu être réalisés à des concentrations de départ différentes (3,2, 4,8 et 5,5 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$)

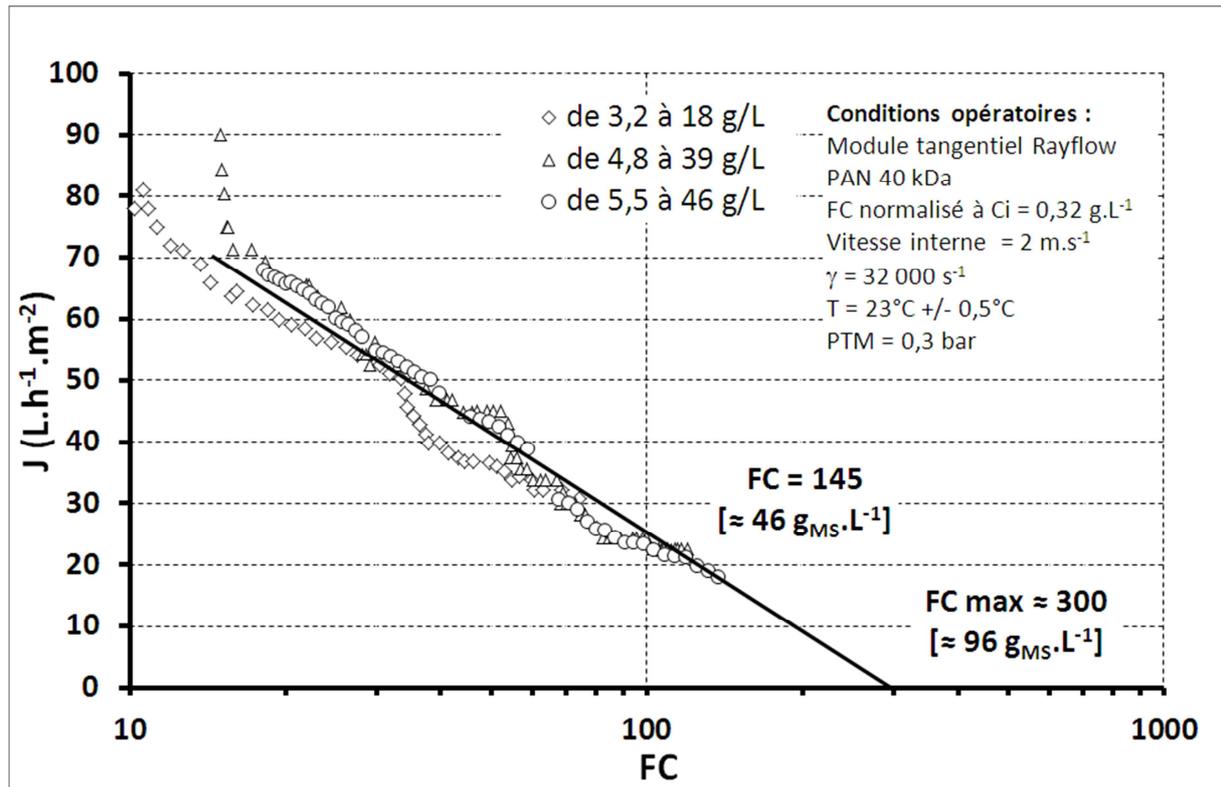


Figure 67 : Ultrafiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris* ; évolution du flux de perméat en fonction du logarithme du facteur de concentration dans le module tangentiel Rayflow

Les résultats sont montrés sur la Figure 67 qui porte le flux de perméation J en fonction du logarithme du facteur de concentration massique des cellules. On y constate que, quelle que soit la concentration en cellules initiale, le flux de perméation chute linéairement avec le logarithme du facteur de concentration, et que, bien que les essais soient différents, les courbes relatives aux trois essais sont assez proches. En se référant à l'Équation 14, on peut estimer la concentration maximale accessible en extrapolant la droite moyenne à flux nul. Ainsi, ces essais montrent que cette concentration serait ici égale à environ 96 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$, soit un facteur de concentration de l'ordre de 300.

Il est à noter que ces valeurs sont purement théoriques car elles ne seront physiquement jamais atteintes (cela correspondrait à un temps de filtration infini) mais vont permettre, par la suite, de comparer plus aisément les différents essais.

La nettoyabilité de la membrane a également été évaluée et les résultats sont présentés dans le Tableau 21. Ces données mettent en évidence que le colmatage de cette membrane semble rester modéré et pouvoir être éliminé par un nettoyage chimique, pour des concentrations en cellules inférieures à 40 g_{MS}.L⁻¹. Au-delà de 40 g_{MS}.L⁻¹, il semble que ce colmatage soit plus sévère, puisque une perte de 21 % de perméabilité demeure après nettoyage chimique.

Tableau 21 : Variation de la perméabilité de la membrane PAN 40 kDa après rinçage à l'eau puis après nettoyage chimique lors des essais de concentration

	Perméabilité de la membrane PAN 40 kDa (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)			
	Initiale	Après manipulation et rinçage à l'eau	Après nettoyage chimique (NaOH, 1N, 50°C ; 1h)	% perte
9 < FC < 56 (3 < C < 18 g _{MS} .L ⁻¹)	319	188	304	4,7
15 < FC < 122 (4,8 < C < 39 g _{MS} .L ⁻¹)	304	158	308	-1%
17 < FC < 145 (5,5 < C < 46 g _{MS} .L ⁻¹)	277	157	220	21 %

1.3. Microfiltration de *Chlorella vulgaris* sur membrane PES 0,05 µm

Une étude similaire a été réalisée sur la membrane de microfiltration en PES à 0,05 µm. La Figure 68 permet de nouveau d'établir des conditions adéquates à la concentration de la suspension de *Chlorella vulgaris*. Les flux limites sont légèrement plus élevés pour cette membrane, mais la différence avec les flux de la membrane d'UF ne peut être jugée significative puisque la concentration en cellules était plus faible. Toutefois, des allures similaires sont observées pour les vitesses de 0,5 et 1 m.s⁻¹ dont les performances sont proches, et un flux limite plus élevé à 2 m.s⁻¹. Contrairement à la membrane en PAN, à cette vitesse de 2 m.s⁻¹, le flux limite est atteint dès 0,2 bar. Cela impose pour les mêmes raisons évoquées précédemment de travailler au maximum à 0,1 bar.

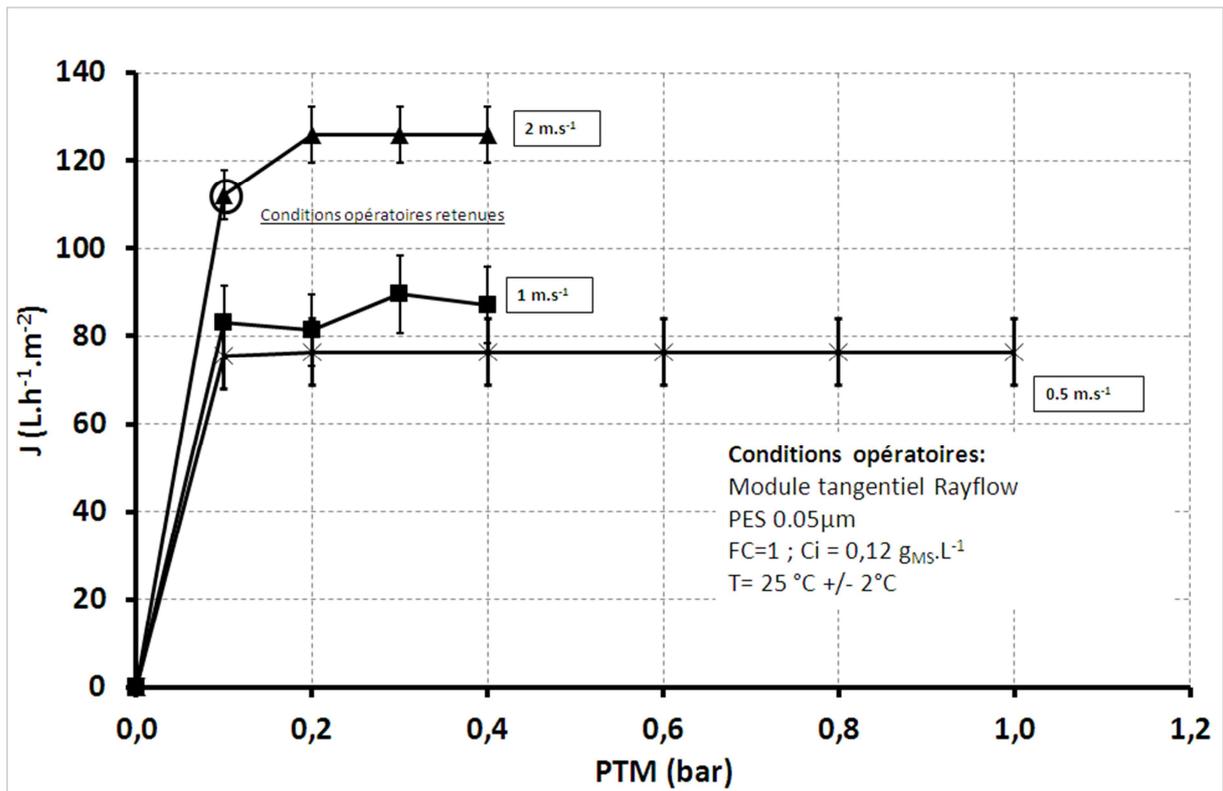


Figure 68 : Microfiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris* de concentration constante ($0,12 g_{MS} \cdot L^{-1}$, recyclage total) ; évolution du flux de perméat en fonction de la PTM pour diverses vitesses de circulation dans le module tangentiel Rayflow

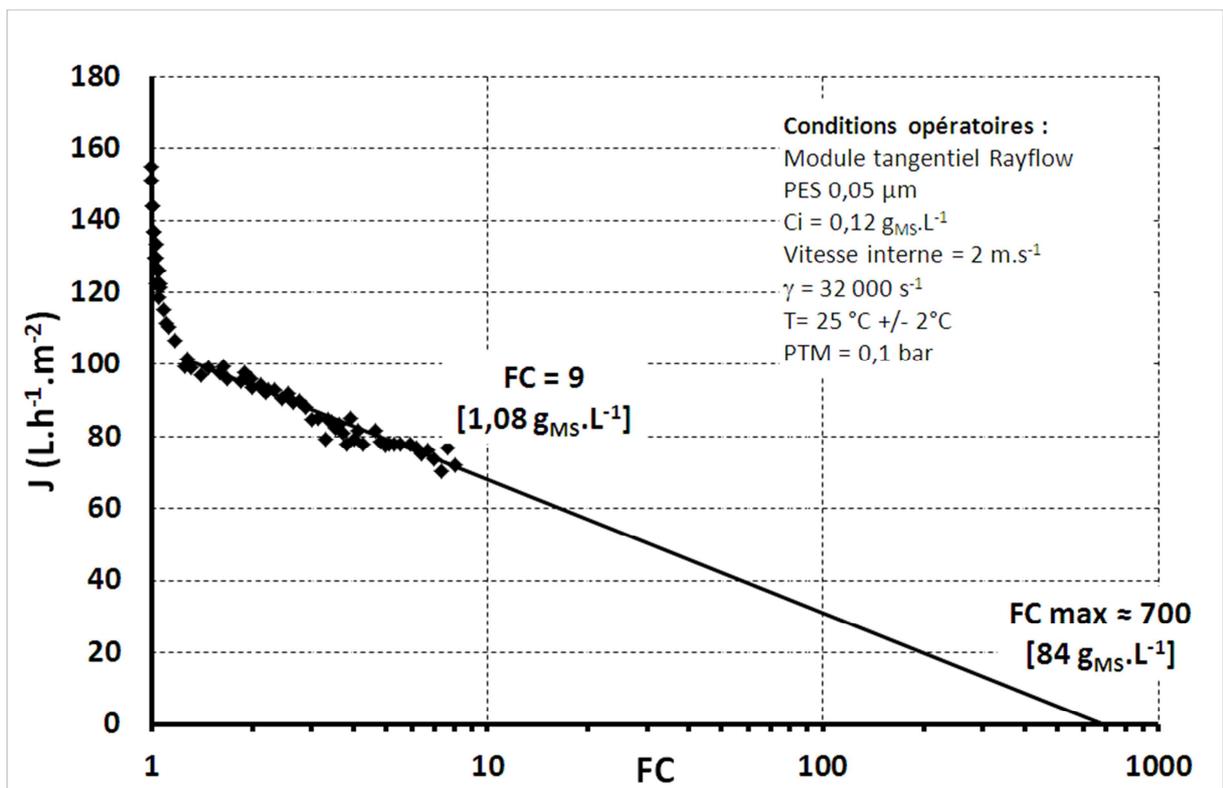


Figure 69 : Microfiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris* ; évolution du flux de perméat en fonction du logarithme du facteur de concentration dans le module tangentiel Rayflow

En mode concentration (Figure 69), la décroissance du flux devient rapidement linéaire avec le logarithme du facteur de concentration. Toutefois les flux obtenus à concentration en biomasse équivalente sont plus faibles dans ce cas présent (à titre d'exemple à FC 10 sur la Figure 67, la concentration en cellules est de l'ordre de $3,2 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ pour un flux voisin de $80 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ alors que sur la Figure 69, à $\text{FC} = 10$ soit une concentration de l'ordre de $1,2 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$, le flux est d'ores et déjà plus faible à $70 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Cela traduit une moins bonne adéquation de la microfiltration à ce type de séparation. Pour autant, la valeur de la concentration maximale qui pourrait être atteinte en extrapolant à flux nul demeure du même ordre de grandeur que celle obtenue avec la membrane PAN avec $84 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$.

Concernant la nettoyabilité de la membrane, les résultats sont relativement variables. Lors des essais de détermination des conditions opératoires de fonctionnement, l'application de paliers de pression supérieurs au palier critique a conduit à des pertes de perméabilité, après nettoyage chimique à la soude, comprises entre 25 et 60 %. Ces pertes étaient d'autant plus importantes que la vitesse d'écoulement, lors de l'essai, était faible. Toutefois, après l'essai de concentration, il s'avère que la perméabilité de la membrane a pu être retrouvée après nettoyage chimique. Cela peut s'expliquer par le choix des conditions opératoires (concentration à la pression critique pour une vitesse tangentielle donnée) et de la faible augmentation de la concentration (de $0,12$ à $1,08 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$), limitant ainsi ce colmatage. Ce résultat peut être encourageant car le module dynamique, en générant un colmatage encore moindre par rapport à la filtration tangentielle, faciliterait le nettoyage de la membrane. Toutefois cela mérite d'être confirmé à plus haute concentration cellulaire.

1.4. Conclusions sur la récolte de *Chlorella vulgaris* par filtration tangentielle

Pour les deux types de membrane, la vitesse de circulation a été fixée à $2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (taux de cisaillement identique à $32\,000 \text{ s}^{-1}$) et des flux critiques d'environ $110 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ et $90 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ont respectivement été obtenus à $0,1$ bar pour la membrane PES et $0,3$ bar pour la membrane PAN. Dans tous les cas, la rétention des cellules était totale.

Les essais de concentration sur les deux matériaux membranaires montrent une décroissance linéaire du flux avec le logarithme du facteur de concentration. Compte tenu de la valeur initiale de la concentration en cellules microalgales, les concentrations maximales atteignables estimées sont similaires dans les deux cas et valent respectivement 84 et $96 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la membrane en PES et celle en PAN. Ces résultats confirment les informations obtenues dans l'étude bibliographique pour la filtration tangentielle mono-étagée. Ils sont prometteurs, puisque même sans un contrôle poussé du flux de perméation (rétro-lavage par

exemple), ces concentrations sont de l'ordre de grandeur de celles requises pour des post-traitements en voie humide (60 à 100 g_{MS}.L⁻¹).

2. Récolte de *Chlorella vulgaris* par filtration dynamique

En filtration tangentielle, le taux de cisaillement, lié au débit d'alimentation, se doit d'être limité pour éviter de subir des pertes de charges trop importantes. À l'inverse, la filtration dynamique conduit à des valeurs de taux de cisaillement plus importantes (classiquement de l'ordre de 10⁴ s⁻¹ pour la filtration tangentielle et jusqu'à 5.10⁵ s⁻¹ pour la filtration dynamique), et ce indépendamment du débit d'alimentation. Il en résulte plusieurs avantages :

- (1) la limitation des dommages créés par les pompes et vannes aux cellules biologiques [Jaouen *et al.* 1999; Vandanjon *et al.* 1999] ;
- (2) la réduction du phénomène de colmatage et/ou un ralentissement de son apparition.

2.1. Impact de l'hydrodynamique sur la culture

Étant donné la sensibilité des cellules microalgales au cisaillement, et que Frappart *et al.* (2011) ont signalé que l'hydrodynamique interne, dans le module de filtration dynamique utilisé dans ce travail, pouvait entraîner un fractionnement ou une modification de forme des cellules microalgales, il n'est pas inutile de vérifier l'intégrité de petites cellules sphériques et réputées robustes, après passage dans le système de filtration dynamique. Cette évaluation a été réalisée par comptage cellulaire et dosage des sucres au cours du temps pour des vitesses de rotation variables et des géométries de disque différentes.

Tableau 22 : Vitesses et taux de cisaillement moyens et maximaux dans le module dynamique à disque rotatif pour différentes configurations d'essais (vitesse de rotation; géométrie du disque ; cf. Chapitre 2 § 3.1.3.)

Disque	N (tr.min ⁻¹)	V _{moyenne} suspension (m.s ⁻¹)	$\dot{\gamma}_{moy}$ (s ⁻¹)	V _{maximale} suspension (m.s ⁻¹)	$\dot{\gamma}_{max}$ (s ⁻¹)
Lisse	200	0,4	780	0,7	1400
Lisse	1000	2,1	14100	3,2	25450
Ailettes 6 mm	300	1,4	6240	2	11260
Ailettes 6 mm	500	2,3	15650	3,4	28244

Les vitesses et taux de cisaillement moyens et maximaux subis par la suspension sont résumés dans le Tableau 22 et sont choisis pour rester dans l'ordre de grandeur de ceux rencontrés sur le module tangentiel Rayflow afin de faciliter la comparaison. De plus, d'un

point de vue énergétique, pour ces mêmes gammes de vitesses et de géométries de disques, Brou *et al.* (2002) ont montré que, sur des suspensions de levures, l'énergie spécifique de ce type de module était inférieure à $5 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-3}$.

La culture cellulaire a été alimentée à faible débit et sans pression pour limiter ou supprimer les effets liés à la pompe péristaltique et à la vanne de contre-pression. Dans les différentes conditions testées, aucun impact significatif n'a été observé sur le nombre de cellules (Figure 70 et Figure 71). En effet, le dénombrement effectué sur hématimètre de Malassez demeure globalement stable au cours des 6 heures de fonctionnement du module et ne met pas en évidence la présence de fragments cellulaires.

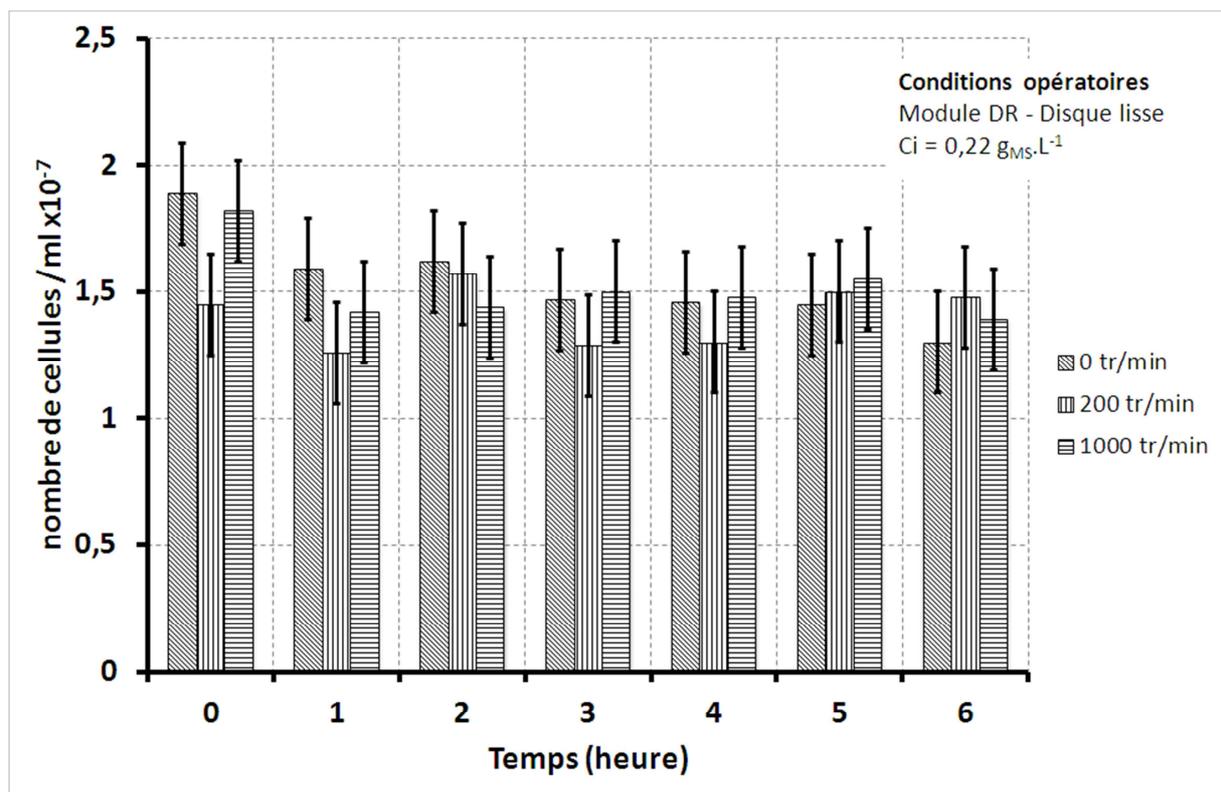


Figure 70 : Évolution au cours du temps du nombre de cellules de *Chlorella vulgaris*, pour différentes vitesses de rotation ; module de filtration dynamique à disque rotatif (DR) équipé d'un disque lisse

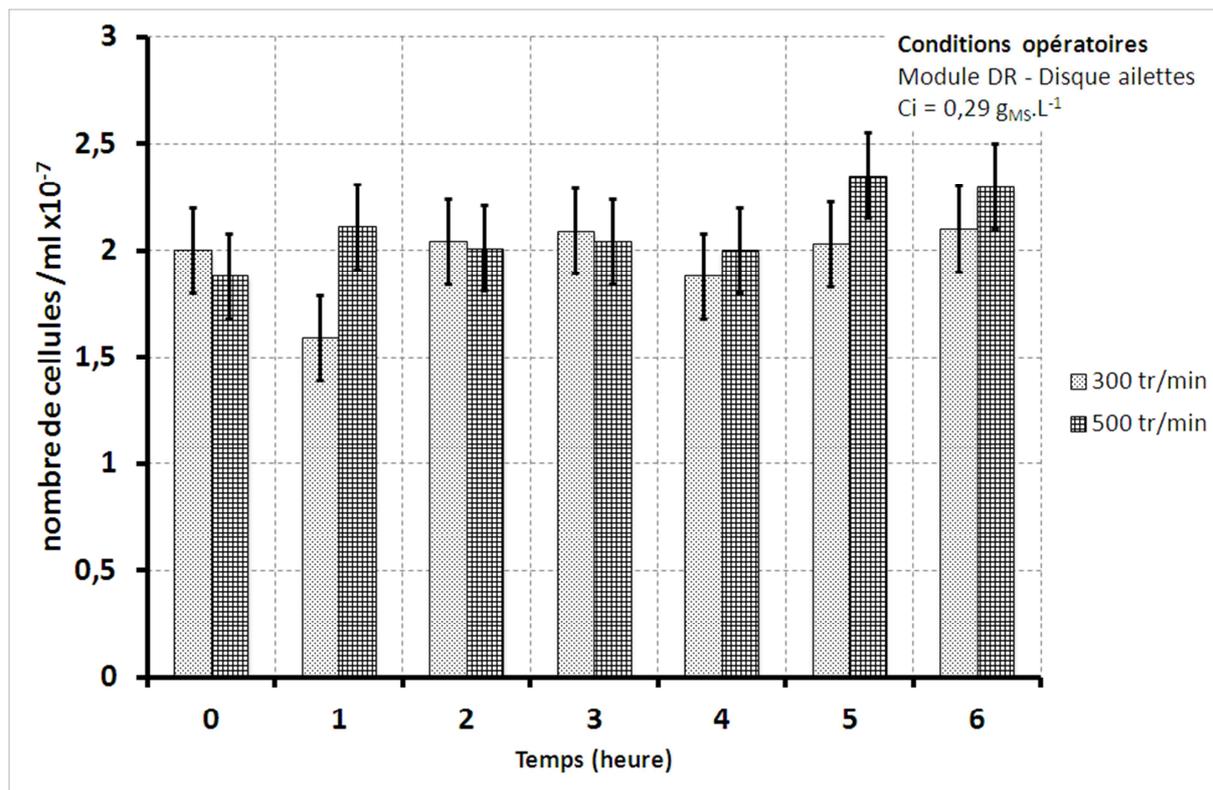


Figure 71 : Évolution du nombre de cellules de *Chlorella vulgaris* avec la vitesse de rotation au cours du temps ; module de filtration dynamique à disque rotatif équipé d'un disque à ailettes

Des exopolysaccharides peuvent également être produits en cas de stress cellulaire [Morineau-Thomas *et al.* 2002]. Un suivi des sucres par dosage colorimétrique de Dubois a donc également été réalisé. Afin de s'affranchir de la variabilité de la concentration initiale liée à l'âge de la culture, l'évolution de la production de sucres a été visualisée à l'aide du ratio de la concentration mesurée à un instant t à la concentration initiale, $C(t)/C_0$ (Figure 72 et Figure 73). Comme pour le comptage cellulaire et ce pour tous les cas (vitesse de rotation et type de disque), le rapport entre $C(t)/C_0$ oscille autour de 1 sans montrer une tendance particulière d'augmentation ou de diminution de la concentration en sucres.

Ces résultats montrent que, dans les conditions testées, le module dynamique n'induit pas de fragmentation ni de stress particulier sur les petites cellules microalgales de *Chlorella vulgaris*. De ce fait, aucun fragment ou métabolite libéré suite à la fragmentation ne sera généré et par conséquent ne participera pas à un accroissement du colmatage dans les opérations de filtration.

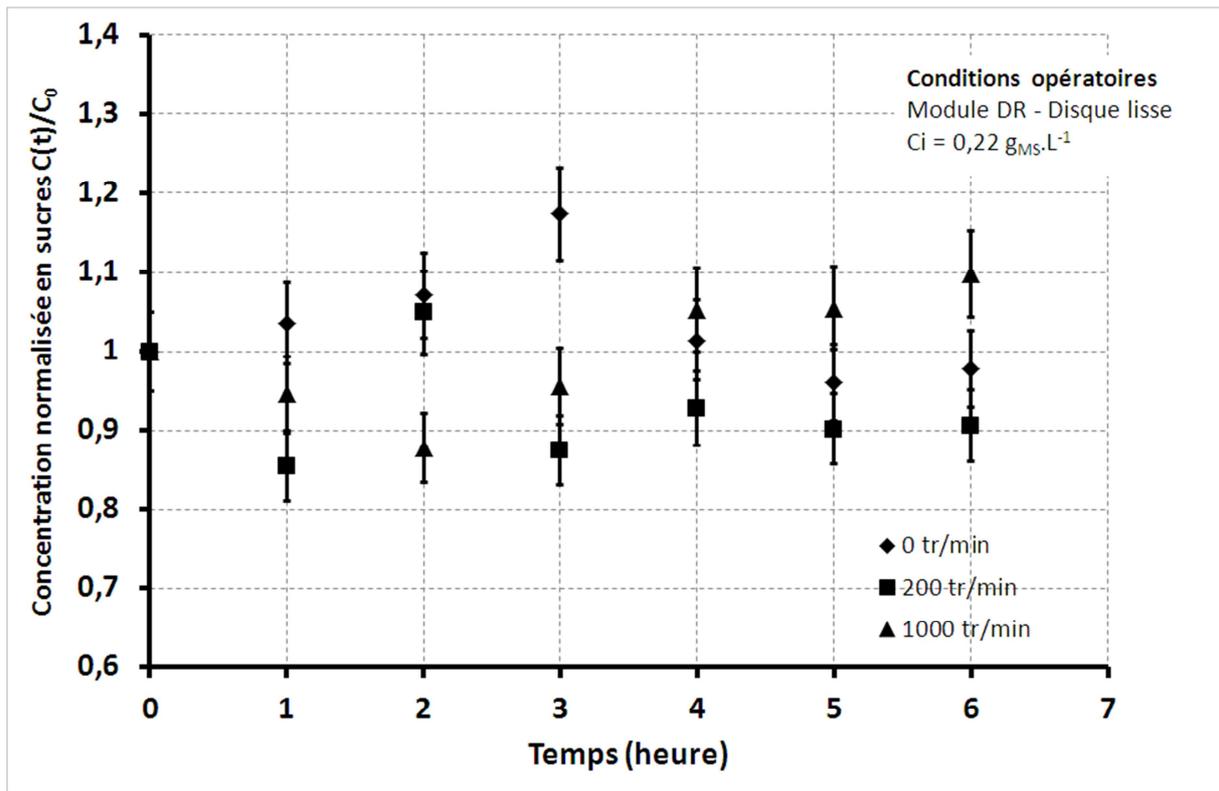


Figure 72 : Évolution de la concentration normalisée en sucres avec la vitesse de rotation au cours du temps ; module de filtration dynamique à disque rotatif équipé d'un disque lisse

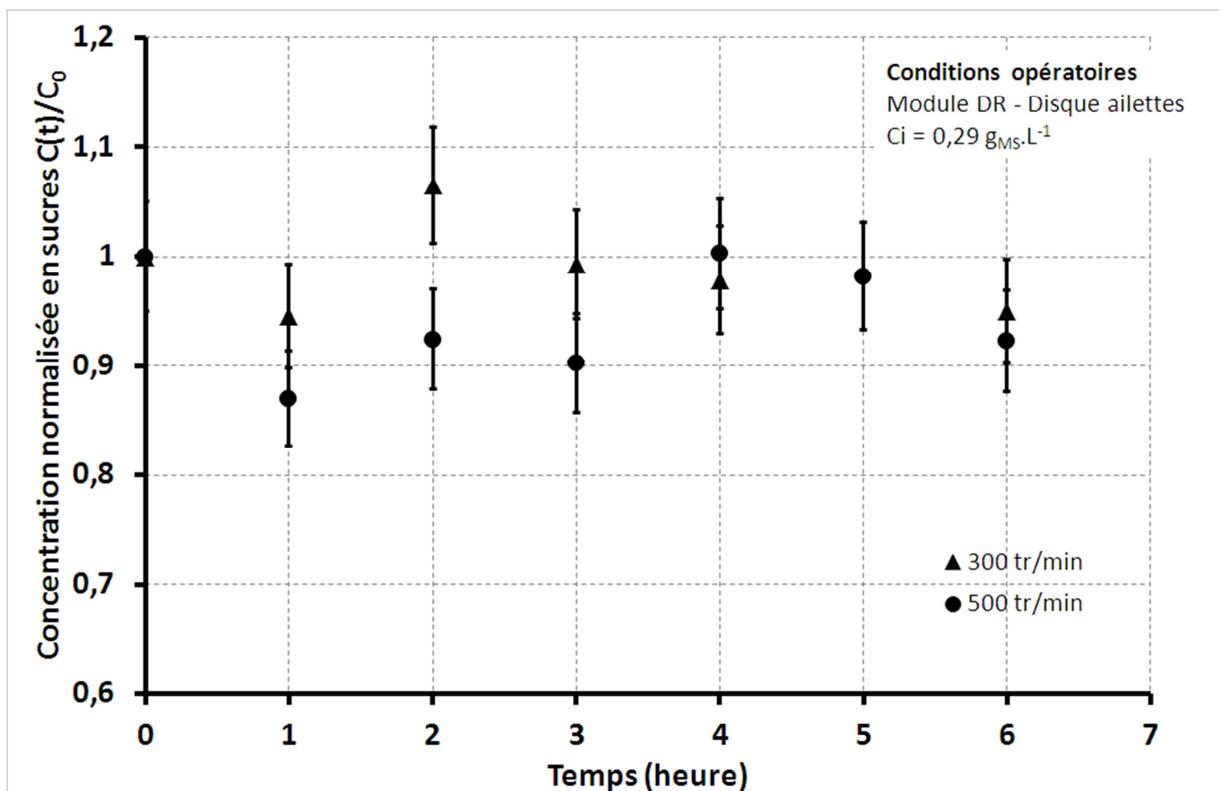


Figure 73 : Évolution de la concentration normalisée en sucres avec la vitesse de rotation au cours du temps ; module de filtration dynamique à disque rotatif équipé d'un disque à ailettes.

2.2. Récolte par ultrafiltration sur PAN 40 kDa

Afin de comparer directement les performances entre filtrations tangentielle et dynamique, un essai de concentration a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires que pour la filtration tangentielle (§ 1.2). Il convient de préciser que le suivi du flux de perméat en fonction de la PTM pour diverses vitesses (et taux de cisaillement) n'a pas été réalisée ici. Les résultats obtenus lors de la concentration de la suspension de *Chlorella vulgaris* sont montrés sur la Figure 74. Il est observé lors de la concentration de la suspension qu'une chute linéaire du flux de perméation s'amorce avec le logarithme du facteur de concentration, ce qui n'est pas sans rappeler les résultats obtenus sur le module Rayflow (Figure 67) malgré que les concentrations soient ici plus faibles (elles sont comprises entre 0,2 à 1 g_{MS}.L⁻¹ contre 3 à 46 g_{MS}.L⁻¹ sur le module Rayflow). L'extrapolation à flux nul montre qu'il serait théoriquement possible d'atteindre ici jusqu'à un facteur de concentration proche de 1000, soit 200 g_{MS}.L⁻¹.

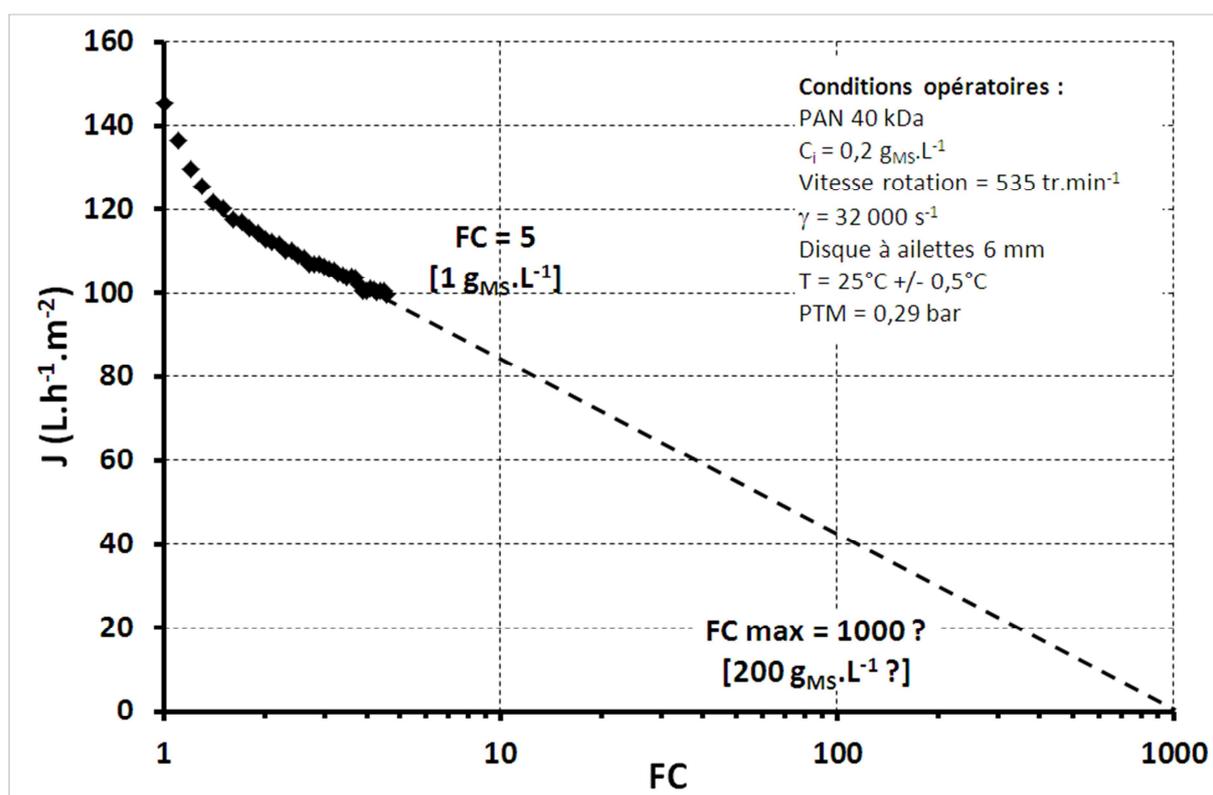


Figure 74 : Ultrafiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris*; Évolution du flux de perméat en fonction du logarithme du facteur de concentration dans le module dynamique à disque rotatif

En comparant les flux obtenus sur la Figure 67 et ceux de l'essai ci-dessus, on peut également noter qu'à concentration en biomasse identique, les flux sont plus élevés avec le module dynamique. À titre d'exemple pour 30 g_{MS}.L⁻¹ (FC = 100 sur la Figure 67 ; FC = 150

sur la Figure 74 ci-dessous), le flux de perméat obtenu pour le module tangentiel est de $22 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, alors qu'il avoisinerait, pour le module dynamique, $35 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

De plus, les analyses effectuées sur le rétentat montrent que les sucres totaux (exopolysaccharides) ont été totalement retenus par la membrane, puisque leur concentration a augmenté proportionnellement avec le facteur de concentration (Figure 75), et que le dosage réalisé sur le perméat a abouti à une concentration nulle. Ces résultats sont également encourageants pour envisager un recyclage direct du perméat pour des économies d'eau et de nutriments. Toutefois, des analyses complémentaires sur la présence éventuelle de petites molécules potentiellement inhibitrices resteront à effectuer.

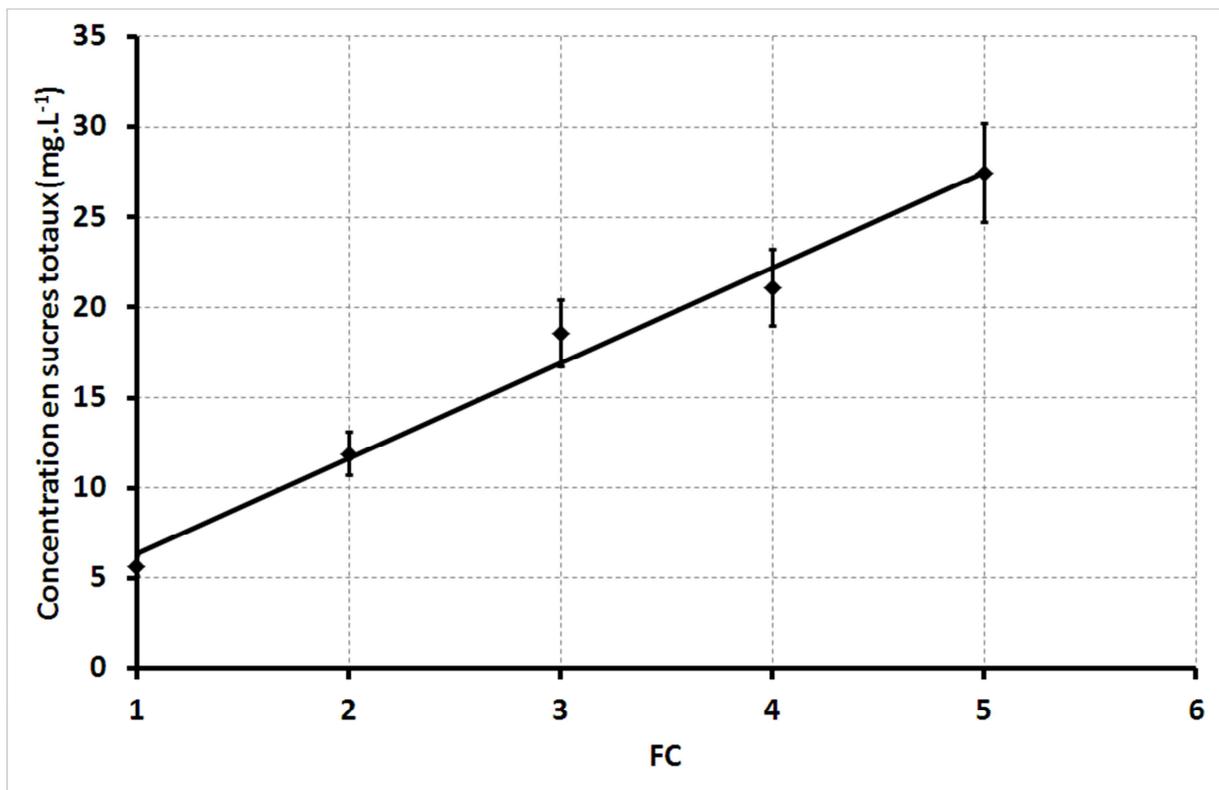


Figure 75 : Ultrafiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris*; Évolution de la concentration en sucres totaux en fonction du facteur de concentration dans le module dynamique à disque rotatif

Par ailleurs, afin de montrer l'importance de la rotation du disque sur la filtration, la concentration a été stoppée en recyclant le perméat à partir de $\text{FC} = 5$. Durant 20 minutes, le flux s'est maintenu à $100 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Puis, la rotation du disque a été arrêtée. Très rapidement le flux a chuté à $20 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Le retour de la rotation à la vitesse initiale permet en quelques minutes de retrouver près de 90% du flux initial (Figure 76). Ce type de résultat sur divers types de solutions ou suspensions avaient déjà été observés [Akoum *et al.* 2004; Mellal *et al.* 2006] et montrent le bénéfice que peut apporter ce type d'hydrodynamique.

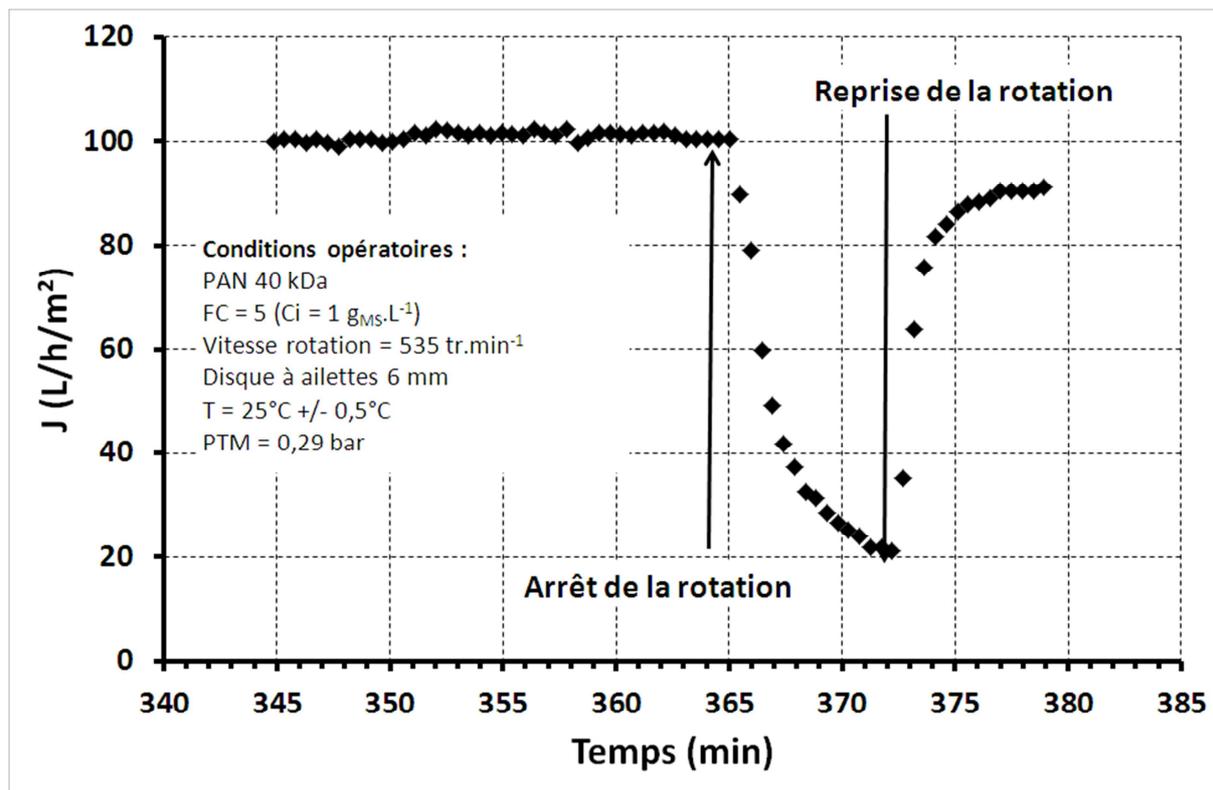


Figure 76 : Ultrafiltration d'une suspension de *Chlorella vulgaris*; Influence de la rotation du disque sur les flux de perméat

2.3. Conclusions sur l'ultrafiltration de *Chlorella vulgaris* par filtration dynamique

Les essais menés dans des conditions opératoires identiques à celles utilisées lors des essais en UF tangentielle montrent que la filtration dynamique permet, à niveau de concentration équivalent, d'obtenir des flux de filtration plus élevés et d'espérer pouvoir atteindre une concentration finale en biomasse de l'ordre de $200 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$, soit des valeurs deux fois plus élevées qu'en filtration tangentielle. Ceci peut être attribué à la fois à la limitation des effets liés aux pompes (dégradation des cellules), puisqu'en permettant des débits de pompe plus faibles, le stress cellulaire engendré par ces équipements sera moindre, mais également à l'hydrodynamique turbulente à l'intérieur du module, alors que, dans le module tangentiel, le régime était laminaire malgré des taux de cisaillement identiques.

Toutefois, des essais à plus haute concentration cellulaire devront être menés, tout d'abord pour valider les flux obtenus et affiner les concentrations maximales atteintes. En effet, à des niveaux de concentrations plus élevés, des changements de comportement rhéologique interviendront et modifieront le comportement de la suspension au cours de sa

filtration [Wileman *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013]. Pour *Chlorella vulgaris*, un comportement non-Newtonien est observé au-delà de $60 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ [Wileman *et al.* 2012 ; Souliès *et al.* 2013].

Il conviendra également d'effectuer des essais à l'échelle pilote afin d'estimer les consommations énergétiques spécifiques de la récolte par filtration dynamique.

3. Références bibliographiques

- Akoum O., Jaffrin M. Y., Ding L. H., Frappart M., Treatment of dairy process waters using a vibrating filtration system and NF and RO membranes, *Journal of Membrane Science* 235 (2004) 111–122.
- Bacchin P., A possible link between critical and limiting flux for colloidal systems: consideration of critical deposit formation along a membrane, *Journal of Membrane Science* 228 (2004) 237–241.
- Brou A., Ding L., Boulnois P., Jaffrin M. Y., Dynamic microfiltration of yeast suspensions using rotating disks equipped with vanes, *Journal of Membrane Science* 197 (2002) 269–282.
- Defrance, L., Jaffrin, M.Y., Reversibility of fouling formed in activated sludge filtration. *Journal of Membrane Science* 152 (1999) 203–210.
- Field R.W., Wu D., Howell J.A., Gupta B.B., Critical flux concept for microfiltration fouling, *Journal of Membrane Science* 100 (1995) 259-272.
- Jaouen P., Vandanjon L., Quéméneur F., The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps, *Bioresource Technology* 68 (1999) 149-154.
- Mellal M., Ding L. H., Jaffrin M., Delattre C., Michaud P., Courtois J., Extraction of oligoglucuronans of low degrees of polymerisation from a fermentation broth by cascade filtration using a rotating disk module, *Desalination* 199 (2006) 207–209.
- Morineau-Thomas O., Jaouen P., Legentilhomme P., The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella* sp. and *Porphyridium purpureum*): Advantage of a swirling decaying flow, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2002) 35–42
- Rossi N., Derouiniot-Chaplain M., Jaouen P., Legentilhomme P., Petit I., *Arthrospira platensis* harvesting with membranes: Fouling phenomenon with limiting and critical flux, *Bioresource Technology* 99 (2008) 6162–6167.
- Rossignol N., Vandanjon L., Jaouen P. and Quéméneur F., Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration, *Aquacultural Engineering* 20 (1999) 191–208.
- Souliès A., Pruvost J., Legrand J., Castelain C., Burghilea T. I., Rheological properties of suspensions of the green microalga *Chlorella vulgaris* at various volume fractions, *Rheologica Acta* 52 (2013) 589-605.

- Vandanjon L., Rossignol N., Jaouen P., Robert J. M., Quéméneur F., Effects of Shear on Two Microalgae Species. Contribution of Pumps and Valves in Tangential Flow Filtration Systems, *Biotechnology and Bioengineering* 63 (1999) 1-9.
- Wileman, A., Ozkan, A., Berberoglu, H., Rheological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production. *Bioresource Technology* 104 (2012) 432–439.
- Zhang X., Jiang Z., Chen L., Chou A., Yan H., Zuo Y. Y., Zhang X., Influence of cell properties on rheological characterization of microalgae suspensions, *Bioresource Technology* 139 (2013) 209–213.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de contribuer à l'évaluation de la faisabilité technique de deux méthodes de récolte de microalgues pour une souche d'eau douce, *Chlorella vulgaris*, la floculation naturelle et la filtration membranaire dynamique. Les performances ont été investiguées sur la base de critères relatifs aux produits obtenus telles que l'efficacité de récupération de cette biomasse, la concentration en biomasse de la fraction floculée ou la consommation en ions.

Dans un premier temps, la floculation naturelle, induite par la précipitation de composés de phosphates de calcium ou de magnésium lors de la remontée lente du pH résultant de la photosynthèse et du stripage du CO₂, a été évaluée. Une estimation des concentrations minimales en ions magnésium ou calcium requises pour floculer les microalgues a tout d'abord été effectuée par ajout instantané de soude (floculation chimique) jusqu'à un pH de 11,8, sur des milieux modèles (eau osmosée et sérum physiologique) puis réels (milieu Sueoka et milieu BBM ayant respectivement NH₄⁺ et NO₃⁻ comme source d'azote pour les microalgues). La floculation par remontée naturelle du pH a ensuite été testée pour ces deux milieux réels.

On a constaté tout d'abord que l'effet du milieu sur les conditions de floculation par ajout de soude était important, les concentrations minimales en ion magnésium et en ion calcium nécessaires à la floculation variant selon le milieu considéré (eau osmosée, sérum physiologique ou milieux réels). Les valeurs trouvées pour les milieux réels sont globalement en accord avec celles reportées dans la littérature.

La floculation naturelle par remontée naturelle du pH n'a été possible que sous certaines conditions. La principale consiste en la présence des ions nitrates comme source d'azote dans le milieu de culture (milieu BBM), seuls à permettre des élévations de pH suffisantes pour entraîner la précipitation des composés inorganiques capables de floculer les microalgues. Les milieux dont la source d'azote est apportée par les ions ammonium (milieu Sueoka) semblent en revanche devoir être exclus. Par ailleurs, les valeurs minimales pour une floculation à la soude dans le milieu BBM étant supérieures aux concentrations présentes dans les milieux de culture initiaux ($[Ca^{2+}]_0 = 6,8 \text{ mg.L}^{-1}$; $[Mg^{2+}]_0 = 13,4 \text{ mg.L}^{-1}$), on s'attendait à ce que le milieu doive être dopé en ions calcium ou magnésium pour permettre la floculation naturelle de *Chlorella vulgaris*. Cependant, il a fallu doper le milieu bien au-delà des valeurs trouvées par ajout de soude ($[Ca^{2+}]_{rs} = 34 \text{ mg.L}^{-1}$ et $[Mg^{2+}]_{rs} = 45 \text{ mg.L}^{-1}$), pour induire la floculation naturelle, à des valeurs $[Ca^{2+}]_{fn} = 120 \text{ mg.L}^{-1}$ et $[Mg^{2+}]_{fn} = 1000 \text{ mg.L}^{-1}$.

Les concentrations requises en floculation naturelle sont bien au-dessus de celles estimées par floculation à la soude, qui s'avère donc ne pas être forcément un bon modèle de la floculation naturelle comme cela est supposé par plusieurs auteurs.

Il a par ailleurs été constaté que la qualité de la floculation naturelle induite par le magnésium était supérieure à celle obtenue avec les composés de phosphates de calcium puisque, malgré des efficacités similaires, les concentrations en biomasse dans la fraction floculée sont respectivement de 33 g_{MS}.L⁻¹ pour le magnésium et de 19 g_{MS}.L⁻¹ pour le calcium. Toutefois, en termes de process, le temps nécessaire pour atteindre la floculation induite par le magnésium est beaucoup plus élevé (11 heures contre 1 – 2 heures pour la précipitation des composés de phosphates de calcium).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la floculation naturelle ne peut être envisagée que pour les souches d'eau de mer dont les milieux de culture vont contenir des concentrations en calcium et en magnésium au-dessus des minima requis, ou bien pour des souches d'eau douces mais en dopant le milieu de culture en magnésium ou en calcium.

Les perspectives de cette partie du travail sont les suivantes. Tout d'abord, il conviendrait d'identifier les causes des écarts importants constatés entre les concentrations minimales en magnésium (facteur supérieur à 20) et dans une moindre mesure en calcium (facteur 3,5) pour la floculation à la soude et la floculation naturelle : ces écarts sont-ils imputables à la présence de matière organique excrétée durant la montée en pH, à une différence entre les cinétiques de précipitation des composés minéraux, ou encore à une adaptation des microalgues ?

*Ensuite, il conviendrait de tester la floculation naturelle sur des souches carencées : le stress des cellules a-t-il un impact sur la productivité de *Chlorella vulgaris* et donc sur la vitesse de montée en pH ? Cette limitation interdit-elle la floculation naturelle ou pas ?*

Enfin, il conviendrait d'établir un ensemble plus complet des indicateurs de performance qui vont conditionner la faisabilité technico-économique du procédé, en particulier l'impact de la floculation sur l'intégrité de la biomasse et la qualité du surnageant, la reproductibilité du procédé dans des conditions de culture plus ou moins contrôlées, la consommation en ions et la dépense énergétique...

Dans les cas où la récolte par floculation (naturelle ou chimique) ne pourraient être mise en œuvre pour diverses raisons, en particulier parce qu'elle conduirait à des concentrations en biomasse trop faibles, la récolte par séparation membranaire peut s'avérer une bonne alternative. Une opération de filtration dynamique à disque rotatif a été comparée à

la filtration tangentielle classique sur la base des flux de perméation, des concentrations en biomasse atteignables et de la nettoyabilité des membranes, dans le cadre d'essais comparatifs réalisés dans des conditions similaires (matériau hydrophile en particulier).

Les essais de filtration tangentielle classique ont été menés dans un module plan Rayflow, sur deux matériaux membranaires organiques (PES MF 0,05 μm ; PAN UF 40 kDa). Dans tous les cas, la rétention cellulaire a été totale. En mode concentration, les flux décroissent linéairement avec le logarithme du facteur de concentration sur la gamme de flux étudiés (80 à 20 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) ce qui a permis par extrapolation à flux nul d'estimer la concentration théorique finale pouvant être atteinte. Ces essais, effectués sans gestion particulière du colmatage, ont montré que la filtration tangentielle ne permettait pas de concentrer les microalgues au-delà de 90 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$. L'utilisation d'un matériau membranaire très hydrophile (comme cela est le cas avec le PAN) a été confirmée comme étant la meilleure solution. Ainsi en associant ce matériau à une gestion optimale des flux par rétrolavage régulier, on peut espérer raisonnablement que ce type de filtration permette d'obtenir une biomasse humide comprise entre 50 et 80 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ avec des performances honorables (flux de perméation élevés et colmatage limité pour faciliter le nettoyage des membranes).

Les essais préliminaires réalisés en filtration dynamique ont montré que l'impact de la rotation du disque sur des cellules de petites tailles telles que *Chlorella vulgaris* était négligeable, comme l'ont indiqué les tests de comptage cellulaire et le suivi des exopolysaccharides (EPS) excrétés.

Les essais comparatifs réalisés ont montré qu'en mode concentration, l'écart entre les flux obtenus en filtrations dynamique et tangentielle s'accroissait au fur et à mesure de l'accroissement du facteur de concentration (dès 30 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$, les flux de perméation en filtration dynamique sont, au minimum, supérieurs de 50%). Par ailleurs, des concentrations nettement supérieures semblent pouvoir être atteintes en filtration dynamique, comme en témoigne l'estimation effectuée par extrapolation à flux nul basée sur la décroissance linéaire du flux de perméation, avec des concentrations maximales estimées à environ 200 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ en filtration dynamique contre 90 $\text{g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ en filtration tangentielle). Compte tenu que les conditions de cisaillement à la membrane ont été maintenues identiques dans les deux modes de filtration, cet avantage de la filtration dynamique peut probablement être attribué à la réduction du débit de pompage permettant de limiter le stress cellulaire source de génération d'EPS, reconnu comme étant les principaux composés colmatants et à son régime d'écoulement turbulent. Ces résultats doivent toutefois être confirmés par des essais à haute concentration.

Ainsi, les niveaux de concentration atteints par les deux types de filtration sont encourageants car ils peuvent être similaires à ceux que l'on peut rencontrer en centrifugation, pour une consommation énergétique probablement moindre comme cela est admis dans la littérature. La filtration dynamique, en permettant des flux et des concentrations finales plus importants tout en limitant le coût de pompage, peut être, dans certains cas, une technologie crédible pour maîtriser le colmatage inhérent à la suspension biologique traitée.

Ses performances à plus haute concentration ($> 60 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$) restent à déterminer pour positionner au mieux cette technologie notamment en cas d'insertion dans des processus à double étage de concentration pour l'obtention de biomasse de concentrations supérieures à $100 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$.

Enfin, on peut envisager de coupler les deux opérations étudiées dans ce travail, en concentrant les floccs par micro ou ultrafiltration.

ANNEXES

1. Annexe 1 : Composition des différents milieux de culture recensés pour *Chlorella vulgaris*

Composés	Composition des milieux de culture de <i>Chlorella vulgaris</i> en mg.L ⁻¹									
	Kuhl	Beneck*	BG11	Bristol*	BBM*	N8	M8	WC**	Sueoka	HAMGM
NaNO ₃			1500	250	750	1000	3000	85		
KNO ₃	1011,1	200								
NH ₄ HCO ₃										1099
NH ₄ Cl									725	
(NH ₄) ₂ HPO ₄										164
NaH ₂ PO ₄	621									
Na ₂ HPO ₄	89					260	260			
KH ₂ PO ₄		200		175,55	175	740	740		100	72,5
K ₂ HPO ₄			40	74,89	75			11,4		
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5	200	75	75	75	50	400	37	140	187
MgCl ₂										
CaCl ₂ .2H ₂ O	14,7	100	36	25	25	13	13	36,8	25	50
FeCl ₃ (1%)		2 gouttes								
FeSO ₄ .7H ₂ O	6,95						130			
NaCl				25	25					
NaHCO ₃								12,6	840	
Na ₂ CO ₃			20							
Citric Acid.H ₂ O			6							
Ferric Ammonium Citrate			6							
Na ₂ EDTA.2H ₂ O			1							
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O								21,2		
Fe EDTA						10	10			
Solution micronutrimet, mL/L	1		1			1	1	1	0,5	0,5
pH		7 – 7,5								

* Pour un milieu d'Agar à 1,5%: ajouter 15 g d'agar dans milieu de culture, ne pas mélanger

**Ajout 1ml de vitamine solution : thiamine HCl 100mg.l⁻¹, biotine 0,5mg.L⁻¹ et test buffer 115 mg.L⁻¹

composés	Composition solution mère micronutrimet (mg.L ⁻¹)						
	Kuhl	BG11	N8	M8	WC	Sueoka	HAMGM
H ₃ BO ₃	61	61			1000	11400	11400
MnSO ₄ .H ₂ O	169	169					
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287	287	3200	3200	22	22000	22000
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5	2,5	1830	1830	10	1570	1570
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	12,5	12,5				1100	1100
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O			3580	3580			
MnCl ₂ .4H ₂ O			12980	12980	180	5060	5060
Na ₂ EDTA.2H ₂ O					4360	50000	50000
FeSO ₄ .7H ₂ O						4990	4990
CoCl ₂ .6H ₂ O					10	1610	1610
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O					6		
KOH						16000	16000
FeCl ₃ .6H ₂ O					3150		

2. Annexe 2 : Protocole de production de la solution de Hutner

1) Composition de la solution de Hutner (en g/L)

Na ₂ EDTA	50	g/L
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	22	g/L
H ₃ BO ₃	11,4	g/L
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	5,06	g/L
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	1,61	g/L
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	1,57	g/L
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	4,99	g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	1,1	g/L
KOH	~16	g/L

2) Préparation

a) Dissoudre dans un bécher de 250 ml, 50 g de Na₂EDTA dans 200 ml d'eau distillée. Mettre ce bécher sur une plaque chauffante pour faciliter la dissolution.

b) Dans un second bécher de 250 ml, préparer environ 200 ml de KOH à 20 % (40 g dans les 200 ml). Laisser agiter. (**Attention la dissolution est hautement exothermique**)

c) - Dans un creuset de grand volume, mettre de l'eau du réseau avec un peu de NaCl. Y introduire une bouteille de 1 L contenant environ 500 ml d'eau distillée et un barreau aimanté.

- Faire chauffer le contenu de la bouteille dans le bain-marie du creuset.

- Introduire dans l'ordre (verre de montre + pissette d'eau) et sous agitation:

→ ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	(22g/L)
→ H ₃ BO ₃	(11,4 g/L)
→ MnCl ₂ , 4 H ₂ O	(5,06 g/L)
→ CoCl ₂ , 6 H ₂ O	(1,61 g/L)
→ CuSO ₄ , 5 H ₂ O	(1,57 g/L)
→ FeSO ₄ , 7 H ₂ O	(4,99 g/L)
→ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	(1,1 g/L)

- Laisser chauffer le contenu jusqu'à 95-100°C (la « solution » est orange et semble contenir un précipité abondant)

- Une fois la température atteinte, ajouter les 200 ml de Na₂EDTA. La solution devient verte avec un aspect bien plus translucide. Si nécessaire, attendre que la température remonte à 95-100°C.

- Une fois que tout est dissous, couper le chauffage et laisser refroidir le bain-marie. Attendre que le contenu de la bouteille de refroidisse jusqu'à environ 70°C (mais pas en dessous).

- Si nécessaire (niveau déjà important compte tenu de ajouts d'eau pour les sels puis des 200ml de EDTA), transvaser le contenu de la bouteille de 1 L vers une bouteille de 2 L. Ajuster correctement le pH entre 6,5 et 6,8 avec la solution de KOH préalablement préparée (si pas assez de solution de KOH, ajouter directement quelques pellets de KOH, **attention de ne pas dépasser le saut de pH**)

- Si nécessaire, ajuster le volume à 1 L avec de l'eau déminéralisée.

d) La solution doit être laissée à l'air libre pendant une à deux semaines jusqu'à ce que la couleur vire au violet (à noter que dès les premiers instants un précipité se forme dans la solution). Si après une semaine, la solution n'a pas encore virée, la mettre sous bullage d'air léger à l'aide d'une pipette plastique reliée au réseau d'air comprimé)

e) Filtrer alors la solution avec un filtre plissée Whatman, et stocker la solution à 4°C. Elle est dorénavant utilisable pendant quelques mois.

RESUMÉ et MOTS CLÉS

La récolte de microalgues contribue pour une part non négligeable au coût total du procédé d'exploitation. Identifier et caractériser des procédés peu énergivores pour remplacer totalement ou partiellement le procédé de référence qu'est la centrifugation représente un enjeu majeur. Ce travail s'intéresse à la floculation naturelle et aux procédés membranaires. Il a montré que la floculation naturelle permettait, par précipitation de composés de phosphates de calcium ou de magnésium lors de la remontée naturelle du pH, de préconcentrer les cellules jusqu'à $30 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$. Ce processus, relativement long, doit être maîtrisé en adaptant la composition ionique des milieux de culture (nitrate comme source d'azote, concentrations en ions Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Mg^{2+}). Cette solution ne semble envisageable que pour les souches microalgales marines dont les milieux sont riches en ces composés. Vu les concentrations modérées atteintes, cette floculation peut être considérée comme une technique de préconcentration qui nécessitera une étape supplémentaire de concentration. Le travail a également investigué les procédés membranaires monoétagés sans gestion des flux de perméation (rétrolavage, augmentation des taux de cisaillement...), qui ont permis de (pré)concentrer les cellules microalgales jusqu'à $100 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ avec des flux de perméation faibles ($< 30 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). L'emploi de la filtration dynamique, qui limite le colmatage, a autorisé l'obtention de flux de filtration plus élevés ($40 < J < 80 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). La baisse modérée de ces flux au cours de la concentration des cellules permet d'être optimiste quant à la capacité de ce type de filtration d'atteindre des concentrations élevées en une seule étape.

Mots clés : Biocarburant, Récolte, Microalgues, *Chlorella vulgaris*, Floculation naturelle, Filtration tangentielle, Filtration dynamique

Harvesting step in a global operating microalgae process whose contribute substantially to whole process cost. Identifying and characterizing low-energy processes to fully or partially replace centrifugation, the reference method, represents a major challenge. In this context, the present work investigates the potential of natural flocculation and membrane processes. So, it has been shown that the natural rise in the culture pH associated with photosynthesis allowed cells flocculation by the precipitation of calcium phosphate or magnesium compounds. Thus, the cells could be pre-concentrated up to $30 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$. This process is rather long and must be controlled by adjusting the ionic composition of the culture media (nitrate as the nitrogen source; concentrations in Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Mg^{2+}). Natural flocculation seems feasible only for marine microalgal strains for which culture media are rich in salts, but not for freshwater strains. As natural flocculation produces a low concentrated harvest, it should be considered as a pre-concentration technique which will probably require an extra step of concentration for most of applications. One stage membrane processes without fouling control (backwashing, enhancing shear-rate...) was also investigated. Microalgal cells were concentrated up to $100 \text{ g}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$ but with low permeation flux ($< 30 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Enhanced dynamic filtration that limits strongly membrane fouling allowed to obtain higher filtration fluxes ($40 < J < 80 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). The moderate flux fall with cells concentration is promising regarding the ability of this kind of filtration to reach high cell concentrations in a single step.

Keywords : Biofuel, Harvesting, Microalgae, *Chlorella vulgaris*, Natural Flocculation, Cross-flow filtration, Dynamic filtration

