HAL
open science

Etude multi-échelle de la récolte de Dunaliella salina - Développement d'un procédé d'autofloculation - flottation de microalgues

Alexandre Besson

To cite this version:

Alexandre Besson. Etude multi-échelle de la récolte de Dunaliella salina - Développement d'un procédé d'autofloculation - flottation de microalgues. Biotechnologies. INSA de Toulouse, 2013. Français. NNT : 2013ISAT0049 . tel-01221439

HAL Id: tel-01221439

https://theses.hal.science/tel-01221439v1

Submitted on 28 Oct 2015

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)*

Présentée et soutenue le *09/12/2013* **par :**

Alexandre BESSON

Étude multi-échelle de la récolte de *Dunaliella salina* - Développement d'un procédé d'autofloculation-flottation de microalgues.

JURY

Ligia BARNA	Pr. INSA-LISBP, Toulouse	Présidente du Jury
Patrick BOURSEAU	Pr. UBS-GEPEA, Saint-Nazaire	Rapporteur
Koenraad MUYLAERT	Pr. KU Leuven, Belgique	Rapporteur
Davide BENEVENTI	CR CNRS Pagora, Grenoble	Examinateur
Olivier BERNARD	DR INRIA LOV, Villefranche	Examinateur
Dominique LEGENDRE	Pr. INP-IMFT, Toulouse	Examinateur
Thomas LASSERRE	Resp. Bioénergies LCV/GDF	Invité
Pascal GUIRAUD	Pr. INSA-LISBP, Toulouse	Directeur de thèse

École doctorale et spécialité :
MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement
Unité de Recherche :
LISBP Toulouse : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792
Directeur de Thèse :
Pascal GUIRAUD
Rapporteurs :
Patrick BOURSEAU et *Koenraad MUYLAERT*

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)*

Présentée et soutenue le *09/12/2013* **par :**

Alexandre BESSON

Étude multi-échelle de la récolte de *Dunaliella salina* - Développement d'un procédé d'autofloculation-flottation de microalgues.

JURY

Ligia BARNA	Pr. INSA-LISBP, Toulouse	Présidente du Jury
Patrick BOURSEAU	Pr. UBS-GEPEA, Saint-Nazaire	Rapporteur
Koenraad MUYLAERT	Pr. KU Leuven, Belgique	Rapporteur
Davide BENEVENTI	CR CNRS Pagora, Grenoble	Examinateur
Olivier BERNARD	DR INRIA LOV, Villefranche	Examinateur
Dominique LEGENDRE	Pr. INP-IMFT, Toulouse	Examinateur
Thomas LASSERRE	Resp. Bioénergies LCV/GDF	Invité
Pascal GUIRAUD	Pr. INSA-LISBP, Toulouse	Directeur de thèse

École doctorale et spécialité :
MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement
Unité de Recherche :
LISBP Toulouse : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792
Directeur de Thèse :
Pascal GUIRAUD
Rapporteurs :
Patrick BOURSEAU et *Koenraad MUYLAERT*

Résumé & Abstract

Français - Il n'est pas constaté d'autofloculation naturelle dans les cultures hypersalines de *D. salina*. De plus, cette dernière ne flotte pas sans déstabilisation de la suspension. La floculation induite par augmentation du pH lors de l'ajout de soude a été choisie dans cette étude pour permettre la flottation. Des efficacités de récupération supérieures à 90% et des facteurs de concentration autour de 20 sont atteints. Un mécanisme d'autofloculation, avec précipitation de $Mg(OH)_2$ est proposé pour expliquer la floculation par balayage de *D. salina*. L'influence du débit d'injection de soude ajoutée est aussi étudié pour anticiper les contraintes relatives à l'industrialisation du procédé. Ce débit n'a pas d'effet sur l'efficacité de récupération des algues et réduit le facteur de concentration seulement pour les injections abruptes. L'augmentation naturelle du pH de culture par l'intermédiaire de l'activité photosynthétique pourrait permettre de réduire le taux de base consommé. Les cellules non-récoltées restent en vie durant l'augmentation du pH et pourraient être utilisées comme inoculum d'une nouvelle culture.

English - Natural autoflocculation was not observed in a *Dunaliella salina* hypersaline culture and the microalgae did not float without destabilization of the algal suspension. High-pH-induced flocculation by sodium hydroxide addition was chosen to induce flotation. Recovery efficiencies greater than 90% and concentration factors of around 20 were reached. An autoflocculation mechanism, with precipitation of magnesium hydroxide, is proposed to explain a sweeping flotation of *D. salina* cells. The influence of the flow rate of sodium hydroxide addition was also studied to anticipate the constraints related to the industrialization of this process. The flow rate of sodium hydroxide addition had no effect on the recovery efficiency and reduced the concentration factor only for abrupt injections. Natural increase of culture pH by photosynthetic activity could reduce the amount of base consumed. Non-harvested cells remained viable during pH increase and could be used as inoculum for a new culture.

Remerciements

Cette thèse qui parle des eaux a été écrite dans le feu de l'action, sur terre et dans les airs. Mais s'il est un élément sans lequel ces feuilles ne se seraient jamais griffonnées, c'est bien l'Homme ! L'Homme et ses contributions, ses conseils, ses épaules, ses délires, ses idées, ses parcours, ses amours... Des hommes et des femmes que je souhaite chaleureusement remercier pour débuter ce manuscrit qui conclut mon doctorat (NB : j'aimerais pouvoir élargir mes remerciements à l'Environnement au sens large, celui qui m'inspire et que j'expire, mais faute de hiéroglyphes universels et par refus d'anthropomorphisme abusif, je me contenterai de le respecter tout en consacrant du coup mes mots à mon espèce).

Ayant refusé le formalisme scientifique contemporain dans la suite de mon manuscrit ainsi que lors de ma soutenance, je lui concèderai la forme de mes remerciements. Nous procèderons du coup linéairement entre introduction et perspectives via les classiques références bibliographiques, matériels et méthodes, chapitres et conclusion.

En introduction, à tous donneurs tout honneur, c'est par mes plus proches parents que je souhaite entamer cette litanie de panégyriques. Ils m'ont tout donné, la vie, les bases d'une éducation dont je suis fier, cette notion de Respect, un Environnement sain et fertile, une sœur, un frère, de l'inspiration, l'orthographe, la possibilité de suivre des études longues, du temps... J'espère faire aussi bien avec leurs futurs petits-enfants. Je les sais fiers de leurs enfants et souhaite qu'ils entendent de nouveau que leurs enfants sont fiers de leurs parents et extrêmement reconnaissants des sacrifices qu'ils ont consentis pour eux ! Merci Papa, merci Maman, vous nous avez donné des ailes, n'oubliez pas que vous avez toujours les vôtres pour profiter de la Vie ! Il y a mes parents mais je n'oublie pas leurs enfants. Cette petite sœur dont les disputes infantiles ont aiguisé mon sens de l'argumentation et nos échanges apaisés favorisent aujourd'hui mon ouverture à l'art. Ce tout petit frère maintenant bien grand qui a éveillé mon sens de l'éducation et qui me pousse aujourd'hui dans mes retranchements sportifs, j'ai pas dit mon dernier mot Petit ! Merci Pauline, merci Valentin. Il y a mes parents mais je n'oublie pas les leurs. Ces moments passés à vos côtés dans vos fermes avec cousins, cousines, oncles et tantes m'ont donné ce goût du naturel et cette envie de comprendre comment il fonctionne. Les débats, les cabanes, les missions, les belotes en famille et bien d'autres ont fait fleurir mes sens critique et tactique qui comptent parmi les fondements actuels de mes raisonnements scientifiques, merci pour ça aussi !

J'ai belle veine car mes liens de sang m'ont donné à cœur de me lier à l'autre quel que soit son sang. C'est d'ailleurs sur mes liens de cœur que s'est fondée ma bibliographie. D'aucuns s'appuient sur de grands auteurs ; c'est sur ma relation à l'autre que je m'appuie pour prendre de la hauteur. L'autre s'appelle Alexandre, nous sommes différenciés par nos sobriquets et par notre inégalité devant le ronflement mais partageons ce goût pour la science, le débat, le refaisage de Monde à façon, les grands espaces escarpés, les utopies... L'autre s'appelle Aude et restera ma voisine préférée qu'importe les kilomètres qui séparent nos adresses. Il s'appelle Julien(s), Émilie(s), Amandine(s), Eléonore, Perrine(s), Anthony(s), Claire(s), Lucie(s), Mathilde(s), Pierre(s), Guillaume(s)... L'autre partage mon goût du sport et de la compétition, de la scène et du show, il a partagé mon lit et ma découverte de la Nature, il a l'esprit libre et respectueux et le cœur sur la main,... Merci à tous de m'avoir construit et sachez que si je me suis éloigné pour vaquer à mes études, je prends toujours autant de plaisir à me rapprocher de vous en Poitou ou à vous voir débarquer par surprise pour ma soutenance !

Une thèse ne pourrait se développer sans méthode et ils sont nombreux à avoir contribué à la mise en place de la mienne. Faisons fi de la chronologie et commençons par la fin, par mon dernier prof. Une étude post morthèse montre que mes chances de devenir docteur sans les contributions de Pascal Guiraud auraient été réduites d'un facteur 4. Pascal m'a fourni un sujet passionnant, des conseils pertinents, des visions éclairantes, des supports facilitants,... Pascal c'est un directeur qui a su manager un poulain impétueux, un collègue avec lequel j'ai adoré défricher nos sujets sous-marins et avec lequel nous allons continuer, un ami avec lequel je me plais à échanger sur la Vie, le Haut-Languedoc, le sport, la famille, la Science... C'est un Homme qui mérite la reconnaissance de ses collègues et de ses pairs et qui quoiqu'il arrive pourra compter sur celle de ses enfants de la Science ! J'ai aussi puisé ma méthode et nombre d'autres choses positives chez mes profs du GPE devenus collègues, Stéphane, Gilles, Arnaud, Nicolas, Dominique, Alain, Jérome, Philippe, Mathieu, Etienne, Yolaine, Ligia, Corinne, Maria, Hubert, Christelle, Stéphanie et Jean-Stéphane. J'ai croisé des profs Briouxais, Mellois, Brestois, Strasbourgeois, Sherbrookois et Toulousains, chacun a contribué à ma passion pour l'apprentissage et la connaissance. Je souhaite les remercier chaleureusement avec une mention spéciale à celles et ceux qui en plus des programmes ministériels, m'ont par leurs investissements extra-scolaires ouvert à d'autres horizons, je pense notamment à Danièle Toublet qui avec le théâtre a changé beaucoup de choses depuis mon CM1. Les profs ne sont pas les seuls à faire l'école. J'ai déjà cité quelques camarades en introduction mais mes méthodes s'inspirent aussi de mes échanges déliro-constructifs avec la team SBSW et leur prophète, ainsi qu'avec nombre de camarades croisés dans ces 24 dernières années ; Merci à tous !

Sans matériel la méthode n'est rien et sans Homme le matériel fonctionne rarement. Sans des personnes comme José Moreau, les thèses dureraient bien plus de 3 ans. Si la thèse était une voiture, José serait la pédale de droite (note poste relecture : sans mauvais jeu de mot !). José c'est l'homme à tout faire mais surtout le bien ! Merci à toi José pour tes idées, ta disponibilité, tes plans hébergements sur Gruissan et les beaux échanges que l'on a pu avoir. Merci aussi

à Frédérick d'avoir enregistré mes innombrables missions, Christelle d'avoir communiqué sur mes travaux sur petites algues et à toute l'équipe technique du hall GPE, Bernard, Dominique, Christophe, Nathalie et Aurore, pour leur soutien.

Maintenant que les bases sont bien posées, intéressons-nous au contenu spécifique de ces remerciements. Le premier chapitre est d'ordre économique. Il est consacré à l'état français et plus spécifiquement au Fond Unique Interministériel et à ses décideurs. Merci à ces Hommes et politiques qui ont rendu possible la réunion et la rémunération des acteurs cités dans le chapitre suivant au sein du projet Salinalgue. La recherche a besoin de ce type de projets collaboratifs et je vois d'un très bon œil ces contributions étatiques.

Le chapitre 2, je l'ai sur-entendu, s'adresse à mes collègues Salinalgue. Thomas, Jean-Phillipe(s), Pascal, Rosine, Julien, Régis, Hubert, Loic, Olivier, Noémie, Jacques, Christophe, Gwendoline, Arnaud, Mélissa, Frédéric, Alexis, Claire,... j'ai partagé à vos côtés trois superbes années de travail collaboratif. Puisse ma carrière se dérouler dans le même environnement professionnel que sur ce projet. Merci à vous pour cette inspiration pour la suite !

Je n'oublie pas non plus les stagiaires sans lesquelles ce manuscrit serait bien moins substantiel et leur consacre ce troisième chapitre. Nesrine, Blandine, Maeva, Wendy, Han, Ana et Emy, ma thèse et son auteur vous doivent beaucoup, ils sauront vous le rendre pour la suite !

Quand les raisonnements s'enlisent, il arrive parfois que les solutions ou les évasions salvatrices viennent du bureau d'à côté. Mon chapitre 4 vient remercier ces thésards, ces post-docs, ces ingé, ces stagiaires, ces fournisseurs officiels d'oxygène, de rire et de sorties de secours qui ont occupé les bureaux voisins. Sans Sébastien, Mélanie, Mélody, Robin, David, Patrick, Nour, Aurélien, Yoann, Benjamin, Jean-Christophe, Marlène, Daniel, Lucie, Marianne, Mathias, Claire, Damien et les autres, je n'aurai surement pas arboré le même sourire en chevauchant mon vélo chaque matin pour fendre l'air vers le labo.

Et comment ne pas se considérer chanceux lorsque le soir, on reprend son vélo bardé du même sourire pour rejoindre ses décompresseurs officiels. Ces concepts LINDEX, Monstrocoloc et Biloc, ces maisons, ces scènes, ces cènes, ces sentiers et ces temps partagés sont mes drogues. Hélène, Teddy, Guillaume, Camille, ToToM, Marion, Nabil, Manu, Constance, raideurs de toute Team et improvisateurs de toutes troupes, vous êtes mes dealers, MERCI de m'approvisionner en plaisir ! Vous avez grandement contribué au maintien de mon équilibre pendant ces 3 ans et m'avez sans cesse rappelé que j'étais là pour trouver... ceci vous valait bien les honneurs de mon dernier chapitre !

Sur ces 3 dernières années, je garde foule de belles choses en tête et vous laisse j'espère aussi de beaux souvenirs. Sans vous ce manuscrit, cette soutenance ne seraient pas et je n'arborerais pas le titre de docteur. À ce propos, j'aimerais aussi remercier Koenraad Muylaert et Patrick Bourseau d'avoir rapporté ce travail ainsi que les autres membres du jury, Ligia Barna, Davide Beneventi, Olivier Bernard, Dominique Legendre, Thomas Lasserre et Pascal Guiraud pour leurs

retours constructifs et euphorisants.

J'ai passé 3 années exceptionnelles, croisé pas mal de hauts sans connaître de véritables bas. Cette thèse, c'était un peu comme randonner sur une arête sommitale lorsque la mère de nuages est dans la vallée ! Qu'on ne me dise plus que durant une thèse on passe forcément par des moments difficiles. Avec mon Environnement, ma cordée de collègues, de parents et d'amis, ça ne pouvait que bien se passer ! Et vous savez quoi... il nous reste pas mal de sommets à visiter !

Certains s'inquiètent peut-être du quasi oubli de ma moitié dans mes remerciements. Que nenni point de goujat je n'oublie pas ma nana ! Je réserve même mes perspectives concupiscentes à cette étudiante qui vient de valider une thèse en Alexandre Besson, à cette femme avec laquelle je souhaite construire mon couple et la Vie. Hélène, parce qu'elle s'appelle Hélène, t'es une fille pas comme les autres ! MERCI pour tout ce que nous avons partagé pendant ces 3 ans et aux plaisirs de découvrir la suite entre tes mains douces et graduées de Doctor of Chiropractic !

Table des matières

Résumé & Abstract **i**

Remerciements **iii**

Table des matières **xi**

Liste des figures **xxii**

Liste des tableaux **xxv**

Introduction générale **1**

1 Contexte de l'étude **3**

1.1 La filière microalgale 5

1.2 *Dunaliella salina*, une matière première à fort potentiel 17

1.3 Objectifs généraux et démarche scientifique de l'étude 31

2 État de l'art sur la récolte des microalgues **33**

2.1 Généralités sur la récolte de microalgues 35

2.2 Pré-oxydation des algues 37

2.3 Coagulation-floculation 38

2.4 Sédimentation gravitaire 59

2.5 Centrifugation 60

2.6 Flottation 62

2.7 Filtration 68
2.8 Adsorption 70
2.9 Autres techniques de récolte 71
2.10 Séchage 72
2.11 Procédés brevetés de récolte de microalgues 72
2.12 Choix des procédés de récolte étudiés dans la présente étude 74

3 Mise au point de la plateforme analytique 77

3.1 Évaluation de la salinité 79
3.2 Comptage cellulaire 83
3.3 Spectrophotométrie 89
3.4 Caractérisation du ratio caroténoïdes/chlorophylles 98
3.5 Évaluation de la matière sèche 99
3.6 Caractérisation du pH dans les solutions hypersalines 102
3.7 Chromatographie ionique - Dionex 103
3.8 Évaluation du caractère hydrophobe des microalgues 104
3.9 Macrophotographie 104
3.10 Conservation des échantillons avant analyse 107

4 Culture de *Dunaliella salina* 109

4.1 Souches de *Dunaliella salina* 111
4.2 Milieux de culture 111
4.3 Milieu nutritif de Conway 117
4.4 Mise en place de la plateforme de culture en laboratoire 117
4.5 Procédure de suivi des cultures en laboratoire 123
4.6 Maturation des cultures 125
4.7 Culture extérieure de *D. salina* sur le site de Gruissan 129

5 Récolte de *D. salina* sans déstabilisation assistée de la suspension 133

5.1 Évaluation des performances de récolte 135
5.2 Centrifugation de *Dunaliella salina* 137
5.3 Sédimentation gravitaire 146
5.4 Flottation naturelle et flottation assistée sans déstabilisation 150
5.5 Conclusions sur la récolte sans déstabilisation 153

6 Déstabilisation assistée de la suspension algale 155

6.1 Coagulants-floculants organiques - cas du chitosane 157
6.2 Propriétés hydrophobes de *D. salina* à très hautes salinités 160
6.3 Floculation induite par modification assistée du pH 163
6.4 Conclusion 166

7 High-pH-induced flocculation-flotation of *D. salina* 167

7.1 Introduction 169
7.2 Background on pH-induced flocculation 170
7.3 Materials and methods 173
7.4 Results and discussion 177
7.5 Conclusions 185
7.6 Reprise des conclusions et perspectives 186

8 Caractérisation de la récolte de *D. salina* par autofloculation-flottation 189

8.1 Modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins 191
8.2 Influence de la quantité de base et mécanisme d'autofloculation-flottation 202
8.3 Influence des conditions d'injection de la base 210
8.4 Influence de la base utilisée pour déstabiliser la suspension algale 221
8.5 Influence de la concentration en calcium des eaux de culture 228
8.6 Influence de la salinité des eaux de culture 231
8.7 Influence de la préparation des eaux de culture 238
8.8 Influence de la souche de *D. salina* récoltée 240

8.9 Influence de l'état de carence en azote sur la récolte 242

8.10 Conclusions sur la récolte par autofloculation-flottation 244

9 Récolte semi-industrielle de *D. salina* par autofloculation-flottation 247

9.1 Pilote de flottation 249

9.2 Plateforme de récolte sur le site de démonstration semi-industriel 265

9.3 Récolte semi-industrielle de *Dunaliella salina* 268

9.4 Conclusions et perspectives sur la récolte semi-industrielle 276

Conclusion et perspectives 277

A Protocole de comptage de microalgues sur cellule de Malassez 281

B Programme Matlab permettant d'évaluer la concentration d'un échantillon 285

C Protocole d'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles 287

D Protocole d'évaluation du caractère hydrophobe d'une culture micoalgale 291

E Composition et préparation du milieu de Conway 293

F Site de démonstration semi-industriel Salinalgue 295

G Integrity conservation of *D. salina* membrane during centrifugation 299

H Protocole de caractérisation de la flottation dans le flottatest Orchidis 301

I Modélisation de la précipitation en milieu hypersalin - bases théoriques 303

J Plan du flottateur CY1 avant et après modifications 319

K Characterization of bubbles produced by DAF in saline water 323

L Diagramme PID et description des éléments de la plateforme de récolte 331

Références bibliographiques **362**

Liste des figures

1.1 Limitation du rendement photosynthétique (Melis, 2009). 8

1.2 Efficacité de la conversion d'énergie solaire dans les processus menant à la production de biomasse pour une irradiation solaire moyenne de 5 $kWh.m^{-2}$ (spectre solaire complet) ou 35 $mol.photons.m^{-2}$ (PAR) (Melis, 2009). 9

1.3 Planning général du projet Salinalgue. 15

1.4 Photo aérienne du site de démonstration pré-industriel Salinalgue localisé sur le site des salins de l'île Saint-Martin de Gruissan (Aude). 16

1.5 Organisation de l'étude de la filière de production et valorisation de *Dunaliella salina* dans le cadre du projet Salinalgue (avec l'aimable autorisation de La Compagnie du Vent). 16

1.6 Photographies de cellules isolées de *D.salina* (A. Besson). 18

1.7 Croissance (A) et production volumétrique totale de β-carotène (B) par *Dunaliella salina* en présence d'un solvant organique biocompatible (Hejazi *et al.*, 2004). . . 27

1.8 Masses volumiques à 20°C pour des eaux de salinités différentes. Courbe réalisée durant cette étude. 30

2.1 Représentation schématique de la chaîne de production de microalgues (Shelef *et al.*, 1984). 36

2.2 État dynamique d'une culture de *Dunaliella salina* après oxydation. La somme des cellules mobiles est divisée en deux catégories, les cellules pouvant se mouvoir librement et celles qui tournent sur elles-mêmes (Liu & Bourne, 1999). 38

2.3 Représentation schématique de la douche-couche électrique définie par le modèle hydrodynamique et du potentiel Zêta (Fabien Leblanc). 40

2.4 Bilan des forces et évolution de l'énergie potentielle d'interaction d'un système colloïdal A-B (Fabien Leblanc). 41

2.5 Conséquence d'une augmentation de la force ionique sur la déstabilisation d'une suspension (Fabien Leblanc). 41

2.6 Coagulation-floculation par balayage d'un hydroxyde (Fabien Leblanc). 43

2.7 Effet de la phase de croissance sur la floculation algale par ajout de polymères organiques. 45

2.8 Efficacité de récolte avec 3 polyélectrolytes différents en fonction de la force ionique (Bilanovic *et al.*, 1988). L'eau de mer méditerranée a une force ionique de 0,7. . . 46

2.9 Autofloculation dans une culture extérieure de *Sc. dimorphus*. La flèche indique l'interruption de l'agitation et de l'apport en CO_2 (Sukenik & Shelef, 1984). . . . 48

2.10 Autofloculation par ajout de NaOH : (a) concentration algale et potentiel zêta des cellules ; (b) concentrations en calcium et orthophosphates dissous après floculation et sédimentation (Sukenik & Shelef, 1984). 50

2.11 Culture et récolte par contrôle du pH de *Dunaliella tertiolecta*. (a) Suivi de la concentration algale dans le réacteur avec récolte au jour 6 par augmentation du pH à 10,5. (b) Suivi de la décantation lors de la récolte (Horiuchi *et al.*, 2003). . . 52

2.12 Efficacité de floculation de *Botryococcus braunii* à différents stades de croissance. Trois méthodes sont comparées. En blanc : ajustement du pH à 11 ; Noir : ajout de 200 *mg* de sulfate d'aluminium ; Rayé : ajout de 100 *mg* de Pestan (Lee *et al.*, 1998). 53

2.13 Effet des concentrations en Ca et Mg sur l'autofloculation (Vandamme *et al.*, 2012). 54

2.14 (a) Effet de la modification du pH sur l'efficacité de floculation et sur le facteur de concentration pour P. tricornutum après 1h de décantation ; (b) cinétique de sédimentation (Sirin *et al.*, 2012). 56

2.15 Efficacité de floculation et potentiel zêta pour *Scenedesmus sp.* (4.32 g/L) en fonction du pH (Liu *et al.*, 2013). 57

2.16 Efficacité de récolte par électrocoagulation à différents voltages pour l'algue marine *Tetraselmis sp.* (Uduman *et al.*, 2011). 58

2.17 Vue en section de différents types de centrifugeuse : (a) décanteur centrifuge, (b) séparateur à assiettes, (c) centrifugeuse à bol, (d) centrifugeuse à bol perforé, (e) hydrocylone (Pahl *et al.*, 2013). 61

2.18 Principe de fonctionnement de l'Aquadaf (Degrémont - Suez Environnement). . . 65

2.19 Influence de la phase de croissance sur la récolte par DAF en présence ou non de matière organique dissoute (DOM) dans la milieu de culture (Zhang *et al.*, 2012). 66

3.1 Indice de réfraction en fonction de la salinité réelle d'une eau salée (en $kg_{NaCl}.kg^{-1}_{solution}$). 80

3.2 Évaluation au réfractomètre ATC des salinités de plusieurs solutions connues. Résultats présentés pour 3 températures différentes. 82

3.3 Cellule de Malassez utilisée pour le comptage de *Dunaliella salina*. 85

3.4 Séquence de traitement ImageJ d'une prise de vue microscopique sur cellule de Malassez. Comptage manuel = 225 ; Comptage ImageJ = 227 (sans les étapes de discrimination, comptage ImageJ = 476). 87

3.5 Comptage cellulaire sur une suspension de *D. salina* progressivement diluée avec de l'eau douce, de l'eau de mer ou une saumure de même salinité et régression linéaire pour chacune des eaux de dilution. 89

3.6 Densité optique à 800 nm d'une suspension de *D. salina* progressivement diluée avec de l'eau douce, de l'eau de mer ou une saumure de même salinité et régression linéaire pour chacune des eaux de dilution. 91

3.7 Densité optique et concentration cellulaire dans une suspension. Les symboles différents marquent des comptages effectués à différents jours. 97

3.8 Plateforme de visualisation macrophotographique. 105

3.9 Exemples de clichés macrophotographiques obtenus sur la plateforme mise en place au LISBP. 106

3.10 Visualisation macrophotographique de la capture de particules sur une bulle fixée. 106

3.11 Vérification de la conservation des propriétés des échantillons en fonction du temps de stockage avant caractérisation. 108

4.1 Schéma de la plateforme de culture composée de 6 photobioréacteurs (PBR) de 5 L agités par bullage à l'air. 118

4.2 Photo de la plateforme de culture, avec la double rampe d'éclairage mais sans les dispositifs de limitation du pH. 120

4.3 Suivis pH de 4 cultures d'une souche Gruissan dans des eaux hypersalées IFREMER. Les zones jaunes (ou grisées) correspondent aux périodes d'éclairage. 121

4.4 Suivi du pH d'une culture de souche Gruissan dans des eaux hypersalées IFREMER limitées à un pH 7,8. Optimisation de la procédure de limitation du pH. 122

4.5 Extrait d'une procédure de suivi d'une culture LOV non carencée, réalisée dans un PBR 5 L avec un cycle d'éclairage $16h/8h$. 124

4.6 Suivi de la croissance microalgale dans les cultures Gruissan N/4 (■), LOV N (◇) et LOV N/4 (□). 126

4.7 Suivi du ratio caroténoïdes/chlorophylles dans une culture Gruissan N/4 (■). . . . 127

4.8 Suivi du ratio caroténoïdes/chlorophylles dans les cultures LOV N (◇) et LOV N/4 (□). 128

4.9 Prises de vues des gaines de production de l'inoculum des raceways sur le site de démonstration de Gruissan. 131

5.1 Prise de vue de 2 échantillons réplicats avant et après centrifugation à 500g pendant 5 min sur une culture non carencée de *Dunaliella salina*. 139

5.2 Tests de sédimentation post centrifugation modérée sur une culture non carencée de *Dunaliella salina*. 140

5.3 Centrifugation à 1000g pendant 2 min sur une culture non carencée de *Dunaliella salina*. 141

5.4 Centrifugation à 5000g pendant 10 min sur une culture non carencée de *Dunaliella salina*. 142

5.5 Outil de choix des conditions opératoires de centrifugation d'une culture non carencée de *Dunaliella salina* selon les produits désirés. 143

5.6 Efficacité de récupération par centrifugation d'une culture non carencée de *Dunaliella salina* en fonction de la RCF et du temps de centrifugation T_c (△ : $T_c = 1\ min$; ◇ : $T_c = 5\ min$; □ : $T_c = 10\ min$). 144

5.7 Exemple de cellule de *Dunaliella salina* dans le surnageant avant et après centrifugation à 10000g pendant 5 min. 145

5.8 Observation de la pâte algale obtenue après centrifugation à 10000g pendant 5 min. 145

5.9 Expérience de sédimentation naturelle réalisée sur 2 souches différentes de *Dunaliella salina* cultivées en gaines de 100 L dans des eaux de salins à 12% et limitées à un pH de 7,4. 151

5.10 Flottatest Orchidis FTH3 équipé pour une manipulation de caractérisation de l'autofloculation/flottation de *Dunaliella salina*. 152

6.1 Unité de base du biopolymère chitosane. 157

6.2 Effet du pH sur l'efficacité de suppression d'algues d'eau douce lors d'une floculation au chitosane. 158

6.3 Observations macrophotographiques de l'interaction bulle/microalgues dans des cultures de salinités différentes. Prises de vues 30 min après la mise en contact, diamètre des bulles 1 mm. 161

6.4 Expérience sur l'ajustement de la salinité par évaporation avant récolte. 162

6.5 Évolution du pH d'une suspension de *D. salina* lors de l'ajout de soude. Tests classés par jour de réalisation. 164

6.6 Performances de flottation post modification assistée du pH par ajout de soude. Tests classés par jour de réalisation. 165

7.1 pH evolutions during sodium hydroxide injection at 3 different flow rates, in syntetic Ifremer hypersaline water with Gruissan strain. 177

7.2 (◆) : pH evolution in 600 mL *D. salina* suspension sample during continuous injection of NaOH 1M (0.5 $mL.min^{-1}$) ; (▫) : pH in 600 mL *D. salina* suspensions after NaOH addition and before each flotation test. 178

7.3 *Dunaliella salina* recovery flotation efficiency (E) versus NaOH added to culture samples. (◆) : abrupt injection of NaOH ; (□) : Flow rate of NaOH addition = 0.0017 $mol.L^{-1}.min^{-1}$; (∗) : Flow rate of NaOH addition < 0.0005 $mol.L^{-1}.min^{-1}$. Error bars reflect accuracy in the evaluation of volumes and optical densities (for readability they only appear on abrupt injection tests). 179

7.4 Concentration factor (CF) of *Dunaliella salina* culture as a function of NaOH added to culture samples. (◆) : abrupt injection of NaOH ; (□) : Flow rate of NaOH addition = 0.0017 $mol.L^{-1}.min^{-1}$; (∗) : Flow rate of NaOH addition < 0.0005 $mol.L^{-1}.min^{-1}$. Error bars reflect accuracy in the evaluation of volumes and optical densities (for readability they only appear on abrupt injection tests). 180

7.5 Optical density of a *Dunaliella salina* culture inoculated with non-harvested cells after pH-induced autoflocculation-flotation. 181

7.6 SEM observation of precipitates formed during NaOH addition in hypersaline culture medium. 182

7.7 Ratio of final concentration to initial concentration of Mg^{2+} (◆) and Ca^{2+} (■) in aqueous phase after NaOH addition and flotation. C_i : ion concentration before NaOH addition and flotation, C_f : ion concentration in aqueous phase after flotation. The curve shows pH evolution in the suspension during NaOH addition. 184

7.8 Recovery efficiency (◆) and concentration factor (□) versus flow rate of NaOH addition in 600 − mL samples for a final concentration of added NaOH of 0.0085 $mol.L^{-1}$. 186

8.1 Influence de la discrétisation, sur l'évaluation des concentrations ioniques en Na^+ et Mg^{2+} lors de la simulation de l'évaporation d'une eau de mer Méditerranée. . . 195

8.2 Influence de la discrétisation, sur l'évaluation des quantités de sels précipités lors de la simulation de l'évaporation d'une eau de mer Méditerranée. 196

8.3 Molalités des principaux cations de l'eau de mer évaluées selon des méthodes différentes en fonction de la densité de la saumure caractérisée. 200

8.4 Molalités des principaux anions de l'eau de mer évaluées selon des méthodes différentes en fonction du facteur de concentration par rapport à l'eau de mer initiale (Facteur égal à 1 pour l'eau de mer). 201

8.5 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) en fonction de la quantité de base ajoutée et du pH dans une suspension de *D. salina*. (◆) : injection abrupte de NaOH ; (□) : Débit d'injection de NaOH = 0.0017 $mol.L^{-1}.min^{-1}$; (∗) : Débit d'injection de NaOH < 0.0005 $mol.L^{-1}.min^{-1}$. 203

8.6 Comparaisons expériences/simulations sur le suivi du pH lors de l'ajout de soude dans une eau synthétique Ifremer. Simulations pour différentes conditions sur le carbone inorganique dissous. 206

8.7 Simulations de l'ajout de soude dans une eau synthétique Ifremer avec différentes concentrations de carbone inorganique dissous initialement. 209

8.8 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV dans un « assemblage 4/saumure Mg » (◆), en comparaison des résultats obtenus sur une eau synthétique Ifremer (◇). 211

8.9 Simulation de l'ajout de soude dans un « assemblage 4/saumure Mg »à différentes salinités. 212

8.10 Schémas de principe des injections de base dites « directe » et « classique ». . . . 214

8.11 Performances d'autofloculation-flottation obtenues avec des modes d'injection de soude différents. L'encart photographique représente le résultat d'autofloculation-flottation post injection classique de soude (à gauche) et post injection directe de soude (à droite), pour une concentration en soude ajoutée dans les échantillons de 0,02 $mol.L^{-1}$. 215

8.12 Relevés des pH après injection de soude dans un assemblage 3,6/26, pour les deux types d'injection. 216

8.13 Relevés des pH dans un assemblage 3,6/26, après injection de solutions de soude de concentrations différentes. 217

8.14 Efficacités de récolte pour 2 quantités finales de soude ajoutée par litre de suspension initiale, en fonction de la concentration des solutions de soude ajoutée dans l'échantillon. L'encart photographique présente les 6 conditions testées pour une quantité finale de soude ajoutée par litre de suspension initiale de 0,02 $mol.L^{-1}$. Les concentrations des solutions de soude ajoutées étant de plus en plus hautes en allant vers la droite. 218

8.15 Suivi de pH lors de l'ajout séquentiel de soude sous différentes vitesses d'agitation. 219

8.16 Influence de la vitesse d'agitation lors de l'injection d'une solution de soude à $1M$, sur l'efficacité de récolte d'une souche Gruissan non carencée, cultivée dans un assemblage 3,6/26. 220

8.17 Floculation-décantation induite par ajout de diverses bases. 222

8.18 Floculation-flottation induite par ajout de diverses bases (de gauche à droite : soude, chaux, hydroxyde de magnésium). Concentrations de bases par litre de suspension algale initiale : 0.01 $mol.L^{-1}$. 224

8.19 Performances d'autofloculation-flottation obtenues avec ajout de soude ou de chaux sur une suspension de souche LOV dans des saumures synthétiques 10%. Performances exprimées en fonction de la concentration de base ajoutée et en fonction de la concentration d'hydroxydes ajoutés. 225

8.20 Simulation de l'ajout de soude et de chaux dans une saumure synthétique à 10%. Brucite (□) ; Gypse (×) ; Dolomite (∗) ; pH (⋄). 227

8.21 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche Gruissan dans des eaux synthétiques LBE. 230

8.22 pH des suspensions de *D. salina*, souche Gruissan dans des eaux synthétiques LBE et Ifremer, après injection de soude. 231

8.23 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV, dans des saumures synthétiques à différentes salinités. 232

8.24 Suivis des DO_{800} dans des cultures de souche LOV, effectuées dans des eaux réelles des marais de Gruissan, à différentes salinités. 233

8.25 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV, dans des eaux naturelles de salins à différentes salinités. 235

8.26 pH des suspensions de *D. salina*, souche LOV dans des eaux naturelles des salins à différentes salinités, après injection de soude. 236

8.27 Suivis de pH durant l'injection de solutions basiques dans des eaux de différentes salinités, prélevées directement dans le circuit des salins de Gruissan. 237

8.28 Suivis des DO_{800} dans des cultures de souche LOV, effectuées dans des eaux réelles des marais de Gruissan à 12%, issues de divers assemblages. 240

8.29 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV, dans différents assemblages à 12% d'eaux naturelles de salins. 241

8.30 Suivis des DO_{800} dans des cultures de souche LOV et Gruissan, effectuées dans des eaux circuits 12% des marais de Gruissan. 242

8.31 Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV et d'une suspension de souche Gruissan, dans des eaux naturelles de salins à 12%. 243

8.32 Boues de flottation post autofloculation observées au microscope. 245

9.1 Photo du flottateur $CY1$ de Sérinol avant modifications. 250

9.2 Schéma général du flottateur $CY1$. 251

9.3 Photo du flottateur $CY1$ de Sérinol après modifications. 252

9.4 Vérification des mesures fournies par les débitmètres électromagnétiques 254

9.5 Malvern Spraytech™ couplé avec la cellule de visualisation conçue dans cette étude, pour mesurer la distribution de taille des bulles produites par DAF 256

9.6 Cellule de mesure et vanne de dépressurisation 257

9.7 Distribution (en nombre) de la taille des bulles produites par DAF dans des eaux de différentes salinités (en $g.L^{-1}$) 258

9.8 Diamètre moyen de Sauter des bulles produites par DAF dans des eaux de différentes salinités 258

9.9 Vitesse terminale des bulles de diamètre moyen dans des eaux de différentes salinités et pour une température de 23.5°C 259

9.10 Plan d'implantation simplifié de la plateforme de récolte mise en place sur le site de Gruissan durant cette étude (réalisation : José Moreau). 265

9.11 Efficacité de récolte obtenue par autofloculation-flottation semi-industrielle en fonction de la quantité de soude ajoutée. Concentration de la solution de soude injectée : 0,2 mol/L. 270

9.12 Localisation des points d'injection de soude testés. 271

9.13 Efficacité de récolte obtenue par autofloculation-flottation semi-industrielle en fonction du lieu d'injection de la soude. La quantité de soude ajoutée par volume de suspension est fixée à 0,022 mol/L. 272

9.14 Différentes mousses de flottation obtenues selon le lieu d'injection de la soude. . . 273

9.15 Efficacité de récolte obtenue par autofloculation-flottation semi-industrielle en fonction de la concentration des solutions de soude ajoutée. La quantité de soude ajoutée par volume de suspension est fixée à 0,022 mol/L. Résultats comparés à ceux obtenus en flottattest en fonctionnement batch. 274

9.16 Échantillons de suspension initiale (à gauche), de suspension traitée (au centre) et de boues flottées (à droite) obtenus lors de l'injection d'une solution de soude à 0,1 mol/L (quantité totale ajoutée par volume de suspension : 0,022 mol/L). . . 275

9.17 Échantillon de boues obtenues après sur-concentration dans le bac de récupération des boues flottées. 275

9.18 Flottation naturelle (sans additif) d'un souche auto-floculante récemment isolée dans le cadre du projet Salinalgue. 279

K.1 Refractive indices at 23.5°C as a function of NaCl concentration in water 325

K.2 Density at 20°C as a function of NaCl concentration in water 326

K.3 Surface tension at 23.5°C as a function of NaCl concentration in water 327

K.4 Salinity ($kg_{NaCl}.kg^{-1}_{Solution}$) as a function of NaCl concentration ($g.L^{-1}$) in saline water 329

L.1 Évaluation du débit imposé par la pompe péristaltique d'alimentation, en fonction de la fréquence réglée au régulateur, pour une eau de salinité 11%. 334

L.2 Débit imposé par la pompe péristaltique d'alimentation en suspension, en fonction du temps de pompage. 335

L.3 Évaluation du débit imposé par la première pompe péristaltique d'injection de base, en fonction de la vitesse réglée sur le régulateur. (◆) : étalonnage initial ; (◇) : étalonnage réalisé 50 h d'utilisation plus tard. 337

L.4 Système d'injection mobile des solutions basiques en amont de la cuve de flottation. 338

Liste des tableaux

1.1 Contenus lipidiques de plusieurs espèces de microalgues. Données recensées par Cadoret & Bernard (2008). 10

1.2 Comparaison de diverses sources possibles de biodiesel (Chisti, 2007). 11

1.3 Quelques projets français de recherche et développement dans le secteur des microalgues. 14

1.4 Influence des facteurs environnementaux ou des paramètres de culture sur la production de biomasse et de β-carotène (Borowitzka & Borowitzka, 1989). 28

3.1 Influence de la présence de microalgues (DO_{800} des cultures supérieures à 0,4) sur la mesure de salinité par réfractométrie. Température de la suspension : 22,5°C. . 83

3.2 Comparaison des résultats obtenus sur l'évaluation du nombre d'algues sur une photo, par comptage automatique et par comptage manuel. Le comptage minutieux sert de référence. 88

3.3 Test de répétabilité des méthodes d'analyse de comptage cellulaire et de spectrophotométrie pour l'évaluation de la concentration cellulaire d'une suspension microalgale. 93

3.4 Test de reproductibilité des méthodes d'analyse de comptage cellulaire et de spectrophotométrie pour l'évaluation de la concentration cellulaire d'une suspension microalgale. 95

3.5 Test de reproductibilité de l'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles. Concentrations exprimées en µg/mL d'acétone. 99

3.6 Caractéristiques des cultures ayant servi à proposer les corrélations Ifremer sur le poids sec, le comptage et la DO des suspensions de souche Gruissan (sources : Noémie Coulombier et Loïc Le Déan) 100

3.7 Caractéristiques des cultures ayant servi à proposer les corrélations LOV sur le poids sec, le comptage et la DO des suspensions de souche LOV (sources : Hubert Bonnefond et Olivier Bernard) 101

4.1 Compositions ioniques et salines de saumures issues de l'évaporation naturelle d'une eau de mer des caraïbes (à 22,2°C). Données extraites des extrapolations proposées dans l'étude expérimentale de Baseggio (1974). 114

4.2 Concentrations ioniques (en $g.L^{-1}$) des ions principaux dissous dans les milieux synthétiques préparés au LISBP. Données évaluées à partir des quantités de sels ajoutées dans de l'eau du robinet lors de la préparation des milieux. 115

4.3 Concentrations ioniques (en $g.L^{-1}$) des ions principaux dissous dans les eaux réelles utilisées ou préparées au LISBP. Données issues d'évaluation Dionex sur des échantillons à 20°C. 116

5.1 Récapitulatif des conditions de culture testées et des résultats obtenus lors des études sur la sédimentation naturelle, flottation naturelle et la flottation assistée. Liens vers les expériences de flottation assistée post-déstabilisation. 149

7.1 EDX analyses of precipitates formed during NaOH addition in hypersaline culture medium. Areas correspond to those mentioned in figure 7.6. 183

8.1 Concentrations en principaux ions et caractéristiques moyennes d'une eau de mer Méditerranée. 198

8.2 Concentrations en principaux ions et autres caractéristiques d'une saumure synthétique de salinité totale 10%. 226

8.3 Évaluations Dionex des concentrations ioniques (en $g.L^{-1}$), pour les ions principaux dissous dans une eau du circuit des salins à 12% et dans 2 assemblages de même salinité totale. 239

8.4 Résultats de l'expérience sur l'influence de l'état de carence en azote des microalgues sur leur récolte. Concentration de soude injectée par volume de suspension : 0,0167 $mol.L^{-1}$. 244

9.1 Influence du débit d'alimentation en suspension à traiter (Qs) sur le bon fonctionnement du pilote. 262

9.2 Influence du débit d'air aspiré (Qa) sur le bon fonctionnement du pilote. 263

9.3 Influence du débit d'eaux pressurisées ajoutées (Qp) sur le bon fonctionnement du pilote 263

9.4 Influence de la pression de pressurisation des eaux (P) sur le bon fonctionnement du pilote 264

Introduction générale

L'agroalimentaire, la cosmétique, l'énergétique, la pharmaceutique, la plasturgie, ... nombreux sont les secteurs dans lesquels les microalgues sont citées comme matière première d'avenir. Ressource renouvelable par excellence, du fait de leurs caractéristiques de production de biomasse et de leur capacité à croître sans apport d'eau potable, ces microorganismes aquatiques représentent l'une des alternatives les plus crédibles aux ressources actuellement exploitées. Peu utilisée aujourd'hui, la diversité des microalgues est présentée comme une source d'innovations multiples, en phase avec les considérations environnementales actuelles. Mais avant que cette richesse sous-marine n'inonde le marché, un effort de recherche important doit être concédé.

L'émergence de la production industrielle de microalgues passe en effet par la levée de certains verrous, dont une grande partie se concentre sur l'étape de récolte. Pour atteindre la rentabilité dans la plupart des secteurs suscités, il est nécessaire de réduire les dépenses énergétiques consenties pour sortir les microalgues de leur milieu, avant d'exploiter leurs richesses. Les travaux retranscrits dans ce mémoire, réalisés dans le cadre du projet Salinalgue, s'inscrivent dans cet objectif.

La récolte de microalgues étant une thématique de recherche nouvelle au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de Toulouse, un effort important a été consacré durant cette étude à l'intégration des fondamentaux de la filière. Ce mémoire rend compte de ceci pour faciliter les éventuelles prochaines études sur le sujet.

Le chapitre 1 situe ce travail dans son contexte global. Il consacre une grande partie à *Dunaliella salina*, la microalgue d'intérêt dans le projet Salinalgue. Il permet de dégager les objectifs de l'étude et d'esquisser la démarche scientifique mise en œuvre pour les atteindre. Un état de l'art sur la récolte de microalgues mène dans le chapitre 2 à une sélection de procédés de récolte pouvant répondre aux objectifs fixés.

Les chapitres 3 et 4 concentrent une grande partie des matériels et méthodes développés et utilisés. Ces chapitres sont structurés pour faciliter le transfert des connaissances acquises sur les cultures microalgales et sur leur suivi vers d'autres chercheurs.

Les recherches originales sur la récolte de *D. salina* commencent réellement à partir du chapitre 5. La nécessité de déstabiliser les suspensions de *D. salina* mise en évidence dans ce chapitre 5

trouve une réponse immédiate dans les tests recensés dans le chapitre 6. À l'issue de ce chapitre, le couplage d'une floculation induite par une augmentation du pH et d'une flottation est choisi pour récolter *D. salina*.

En plus de mettre en évidence les bonnes performances de récolte obtenues avec ce couplage, le chapitre 7 donne une première description des mécanismes mis en jeu. Le procédé d'autofloculation-flottation alors défini est largement étudié dans le chapitre 8. Les différentes études expérimentales et la simulation des équilibres ioniques en milieux hypersalins permettent de préciser les mécanismes de séparation et de proposer de nombreuses pistes d'optimisation.

La compréhension des mécanismes et l'expérience acquise sur le procédé sont finalement mises en pratique sur la plateforme de récolte semi-industrielle développée en parallèle des essais laboratoires. Les très bonnes performances de récolte obtenues à l'échelle semi-industrielle sont rapportées dans le chapitre 9.

Chapitre 1

Contexte de l'étude

Ce chapitre permet de situer le contexte général de l'étude. Dans un premier temps, une présentation de la filière microalgale globale est proposée. Après un rapide balayage historique du secteur (§ 1.1.1), plusieurs sections permettent d'appréhender les caractéristiques qui donnent aux microalgues un attrait universellement reconnu (§§ 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4, 1.1.5). L'intérêt croissant économique et politique pour cette filière se traduit par la mise en place de nombreux programmes de recherche et développement, succinctement présentés en suivant (§ 1.1.6). Au sein de cette variété de programmes scientifiques, le projet Salinalgue, dans lequel s'inscrit cette étude, tient une place toute particulière à l'échelle française. Une rapide présentation de ce projet (§ 1.1.7) conclut la présentation de la filière microalgale et introduit celle de *Dunaliella salina* (§ 1.2), microalgue d'intérêt dans ce projet.

Les principales caractéristiques de *Dunaliella salina* sont d'abord recensées pour bien comprendre les particularités de cette microalgue qui pourront influencer les procédés de récolte utilisés (§ 1.2.1). Ensuite, pour bien cerner les conditions dans lesquelles cette microalgue est produite au sein du projet Salinalgue, une présentation rapide des types de bioréacteurs utilisés pour la culture de *Dunaliella salina* et de la plupart des autres microalgues est proposée (§§ 1.2.2.1, 1.2.2.2). Les conditions de culture particulières de *Dunaliella salina* sont explicitées en suivant (§§ 1.2.2.3, 1.2.2.4). Les valorisations possibles de cette microalgue sont ensuite recensées pour comprendre ce qui fait de *Dunaliella salina* l'une des 3 microalgues les plus produites au monde (§ 1.2.3). Pour conclure cette présentation de la microalgue, un paragraphe permet d'appréhender ce qui fait la difficulté de sa récolte, objet de l'étude retranscrite dans ce manuscrit (§ 1.2.4).

Pour refermer cette mise en contexte, il est proposé une dernière partie posant les objectifs généraux de cette étude (§ 1.3). Ces derniers s'appuient sur les analyses de la filière et de la microalgue, ainsi que sur les objectifs propres du projet Salinalgue. Le lecteur trouvera aussi dans ces lignes les grands axes de la démarche scientifique développée pendant 3 ans au LISBP.

Sommaire

1.1 La filière microalgale **5**
1.1.1 Une histoire récente 5
1.1.2 Une ressource naturelle durable et diversifiée 6
1.1.3 Une capacité à fixer le carbone inorganique 6
1.1.4 Un rendement photosynthétique, des taux de croissance et des productivités élevés 7
1.1.5 Les microalgues comme ressource énergétique 9
1.1.6 Dynamique R&D autour des microalgues en France 12
1.1.7 Le projet Salinalgue 15
1.2 *Dunaliella salina*, une matière première à fort potentiel **17**
1.2.1 Généralités sur *Dunaliella salina* 17
1.2.2 Culture de *Dunaliella salina* 20
1.2.3 Valorisations de *Dunaliella salina* 25
1.2.4 Les difficultés de la récolte de *Dunaliella salina* 29
1.3 Objectifs généraux et démarche scientifique de l'étude **31**

1.1 La filière microalgale

1.1.1 Une histoire récente

La culture d'algue en laboratoire n'a pas plus de 150 ans et son application commerciale se concentre sur les 60 dernières années. En 1942 pour subvenir aux besoins particuliers en temps de guerre, Harder et von Witsch (article non disponible en anglais) ont mis en évidence le pouvoir de production de lipides par les microalgues (Borowitzka, 2013). On peut toutefois considérer que les recherches sur « l'algue énergétique » n'ont commencé qu'en 1955 avec les travaux de Meier (Meier, 1955). Par la suite, l'avènement du pétrole a fortement ralenti la dynamique de recherche et ce n'est que dans les années 1970, durant les chocs pétroliers, que la production de biocarburants à partir de lipides fut véritablement envisagée et que les recherches sur la production d'hydrogène furent relancées au Japon, aux USA et en Europe. Entre temps, les recherches dans le secteur se sont focalisées principalement sur la production de microalgues agroalimentaires, sur leur efficacité à capter la lumière et sur l'utilisation de ces dernières dans le traitement des eaux avec de nombreux travaux d'Oswald, Golueke et Shelef notamment.

La production commerciale de microalgues est apparue au Japon dans les années 60 avec le développement de la filière *Chlorella*, pour les compléments alimentaires et la nutraceutique. Cette filière s'est étendue en Chine et dans d'autres pays asiatiques dans les années 70. La filière *Spiruline* (*Arthrospira*) s'est aussi développée dans les années 70-80 depuis le Mexique, les USA, la Thaïlande notamment et à partir des années 90 en Chine (Borowitzka, 2013).

En ce qui concerne *Dunaliella salina*, les premières cultures extérieures à grande échelle ont été conduites en Ukraine sous la direction de Massyuk dans les années 60 (Massyuk, 1965). Elle fut la troisième algue à connaitre un développement commercial à partir des années 80, en Israël, en Australie et aux USA, pour sa capacité à produire du β-carotène. À partir des années 90, l'algue d'eau douce, *Haematococcus pluvialis*, a aussi été produite pour sa capacité à générer des caroténoïdes et notamment de l'astaxanthine. La culture hétérotrophique de *Crypthecodinium cohnii* s'est aussi développée pour la production d'acide eicosapentaénoïque. En ce qui concerne *Botryococcus braunii*, sa capacité à produire des longues chaines d'hydrocarbures similaires aux carburants fossiles lui confère un grand intérêt dans les années 80, mais son développement commercial est toujours limité par sa faible vitesse de croissance.

De très gros programmes de recherche, « Algae Species Programme » aux USA et « Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE) biological CO_2 fixation programme » au Japon ont alimenté la dynamique de recherche dans les années 80 et 90. Le premier programme a notamment conclu sur la nécessité d'intégrer la production énergétique à partir de microalgues au traitement des eaux usées (Sheehan, 1998). Le second a entre autres démontré que les algues

pouvaient utiliser du CO_2 non traité en sortie d'usine (Negoro *et al.*, 1992). L'effort de recherche ne s'est pas stoppé avec la fin de ces programmes. Au contraire, la production scientifique (brevets et publications) sur le thème des microalgues a doublé entre 1998 et 2008. Il faut noter que 77% des brevets déposés sont d'origine asiatique (données issues d'un benchmark réalisé en 2009 par TecKowMetrix pour Algasud). Ceci traduit bien la dynamique de recherche actuelle autour des microalgues. Une dynamique qui fluctue et se recentre en fonction des priorités économiques et politiques du moment.

1.1.2 Une ressource naturelle durable et diversifiée

Les algues sont les seuls légumes qui ne nécessitent pas d'irrigation à base d'eau douce, ce qui en terme de bilan environnemental peut s'avérer très intéressant selon le lieu de culture. Elles peuvent se développer pour la plupart dans des eaux non potables du type eaux de mer, eaux hypersalines ou eaux usées (Cheng & Ogden, 2011). Elles ne nécessitent pas non plus l'utilisation de surfaces désignées « cultivables » (Dragone *et al.*, 2010) ce qui rend leur utilisation par d'autres secteurs que celui de de l'agro-alimentaire socialement convenable.

Il existe une très grande biodiversité micro-algale. Le nombre d'espèces de microalgues estimé est compris entre 200000 et plusieurs millions (Cadoret & Bernard, 2008). Comparativement, on recense environ 250000 espèces de végétaux supérieurs. Cette biodiversité permet l'utilisation des microalgues dans des secteurs aussi variés que l'énergétique (Demirbas, 2010), l'agroalimentaire (Becker, 2007), la nutraceutique, la cosmétique, la pharmaceutique (Rosenberg *et al.*, 2008), ... Aujourd'hui, seule une trentaine d'espèces de microalgues sont exploitées industriellement.

1.1.3 Une capacité à fixer le carbone inorganique

Il existe 4 principaux types de conditions de cultures pour les microalgues : photoautotrophie , hétérotrophie , mixotrophie et photohétérotrophie (Chojnacka, 2004). La photoautotrophie est la capacité à produire de la matière organique à partir de la réduction de matière inorganique et d'une source d'énergie externe, en l'occurrence, de la lumière. L'hétérotrophie est la capacité à produire de la matière organique, uniquement à partir de sources de carbone organique. La mixotrophie caractérise les organismes capables de se nourrir soit par autotrophie, soit par hétérotrophie ou soit par les deux modes trophiques simultanément. La photo-hétérotrophie caractérise certains organismes capables de combiner comme sources d'énergie, la lumière et des molécules organiques.

Seule la culture photoautotrophique sera considérée dans la suite de ce manuscrit. C'est le moyen de culture le plus commun des microalgues, car il permet notamment de réduire les problèmes de contamination de culture (Chen *et al.*, 2011). Dans ces conditions, l'algue utilise l'énergie lumineuse et le carbone inorganique (principalement CO_2 et bicarbonate) pour produire l'énergie chimique nécessaire à son développement (Huang *et al.*, 2010). La production d'un kilogramme de biomasse entraine la fixation moyenne de 1,8 kg de CO_2 (Chisti, 2007). Cette capacité à fixer le carbone inorganique permet d'expliquer l'intérêt croissant porté par de nombreux industriels aux microalgues dans un contexte de marché du carbone.

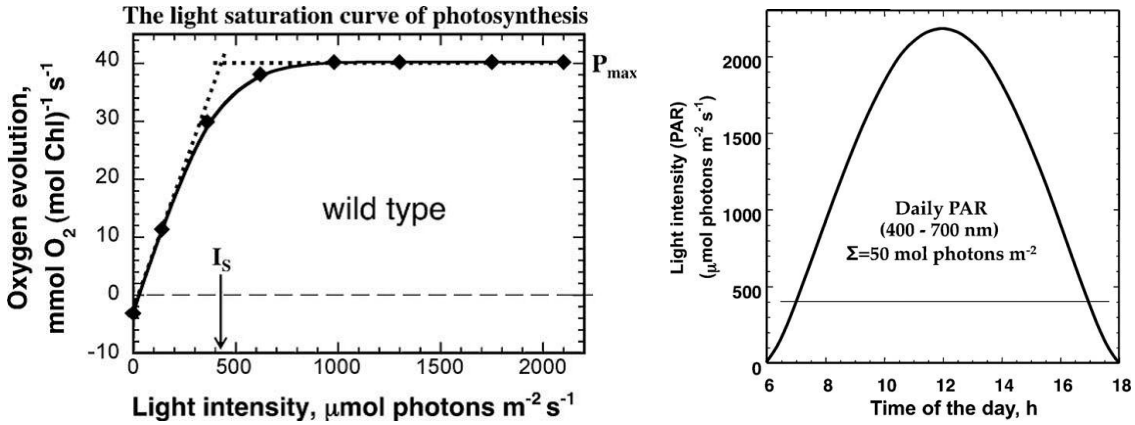
Cet intérêt est croissant mais n'est pas nouveau. Benemann (1997) notamment a étudié la possibilité de produire des biocarburants à partir d'algues cultivées dans de grands bassins alimentés en CO_2 anthropique dans l'objectif premier de traiter ce CO_2. Les besoins de larges espaces, de climat extrêmement favorable et d'eau réduisaient selon lui à l'époque le potentiel d'une technologie de fixation du CO_2 en sortie d'usine par les microalgues. Il arguait que la rentabilité pouvait être plus rapidement atteinte en couplant la fixation du CO_2 avec un traitement des eaux usées par les microalgues.

Il faut préciser que les microalgues fixent le carbone mais ne le piègent pas. Le carbone capté lors de la photosynthèse est, en conditions normales, rejeté lors de la combustion du carburant produit par exemple (Jorquera *et al.*, 2010). Les microalgues peuvent permettre de réduire l'extraction du carbone de cycle long, mais ne permettent pas à court terme de le réinjecter dans ce dernier. De plus, il est nécessaire d'éviter la décomposition anaérobie des algues pour ne pas produire de méthane, qui de par son fort PRG (Pouvoir de Réchauffement Global), amputerait fortement le bilan carbone de la filière s'il n'était pas capté.

1.1.4 Un rendement photosynthétique, des taux de croissance et des productivités élevés

Comparativement aux végétaux supérieurs, les microalgues ont de très forts taux de croissance, ce qui permet d'envisager de très fortes productivités à l'hectare. Les scientifiques annoncent, selon les algues et leurs conditions de culture, des taux de croissance de 10 à 100 fois plus importants que ceux constatés pour les végétaux supérieurs. Certaines espèces suivent des temps de doublement de leur population de 4,3 heures dans des conditions optimales. En extérieur, on trouve des algues capables de doubler leur population plus de 2 fois par jour (Sheehan, 1998).

Ces taux de croissance sont la conséquence du rendement photosynthétique très élevé rencontré chez les microalgues. Ceci traduit le fait qu'elles captent et stockent de manière efficace l'énergie lumineuse incidente qu'elles reçoivent. Des études montrent que pour certaines microalgues, environ 9,5 moles de photons permettent la fixation d'une mole de CO_2, alors que le rendement



(a) Courbe de saturation lumineuse de la photosynthèse pour des microalgues sauvages

(b) Profil de radiation solaire photosynthétique active journalière

Figure 1.1 – *Limitation du rendement photosynthétique (Melis, 2009).*

théorique maximal de photosynthèse indique qu'à minima 8 moles de photons sont nécessaires pour fixer 1 mole de CO_2 (Melis, 2009). Ces chiffres sont à nuancer car obtenus en conditions optimales et pour des irradiations solaires limitées. Sur la figure 1.1 on constate en effet que passé un certain seuil, l'augmentation de l'irradiation solaire n'entraine plus d'augmentation d'émission d'oxygène et donc de fixation de carbone. Lorsque que l'on compare ce seuil au profil de radiation solaire active on comprend qu'une partie des photons incidents ne sera pas utilisée à des fins de production de matière algale au moins par les algues à la surface de la culture. En considérant l'effet de dissipation de la lumière dans une culture, Melis *et al.* (1998) estiment que 60% des photons incidents ne sont pas actifs pour la photosynthèse dans une culture de *Dunaliella salina*. En bout de chaine, on considère que le taux optimal de conversion énergie solaire / biomasse est d'environ 10% (figure 1.2).

Ce rendement maximal théorique est de l'ordre de ceux rencontrés chez certains végétaux supérieurs mais il est plus facile de s'en approcher pour les microalgues. En effet, les conditions de croissance en phase liquide sont plus faciles à optimiser et permettent notamment de ne pas être limité par l'apport en carbone (Cadoret & Bernard, 2008).

En considérant que 9,5 moles de photons permettent de fixer 1 mole de CO_2 dans 30 g de biomasse algale (CH_2O), pour une irradiation moyenne de 35 $mol.photons.m^{-2}$, la productivité de biomasse maximale serait de 110 $g.m^{-2}.jour^{-1}$. Si l'on ajoute les pertes dues à la respiration cellulaire et aux autres métabolismes cellulaires, on obtient une productivité de biomasse maximale d'environ 77 $g.m^{-2}.jour^{-1}$ (Melis, 2009).

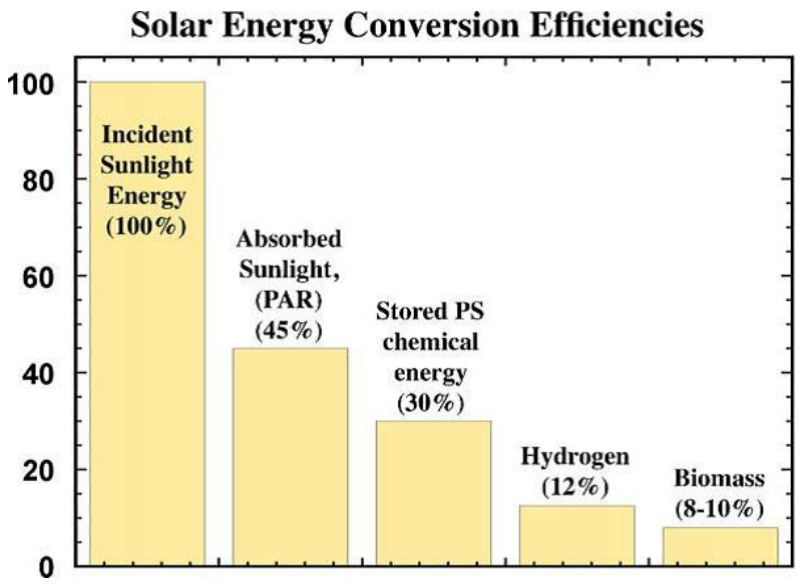


Figure 1.2 – *Efficacité de la conversion d'énergie solaire dans les processus menant à la production de biomasse pour une irradiation solaire moyenne de* 5 $kWh.m^{-2}$ *(spectre solaire complet) ou* 35 $mol.photons.m^{-2}$ *(PAR) (Melis, 2009).*

1.1.5 Les microalgues comme ressource énergétique

Les microalgues sont valorisées ou valorisables dans de nombreux secteurs, mais du fait de la déplétion des ressources fossiles alimentant le secteur énergétique, un très fort intérêt se porte aujourd'hui sur leur utilisation dans ce secteur clé de l'économie mondiale (Stephens *et al.*, 2010). La majeure partie des investissements aujourd'hui consentis dans le secteur des microalgues est fléchée vers la production de bioénergie.

Certaines microalgues peuvent accumuler dans des conditions particulières de stress jusqu'à 75% de leur masse de matière sèche en lipides (tableau 1.1), principalement sous forme de triglycérides, contre 5% pour les végétaux supérieurs (Metting, 1996; Amaro *et al.*, 2011). Ceci permet d'envisager leur utilisation pour la production de biodiesel (Gouveia & Oliveira, 2009). Ce biocarburant, baptisé de 3e génération, n'entre pour l'instant pas en concurrence avec l'utilisation alimentaire des ressources renouvelables, contrairement au biodiesel issu d'huiles végétales (Mata *et al.*, 2010).

Il est possible de doper la production de lipides par l'application d'un stress (carence en azote, en silice pour les diatomées, augmentation soudaine de l'intensité lumineuse, choc thermique ou osmotique). Les rendements en lipides des microalgues peuvent être 20 à 30 fois supérieurs à ceux des cultures oléagineuses types colza et tournesol (Moheimani & Borowitzka, 2006). Considérant ces caractéristiques, on comprend pourquoi les microalgues possèdent, parmi les cultures énergétiques, les meilleurs taux théoriques de production d'huile : 136900 L d'huile par

Espèces	Contenu lipidique maximal (%MS)	Sources
Botryococcus braunii	29-75	(Sheehan, 1998)
Chlorella protothecoides	15-55	(Xu *et al.*, 2006)
Cyclotella DI-35	42,1	(Tadros, 1985)
Dunaliella tertiolecta	71.4	(Takagi *et al.*, 2006)
Hantzschia DI-160	66	(Tadros, 1985)
Isochrysis sp.	7-33	(Sheehan, 1998)
Nannochloris	6-63	(Sheehan, 1998)
Nannochloropsis	31-68	(Sheehan, 1998)
Neochloris oleoabundans	35-54	(Sheehan, 1998)
Nitzschia sp	45-50	(Sheehan, 1998)
Phaeodactylum tricornutum	31	(Sheehan, 1998)
Pleurochrysis carterae	32-35	(Moheimani & Borowitzka, 2006)
Scenedesmus TR-84	44,7	(Tadros, 1985)
Stichococcus	9-59	(Sheehan, 1998)
Tetraselmis suecica	15-32	(Sheehan, 1998)
Thalassiosira pseudonana	21-31	(Brown *et al.*, 1996)

Tableau 1.1 – *Contenus lipidiques de plusieurs espèces de microalgues. Données recensées par Cadoret & Bernard (2008).*

hectare et par an contre moins de 10000 L pour les cultures oléagineuses classiques (tableau 1.2). Il faut noter qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de démonstrateur industriel permettant de valider de tels taux.

Type de culture	Productivité théorique d'huile (L/ha)
Maïs	172
Soja	446
Colza	1190
Jatropha	1892
Noix de coco	2689
Huile de palme	5950
Microalgue (MS = 30% huile)	58700
Microalgue (MS = 70% huile)	136900

Tableau 1.2 – *Comparaison de diverses sources possibles de biodiesel (Chisti, 2007).*

Le dopage de la production de lipides s'accompagne d'une baisse de la productivité en biomasse algale (Chen *et al.*, 2011), ce qui limite la productivité en huile. Des conditions optimales de production sont déduites de la prise en compte de cette limitation et de nombreux travaux sont en cours, notamment en génétique, pour permettre de maximiser à la fois les productions de biomasse et de lipides.

Le biodiesel n'est pas le seul vecteur énergétique envisagé à partir de microalgues. La méthanisation de la biomasse algale peut par exemple permettre la production de gaz naturel (Sialve *et al.*, 2009). Il a aussi été vu précédemment que certaines microalgues peuvent générer la production d'hydrogène. Il est aussi possible de produire du bioéthanol par fermentation des sucres de production algale, de pratiquer une combustion directe de la biomasse ou de passer par des conversions thermochimiques de cette biomasse comme la gazéification ou la pyrolyse (Huesemann & Benemann, 2009).

Aujourd'hui, de nombreuses startups, principalement américaines, tentent de commercialiser des carburants à base d'algues (Chisti & Yan, 2011). Des études théoriques montrent que ces derniers seraient économiquement viables pour un prix du baril de pétrole supérieur à 100 $\$US$ (Stephens *et al.*, 2010), mais malgré un prix actuel du baril supérieur à ce seuil, aucune entité ne peut actuellement se targuer de produire des biocarburants algaux de manière rentable face aux carburants fossiles. La plupart des chercheurs s'accordent à dire que le seuil de rentabilité ne sera pas atteint avant 10 ou 20 ans.

1.1.6 Dynamique R&D autour des microalgues en France

La filière microalgale est très dynamique à travers le monde et la France n'est pas en reste en ce qui concerne la recherche. Elle figure parmi les premiers pays déposant de brevets et de publications scientifiques sur le sujet (étude bibliométrique réalisée en 2009 dans le cadre de l'action collective Algasud). Outre le projet Salinalgue, cadre de cette étude, de nombreux projets de recherche ont vu le jour récemment en France. Le tableau 1.3 présente une partie de ces projets.

Malgré cette dynamique de recherche, la France ne représente qu'une faible part des investissements industriels mondiaux dans le secteur des microalgues. Des initiatives comme par exemple la création de la plateforme technologique régionale défi-μALG ont pour objectif de répondre à cet état de fait. Cette plateforme, portée par le GEPEA, a pour ambition d'intensifier le développement de la filière en région Pays de la Loire par l'acquisition d'un démonstrateur de recherche et de développement. Il s'agit de démontrer la faisabilité industrielle des procédés développés en laboratoire.

Acronyme du projet	Objectif principal	Type de projet	Dates	Partenaires
SymBio2	Cultiver des microalgues en biofaçades.	FUI	2013 – 2017	X-TU Architects ; GEPEA ; Séché Environnement ; OASIIS ; AlgoSource Techno
Facteur 4	Amélioration non-OGM des performances de microalgues.	ANR	2012 – 2015	PBA ; BIOCORE ; LOV
SHAMASH	Production de biocarburant lipidique à partir de microalgues autotrophes.	ANR	2006 – 2009	COMORE ; LOV ; PBA ; LB3M ; LGPEB ; GEPEA ; M2P2 ; Alpha Biotech
SYMBIOSE	Couplage production microalgale/digestion anaérobie.	ANR	2009 – 2011	Naskeo ; LBE ; COMORE ; ECOLOG ; PBA
BIOSOLIS	Développement de photobioréacteurs solaires intensifiés.	ANR	2007 – 2010	GEPEA ; LGCB ; PROMES ; Enki Innovation ; Sibylux ; Saint-Gobain
Lip-Alg	Étude des profils lipidiques des algues.	Programme Energie CNRS	2009 – 2012	LB3M ; GEPEA ; CEMCA
ALGOMICS	Étude de la conversion et du stockage de l'énergie chez les microalgues.	ANR	2008 – 2012	LB3M ; GEPEA ; MetaSys ; EDyP ; Genoscope
DIESALG	Production de biodiesel par les microalgues.	Programme Bio-matières et énergies	2012 – 2015	GEPEA ; LTB CEA ; Alpha Biotech
SOLAR-H2	Production de biohydrogène à partir du soleil et de l'eau.	Programme Energy (initiative européenne)	2008 – 2011	CNRS ; CEA

Suite en page suivante...

Acronyme du projet	Objectif principal	Type de projet	Dates	Partenaires
		... suite de la page précédente.		
ALGO-H2	Production biologique d'hydrogène par voie photosynthétique.	ANR	2011 – 2015	LB3M ; BIP ; GEPEA ; LGCB ; iBiTec-S

Tableau 1.3 – *Quelques projets français de recherche et développement dans le secteur des microalgues.*

1.1.7 Le projet Salinalgue

À l'heure actuelle, le projet Salinalgue est le plus grand projet français de culture de microalgues pour une valorisation en bioénergies et autres bioproduits. Ce projet R&D regroupe des grands groupes industriels (La compagnie du vent, Air liquide), des PME (Idee aquaculture, Naskeo, Someval) et des laboratoires de recherche (LISBP, Ifremer, CEA, LBE, Green, LM2P2, LOV, Tour du Valat). Sélectionné au 9e appel à projets « Fonds Unique Interministériel » il bénéficie d'une subvention publique de 3,9 M€ pour un budget total de 7,5 M€. Il est labellisé par 4 pôles de compétitivité : pôle mer PACA, Trimatec, Derbi et Cap Energies.

Ce projet prend corps sur le constat que les zones littorales humides du sud de la France présentent un écosystème particulièrement favorable au développement de l'algoculture. De grandes superficies sont en effet mobilisables : les salins. Les savoirs faire ancestraux de gestion des eaux pour la production de sel et le besoin de reconversion partielle d'activité de l'industrie du sel en font des lieux privilégiés pour l'implantation d'une future filière de production microalgale. La présence naturelle de microalgues valorisables dans ces marais et la proximité d'usines grosses productrices de CO_2, renforce l'intérêt de ces espaces.

Les partenaires du projet Salinalgue s'attachent à démontrer la faisabilité technico-économique d'une filière de production et valorisation de la microalgue native *Dunaliella salina* et ce, en vue d'un déploiement industriel progressif à partir de 2016 (figure 1.3). Pour ce faire, un démonstrateur disposant de 1000 m^2 de surface cultivable a été construit sur le site des salins de l'île Saint-Martin à Gruissan (Aude - France). Cet outil, visible sur la photo aérienne 1.4, permet l'étude de la production de *Dunaliella salina* et de sa valorisation en bioénergies (biométhane, biodiesel), bioproduits (β-carotène, oméga 3) et en aliments aquacoles.

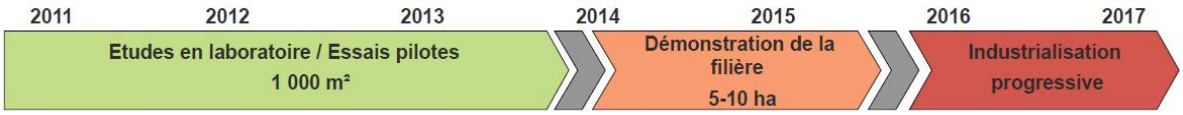


Figure 1.3 – *Planning général du projet Salinalgue.*

Au sein du consortium Salinalgue, les partenaires apportent leurs compétences spécifiques pour mettre en place chacune des étapes de la filière globale, dans une optique permanente de développement durable (voir figure 1.5). Le LISBP a comme charge principale de développer et optimiser un procédé de récolte innovant de *Dunaliella salina*. Cette étape de récolte est régulièrement identifiée comme l'un des verrous principaux au développement des filières microalgales. Ce manuscrit reprend une partie des travaux menés dans l'optique de lever ce verrou en commençant par la prise de connaissance avec cette microalgue, objet de toutes nos attentions et de la section suivante !

Figure 1.4 – *Photo aérienne du site de démonstration pré-industriel Salinalgue localisé sur le site des salins de l'île Saint-Martin de Gruissan (Aude).*

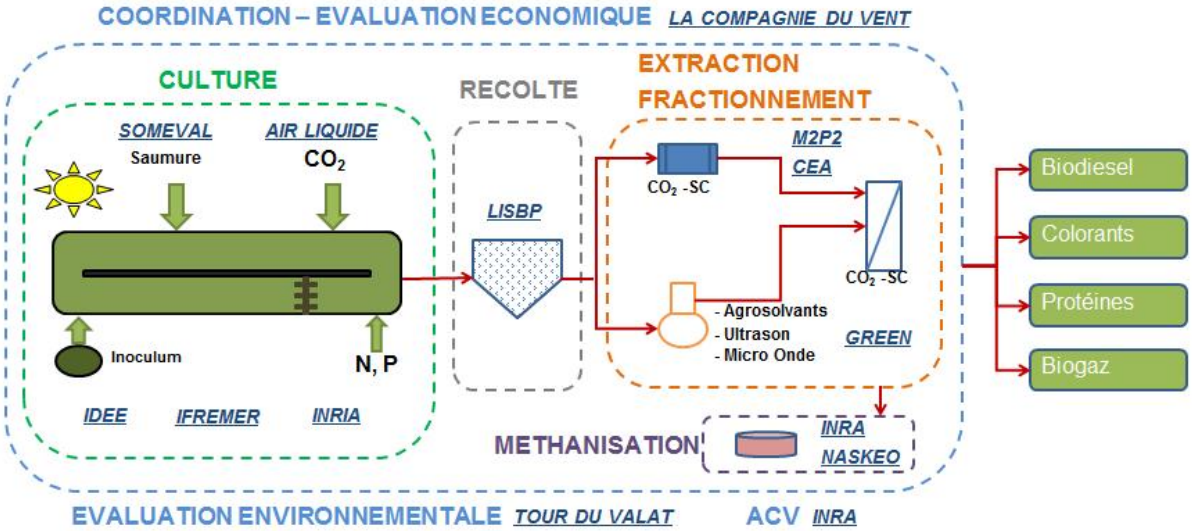


Figure 1.5 – *Organisation de l'étude de la filière de production et valorisation de Dunaliella salina dans le cadre du projet Salinalgue (avec l'aimable autorisation de La Compagnie du Vent).*

1.2 *Dunaliella salina*, une matière première à fort potentiel

1.2.1 Généralités sur *Dunaliella salina*

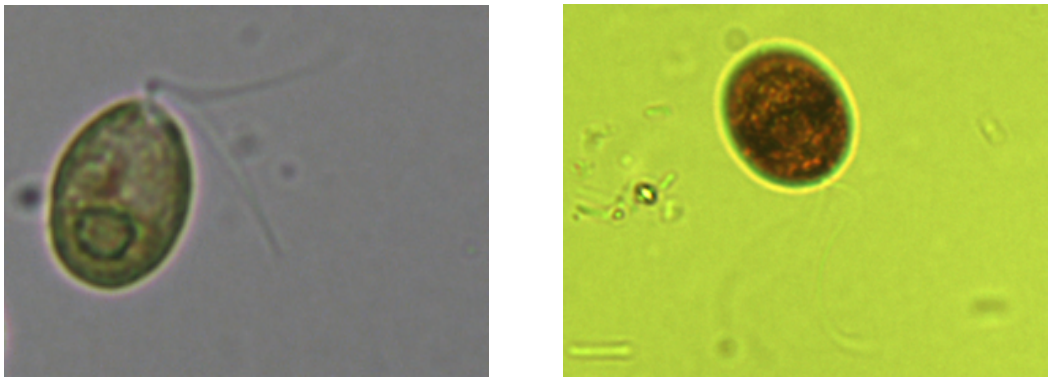
1.2.1.1 Taxonomie

Dunaliella salina est une microalgue unicellulaire dont la taxonomie fut proposée pour la première fois en 1905 par Teodoresco (Oren, 2005). C'est une espèce du domaine Eukaryota, du règne Plantae, du phylum Chlorophyta, de la classe Chlorophyceae, de l'ordre Chlamydomonadales (= Volvocales), de la famille Dunaliellaceae et du genre *Dunaliella* (Gonzalez *et al.*, 2009). Il faut noter qu'à l'intérieur du genre *Dunaliella* qui comprend aujourd'hui 28 espèces, il est parfois très difficile de différencier ces dernières.

1.2.1.2 Environnement naturel

Dunaliella salina est naturellement présente dans les marais salants et les mers à forte salinité (Polle *et al.*, 2009). Elle est par exemple présente sur le site des salins de l'île Saint-Martin à Gruissan et une partie des études recensées dans ce manuscrit est effectuée avec une souche isolée dans ces marais. Elle est l'un des organismes eucaryote les plus tolérants aux conditions environnementales extrêmes. Elle peut supporter des salinités massiques allant de 3% à la saturation en NaCl, des pH de 5,5 à 11 et des températures comprises entre 0 et 40 °C (Ginzburg, 1987; Mishra *et al.*, 2008). Dans ces gammes de conditions, *Dunaliella salina* est en suspension mobile.

Sa caractéristique membranaire la rend très digeste par les animaux et notamment par *Artémia salina* qui colonise le même type d'environnement. Cette crevette, aliment principal des flamants roses, est le principal prédateur de *Dunaliella salina* avec certains ciliés et autres protozoaires. Au sein du projet Salinalgue, des études sur l'impact environnemental du lancement de la filière sont réalisées en considérant les populations d'*Artémia salina* et de flamants roses.



(a) Forme verte (b) Forme orange

Figure 1.6 – *Photographies de cellules isolées de D.salina (A. Besson).*

1.2.1.3 Morphologie

Cette algue verte halophile est pourvue de 2 flagelles d'égale longueur. Selon le taux d'irradiation lumineuse auquel elle est soumise, sa couleur apparente passe d'une teinte à dominante verte à une teinte rouge sang (figure 1.6). Ses dimensions moyennes sont de 11 µm de longueur (a) et 6 µm de largeur (b). Elle est de forme ovoïdale et son volume varie entre 50 et 100 μm^3 (Mishra *et al.*, 2008). Ce dernier est exprimé comme suit (Giordano, 2001; Giordano & Bowes, 1997) :

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (a \cdot b^2) \tag{1.1}$$

Elle ne possède pas de paroi rigide de polysaccharides mais une fine membrane plasmique élastique couverte de muqueuses (Jin & Melis, 2003). Cette absence de paroi rigide permet un changement rapide de volume de cellule pour l'adaptation aux variations de pressions osmotiques. A contrario, cette caractéristique ne facilite pas la culture et la récolte de l'algue. L'algue étant très sensible aux forces de cisaillement, durant sa production, l'utilisation de pompes centrifuges est proscrite et la taille des tuyaux de circulation doit être choisie en conséquence (Borowitzka, 1991). Le choix des procédés de récolte étudiés dans le cadre du projet Salinalgue tient compte de cette fragilité.

1.2.1.4 Caractère halophile

Dunaliella salina a la rare capacité de pouvoir réaliser la photosynthèse dans un milieu hypersalin (Raja *et al.*, 2007; Liska *et al.*, 2004). Ceci lui confère une originalité qui lui permet de se

développer dans cet environnement quasi vierge d'organismes concurrents.

Outre la non rigidité de sa paroi, *Dunaliella salina* s'appuie sur un système de transport des ions Na^+ pour s'adapter à la pression osmotique exercée sur ses parois. Ceci lui permet de conserver une concentration en Na^+ intracellulaire très inférieure aux concentrations externes. L'algue réagit aussi à une soumission rapide à des concentrations élevées en sel, en modifiant la composition de sa membrane. Dans ces circonstances, on constate au niveau membranaire des changements de compositions phospholipidiques, protéiques et une présence accrue de tubuline (Katz *et al.*, 2007; Azachi *et al.*, 2002).

L'autre caractéristique de *Dunaliella salina* est l'accumulation de glycérol due à la non perméabilité de la membrane à ce composé (Oren, 1999). Cette accumulation participe aussi à l'équilibre de la balance osmotique. Borowitzka & Brown (1974) ont montré que *Dunaliella viridis* pouvait accumuler de très fortes concentrations en glycérol dans son cytoplasme pour combattre l'effet du stress osmotique imposé par le milieu hypersalin. Ben-Amotz *et al.* (1982) présentent dès 1982 *Dunaliella salina* comme une source commerciale de glycérol.

1.2.1.5 Caractère hydrophobe

Comme vu précédemment, la composition membranaire de *Dunaliella salina* est fonction de son environnement. Le brevet de Curtain & Snook (1985) postule que passée une certaine concentration de NaCl dans la saumure (3M, environ 174 g/L), la membrane des algues du genre *Dunaliella* peut revêtir des propriétés hydrophobes. Les auteurs utilisent cette propriété pour extraire l'algue par adsorption sur des surfaces hydrophobes. Pour des plus faibles concentrations en NaCl, la composition de la surface des cellules est dominée par la présence de groupes polaires et n'est donc pas hydrophobe. Le passage d'un comportement hydrophile à un comportement hydrophobe n'est ceci dit pas abrupt.

En parallèle, Mishra & Jha (2009) ont constaté que la production de substances polymériques extracellulaires (EPS) augmente avec la salinité pour être maximale à 5 M de NaCl (environ 290 g/L de NaCl). Ces polymères, en plus d'être une source valorisable (De Philippis *et al.*, 2001; Suresh Kumar *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2010) pourraient conférer à *Dunaliella salina* des propriétés intéressantes pour sa récolte. Certaines études montrent en effet que la présence d'EPS sur la membrane de cellules microbiennes augmente significativement leur caractère hydrophobe (Gao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006). Toutefois, la difficulté de caractérisation des EPS complique fortement l'analyse de leur influence sur le procédé de récolte.

1.2.1.6 Photo-attraction - Phototaxie

Dunaliella salina a une phototaxie positive, elle est attirée par la lumière (Wayne *et al.*, 1991). Schlipalius (1991) a rapporté qu'en cas de non agitation du milieu, *Dunaliella salina* est attirée à la surface du bassin du fait de cette photo-attraction. Cette caractéristique pourrait être utilisée pour préconcentrer les algues avant la récolte.

1.2.2 Culture de *Dunaliella salina*

Dunaliella salina est la troisième microalgue la plus produite au monde derrière *Arthrospira platensis* (plus connue sous le nom commun « Spiruline »), qui est une cyanobactérie souvent confondue avec une algue et derrière *Chlorella* (Borowitzka, 1999; Dibenedetto, 2011). En 2004, la production annuelle de *Dunaliella salina* était estimée aux alentours de 1200 tonnes (Pulz & Gross, 2004).

Divers systèmes de culture sont aujourd'hui utilisés pour produire *Dunaliella salina*. On classe ces différents systèmes en deux catégories, les systèmes ouverts et fermés. Quel que soit le système choisi, il est nécessaire de se prévenir ou de limiter toute contamination par d'autres algues ou protozoaires (Borowitzka, 1999), même si le caractère extrême du milieu de culture réduit fortement les risques (Das *et al.*, 2011). Dans les 2 types de systèmes, l'apport de lumière est l'un des critères prépondérants de la productivité constatée (Mata *et al.*, 2010).

1.2.2.1 Systèmes de culture fermés - photobioréacteurs (PBR)

Les systèmes fermés permettent un meilleur contrôle des conditions de culture que les systèmes ouverts. Il s'agit ici de faire croître l'algue dans un environnement sélectif isolé, ce qui n'exclut pas la culture en systèmes fermés utilisant la lumière solaire. Le contrôle des conditions permettant d'atteindre l'optimal de croissance est facilité dans ce type de systèmes (Harun *et al.*, 2010). Les risques de contamination sont bien moindres que pour une culture ouverte.

La culture peut s'effectuer sous lumière naturelle ou artificielle, dans des PBR qui vont du simple sac posé au sol à des design bien plus sophistiqués. Diverses configurations de PBR existent, la plupart ont pour objectif d'optimiser l'apport en lumière souvent limitant. Les nouvelles avancées dans le domaine de l'apport lumineux (LED, fibres optiques, design des PBR) permettent d'augmenter l'efficience des systèmes fermés.

Zimmerman *et al.* (2011) affirment que des PBR airlift permettent un bon maintien en suspension des microalgues et facilitent leur mise en circulation ce qui est favorable pour l'accès à la lumière. Selon la taille et la composition des bulles créées, ils permettent aussi de faciliter le transfert de carbone inorganique nécessaire à la croissance et de stripper l'oxygène qui pourrait bloquer cette dernière à des concentrations trop importantes. Ce stripage d'oxygène et cet apport en carbone inorganique font partie des enjeux majeurs de la production en PBR, avec l'apport de lumière.

Dans le cadre du projet Salinalgue, des systèmes de culture fermés avec apport de lumière artificielle sont utilisés durant la phase laboratoire. Durant la phase d'essais pilote, la chaine d'inoculation comprend aussi ce type de photobioréacteurs. Il s'agit dans ce cas de gaines plastiques contenant 100 à 500 L de solution algale dans lesquelles l'apport de lumière est mixte (solaire et artificiel). L'utilisation de ces systèmes fermés permet d'avoir plus de robustesse et de contrôle sur la chaine d'inoculation.

1.2.2.2 Systèmes de culture ouverts

Les systèmes ouverts permettent l'utilisation de la lumière naturelle (Terry & Raymond, 1985). Ils sont opérés en plein air et donc sujets aux contaminations et variations de paramètres de culture. Borowitzka (1994) affirme qu'il est difficile d'atteindre des concentrations supérieures à 1 g de matière sèche par litre dans des bassins ouverts. Les moindres concentrations des solutions algales obtenues entrainent une augmentation des coûts de récolte de la biomasse (Lee, 2001).

L'emplacement géographique du lieu de culture et les conditions environnementales correspondantes jouent un rôle essentiel sur les paramètres d'optimisation du système. Des conclusions sur un lieu peuvent difficilement être extrapolées à un autre.

L'apport de lumière et l'agitation sont deux caractéristiques essentielles de la culture. La profondeur d'eau dans les différents bassins doit être suffisante pour assurer une bonne agitation sans pour autant priver les algues de lumière en fond de bassin (Borowitzka, 1999; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2003).

On retrouve 2 principaux types de systèmes de culture ouverts pour *Dunaliella salina*, les étangs à bas-fonds et les raceways. Les bassins circulaires avec bras rotatif de brassage sont peu voire pas rencontrés pour la culture de cette algue, mais plus développés pour celle de *Chlorella* notamment.

1.2.2.2.1 Les étangs à bas-fonds

Les étangs à bas-fonds sont notamment utilisés en Australie, principal pays producteur de *Dunaliella salina*. Dans ces bassins, le mélange s'effectue seulement grâce au vent et aux vagues. Leur profondeur varie entre 20 et 50 cm. Il s'agit de cultures extensives dans lesquelles l'algue croît quasiment sans l'intervention de l'homme. Dans certaines cultures, l'imperméabilisation des fonds est assurée par une croûte composée de carbonate de calcium et de sulfate de calcium (Schlipalius, 1991). Cette croûte se forme sous l'action répétée de l'évaporation de l'eau salée (exemple des tables de récolte dans les marais salants).

Des études sur les bassins à bas-fonds ont montré l'importance des vents dominants dans le processus d'agitation. L'orientation des bassins doit être fonction de ces vents dominants et le couplage avec une profondeur optimale permet d'éviter l'utilisation d'une agitation mécanique ou par aération (Borowitzka, 1991). La variation de direction des vents peut être positive pour le mélange. L'absence de vent peut provoquer un manque de recirculation des algues, qui s'accumulent à la surface par photo-attraction et forment une couche supérieure gélatineuse dans laquelle elles ne peuvent se développer normalement. Dans des conditions de très faible agitation par le vent, cette couche supérieure est amenée vers le rivage où les algues sèchent et meurent (Schlipalius, 1991). Une attention particulière doit donc être portée aux zones abritées.

La plupart des études ayant lieu en laboratoire, le passage à l'échelle du pilote extérieur s'accompagne toujours d'une perte de productivité. En Australie, une étude a par exemple montré une baisse de la productivité en caroténoïdes de 44% entre l'échelle laboratoire et le pilote extérieur (Moulton *et al.*, 1987). Le changement d'échelle entre différents étangs est moins problématique et s'accompagne même parfois de points positifs, notamment en ce qui concerne les perturbations par les intempéries moins ressenties sur de grands bassins.

Ce sont les types de bassins dans lesquels il est prévu d'effectuer la culture de *Dunaliella salina* dans le cadre des phases de démonstration et d'industrialisation du projet Salinalgue. Dans ce cas, il s'agira de réhabiliter d'anciens bassins consacrés autrefois à l'évaporation de l'eau pour la production de sel.

1.2.2.2.2 Les Raceways (« champs de courses »)

Les raceways sont des bassins artificiels développés notamment en Chine, Israël, Inde, Vietnam, Chili, USA, ... Dans ces réacteurs ouverts, la plupart du temps, le mélange est assuré artificiellement par des roues à aubes qui permettent un respect relatif de l'intégrité des cellules (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2003). Leur profondeur est généralement comprise entre 20 et 30 cm

pour maximiser l'apport de lumière sans poser de problème en ce qui concerne l'agitation. La vitesse de déplacement de la solution induite par les roues à aubes est d'environ 0,2 m/s et dans la plupart des cas un apport en CO_2 est effectué aussi de manière artificielle pour maximiser la productivité (Del Campo *et al.*, 2007).

Dans le cadre de la phase des essais pilotes du projet Salinalgue, ce sont ces types de bassins qui ont été construits sur le site des salins de l'île Saint-Martin à Gruissan (voir photo 1.4). Les 4 raceways en question ont une surface au sol de 500 m^2 et des profondeurs comprises entre 20 et 30 cm. Ils sont agités par des roues à aubes, les vents violents de la région et le système d'injection du carbone inorganique.

1.2.2.3 Besoins nutritifs principaux

En laboratoire *Dunaliella salina* est généralement cultivée dans des milieux « f/2 », de Jonhsons ou de Walnes. Dans le cadre du projet Salinalgue, pour synchroniser l'ensemble des partenaires et faciliter l'extrapolation des résultats obtenus, le milieu de Conway a été choisi. Tous ces milieux ont des compositions universellement définies. Les principaux éléments dont doit disposer l'algue pour sa croissance et son maintien sont listés ci-après (Rao, 2009).

1.2.2.3.1 Carbone

Dunaliella salina est une algue phototrophe stricte, elle puise l'énergie nécessaire à son maintien et à son développement exclusivement dans la lumière. Lors de la photosynthèse, elle fixe du carbone inorganique (autotrophe). La solubilité de ce carbone inorganique dans les eaux salées étant faible, il est nécessaire d'envisager des apports en carbone dans le cas d'une intensification de la culture. Une régulation du pH s'impose alors pour éviter de perturber la croissance en abaissant trop fortement le pH lors du bullage de CO_2 par exemple. Il faut noter que selon le pH, le carbone inorganique n'est pas forcément sous une forme assimilable par la microalgue.

1.2.2.3.2 Azote

Du fait de sa faible demande en énergie pour son assimilation, NH_4^+ est la source d'azote optimale pour la croissance de *Dunaliella salina*. Il est cependant montré qu'un apport en azote sous forme

NO_3^- peut permettre d'accroitre dans certaines conditions la production de glycérol (Giordano, 2001). Au delà d'une certaine concentration, les ions NH_4^+ deviennent toxiques pour la culture, c'est pourquoi l'apport d'azote par NO_3^- est souvent privilégié (communication personnelle avec des spécialistes de la culture de *Dunaliella salina*).

1.2.2.3.3 Phosphore

Les phosphates sont la meilleure source de phosphore pour la croissance des algues. Cependant, McLachlan (1960) a montré que la prudence doit rester de mise lors de leur utilisation, car de très fortes concentrations dans le milieu de culture peuvent inhiber la croissance de *Dunaliella tertiolecta* par exemple.

1.2.2.3.4 Chlorure et sulfate

Massyuk (1965) a montré que le ratio optimal Cl^-/SO_4^{2-} pour la croissance de *Dunaliella salina* est de 3,2. Il est de 8,6 pour la production de β-carotène. Ces paramètres doivent donc être choisis en fonction de l'objectif de valorisation visé.

1.2.2.3.5 Autres besoins

Des traces de Fe, Zn, Co, Cu, Mo et Mn sont nécessaires à la croissance des algues. Selon les eaux utilisées pour préparer le milieu de culture il n'est pas forcément nécessaire d'en ajouter artificiellement.

1.2.2.4 Salinité, température et pH optimaux

Il n'est pas donné dans ce paragraphe de valeurs exactes. En effet, les optimaux pour chaque critères sont généralement corrélés aux autres critères.

Bien que pouvant vivre dans une large gamme de pH, le pH optimal de culture de *Dunaliella salina* est compris entre 7 et 9 selon les études (Loeblich, 1982). Cette fourchette a été confirmée

durant la phase laboratoire du projet Salinalgue.

Il en va de même pour la température optimale qui varie entre 20 et 40°C, selon la souche et la valorisation souhaitée. Les températures supérieures à 40°C semblent létales.

En ce qui concerne la salinité optimale pour la croissance des algues, Mishra *et al.* (2008) proposent une salinité de 58 g/L avec une très bonne croissance à 116 g/L. Ce dernier résultat coïncide avec les travaux de Munoz *et al.* (2004) qui avancent une salinité optimale de croissance de 116 g/L et se rapproche des gammes obtenues dans le cadre du projet Salinalgue.

1.2.3 Valorisations de *Dunaliella salina*

La tendance actuelle au « greenwashing » dans de nombreux secteurs permet d'envisager sereinement une hausse de la consommation de microalgues et une diversification des secteurs de valorisation.

En ce qui concerne *Dunaliella salina*, sa valorisation peut être multiple. Le projet Salinalgue a pour objectif d'utiliser cette algue comme matière première d'une bioraffinerie de nouvelle génération et vise la production de β-carotène, de biodiesel, de compléments alimentaires, de protéines pour la nourriture aquacole, de biogaz et de nutriments post-méthanisation.

Les facteurs d'échelles différents de chaque type de marchés compliquent cette multi-valorisation. De nombreuses études sont réalisées pour permettre de privilégier certaines voies métaboliques. La gestion des carences en éléments nutritifs, du flux lumineux, de la température, de la salinité permet notamment de privilégier la production de certains composés aux dépens des autres.

1.2.3.1 Production de caroténoïdes

Les pigments naturels sont de plus en plus utilisés dans les secteurs alimentaire, cosmétique et nutraceutique. Les caroténoïdes et notamment le β-carotène servent notamment de colorants alimentaires (E160a), de compléments vitaminés (provitamine A) dans la nourriture humaine ou animale et d'agents filtrants contre le soleil. Ce sont des molécules à très haute valeur ajoutée (Raja *et al.*, 2007), connues aujourd'hui pour leur caractère antioxydant.

Ils agissent chez les algues comme des photo-protecteurs (Ben-Amotz & Avron, 1981; Ben-Amotz *et al.*, 1989; Jin & Melis, 2003). Ils peuvent aussi permettre le stockage du carbone produit en excès par photosynthèse en conditions de limitation de croissance (Borowitzka, 1992).

Dunaliella salina peut accumuler une grande quantité de caroténoïdes dans ses chloroplastes sous forme de gouttelettes (Borowitzka, 1990; Vorst *et al.*, 1994). En 1965, constatant cette capacité, Massyuk propose pour la première fois la culture de *Dunaliella salina* à des fins commerciales (Massyuk, 1965). Actuellement, elle est principalement cultivée pour cette capacité de production de caroténoïdes. Elle est d'ailleurs la première source de β-carotène naturel au niveau mondial (Martin del Campo & Patino, 2013) et est reconnue comme étant la meilleure source commerciale de β-carotène naturel (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2006). Des études ont montré que *Dunaliella salina* peut accumuler jusqu'à 13,8% de sa masse totale de matière sèche en β-carotène (Aasen *et al.*, 1969).

Pour maximiser la production de caroténoïdes, l'algue est cultivée dans des conditions de limitation de l'apport en nutriments (carence en azote notamment), de sur-irradiation lumineuse et de fortes températures qui ne favorisent pas le développement de la biomasse (Borowitzka, 1991). Hadi *et al.* (2008) ont montré que la production de β-carotène augmente avec la salinité. Pour maximiser la production de β-carotène on peut se placer à des salinités supérieures à 27% massique de NaCl. Si l'on confronte celle-ci à l'optimale de croissance (18 à 22%), on obtient une salinité optimale de culture dans l'optique de la production de caroténoïdes d'environ 24% massique de NaCl (Borowitzka *et al.*, 1984). Il est aussi possible de mettre en place des procédés permettant d'optimiser la croissance de l'algue dans un premier bassin et de maximiser la production de caroténoïdes dans un bassin à salinité importante (Avron & Ben-Amotz, 1978), c'est la technique utilisée dans les productions commerciales en Israël. Le tableau 1.4 résume l'influence des facteurs environnementaux ou des paramètres de culture sur la production de cellules de *Dunaliella salina* et sur la capacité des cellules à accumuler du β-carotène.

Il est montré que pour les cultures en systèmes ouverts (open ponds), l'intensité de la lumière et la présence de protozoaires prédateurs sont les 2 paramètres principaux influençant les rendements en caroténoïdes (Post *et al.*, 1983; Borowitzka *et al.*, 1984).

Hejazi *et al.* (2004) ont mis au point une technologie de bioréacteurs double-phasiques contenant un solvant organique qui permet de récolter le β-carotène en continu avec une très bonne productivité (2,45 $mg.L^{-1}.jour^{-1}$ à comparer aux 0,1 $mg.L^{-1}.jour^{-1}$ dans les étangs australiens et 1,5 $mg.L^{-1}.jour^{-1}$ dans les raceways Israéliens), sans récolter les algues et sans passer par la phase d'extraction. Cette technique est baptisée « milking » et d'après les tests laboratoires elle peut être conduite sur des longues durées sans perte de la viabilité et de la productivité des cellules (Figure 1.7) et avec une efficacité d'extraction supérieure à 55%. Une autre étude contredit la conservation de l'intégrité des cellules avec la méthode utilisée (Kleinegris *et al.*, 2011a). Les différents mécanismes menant à l'excrétion des métabolites d'intérêts (excrétion ; perméabilité de la cellule ; mort de la cellule) sont discutés dans une review des mêmes auteurs (Kleinegris *et al.*, 2011b).

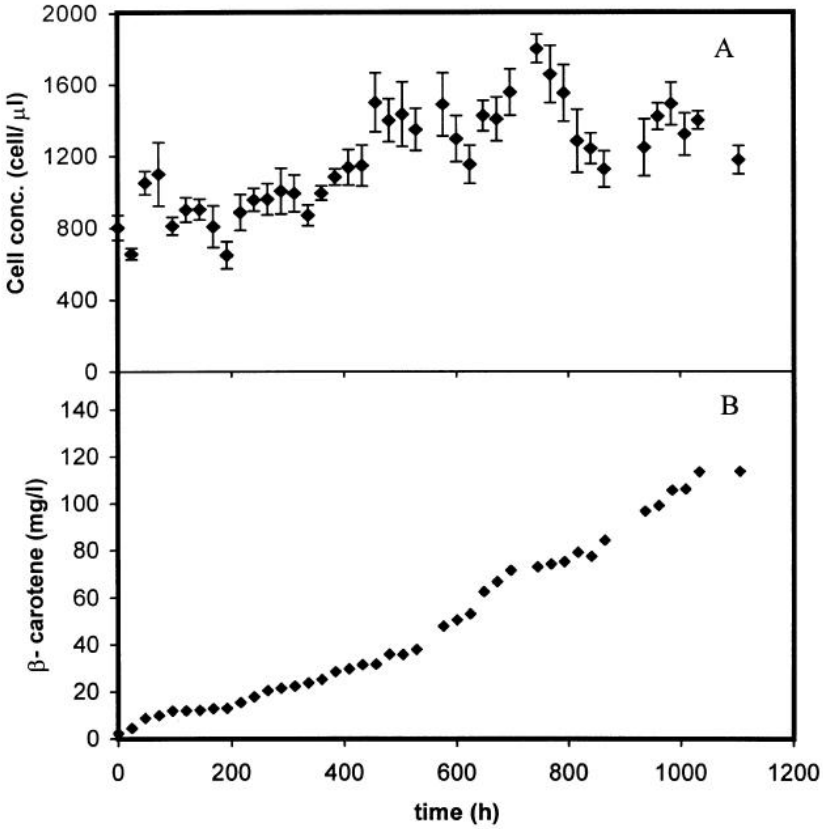


Figure 1.7 – *Croissance (A) et production volumétrique totale de β-carotène (B) par Dunaliella salina en présence d'un solvant organique biocompatible (Hejazi* et al., *2004).*

Facteurs environnementaux ou paramètres de culture	Influence sur la productivité de biomasse	Influence sur l'accumulation de β-carotène
Augmentation de la salinité	−−	++++
Augmentation de l'intensité lumineuse	+	++++
Augmentation de la température	+	++
Augmentation de la concentration en carbone inorganique dissous	+++	0
Augmentation de la concentration en O_2 dissous	−	−
Carence en N	−−	+++
Carence en P	−−	+

Tableau 1.4 – *Influence des facteurs environnementaux ou des paramètres de culture sur la production de biomasse et de β-carotène (Borowitzka & Borowitzka, 1989).*

1.2.3.2 Production de biodiesel

Dunaliella salina n'est pas reconnue en premier lieu pour sa capacité à produire les métabolites menant à la formulation de biodiesel mais cette dernière peut tout de même accumuler une certaine quantité de lipides valorisables.

Rabbani *et al.* (1998) ont rapporté que sous conditions de stress lumineux, *Dunaliella salina* accumule des larges gouttes de lipides principalement formées de triglycérides et de β-carotène. Une augmentation parallèle du taux de β-carotène et de triglycérides est constatée dans cette étude. Ce dernier résultat est nuancé dans une étude plus récente qui rapporte une augmentation de la concentration de certains acides gras et une diminution de la quantité totale d'acides gras lors de l'augmentation de la concentration en β-carotène (Lamers *et al.*, 2010).

Tornabene *et al.* (1980) ont aussi rapporté que *Dunaliella salina* pouvait accumuler entre 45 et 55% de sa masse sèche en lipides, ces derniers étant composés dans leur étude de plus de 30% d'hydrocarbures. Park *et al.* (1998) ont aussi montré que cette microalgue pouvait accumuler des taux intéressants d'hydrocarbures.

1.2.3.3 Production de protéines

Chez *Dunaliella salina*, la production de protéines diminue avec la salinité pour augmenter finalement fortement à saturation en NaCl. Ces protéines peuvent notamment être valorisées directement dans l'industrie agroalimentaire ou indirectement en passant par l'aquaculture (Borowitzka, 1997; Becker, 2007).

1.2.3.4 Production d'acides gras essentiels

Dunaliella salina peut contenir des quantités valorisables d'acides gras essentiels (dans les groupes oméga 3 et 6 notamment). Parmi les $\omega 3$ produits par *Dunaliella salina* on retrouve des acides eicosapentaénoïques (EPA) et des acides docosahexaénoïques (DHA) utilisés comme suppléments nutritifs ou comme additifs pour la nourriture animale.

1.2.3.5 Méthanisation des déchets de bioraffinerie

Une fois les composés valorisables récupérés, il est possible de méthaniser « les déchets » restants pour obtenir du biogaz et des nutriments. Chez *Dunaliella salina* la difficulté de l'étape de méthanisation réside dans la haute salinité du milieu de culture résiduel qui peut fortement limiter la méthanogénèse.

1.2.4 Les difficultés de la récolte de *Dunaliella salina*

Les principales méthodes actuelles de récolte de Dunaliella salina sont présentées dans les chapitres sur l'adsorption (2.8) et sur la centrifugation (2.5). Cette section n'a pas pour but de présenter ces méthodes mais plutôt de cibler les points clés à considérer lors de la mise en place d'un nouveau procédé de récolte de Dunaliella salina.

Quel que soit son moyen de production, *Dunaliella salina* reste très diluée dans son milieu de culture (maximum 0,5 $g.L^{-1}$ en cultures extérieures). Avant d'envisager toute valorisation, il

est nécessaire de diminuer la quantité d'eau présente dans les solutions algales. Cette phase de récolte de la microalgue n'est pas tâche aisée pour cette microalgue d'intérêt.

On ne constate pas de décantation naturelle chez *Dunaliella salina*. La densité de l'algue, variable selon son état, se situe autour de 1,1. Ceci ne permet pas de la faire décanter rapidement, tout particulièrement dans des saumures dont la densité est supérieure à l'unité (figure 1.8).

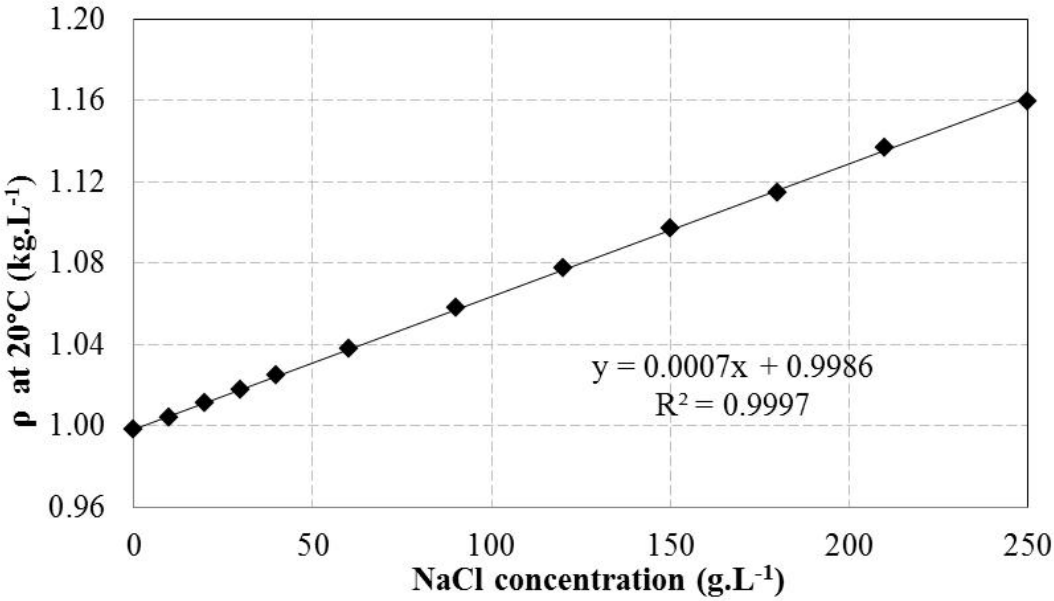


Figure 1.8 – *Masses volumiques à* $20°C$ *pour des eaux de salinités différentes. Courbe réalisée durant cette étude.*

Du fait de l'absence de membrane rigide chez *Dunaliella salina*, il a déjà été vu que sa récolte n'est pas facilitée. L'unicellularité de l'algue accentue cette complexité. Des techniques classiques de récolte comme la centrifugation et la filtration peuvent conduire à la lyse cellulaire qui pourrait entrainer la perte de certains métabolites d'intérêt par oxydation dans le milieu de culture.

La présence de sel en forte concentration dans le milieu de culture pose aussi des problèmes de corrosion du matériel. Quel que soit le type de procédé utilisé pour *Dunaliella salina*, une attention particulière doit être portée au choix des matériaux pour éviter une corrosion rapide dans les milieux hypersalins rencontrés (Schlipalius, 1991). Les coûts d'investissement sur les équipements de récolte sont généralement élevés dans ces conditions (Pahl *et al.*, 2013).

Toutes ces considérations permettent de comprendre pourquoi la récolte de *Dunaliella salina* est l'un des principaux verrous au développement de sa production, notamment pour les marchés de produits à faible valeur ajoutée. L'invention de procédés ou l'optimisation de procédés de récolte existants s'avèrent être des paramètres clés de l'expansion du marché.

1.3 Objectifs généraux et démarche scientifique de l'étude

La finalité des travaux recensés dans ce manuscrit est la mise en place d'un procédé semi-industriel de récolte de *Dunaliella salina*. Pour atteindre cet objectif, plusieurs étapes intermédiaires furent nécessaires à la bonne appréhension du problème posé. Il a d'abord fallu identifier l'ensemble des procédés actuels de récolte de microalgue et en assimiler le fonctionnement et les caractéristiques : le chapitre 2 est consacré à un état de l'art des différents moyens de récolte usités à l'heure actuelle pour les microalgues, sans se limiter au cas particulier de *Dunaliella salina*.

Si l'on considère les impératifs suivants, on comprend pourquoi toutes les techniques de récolte n'ont pas bénéficié de la même attention dans cette étude. Le procédé de récolte plébiscité doit en effet s'adapter aux très faibles concentrations obtenues lors de la culture en étangs à bas-fonds et permettre la concentration de la biomasse jusqu'au seuil exigé par les méthodes d'extraction avales développées par les autres partenaires du projet. Ce seuil a évolué durant le projet et continue d'évoluer avec l'amélioration des procédés d'extraction en voie humide. La matière récoltée doit pouvoir être valorisée dans de nombreux secteurs y compris en alimentation aquacole et dans le secteur de la production de biocarburants. Ces derniers impliquent de ne pas contaminer la biomasse par l'ajout de certains intrants chimiques comme des sels métalliques par exemple. Pour ne pas dégrader les métabolites d'intérêt dans le milieu de culture oxydant, les procédés de récolte doivent respecter l'intégrité de la fragile membrane plasmique. Ceci exclut l'utilisation de certains procédés pouvant soumettre l'algue à des forces de cisaillement importantes. Contrairement à de nombreuses études actuelles, pour respecter les engagements du projet Salinalgue, aucune manipulation génétique facilitant la récolte de l'algue ne doit être réalisée sur la souche.

Pour permettre la rentabilité de la filière globale dans des secteurs de production de métabolites à faible valeur ajoutée et malgré les restrictions présentées ci-dessus, la phase de récolte doit s'avérer peu consommatrice d'énergie et de manière plus générale respectueuse de l'environnement naturel des salins. Cet environnement naturel n'étant lui pas forcément respectueux du procédé de récolte, ce dernier doit tenir compte du caractère très corrosif des eaux de culture.

Bien qu'il ne soit pas constaté dans la littérature sur *Dunaliella salina* de phénomène naturel menant à la séparation à moindre coût de la biomasse (décantation ou flottation naturelles trop lentes), en s'appuyant sur les principes du biomimétisme, du temps a été consacré à l'observation de l'algue et de son environnement, dans l'optique de déceler ce qui pourrait faciliter leur séparation. De l'analyse systémique de ces observations, de l'état de l'art, des caractéristiques connues de l'algue et des impératifs susnommés découle le choix de plusieurs procédés : la centrifugation, l'adsorption sur matériaux hydrophobes et surtout la floculation-flottation.

Pour permettre l'étude de ces procédés au LISBP, il a d'abord fallu créer la plateforme analytique (chapitre 3) et celle de culture de microalgues (chapitre 4). Après validation des protocoles de

suivi des cultures, les dynamiques de culture de *Dunaliella salina* en laboratoire ont dû être appréhendées. Ceci s'est fait en collaboration avec les partenaires spécialisés culture du projet Salinalgue.

Une fois cette culture maitrisée, les procédés de récolte ont pu être éprouvés et analysés (chapitre 5). En considérant les premiers résultats, les recherches se sont rapidement concentrées sur la récolte par floculation-flottation.

Plusieurs méthodes de déstabilisation de la solution algale ont alors été testées (chapitre 6). En s'appuyant sur des observations naturelles, l'interprétation de la littérature et les premiers tests, l'étude s'est vite concentrée sur la déstabilisation par augmentation du pH de culture.

S'en est suivi alors une longue phase de compréhension et d'optimisation du procédé baptisé ici « autofloculation-flottation induite par modification assistée du pH » (chapitres 7 et 8). Durant cette phase, en plus de l'analyse expérimentale de l'influence de nombreux critères opératoires, un outil de simulation a été développé pour faciliter la compréhension et la mise en œuvre des procédés de culture et de récolte.

Pour ne pas perdre de vue la finalité de l'étude, en parallèle des études in vitro et in silico rapidement exposées, un pilote de flottation a été défini, dimensionné et mis en œuvre en collaboration avec l'entreprise Serinol (Bram, Aude). La caractérisation de ce pilote a mené notamment au développement d'une nouvelle méthode d'évaluation de la taille des bulles produites par DAF (§ 9.1.2.3). L'ensemble de la plateforme de récolte semi-industrielle présente aujourd'hui sur le site de démonstration de Gruissan a aussi été développé durant cette thèse. Cet outil a permis l'étude du passage à l'échelle semi-industrielle du procédé étudié et optimisé en laboratoire (chapitre 9).

Chapitre 2

État de l'art sur la récolte des microalgues

Ce chapitre balaye l'ensemble des moyens de récolte couramment utilisés ou préconisés pour la récolte des microalgues. Certains procédés sont éprouvés à l'échelle industrielle, d'autres sont toujours en phase de développement dans les laboratoires. Le propos ne se limite pas à la récolte de *Dunaliella salina*, il s'élargit à l'ensemble des microalgues. Cet état de l'art concentre un nombre important de références bibliographiques, mais n'a pas pour but d'être exhaustif pour chacun des procédés présentés. Des compléments bibliographiques centrés sur les axes de recherches développés durant 3 ans au LISBP sont aussi proposés dans d'autres chapitres de ce manuscrit.

Quelques généralités sur la phase de récolte sont d'abord présentées (§ 2.1). L'inventaire des procédés de récolte se centre ensuite successivement sur : la pré-oxydation (§ 2.2), la coagulation-floculation (§ 2.3), la sédimentation gravitaire (§ 2.4), la centrifugation (§ 2.5), la flottation (§ 2.6), la filtration (§ 2.7) et l'adsorption (§ 2.8). Objets centraux d'étude de ce manuscrit, les chapitres sur la coagulation-floculation et la flottation sont plus particulièrement développés. Pour clôturer cet inventaire, de rapides présentations d'autres techniques de récoltes (§ 2.9), de l'étape de séchage (§ 2.10) et de procédés brevetés sur la récolte des microalgues (§ 2.11) sont proposées.

En conclusion de cet état de l'art, les choix de procédés de récolte de *Dunaliella salina* étudiés au LISBP dans le cadre du projet Salinalgue sont justifiés (§ 2.12).

Sommaire

2.1 Généralités sur la récolte de microalgues **35**
2.2 Pré-oxydation des algues **37**
2.3 Coagulation-floculation **38**
2.3.1 Mécanismes de déstabilisation d'une suspension 39
2.3.2 Coagulation-floculation chimique 43
2.3.3 Biofloculation - Autofloculation 46
2.3.4 Électrocoagulation 57
2.3.5 Électrofloculation 58
2.3.6 Ultrasons 59
2.4 Sédimentation gravitaire **59**
2.5 Centrifugation **60**
2.6 Flottation **62**
2.6.1 Généralités sur la flottation assistée 63
2.6.2 Flottation à Air Induit (FAI) 63
2.6.3 Flottation à air dissous (DAF) 64
2.6.4 Electroflottation 67
2.6.5 Flottation à air suspendu (SAF) 67
2.6.6 Autoflottation 67
2.7 Filtration **68**
2.7.1 Procédés membranaires 68
2.7.2 Filtration frontale gravitaire (tamisage) 69
2.7.3 Filtre tambour rotatif 70
2.7.4 Filtre à bande 70
2.7.5 Filtres presses 70
2.8 Adsorption **70**
2.9 Autres techniques de récolte **71**
2.10 Séchage **72**
2.11 Procédés brevetés de récolte de microalgues **72**
2.11.1 Procédés brevetés spécifiques à *Dunaliella salina* 72
2.11.2 Procédés brevetés pour la récolte d'autres microalgues 73
2.12 Choix des procédés de récolte étudiés dans la présente étude **74**

2.1 Généralités sur la récolte de microalgues

De nombreuses revues ont été publiées sur la récolte de microalgues (Shelef et al., 1984; Molina Grima et al., 2003; Uduman et al., 2010; Ghernaout et al., 2010; Pragya et al., 2013; Pahl et al., 2013). De nouvelles études sortent régulièrement sur ce sujet, mais il est parfois oublié de rappeler certaines généralités sur cette étape de la filière microalgale. Ceci peut mener à quelques incompréhensions ou mauvaises interprétations des travaux. Cette section permettra à chacun de s'approprier le vocabulaire et les notions utilisés dans cette étude.

Dans la chaine globale de production de métabolites d'origine algale, la récolte se situe entre l'étape de culture et celle d'extraction/fractionnement (figure 1.5). Il faut noter que certains procédés permettent de s'affranchir de l'étape de récolte. Le « milking » permet par exemple de grouper les phases de récolte et d'extraction lors de la production de certaines molécules d'intérêt (Hejazi *et al.*, 2004; Malcata, 2011). Ce dernier n'est pas étudié dans ce manuscrit, mais le lecteur peut se référer aux études citées pour plus d'informations.

Pour simplifier le propos, le terme « récolte » désigne dans ce manuscrit l'action de concentrer la matière algale par séparation de phases et conservation de la phase la plus concentrée en algues. Il s'agit de concentrer une suspension d'algues diluées (0.01% à 0.40% de matière sèche selon le système de culture) pour obtenir une pâte algale contenant de 5% à 25% de matière sèche. Selon les algues, les procédés de récolte utilisés et le taux de matière sèche de la pâte souhaité, la récolte nécessite une ou plusieurs étapes de séparation (Figure 2.1).

Dans le cas d'une récolte à plusieurs étapes, on parle selon les auteurs d'étape de pré-concentration ou de récolte ou d'épaississement après laquelle on obtient une boue algale encore liquide (2 à 7% de matière sèche), suivie d'une étape de déshydratation qui permet d'obtenir une pâte algale humide (15 à 25% de MS). Selon les besoins, il est ensuite possible de sécher la pâte algale pour obtenir un solide sec et éviter notamment la dégradation de certains métabolites.

Actuellement, plus le taux de matière sèche obtenu est grand, plus les coûts d'extraction, de purification et autres procédés avals seront réduits. Il est nécessaire d'obtenir des concentrations d'au moins 20 g/L de matière sèche pour l'application des techniques actuelles d'extraction, alors que les cultures ne dépassent rarement des concentrations en matières sèches de 2 g/L quel que soit le réacteur utilisé (Sing *et al.*, 2013).

Les chercheurs s'accordent à dire que la récolte représente aujourd'hui, selon les techniques utilisées, de 20 à 40% du bilan énergétique et économique de la filière de production de biomasse algale. Les coûts d'investissement sur les équipements de récolte sont généralement élevés notamment lorsque les algues sont cultivées en solutions salines (Pahl *et al.*, 2013).

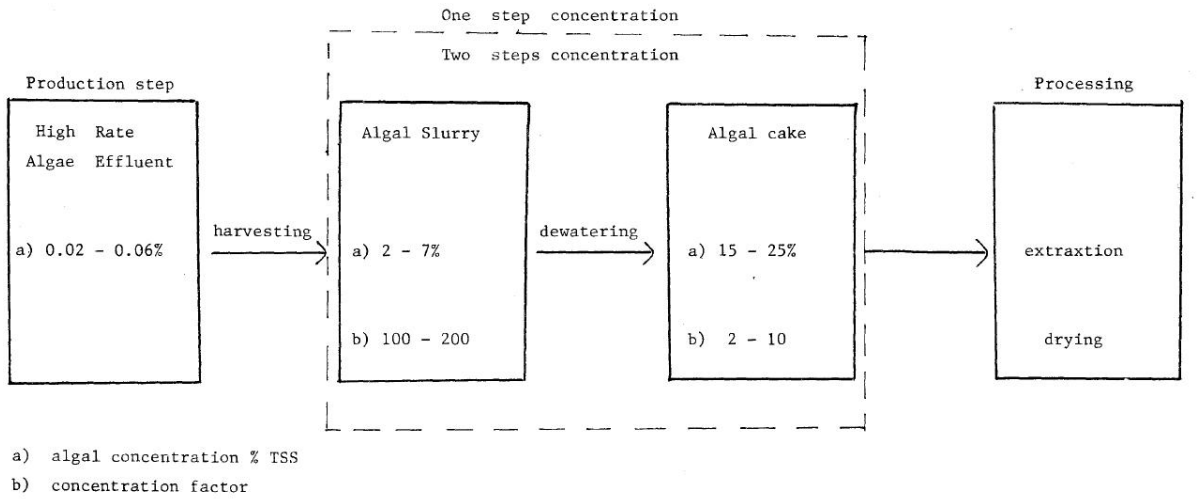


Figure 2.1 – *Représentation schématique de la chaîne de production de microalgues (Shelef* et al.*, 1984).*

Pour permettre aux algues d'investir le secteur énergétique notamment, le poste récolte doit être fortement réduit. Cette étape clé, dépendante des étapes de culture (type de réacteurs, concentration en algues), conditionne fortement l'étape d'extraction de par la concentration en matière sèche obtenue dans la phase concentrée (DOE, 2010). Du fait de l'impact stratégique de cette étape, les procédés de récolte sont pour la plupart tenus secrets par les entreprises du secteur.

Les faibles concentrations avant récolte, le potentiel zêta, la mobilité et la taille des algues sont autant de paramètres compliquant les opérations de récolte et justifiant les coûts afférents (Ghernaout *et al.*, 2010). L'ordre de grandeur des microalgues (2 à 50 µm), leur différence de densité avec le milieu (faible dans le cas d'algues chargées en huile comme *Dunaliella salina*) et parfois leur mobilité ne permettent pas par exemple, d'atteindre des vitesses de décantation suffisantes. Leur potentiel zêta généralement négatif, -10 à -35 mV selon Henderson *et al.* (2008), entraîne le développement de forces de répulsions intracellulaires qui stabilisent la suspension (Shelef *et al.*, 1984).

Les diversités morphologiques, dimensionnelles et physiologiques en fonction des espèces de microalgues ou des conditions de culture et de l'âge de la culture d'une même espèce n'ont pas permis la standardisation d'un procédé de récolte. Golueke & Oswald (1965) avaient anticipé que chaque cas serait pratiquement unique. Les critères de choix permettant la validation du type de procédé utilisé sont divers : coûts, valeur ajoutée des produits, physionomie de l'algue, débit à traiter, conservation des propriétés de la biomasse, siccité finale visée, régulation du procédé, caractéristiques du milieu de récolte (Brennan & Owende, 2010).

On peut classer les procédés de récolte en deux grandes catégories, ceux où la séparation s'appuie sur une différence de masse volumique (sédimentation § 2.4, centrifugation § 2.5, flottation

§ 2.6), et ceux qui pratiquent la séparation par exclusion (filtration § 2.7, adsorption § 2.8). Avant certaines séparations, il peut être nécessaire de déstabiliser la suspension algale. Cette déstabilisation peut être le fruit d'une pré-oxydation de la suspension (§ 2.2), d'une floculation assistée (Coagulation-floculation chimique § 2.3.2, Électrocoagulation § 2.3.4, Électrofloculation § 2.3.5) ou d'une floculation naturelle (Biofloculation - Autofloculation § 2.3.3).

Tous ces procédés sont plus ou moins énergivores et conduisent à des taux de matière sèche différents. Il n'est pas présenté dans ce manuscrit de données comparatives, car il est compliqué de recenser des études réalisées selon les mêmes critères. Une interprétation trop rapide de ces comparaisons peut mener à des conclusions erronées. Le lecteur peut s'il le souhaite se référer à l'article de Pahl *et al.* (2013) qui propose ce type de comparaison.

2.2 Pré-oxydation des algues

La pré-oxydation (à l'ozone par exemple) n'est pas un procédé de récolte en soit, c'est un facilitateur de récolte. Elle déstabilise la suspension algale (Ghernaout *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2009), ce qui est nécessaire notamment avant floculation (Hogg, 2000).

En traitement des eaux, la séparation des algues est souvent précédée d'une étape de pré-ozonation pour améliorer les taux de séparation (Dowbiggin & Singer, 1989; Edwards & Benjamin, 1992; Edzwald & Paralkar, 1992; Henderson *et al.*, 2008). Cette pré-oxydation permet d'agir sur l'architecture externe des algues, elle peut endommager les flagelles et ainsi réduire le mouvement naturel des algues (Petrusevski *et al.*, 1996). Elle peut aussi provoquer la sécrétion chez certaines algues d'exsudat coagulant comme la chitine.

Cette pré-oxydation peut être couplée avec une flottation (Betzer *et al.*, 1980). Une étude d'épuration des eaux a montré que la non immobilisation par pré-oxydation des algues pouvait réduire fortement le taux de récupération par flottation (Markham *et al.*, 1997). Cette étude portait sur *Volvox* qui est de taille apparente bien plus importante que *Dunaliella salina* (même ordre de grandeur pour les cellules, mais pour *Volvox* ces dernières évoluent en colonies qui peuvent atteindre 2 mm). La pré-ozonation peut aussi être bénéfique lors d'une filtration directe (Ferguson *et al.*, 1995). Il faut noter que dans tous les cas, un surdosage d'oxydant peut entrainer la lyse des cellules et ainsi ne pas faciliter l'opération de récolte (Chen *et al.*, 2009).

Liu & Bourne (1999) montrent qu'après une destruction de flagelles, *Dunaliella salina* régénère rapidement ces derniers et commence à retrouver sa mobilité après environ 90 min (Figure 2.2). La récolte doit donc s'effectuer dans un délai très court après l'oxydation.

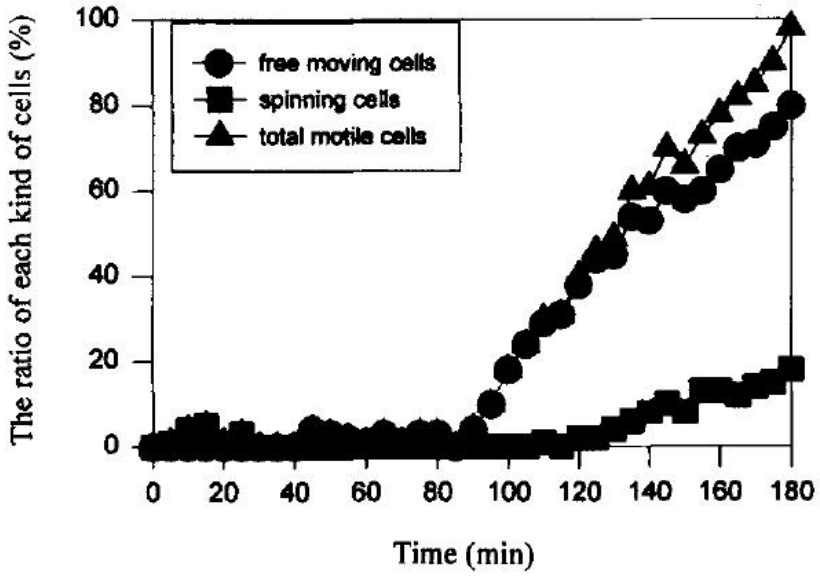


Figure 2.2 – *État dynamique d'une culture de Dunaliella salina après oxydation. La somme des cellules mobiles est divisée en deux catégories, les cellules pouvant se mouvoir librement et celles qui tournent sur elles-mêmes (Liu & Bourne, 1999).*

2.3 Coagulation-floculation

La coagulation consiste en l'ajout d'un composé chimique, baptisé pour l'occasion « coagulant », dans l'optique de conditionner les matières en suspension, les colloïdes ou certaines matières dissoutes pour d'autres opérations unitaires telle que la floculation par exemple. La floculation consiste en l'agrégation des composés déstabilisés pour former des structures de taille apparente plus importante, baptisées « flocs ». Dans le cas de l'ajout ou de la formation de coagulants ou de floculants, il est nécessaire que ces derniers ne perturbent pas les étapes avales (extraction, raffinage,...) du procédé, qu'ils soient bon marché, non toxiques et efficaces à faible concentration.

La coagulation-floculation s'intègre dans des procédés de récoltes en plusieurs étapes. Elle peut être utilisée en préliminaire d'une étape de sédimentation, de centrifugation, de flottation ou de filtration. Pour obtenir des vitesses de sédimentation satisfaisantes par exemple, la taille apparente des flocs algaux doit excéder 100 µm (Edzwald, 1993), d'où la nécessité d'intégrer une phase de coagulation-floculation.

La coagulation-floculation de microalgues peut être initiée de différentes manières. Pour certaines algues et sous certaines conditions de culture, la floculation peut survenir de manière naturelle, on parle alors de biofloculation (§ 2.3.3.1) ou d'autofloculation (§ 2.3.3.2). Mais la plupart du temps elle nécessite une intervention humaine avec l'ajout de coagulants-floculants inorganiques ou organiques (§ 2.3.2), ou par électrocoagulation (§ 2.3.4) et électrofloculation (§ 2.3.5).

Avant de décrire plus précisément chacune des méthodes précédemment citées il est nécessaire de bien appréhender les mécanismes mis en jeu lors de la déstabilisation d'une suspension.

2.3.1 Mécanismes de déstabilisation d'une suspension

La déstabilisation des suspensions algales par coagulation-floculation peut être la résultante d'un ou plusieurs mécanismes : la compression de la double couche électrique, l'adsorption et neutralisation de charge, l'adsorption et pontage et/ou le piégeage dans un précipité que l'on baptise aussi floculation par balayage (« sweep flocculation »).

2.3.1.1 Double-couche, potentiel Zêta et stabilité de la suspension

La plupart des microalgues sont chargées négativement. Par interactions électrostatiques elles attirent des ions chargés positivement et disponibles dans la solution. Certains de ces ions s'adsorbent à la surface de la microalgue pour former une couche dense. D'autres ne restent liés que par des interactions électrostatiques, ils forment la couche diffuse. On parle alors de double-couche électrique. Cette distribution d'ions est précisément décrite par le modèle de Stern basé sur des critères de densité en ion. Pour simplifier le modèle on peut caractériser la notion de double-couche par des critères hydrodynamiques. Dans ce nouveau modèle, on ne parle plus de couches denses et diffuses mais de couches liées (les ions restent liés à la microalgue si elle se déplace) et non-liées. Le plan qui sépare la couche liée de la couche non-liée est baptisé plan de cisaillement (PC). Le potentiel au plan de cisaillement est baptisé potentiel Zêta (ζ). La figure 2.3 représente schématiquement la double-couche électrique définie par des critères hydrodynamiques.

A partir du potentiel Zêta et de la théorie DLVO on peut réaliser le bilan des forces exercées par une algue sur une autre et comprendre la stabilité d'une suspension. Ce bilan est fonction de la distance entre les algues. La figure 2.4 montre que lorsque deux algues sont éloignées elles n'exercent pas d'interaction l'une sur l'autre. Lorsque ces algues se rapprochent, elles rencontrent une région dans laquelle les forces électrostatiques de répulsion sont prédominantes sur les forces attractives de Van der Waals. La résultante est une répulsion mutuelle des algues qui explique la stabilité des suspensions. Si cette force de répulsion est vaincue et cette zone franchie (quelle que soit la manière), les algues rencontrent alors une zone où les forces d'attraction sont prédominantes sur les forces répulsives, elles rentrent alors en contact.

Ce type de mécanisme doit être remis en question quand la force ionique de la solution est élevée, ce qui est le cas pour les solutions dans lesquelles *D. Salina* évolue. En effet, le champ électrique

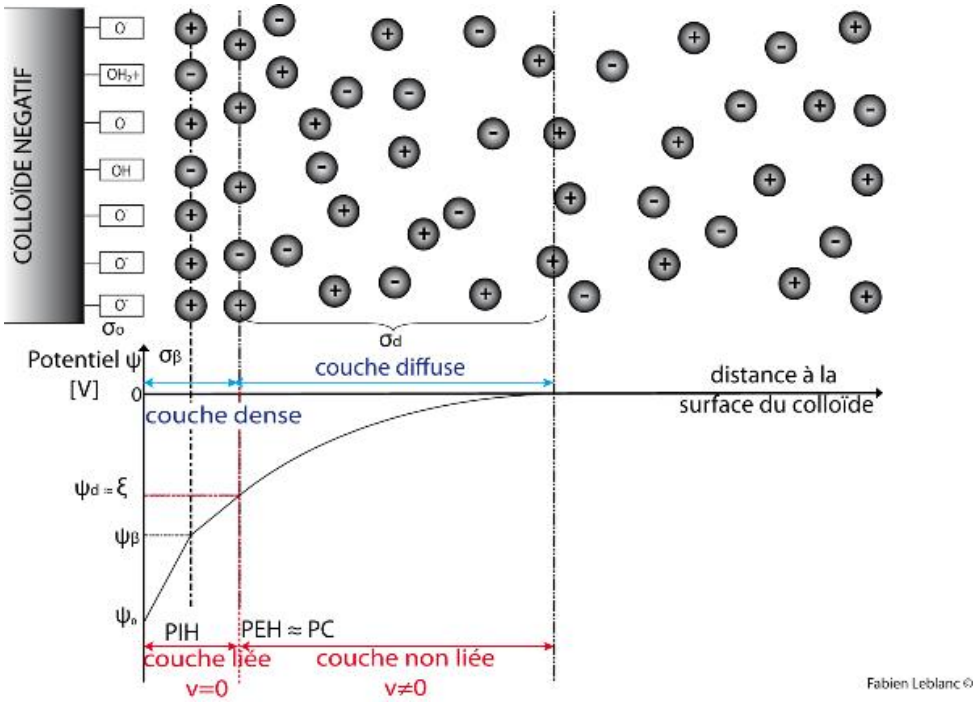


Figure 2.3 – *Représentation schématique de la douche-couche électrique définie par le modèle hydrodynamique et du potentiel Zêta (Fabien Leblanc).*

est alors écranté par les ions présents dans la solution.

2.3.1.2 Compression de la double-couche électrique

Plus la force ionique de la solution augmente, plus le potentiel Zêta des microalgues diminue en valeur absolue du fait du rétrécissement de l'épaisseur de la couche non-liée (figure 2.5). Pahl *et al.* (2013) confirment que le potentiel ζ des microalgues réduit avec la salinité. Cette diminution entraine une réduction des forces électrostatiques de répulsion. Cette dernière peut mener à la disparition de la barrière énergétique présente initialement et engendrer l'agglomération des microalgues grâce aux forces de Van Der Waals devenues prédominantes.

Du fait des forces ioniques très importantes rencontrées dans les milieux de culture de *Dunaliella salina*, il parait peut probable de pouvoir jouer sur cette compression de la double-couche électrique pour déstabiliser la suspension.

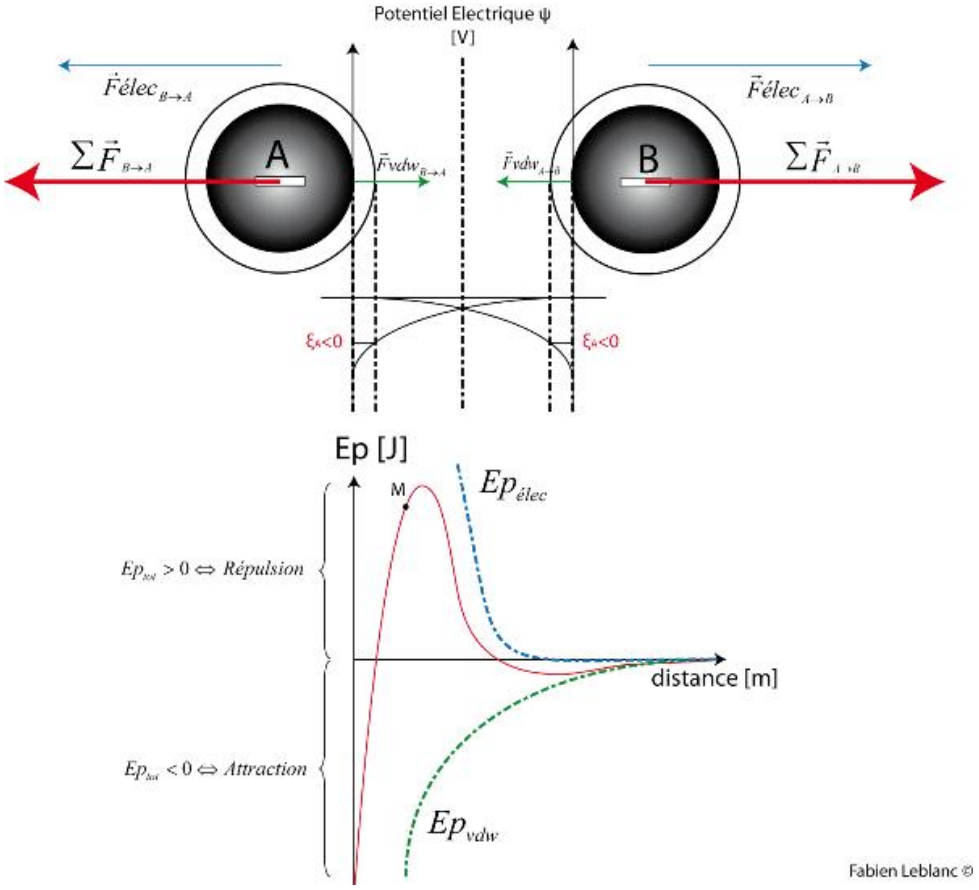


Figure 2.4 – *Bilan des forces et évolution de l'énergie potentielle d'interaction d'un système colloïdal A-B (Fabien Leblanc).*

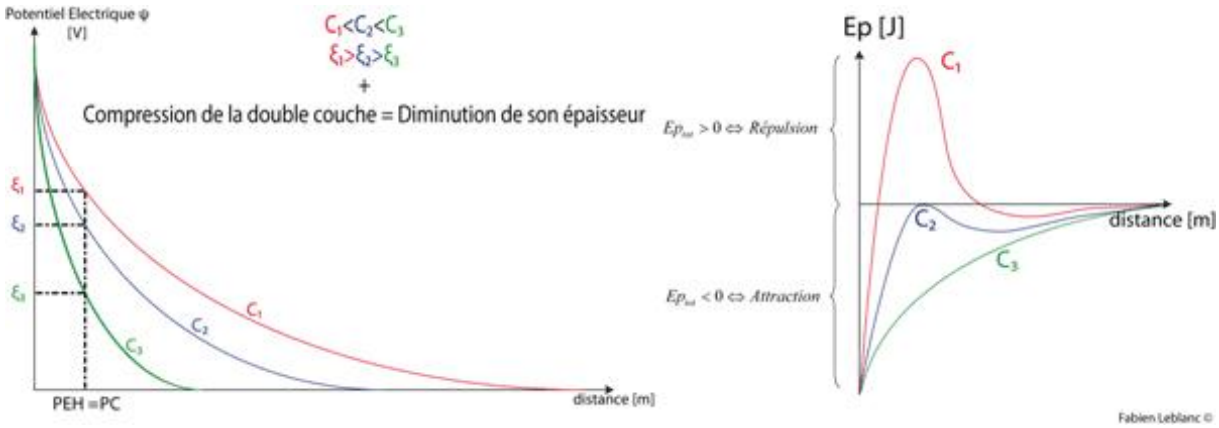


Figure 2.5 – *Conséquence d'une augmentation de la force ionique sur la déstabilisation d'une suspension (Fabien Leblanc).*

2.3.1.3 Adsorption et neutralisation de charge

En général, le potentiel zêta des microalgues est négatif pour une gamme de pH allant de 4 à 10 et un point isoélectrique est régulièrement mis en évidence selon les espèces pour un pH entre 3 et 4 (Phoochinda & White, 2003). Il est donc possible de réduire les forces électrostatiques de répulsion en imposant un pH proche du point isolélectrique des microalgues. Il est aussi possible de réduire les charges négatives de surface des algues pour les rapprocher de la neutralité en ajoutant certains composés chargés positivement qui s'adsorbent sur les algues. Cette neutralisation de charge permet la prédominance des forces attractives de Van der Waals et le rapprochement des microalgues.

Cette coagulation-floculation par neutralisation de charges est surtout efficace pour des algues sphériques de taille microscopique, non porteuses d'appendices externes (Pieterse & Cloot, 1997), dans des conditions de salinité modérée. Ceci exclut a priori *Dunaliella salina*.

2.3.1.4 Adsorption et pontage

Le pontage est le résultat de l'adsorption d'un polymère avec plusieurs microalgues via des liaisons hydrogènes. Ces polymères ont généralement de fortes masses moléculaires et leur charge ne joue pas de rôle prépondérant dans ce cas. Le pontage permet la production de gros flocs dont la rupture est irréversible.

Il faut noter que le pontage est aussi rencontré avec les formes hydratées des sels métalliques post-olation. Les polymères formés vont dans un premier temps neutraliser les colloïdes en augmentant la force ionique du milieu. Dans un second temps, ils adsorbent les microalgues sur leurs sites fonctionnels réactifs. On comprend ici qu'il n'est pas aisé de définir quel est le mécanisme prépondérant de coagulation-floculation, tant ces derniers peuvent se combiner les uns aux autres.

2.3.1.5 Floculation par balayage d'un hydroxyde

Les microalgues sont piégées ici dans la structure massive d'un précipité inorganique. Les microalgues sont d'abord adsorbées sur les charges positives du précipité formé et le précipité continue de se développer autour de ce « noyau colloïdal ». Les microalgues sont alors piégées mécaniquement dans un enchevêtrement tridimensionnel de précipité (figure 2.6).

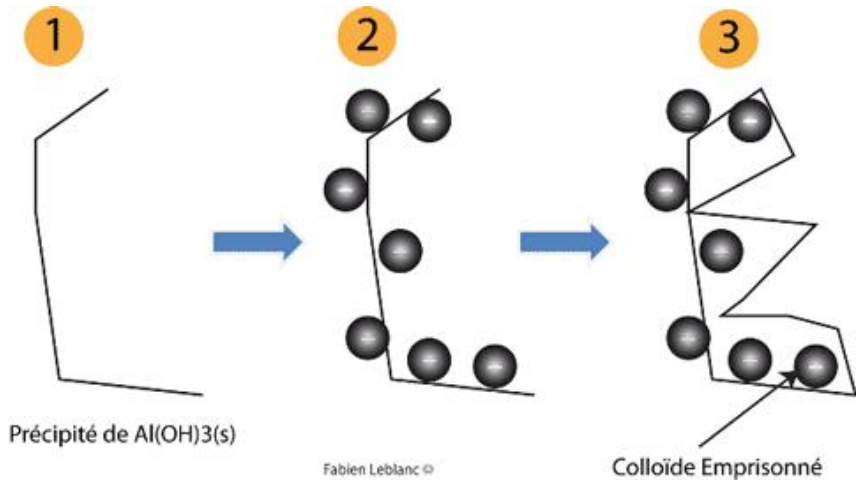


Figure 2.6 – *Coagulation-floculation par balayage d'un hydroxyde (Fabien Leblanc).*

2.3.2 Coagulation-floculation chimique

On distingue les coagulants-floculants inorganiques (sels métalliques, chaux éteinte,...) et organiques (polymères anionique, cationique ou non ionique). Shelef *et al.* (1980) ont proposé une revue des concentrations et pH optimaux de floculation avec quelques-uns de ces composés. Récemment, Pahl *et al.* (2013) ont réalisé le même type de revue. Il est conseillé de se référer à ces revues et aux études qu'elles regroupent pour utiliser les floculants dans leurs gammes de pH et de concentrations efficaces.

2.3.2.1 Coagulants-floculants inorganiques

Les sels métalliques multivalents ($FeCl_3$; $Al_2(SO_4)_3$; $Fe_2(SO_4)_3$) sont souvent utilisés comme coagulants pour les microalgues, notamment dans le traitement des eaux. L'addition de ce type de coagulants entraine la formation et la précipitation de carbonate de calcium et d'hydroxydes métalliques inorganiques ($Al(OH)_3$, $Fe(OH)_3$ et $Mg(OH)_2$,...). Ces derniers neutralisent les charges négatives de surface des algues et servent de site d'adsorption des microalgues. Les doses optimales de coagulants dépendent des algues et de leurs conditions de culture. La force ionique du milieu notamment a un effet significatif sur les doses optimales. Sukenik *et al.* (1988) montrent par exemple pour *Isochrysis galbana*, que plus la force ionique est élevée, plus la dose optimale de sels d'aluminium ou de fer est importante.

L'utilisation de sels métalliques dans le cas d'une valorisation aquacole de la biomasse n'est pas envisageable (Borodyanski & Konstantinov, 2002; Molina Grima *et al.*, 2003), ce qui exclut

leur utilisation dans le processus industriel envisagé dans le projet Salinalgue. Sans même parler de valorisation aquacole, les coûts opératoires de ce genre de traitement, les sels métalliques dissous dans le milieu de culture qui sera potentiellement recyclé et les sels métalliques présents dans la pâte algale ne permettent pas d'envisager ce type de procédés pour la production de biocarburants algaux.

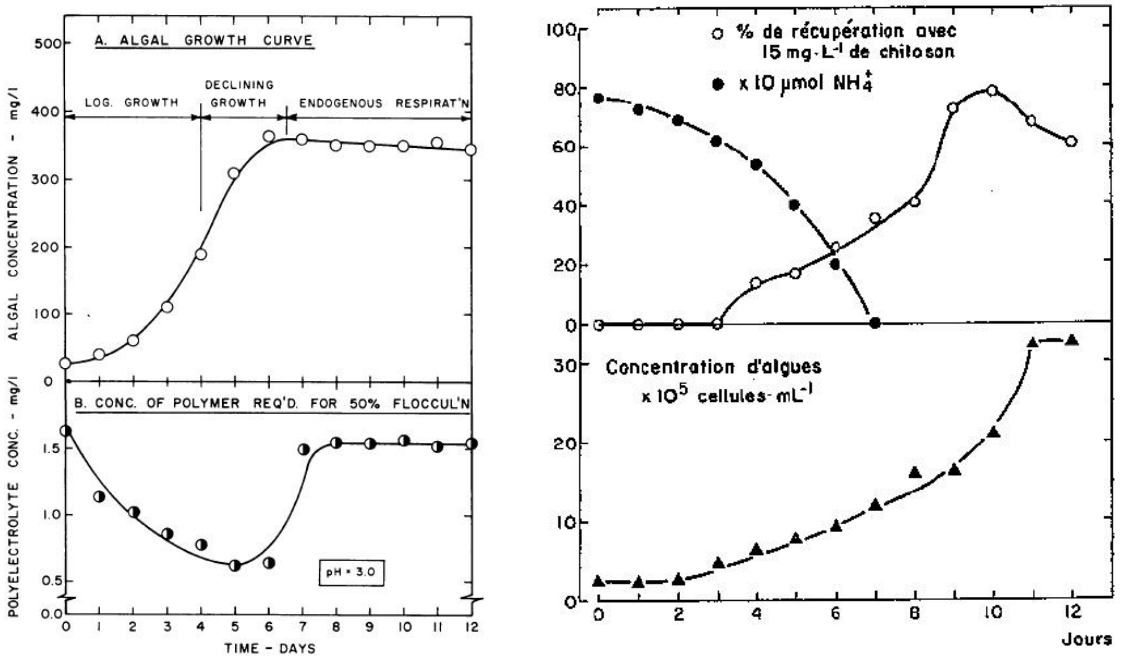
2.3.2.2 Coagulants-floculants organiques

Les coagulants-floculants organiques sont des polymères dérivés de substances naturelles ou synthétisées. On retrouve des polymères sans groupe fonctionnel ionisable, les non ioniques, des polymères anioniques et des cationiques. Les polymères cationiques sont efficaces pour les algues dont la charge de surface est négative (Bilanovic *et al.*, 1988; Divakaran & Pillai, 2002). Ils peuvent opérer par neutralisation de charges de surface et/ou par pontage entre les algues (Tenney *et al.*, 1969). Les polymères sont utilisés seuls ou en combinaison avec des coagulants inorganiques pour permettre dans ce cas le pontage des composés déstabilisés. Pour ce dernier cas on parlera de coagulation-floculation combinée (Sukenik *et al.*, 1988). Les floculants organiques se différencient par leur poids moléculaire et leur densité de charge. Ils sont souvent considérés comme non toxiques et pourraient donc être envisagés pour la récolte de *Dunaliella salina* dans le cadre du projet Salinalgue.

Le stade de croissance de la culture peut jouer un rôle important dans l'efficacité de floculation par utilisation de polyélectrolytes mais aussi dans le cas de l'autofloculation qui sera traitée dans le paragraphe 2.3.3.2. Sur la figure 2.7(a), Tenney *et al.* (1969) montrent que la quantité de polyélectrolytes nécessaire pour obtenir une efficacité de récolte de 50% augmente en fin de phase de croissance. Sur la figure 2.7(b), Lavoie *et al.* (1984) montrent aussi que l'efficacité de récupération stagne puis diminue en fin de phase de croissance de la population microalgale.

Tenney *et al.* (1969) postulent que l'accumulation de composés extracellulaires d'origine algale (AOM) peut être la cause de cette baisse d'efficacité de floculation, en agissant comme une couche protectrice de la charge de surface des algues et annihilant par la même occasion l'effet des coagulants-floculants. Des conclusions similaires sont proposées par Zhang *et al.* (2012) lors d'une étude couplant floculation chimique et flottation. Ces derniers montrent que l'augmentation des concentrations en matière organique dissoute pendant la culture entraine une augmentation de la consommation de floculant nécessaire pour une bonne séparation.

Les salinités importantes, rencontrées lors de la culture de *Dunaliella salina* notamment, peuvent inhiber l'efficacité des floculants organiques (Figure 2.8). Cette baisse d'efficacité pour les forces ioniques importantes s'explique par la déstructuration des polymères (Bilanovic *et al.*, 1988). L'amidon cationique présente par exemple des caractéristiques intéressantes de floculation



(a) Polyélectrolyte cationique non spécifié (Tenney *et al.*, 1969)

(b) Chitosane (Lavoie *et al.*, 1984)

Figure 2.7 – *Effet de la phase de croissance sur la floculation algale par ajout de polymères organiques.*

uniquement sur des microalgues d'eaux douces (Vandamme *et al.*, 2010).

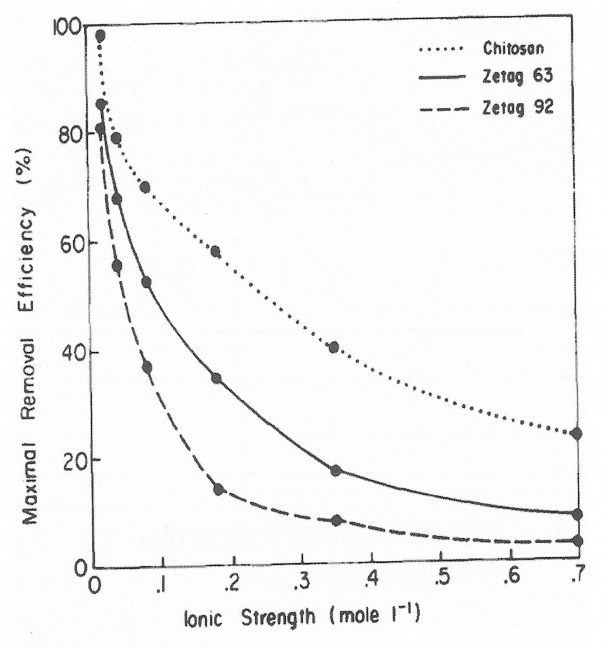


Figure 2.8 – *Efficacité de récolte avec* 3 *polyélectrolytes différents en fonction de la force ionique (Bilanovic* et al.*, 1988). L'eau de mer méditerranée a une force ionique de* 0,7.

Un complément bibliographique sur le cas spécifique du chitosane est proposé dans le chapitre 6.1.1 sur l'étude de l'efficacité d'une récolte de Dunaliella salina par ajout de chitosane.

2.3.3 Biofloculation - Autofloculation

Lorsque la coagulation-floculation est obtenue par ajout de produits chimiques, qu'ils soient d'origine organique ou inorganique, les additifs (sels métalliques, polyélectrolytes, chaux, acide chlorhydrique,...) amputent de manière significative les bilans environnementaux et économiques du procédé. Il est envisageable sous certaines conditions d'induire une formation naturelle de flocs algaux. Golueke & Oswald (1965) ont pour la première fois mentionné cette caractéristique lors de l'observation de cultures microalgales en conditions d'ensoleillement et de chaleur optimales. Les travaux inspirés de cette observation ont mis en évidence différents mécanismes pouvant expliquer ce comportement. Ces mécanismes peuvent être regroupés en deux catégories, la biofloculation et l'autofloculation.

Ces deux types de floculation naturelle sont initiés par une modification du milieu de culture (pH, lumière, température, carences nutritives,...). Le stress engendré par la modification du milieu induit parfois des modifications de la physiologie des algues ou d'autres espèces vivantes dans

la suspension. Ces modifications peuvent se traduire notamment par la sécrétion de certaines molécules qui déclenchent la floculation des algues, on parle alors de biofloculation (2.3.3.1). Dans le cas de l'autofloculation (2.3.3.2), la modification du milieu de culture engendre une perturbation des équilibres de ce milieu qui entraine la précipitation de composés permettant la floculation des algues (Lavoie & Delanoue, 1987).

2.3.3.1 Biofloculation

La biofloculation est provoquée soit directement par les algues, soit par d'autres espèces vivantes présentes dans la culture ou non. Sous certaines conditions de stress, comme des températures ou pH ou conditions nutritives extrêmes, certains organismes vivants exsudent des EPS (polysaccharides, acide uronique, acide pyruvique, ...) qui peuvent entrainer la floculation microalgale (Lee *et al.*, 2009). Un des problèmes de cette technique de séparation réside dans le fait que les EPS sont sécrétés dans des conditions non optimales de croissance microalgale.

La production de biofloculant peut se faire hors culture comme c'est le cas avec la bactérie *Paenibacillus polymyxa AM*49 qui produit un biofloculant efficace sur les microalgues. Kim *et al.* (2011) utilisent ce dernier avec succès sur *Scenedesmus sp.* et Oh *et al.* (2001) sur *Chlorella vulgaris*. Mais les coûts de formulation des biofloculants peuvent être prohibitifs (Pahl *et al.*, 2013).

Aujourd'hui, des techniques de co-culture sont utilisées pour pallier aux deux problèmes suscités et récolter à moindre coût. Dans ce type de procédés, des organismes cultivés en symbiose synthétisent en condition de culture microalgale optimale des exsudats permettant l'agrégation des algues. Certaines bactéries hétérotrophes, qui n'ont donc pas les même besoins nutritifs que les algues, produisent dans des conditions de manque de nutriments des EPS permettant la floculation de *Pleurochrysis carterae* par exemple (Lee *et al.*, 2009). L'efficacité de la biofloculation microbienne dépend de la production d'EPS et de l'affinité de l'algue avec les polymères. Elle a l'avantage de ne pas mettre en jeu d'ions métalliques pouvant annihiler certaines valorisations. Lee *et al.* (2010) affirment que sa mise en œuvre dans un floculateur à chicanes pourrait être rentable à l'échelle industrielle.

Certaines algues peuvent entrainer la floculation d'une autre espèce habituellement non biofloculante. C'est le cas par exemple de *A. falcatus*, *E. texensis* et *S. obliqus* qui permettent la floculation de *C. vulgaris* en eau douce. Pour les algues d'eau de mer, *T. suecica* permet la floculation de *N. oleoabundans* (Salim *et al.*, 2011, 2012).

2.3.3.2 Autofloculation

English readers can considering paragraph 7.2 which covers the main concepts covered in this section but in Shakespeare's style.

Cette étude bibliographique sur l'autofloculation est reprise dans ses grandes lignes en version anglaise dans le chapitre 7.2.

Plusieurs modifications peuvent être envisagées pour perturber les équilibres du milieu. L'une des principales relevées dans la littérature pour faire floculer les microalgues est la modification du pH. Dans ce manuscrit, le propos sur l'autofloculation s'articule essentiellement autour de cette modification du pH.

Il est connu que la consommation du CO_2 par photosynthèse entraine l'augmentation du pH du milieu. Comme le montre la figure 2.9, cette caractéristique peut être utilisée pour faire floculer certaines algues en limitant l'apport en CO_2 sous conditions de lumière favorables (Sukenik & Shelef, 1984) mais cette variation naturelle du pH n'est pas suffisante pour une grande partie des algues. L'ajout d'une base peut s'avérer nécessaire pour franchir le seuil de floculation. Dans cette étude, le terme « autofloculation » sera conservé lors de l'ajout de base, car il sera mis en évidence que les phénomènes mis en jeu restent identiques. Pour différencier les deux situations, on parlera d'« Autofloculation induite par modification naturelle du pH » et d'« Autofloculation induite par modification assistée du pH ».

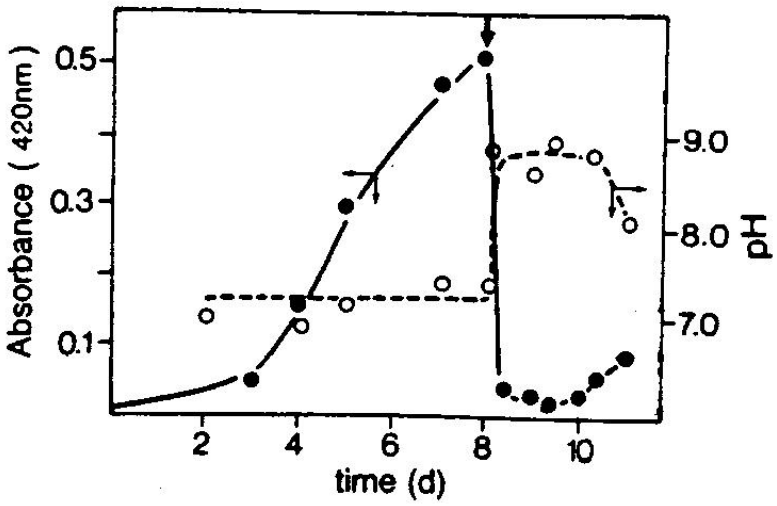


Figure 2.9 – *Autofloculation dans une culture extérieure de Sc. dimorphus. La flèche indique l'interruption de l'agitation et de l'apport en CO_2 (Sukenik & Shelef, 1984).*

2.3.3.2.1 Autofloculation induite par modification naturelle du pH

C'est la situation la plus prometteuse d'un point de vue développement industriel. Un monitoring de culture judicieux peut mener à une récolte à moindres coûts économique et environnemental du fait de l'absence d'additif chimique.

Les diatomées sont réputées pour floculer naturellement à forts pH (Knuckey *et al.*, 2006). Une étude sur *Phaeodactylum tricornutum* met en évidence la floculation de cette espèce à partir d'un pH 10,5 ainsi que la décantation induite (Spilling *et al.*, 2011). Le processus global permet de pré-concentrer à moindre coût une culture de cette algue, car cette dernière, par sa consommation photosynthétique du carbone inorganique, est capable de faire croître le pH aux alentours de 10,8 (au-dessus du pH d'autofloculation/décantation). Les facteurs de concentration obtenus sont compris entre 8 et 60 et les vitesses de décantation des larges flocs entre 180 et 360 $cm.h^{-1}$. Dans cette même étude il est montré que l'algue verte *Scenedesmus obliquus* flocule aussi à partir d'un pH 11,3, mais que la culture n'est pas capable d'atteindre ce pH sans ajout d'une base. Cette dernière observation vient confirmer les travaux de Lavoie & Delanoue (1987).

Sukenik & Shelef (1984) ont très tôt mis en avant le rôle de la précipitation de certains éléments du milieu de culture pour expliquer cette déstabilisation naturelle de la suspension. Dans cette étude fondatrice sur la récolte par autofloculation de *Scenedesmus dimorphus*, les concentrations en calcium et en orthophosphate sont mises en relation avec l'efficacité de récolte. La formation d'un précipité de ces composés suite à l'ajout de NaOH semble être la voix privilégiée pour expliquer le phénomène. Ce précipité, chargé positivement, serait adsorbé par les algues chargées négativement, neutralisant ces dernières pour permettre la floculation (Figure 2.10).

2.3.3.2.2 Autofloculation induite par modification assistée du pH

Les premières études sur l'autofloculation assistée se sont concentrées sur le retrait des microalgues dans les eaux usées avant de s'orienter plus récemment vers la récolte d'algues valorisables.

Dans les eaux usées, lors de l'ajout de chaux, Folkman & Wachs (1973) indiquent que la précipitation de l'hydroxyde de magnésium entraine la floculation des algues. La concentration de magnésium dans le milieu s'avère donc être un paramètre essentiel. Pour les eaux usées chargées en magnésium, la précipitation de ce dernier a lieu pour des pH compris entre 9,5 et 11,5. Folkman & Wachs (1973) proposent que ce précipité gélatineux, pourvu d'une large surface d'adsorption et chargé positivement quel que soit le pH, permet la neutralisation et l'agglomération des algues chargées négativement. Il est précisé que dans certains cas, la formation simultanée de carbonate

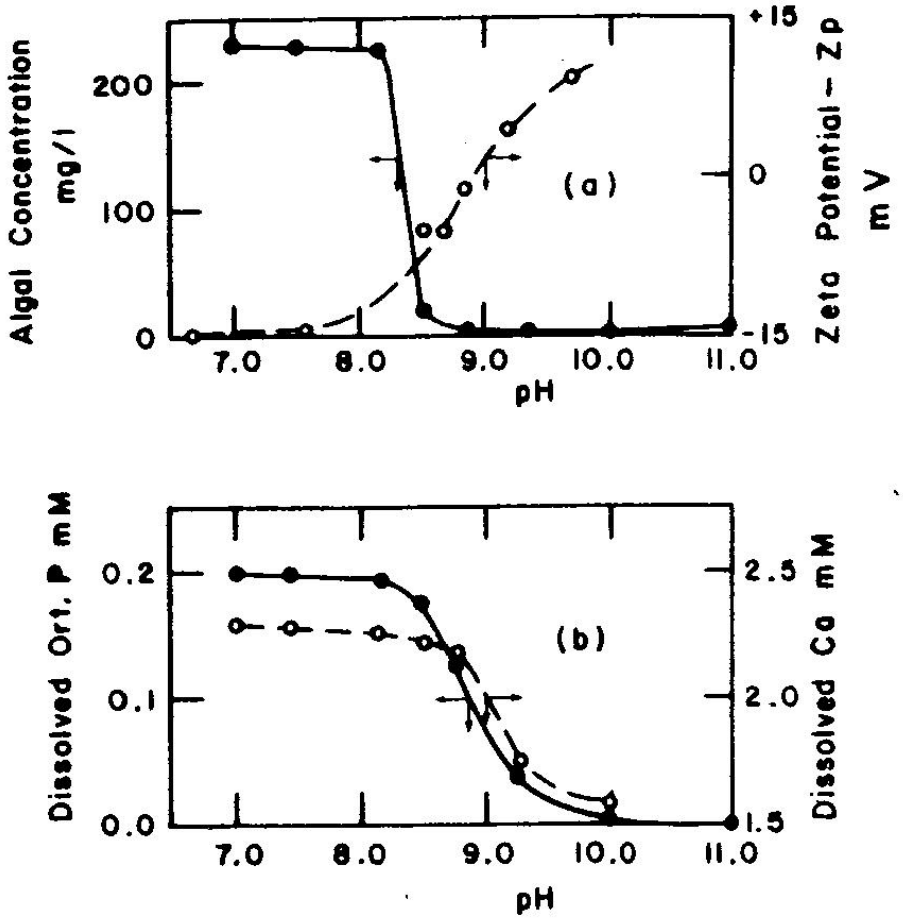


Figure 2.10 – *Autofloculation par ajout de NaOH : (a) concentration algale et potentiel zêta des cellules ; (b) concentrations en calcium et orthophosphates dissous après floculation et sédimentation (Sukenik & Shelef, 1984).*

de calcium peut entrainer le balayage et la décantation des flocs formés. Yahi *et al.* (1994) obtiennent de très bons abattements de matière en suspension dans les eaux usées avec ajout de chaux et de soude.

L'ajout de chaux s'est montré efficace sur le retrait d'algues lors du traitement d'eaux usées contenant suffisamment de bicarbonates (Ayoub & Koopman, 1986). Dans ce cas, le mécanisme proposé est la précipitation de carbonate de calcium qui induit une coagulation par balayage des algues et une décantation du fait de sa densité importante. Toutefois, quatre années plus tôt, Leentvaar & Rebhun (1982) avaient mis en évidence que seules les larges cellules déstabilisées sont entrainées dans ce cas. Pour déstabiliser les algues restantes une co-précipitation à fort pH d'hydroxyde de magnésium est nécessaire. Une autre étude en traitement des eaux dans laquelle la chaux est remplacée par de la dolomite met en évidence l'adsorption de la matière organique sur le carbonate de calcium précipité et sur l'hydroxyde de magnésium apporté par le coagulant (Dziubek & Kowal, 1989). Il faut noter que la formation d'hydroxyde de magnésium peut s'éloigner du comportement attendu en ne considérant que la constante de solubilité de ce dernier. Leentvaar & Rebhun (1982) montrent par exemple que dans les eaux usées les ions magnésium restent en solution malgré l'augmentation du pH qui devrait induire leur précipitation.

Considérant l'importance de la concentration en magnésium, des procédés de traitement des eaux usées couplant augmentation du pH et ajout d'une source de magnésium (eau de mer, saumure,...) ont été développés (Ayoub & Koopman, 1986; Elmaleh *et al.*, 1991). Semerjian & Ayoub (2003) présentent une revue de ces procédés couplés. Étant données les très fortes concentrations en magnésium rencontrées dans les saumures de culture de *Dunaliella salina*, la récolte de cette microalgue par modification assistée ou non du pH peut s'avérer intéressante.

D'autres algues sont déjà récoltées avec succès par cette méthode. Horiuchi *et al.* (2003) montrent que *Dunaliella tertiolecta*, la cousine marine de *Dunaliella salina*, flocule et sédimente lorsque le pH est augmenté par ajout de soude dans une gamme comprise entre 8,6 et 10,5. Ils précisent que rien n'est observé dans le cas d'une acidification. Des taux de récupération des algues supérieurs à 90% sont obtenus et les suspensions peuvent être concentrées jusqu'à 15 grammes de matière sèche par litre. L'opération ne semble pas dans ce cas endommager sérieusement les algues, la portion non récoltée d'algues pouvant servir d'inoculum à une nouvelle culture après neutralisation à l'acide chlorhydrique (Figure 2.11).

Il faut noter qu'il existe un pH optimal de récolte à partir duquel une augmentation influencera négativement la vitesse de décantation des algues. Dans une étude sur *Botryoccoccus braunii*, une algue d'eau douce, le pH optimal mis en évidence est de 11 (Lee *et al.*, 1998). Dans ces conditions, il est précisé que la méthode de récolte par modification assistée du pH est plus efficace que la floculation au sulfate d'aluminium ou au Pestan (floculant microbien) dans les premières semaines de la phase de croissance de la population algale (Figure 2.12). L'efficacité de floculation est maximale en fin de phase exponentielle de croissance et décline rapidement dès le début de la phase décroissante de croissance. Dans une étude antérieure d'autres auteurs, la

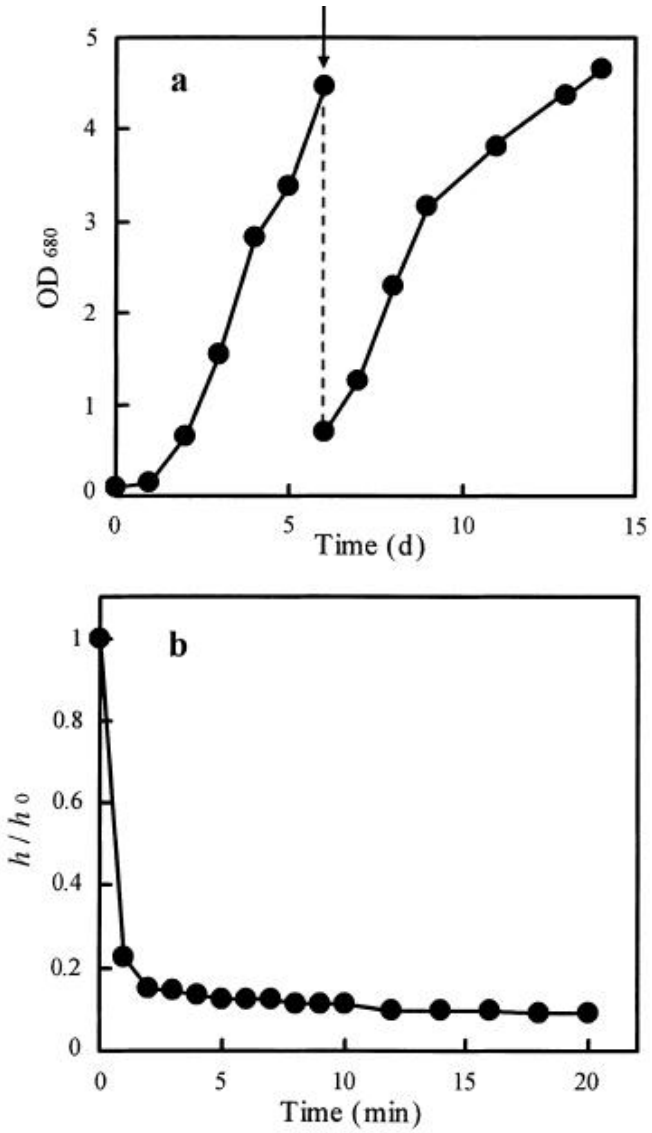


Figure 2.11 – *Culture et récolte par contrôle du pH de Dunaliella tertiolecta. (a) Suivi de la concentration algale dans le réacteur avec récolte au jour 6 par augmentation du pH à 10,5. (b) Suivi de la décantation lors de la récolte (Horiuchi* et al.*, 2003).*

production de sucres extracellulaires au début de cette phase décroissante de croissance avait été avancée pour expliquer le déclin d'efficacité (Lavoie & Delanoue, 1987).

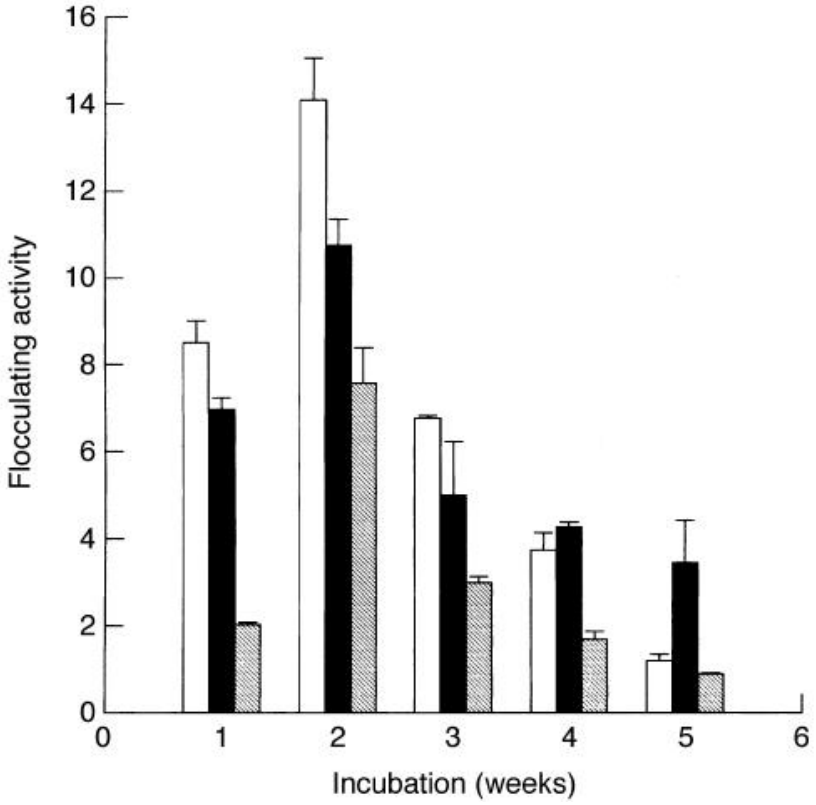
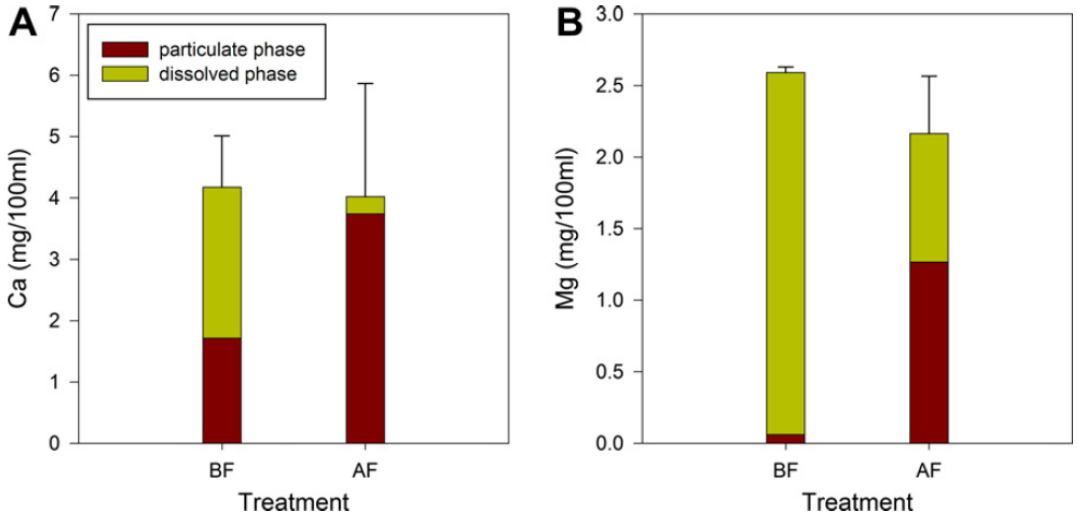


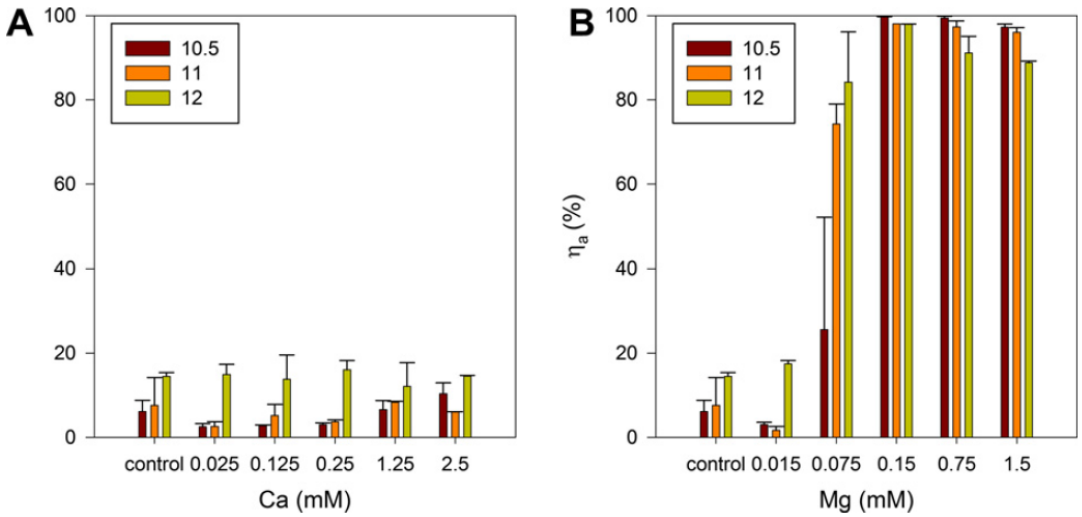
Figure 2.12 – *Efficacité de floculation de Botryococcus braunii à différents stades de croissance. Trois méthodes sont comparées. En blanc : ajustement du pH à* 11 *; Noir : ajout de* 200 *mg de sulfate d'aluminium ; Rayé : ajout de* 100 *mg de Pestan (Lee* et al.*, 1998).*

Au même titre que pour le traitement des eaux usées, dans une étude de récolte par augmentation du pH sur trois espèces d'algues d'eau douce et deux espèces d'algues d'eau de mer, il est constaté que le magnésium joue un rôle essentiel dans l'efficacité de floculation (Wu *et al.*, 2012). Il est supposé ici qu'à partir d'un certain pH, la précipitation des hydroxydes de magnésium permet la floculation en déstabilisant la suspension et en emprisonnant dans certaines conditions les algues. On parle ici de floculation par balayage. Les auteurs complètent leur analyse en montrant que l'efficacité de floculation décroît avec l'augmentation de la concentration algale et avec l'augmentation de la concentration en EPS.

Une étude sur la floculation et décantation d'une algue d'eau douce, *Chlorella vulgaris*, confirme l'importance du magnésium dans le processus de floculation (Vandamme *et al.*, 2012). Il est montré que du calcium et du magnésium précipitent lors de l'augmentation du pH. Des essais conduits en eaux exemptes de magnésium montrent l'importance de ce dernier dans les processus de floculation (figure 2.13). Le processus proposé par les auteurs est cette fois une neutralisation de charge par les hydroxydes de magnésium chargés positivement. Il est avancé que



(a) Bilan sur le calcium (A) et le magnésium (B) avant floculation (BF) et après floculation (AF) à pH 11



(b) Efficacité de récupération de *Clorella vulgaris* à 3 pH en fonction de la concentration en calcium (A) et en magnésium (B) dans le milieu.

Figure 2.13 – *Effet des concentrations en Ca et Mg sur l'autofloculation (Vandamme et al., 2012).*

les carbonates de calcium, neutres ou chargés négativement, ne peuvent induire de la floculation. La précipitation d'hydroxydes de magnésium chargés positivement pour les pH considérés avait aussi été mise en avant dans un brevet sur la séparation magnétique d'algues diverses (Zhang & Crowell, 2011). Le même mécanisme est proposé lors de l'ajout efficace de NH_3 dans des suspensions d'algues d'eau douce et d'algues marines (Chen *et al.*, 2012).

Un récent brevet postule que le taux de floculant nécessaire, chaux éteinte dans ce cas, est une fonction logarithmique de la concentration en algue dans le milieu (Schlesinger *et al.*, 2011). Ce résultat est remis en évidence dans une autre étude des mêmes auteurs. Il est alors proposé que la floculation n'est pas essentiellement la résultante de la neutralisation des algues par un précipité positif, et que les probabilités de collision entre cellules influent également sur l'efficacité de floculation (Schlesinger *et al.*, 2012).

Dans une étude sur la floculation-sédimentation de l'algue marine *Phaeodectylum tricornutum*, il est montré que la sédimentation naturelle de l'algue et la sédimentation post acidification du milieu sont inefficaces (Sirin *et al.*, 2012). Par contre, l'ajout de soude entraine des performances de floculation-sédimentation très intéressantes. Il est constaté que l'efficacité de floculation augmente avec l'ajout de soude pour se maintenir au-dessus de 90% passé un certain pH. Le facteur de concentration augmente lui aussi avec l'ajout de soude avant de diminuer passé un pH de 9,75 (Figure 2.14). Passé ce pH seuil, la cinétique de sédimentation est aussi plus lente. La disparition du magnésium dans les eaux résiduaires fait aussi dire aux auteurs que la précipitation d'hydroxyde de magnésium chargé positivement entraine l'adsorption et la floculation des algues.

En plus de l'efficacité de l'augmentation du pH sur la récolte de plusieurs microalgues, Knuckey *et al.* (2006) montrent que la neutralisation de la solution obtenue entraîne la re-dissolution des hydroxydes et la dissociation des flocs. Cette caractéristique peut s'avérer intéressante lors du post-traitement de la biomasse. De leurs côtés, Castrillo *et al.* (2013) montrent qu'il est possible de réutiliser les eaux post floculation-sédimentation pour réengendrer des cultures de *Scenedesmus obliquus* et de *Chlorella vulgaris*. Ils précisent qu'un ajout de magnésium pourrait s'avérer nécessaire pour compenser la perte engendrée par la précipitation. Ce résultat est confirmé dans de nombreuses études (Vandamme *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Vandamme *et al.* (2012) suggèrent qu'en considérant les coûts, les risques opératoires et les efficacités de floculation, du point de vue industriel, la chaux s'avère plus intéressante que la soude et que les hydroxydes de potassium et de magnésium.

L'augmentation du pH n'est pas la seule variation ayant des résultats bénéfiques sur la récolte des microalgues. Dans leur étude sur plusieurs algues d'eau douce, Liu *et al.* (2013) obtiennent des efficacités de récupération supérieures à 90% en abaissant le pH de la suspension algale (figure 2.15). Ces performances de séparation par floculation-sédimentation ne sont pas amputées par la présence d'EPS dans la suspension. Dans ce cas d'abaissement du pH, le mécanisme proposé par les auteurs est la neutralisation des charges négatives des ions carboxylates de la matière organique adsorbée sur la paroi des algues par des protons. Les auteurs précisent aussi que le

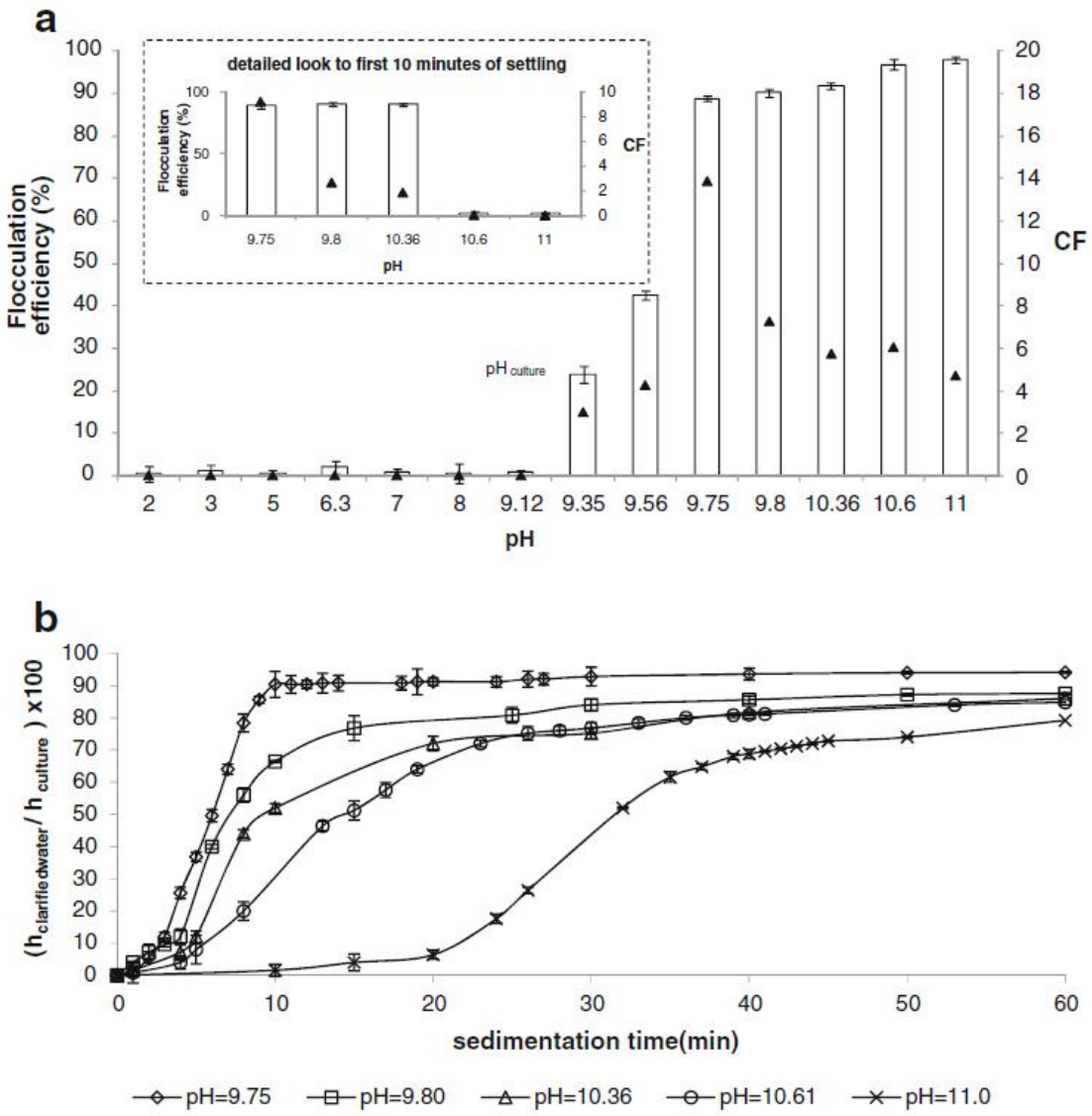


Figure 2.14 – *(a) Effet de la modification du pH sur l'efficacité de floculation et sur le facteur de concentration pour P. tricornutum après 1h de décantation ; (b) cinétique de sédimentation (Sirin* et al.*, 2012).*

milieu peut être réutilisé après la récolte pour une nouvelle culture.

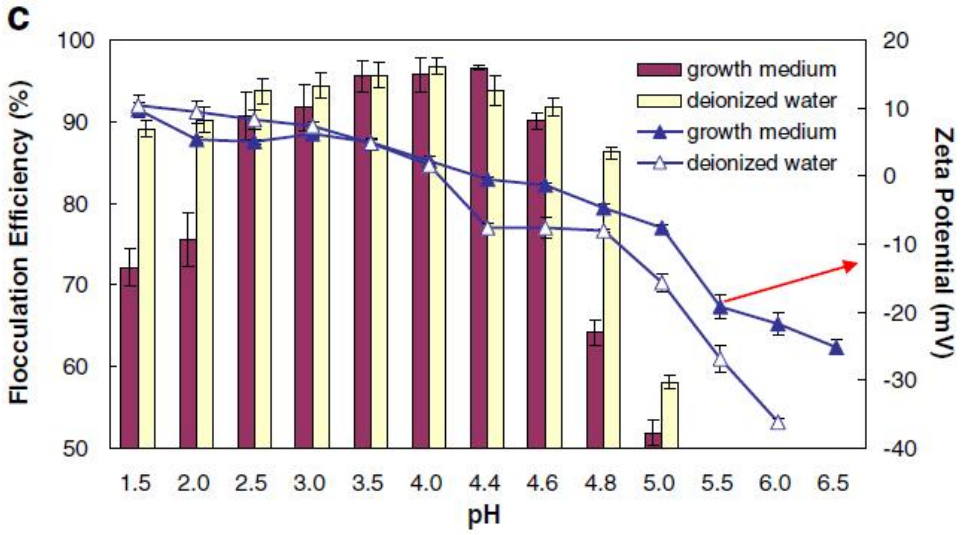


Figure 2.15 – *Efficacité de floculation et potentiel zêta pour Scenedesmus sp. (4.32 g/L) en fonction du pH (Liu* et al.*, 2013).*

2.3.4 Électrocoagulation

L'électrocoagulation s'appuie sur la libération d'ions métalliques par oxydo-réduction lors du passage d'un courant dans des électrodes à base de Fe ou d'Al (Azarian *et al.*, 2007). La libération des ions métalliques (coagulants) s'effectue à l'anode tandis que de l'hydrogène est libéré à la cathode (Chen, 2004). Les coagulants déstabilisent la suspension algale et permettent l'agrégation des algues comme dans le cas d'une coagulation chimique (Mollah *et al.*, 2004).

Les bulles d'hydrogène formées à la cathode, de diamètre 15 à 45 µm de diamètre selon Chen (2004), peuvent faciliter la flottation des flocs formés, on parle alors d'électro(-coagulation-)flottation. Cette dernière est présentée comme efficiente, lorsqu'il s'agit de retirer des algues lors d'un traitement des eaux (Gao *et al.*, 2010), ainsi que pour la récolte des algues marines *Tetraselmis sp.* (aux caractéristiques de forme et mobilité proches de *Dunaliella salina*) et *Chlorococcum sp.* (Uduman *et al.*, 2011). Dans cette dernière étude, des taux de récupération de 99% sont observés et une séparation plus rapide est observée pour de forts voltages (Figure 2.16). Il est aussi précisé que la présence de NaCl grâce à son influence sur l'augmentation de la conductivité et sur la mobilité des cellules peut être bénéfique.

La précipitation possible de Ca^{2+} et Mg^{2+} sur les électrodes peut fortement entraver l'efficacité du courant (Chen, 2004), mais le principal inconvénient de l'électrocoagulation reste la dégradation de l'anode qui nécessite un remplacement régulier. La contamination de la biomasse algale par les

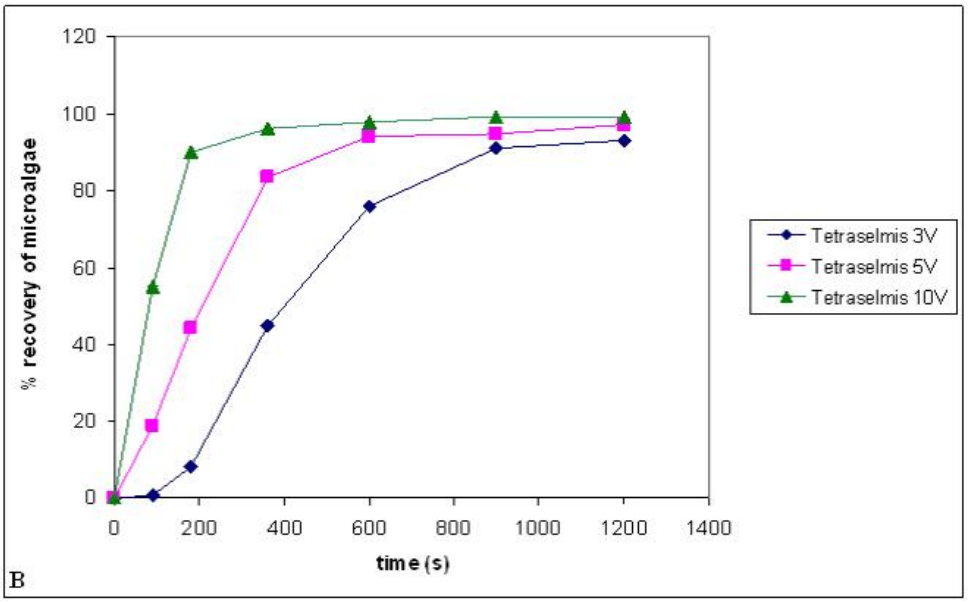


Figure 2.16 – *Efficacité de récolte par électrocoagulation à différents voltages pour l'algue marine Tetraselmis sp. (Uduman* et al.*, 2011).*

cations métalliques peut aussi poser problème pour certaines valorisations (cf paragraphes sur la coagulation-floculation chimique 2.3.2) mais Vandamme *et al.* (2011) précisent qu'aucun anion n'est introduit dans le milieu de culture contrairement à la floculation chimique précédemment citée et des doses plus faibles de coagulants sont nécessaires.

2.3.5 Électrofloculation

L'électrofloculation se base sur le principe de mouvement des particules chargées dans un champ électrique. Elle consiste à faire perdre la charge de surface négative des algues, par attraction vers l'anode (+), et contact avec cette dernière, pour faciliter l'agrégation des algues. On ne sacrifie pas l'anode, contrairement à l'électrocoagulation, mais dans certaines conditions, un encrassement de la cathode par des précipités de calcium et magnésium peut réduire les performances du procédé (Poelman *et al.*, 1997).

Des taux de récupération de la matière algale allant de 80 à 95% sont constatés après application de l'électrofloculation sur des algues d'eaux douces (Poelman *et al.*, 1997). Dans la même étude, on constate que plus la tension appliquée est importante plus la séparation est rapide, mais de fortes tensions entrainent de fortes consommations énergétiques. La réduction des coûts énergétiques passe aussi par une diminution de la surface des électrodes et par une augmentation de la distance cathode/anode. Il s'agit de trouver le compromis entre efficacité de séparation et

coût énergétique.

2.3.6 Ultrasons

De nouvelles techniques permettent d'améliorer l'efficacité de la coagulation en utilisant préalablement un traitement par ultrasons (Liang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Ce traitement permet la concentration dans certains espaces de la matière algale et augmente ainsi les probabilités de rencontre des algues.

Ce traitement aux ultrasons peut aussi être utilisé seul. La génération du champ acoustique entraine la concentration des cellules dans les zones où le potentiel est minimum et où elles s'agrègent (Bosma *et al.*, 2003). Cette technique ne semble pas utilisable sur de très grands volumes de traitement du fait de ses coûts opératoires (Vandamme *et al.*, 2013), bien qu'elle puisse être opérée en continu.

2.4 Sédimentation gravitaire

C'est le procédé de séparation solide-liquide le plus simple. Les coûts d'investissement sont limités et la mise en œuvre est peu consommatrice d'énergie et ne nécessite pas de compétences très poussées.

Pour les produits à faible valeur ajoutée la sédimentation est un procédé de récolte, ou plus précisément de pré-concentration, qui peut s'avérer efficace (Molina Grima *et al.*, 2003). Cependant, les trop faibles vitesses de sédimentation des microalgues ne permettent pas souvent d'envisager la sédimentation sans une floculation préalable (§ 2.3). La densité des algues, proche de celle des milieux de culture notamment pour les algues chargées en huiles, leur rayon et leur forme influencent l'efficacité du procédé (Brennan & Owende, 2010). Dans le cas d'une floculation préalable et selon la différence de densité entre l'algue et son milieu, la flottation (§ 2.6) peut être préférée à la sédimentation du fait de sa rapidité d'exécution. Pour augmenter la vitesse de séparation des algues et du milieu, il est aussi possible d'augmenter la force de séparation par accélération centrifuge (§ 2.5).

La sédimentation ne permet pas d'atteindre des concentrations en algues très importantes. Dans leur revue, Shelef *et al.* (1984) parlent de taux de matière sèche inférieurs à 3%. Les taux de récupération des algues peuvent aussi s'avérer limités dans le traitement des eaux, 63% à 94% pour les études considérées par Henderson *et al.* (2008). La sédimentation est mise en

œuvre dans des bassins de sédimentation (des épaississeurs gravitaires). Ces derniers peuvent être rectangulaires, mais le format circulaire est plus usité du fait de coûts d'investissement et d'opération plus raisonnables. Pour améliorer la sédimentation des algues on utilise des séparateurs à lamelles (Uduman *et al.*, 2010) ou des séparateurs inclinés (Wang *et al.*, 2013).

La sédimentation est plus efficace en absence de lumière ce qui peut s'expliquer soit par la convection thermique, soit par la formation de bulles d'oxygène par photosynthèse qui entrainerait la flottation des algues sous conditions lumineuses. La mobilité des algues et l'hydrodynamique engendrée par le vent et les stratifications de température en milieu naturel peuvent aussi perturber la sédimentation (Shelef *et al.*, 1980). Toutefois, conserver les algues sans lumière pendant une période importante peut entrainer la réduction du taux de biomasse total ou au moins du taux de métabolites d'intérêt (Bux, 2013).

Dans le cadre de la sédimentation post autofloculation (2.3.3.2), on constate une amélioration de l'efficacité de séparation avec l'avancée de l'âge de la culture. Ceci peut être expliqué par l'augmentation de la densité moyenne des cellules, elle-même entrainée par la formation de produits de photosynthèse, principalement des sucres, durant la phase décroissante de croissance (Lavoie & Delanoue, 1987).

Une étude de Salim *et al.* (2013) propose un modèle combiné floculation-sédimentation pour prédire la séparation des algues dans une cuve de sédimentation. Ce modèle peut permettre de faciliter le dimensionnement des opérations de sédimentation mais il est dépendant des caractéristiques de chaque espèce. Cette approche par modélisation est récente dans le secteur de la récolte de microalgues, peu d'études sont à ce jour disponibles.

2.5 Centrifugation

La centrifugation est une technique de séparation utilisant comme son nom l'indique la force centrifuge. C'est une extension de la sédimentation gravitaire dans laquelle l'accélération de la gravité (g) est remplacée par l'accélération centrifuge ($r\omega^2$ avec r la distance en m entre la particule et l'axe de rotation et ω la vitesse angulaire en rad/s). La taille des algues et leur différence de densité avec le milieu sont donc aussi les paramètres essentiels de la séparation centrifuge. Des études montrent que pour certaines microalgues, on peut récupérer entre 90% et 100% de la matière algale en moins de 5 min de traitement (Chen *et al.*, 2011; Heasman *et al.*, 2000).

C'est le principal procédé utilisé aujourd'hui pour la récolte des microalgues. Il peut permettre dans certains cas une concentration suffisante en une seule étape. Les coûts d'investissements et opératoires sont très importants (Molina Grima *et al.*, 2003) et les problèmes mécaniques

rencontrés sont fréquents (Bosma *et al.*, 2003). On privilégie l'utilisation de la centrifugation pour la production de molécules à haute valeur ajoutée ou comme étape de déshydratation de boues algales contenant 1 à 5% de matière sèche. Ce système de récolte n'est pas envisageable seul pour la récolte de microalgues à très grande échelle dans le cas de la production de biocarburants (DOE, 2010).

Knuckey *et al.* (2006) considèrent que le problème de lyse cellulaire dû aux forces de cisaillement encaissées rend peu envisageable son utilisation pour les algues fragiles. Cette lyse serait synonyme de perte de métabolites d'intérêt avant extraction. C'est pourtant la centrifugation qui est utilisée pour *Dunaliella salina* à l'échelle industrielle en Israël. La très haute valeur ajoutée des produits fabriqués et les concentrations relativement importantes obtenues en raceways permettent son utilisation directe.

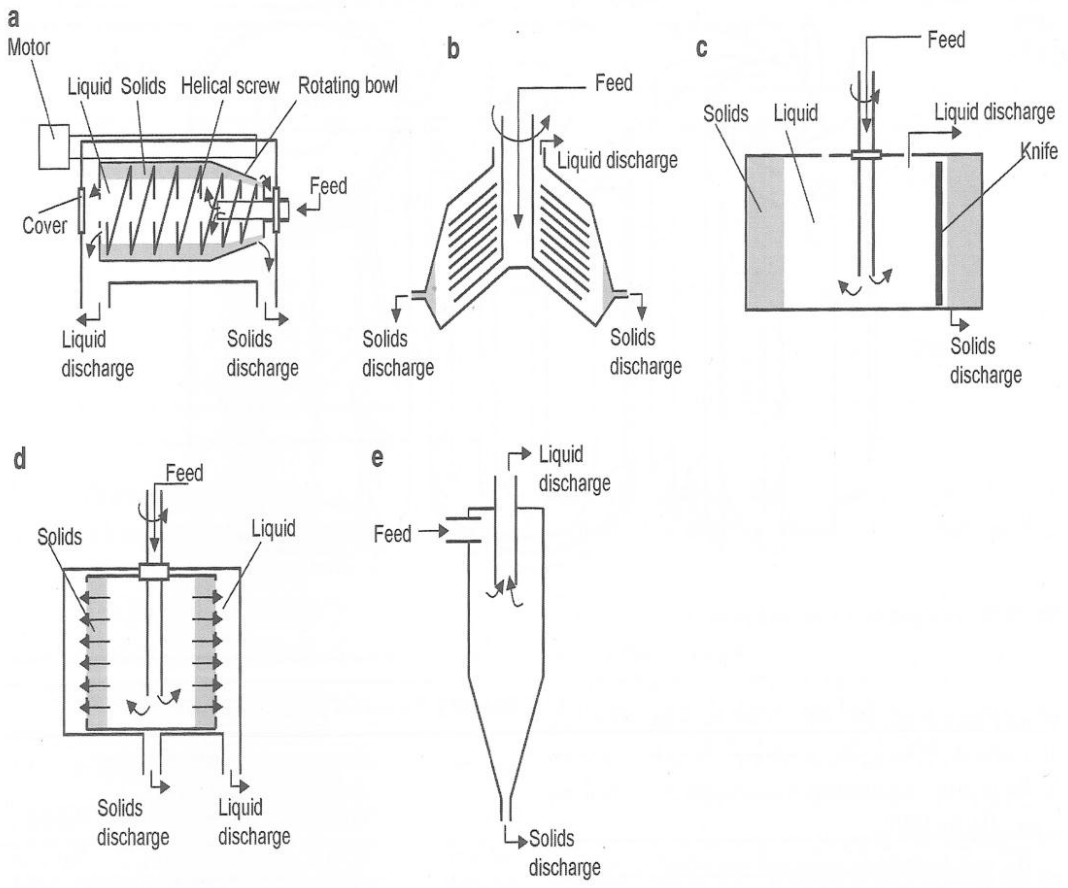


Figure 2.17 – *Vue en section de différents types de centrifugeuse : (a) décanteur centrifuge, (b) séparateur à assiettes, (c) centrifugeuse à bol, (d) centrifugeuse à bol perforé, (e) hydrocylone (Pahl* et al.*, 2013).*

Plusieurs technologies de centrifugation sont mises en œuvre (figure 2.17) :

- **Le décanteur centrifuge** (a) : Technologie qui peut être opérée en continu, avec une

forte capacité et des coûts de maintenance modérés. Il est nécessaire de préconcentrer la matière algale avant passage dans le décanteur centrifuge. L'accélération mise en œuvre permet d'obtenir des taux de MS très élevés (autour de 20%), mais avec une consommation énergétique élevée. Application limitée aux produits à haute valeur ajoutée.

- **Le séparateur à assiettes** (b) : Technologie de référence pour la récolte d'algues. Du fait de la forte accélération on obtient une bonne efficacité de séparation et des taux de matière sèche (MS) élevés. Un des problèmes rencontrés est l'intermittence de la séparation.

- **La centrifuge à bol** (c) : Elle permet d'obtenir des taux de MS élevés mais la décharge manuelle de l'appareil n'encourage pas son utilisation à grande échelle.

- **La centrifuge à bol perforé** (d) : Elle permet d'obtenir des taux de MS faible mais avec l'avantage d'un fonctionnement en continu.

- **L'hydrocyclone** (e) : Faibles coûts d'investissement, d'opération et de maintenance du fait de l'absence de partie mouvante. Requiert cependant une ingénierie de précision, est peu flexible et présente des défauts de fiabilité. L'hydrocyclone ne permet d'obtenir que des faibles efficacités et des faibles taux de MS en sortie, 0,4% TSS pour Mohn selon Shelef *et al.* (1980).

2.6 Flottation

Certaines microalgues et cyanobactéries flottent de manière naturelle. Ces espèces sont généralement pourvues de vacuoles de gaz que ne possède pas *Dunaliella salina*. En 2005, Kim *et al.* (2005) montrent que l'augmentation de la concentration en sel favorise la flottation naturelle de *Spirulina platensis* en modifiant la densité du milieu. Près de 80% des cellules sont récupérées en 2 h par flottation naturelle. Kashyap *et al.* (1998) mettent en évidence la flottation naturelle d'une autre cyanobactérie, *Anabaena flos-aquae*. Pour ces espèces, le coût de récolte peut être fortement réduit si l'on utilise cette capacité à flotter naturellement. Une grande partie des espèces de microalgues ne présente cependant pas cette caractéristique, mais il est tout de même possible de récolter la plupart par flottation assistée.

On classe les procédés de flottation assistée en deux grandes catégories, la flottation à air induit (ou flottation à air dispersé, § 2.6.2) et la microflottation. En microflottation, plusieurs techniques de génération de bulles sont envisagées ce qui permet de distinguer d'autres types de flottation : flottation à air dissous (§ 2.6.3), électroflottation (§ 2.6.4), flottation à air suspendu (§ 2.6.5) et autoflottation (§ 2.6.6).

2.6.1 Généralités sur la flottation assistée

La flottation assistée est utilisée dans l'industrie minière depuis le 19e siècle et dans le traitement des eaux depuis le début du 20e. Dans les années 60, on a commencé à utiliser la flottation pour le traitement des eaux peu turbides, colorées et concentrées en algues ou acide fulvique (Levin *et al.*, 1962; Stander & Van Vuuren, 1969). Actuellement, ce procédé est aussi utilisé pour l'épaississement des boues de station d'épuration (Arora *et al.*, 1995) et dans les procédés de recyclage des papiers imprimés.

Le principe de la flottation assistée est de faire remonter à la surface, sous l'action de bulles de gaz, les particules solides isolées ou les flocs formés dans une étape préliminaire. En pratique, les particules solides viennent se fixer sur les bulles chargées négativement pour former un complexe, de masse volumique inférieure à celle de l'eau, qui aura donc tendance à flotter. Dans de nombreux cas, il se forme une couche de mousse à la surface qui piège les particules captées. Ce phénomène peut être artificiellement favorisé par l'ajout de produits moussants. Les mousses ainsi accumulées à la surface sont récupérées par un système de racleur ou de déverse.

Un réactif collecteur (xanthane, dithiophosphates, acides gras, savons,...) peut être ajouté pour rendre hydrophobes les particules en suspension et faciliter ainsi leur capture par les bulles. Dans des suspensions complexes, des activants ou déprimants (sels métalliques, permanganate de potassium, amidon,...) peuvent être ajoutés pour favoriser la capture d'un type de composé. Cependant, comme vu précédemment pour d'autres procédés de récolte, tout ajout de produits chimiques peut s'avérer problématique pour la valorisation des microalgues (Cheng *et al.*, 2010).

La flottation est un procédé complexe. Les très fines particules (10 à 15 µm) ont par exemple du mal à flotter. Elles sont déplacées par les courants liquides induits par l'ascension des bulles et par conséquent n'entrent pas en contact avec ces dernières et ne peuvent donc pas être captées. L'état de contamination de la surface des bulles a aussi un impact considérable sur l'efficacité de collision de la bulle avec la particule. Les efficacités des mécanismes de collision bulles-particules ont été abondamment étudiées au LISBP (Sarrot *et al.*, 2005, 2007; Legendre *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011, 2012).

2.6.2 Flottation à Air Induit (FAI)

Dans la flottation à air induit, la génération des bulles est effectuée, par agitation mécanique (bulles de diamètre d_b = 0,2−2 mm) ou par le passage dans un distributeur poreux (d_b = 2−4 mm). La distribution de taille des bulles peut être modifiée par l'intensité d'agitation ou par l'ajout de tensio-actifs (Rubio *et al.*, 2002).

Il est montré que l'efficacité de capture d'une particule de diamètre d_p, par une bulle de diamètre d_b dont la surface est recouverte de particules ou de molécules tensio-actives, varie selon les rapports d_p/d_b ou $(d_p/d_b)^2$. Pour la capture de particules de l'ordre de grandeur des microalgues, il est donc préférable de pouvoir disposer de bulles de diamètres inférieurs à ce qui est réalisable par FAI. Pour de nombreuses microalgues, la FAI ne produit pas de résultats significatifs (Cheng *et al.*, 2010) mais sous certaines conditions, la FAI peu s'avérer efficace.

Sur *Scenedesmus quadricauda*, une algue verte d'eau douce, la FAI se montre par exemple efficace lors de l'ajout d'un collecteur cationique et lors de l'ajout simultané d'un collecteur anionique et de chitosane (Chen *et al.*, 1998). Les interactions électrostatiques entre le collecteur et les algues jouent ici un rôle déterminant, ce qui ne sera pas le cas pour de fortes salinités. Les variations de pH et de température peuvent influencer l'efficacité de la récolte par FAI (Phoochinda & White, 2003). Dans une autre étude de FAI sur une algue d'eau douce et une d'eau de mer, il est montré que l'ajout d'un collecteur favorisant le caractère hydrophobe de l'algue marine permet une flottation efficace (Garg *et al.*, 2012).

En modifiant le gaz dispersé, il est aussi parfois possible d'obtenir des résultats intéressants. Betzer *et al.* (1980) obtiennent par exemple des taux en matière sèche de 2 à 7% sur un consortium d'algues avec l'utilisation d'air enrichi en ozone. On retrouve ici l'effet de l'oxydation préalable des algues. Cheng *et al.* (2011a) montrent aussi que *Scenedesmus obliquus FSP-3* présente des résultats intéressants avec la FAI si l'on utilise une dose d'ozone. L'influence de la présence des AOM (Matière Organique Algale) est soulignée dans cette étude.

Un autre axe d'étude sur la FAI est la réduction de la taille des bulles générées. Une nouvelle méthode de création de bulles couplant diffuseur et oscillateur fluidique permet la création de bulles de diamètre inférieur à 100 µm et ceci à moindre coût. L'oscillateur fluidique perturbe la croissance de la bulle au niveau des pores et permet sa libération avant l'équilibrage des forces habituel (Hanotu *et al.*, 2012). Cette méthode a été testée avec succès sur la séparation de microalgues. Des performances similaires à celles rencontrées en flottation à air dissous (DAF) sont obtenues.

2.6.3 Flottation à air dissous (DAF)

Avec la flottation à air dissous (DAF), des bulles de diamètre 10 à 100 µm sont formées suite à la dépressurisation, dans la cellule de séparation, d'une eau saturée en gaz. La formation des bulles comprend deux étapes : la nucléation et la croissance des bulles (Edzwald, 1995). Des diamètres moyens proches de 40 µm sont obtenus. La distribution de taille de bulles est fonction de la détente. En général, plus la pression de saturation est importante plus les bulles générées sont petites, mais au-dessus de 5 bars, augmenter la pression de saturation n'a que peu

d'influence sur la taille des bulles (Heinanen *et al.*, 1992; De Rijk *et al.*, 1994). Feris & Rubio (1999) montrent qu'il est possible d'obtenir de très petites bulles malgré de faibles pressions de saturation (inférieures à 2 Atm) en utilisant des faibles doses de surfactant (le collecteur) pour abaisser la tension interfaciale eau/air dans le saturateur.

Pour la séparation des microalgues, la DAF est très souvent couplée avec une floculation préalable (Molina Grima *et al.*, 2003) et l'ajout de surfactant cationique rend l'opération efficace (Bare *et al.*, 1975; Liu & Bourne, 1999). Sa consommation énergétique est élevée et les concentrations algales obtenues restant assez faibles, environ 6% selon Shelef *et al.* (1984), une deuxième étape de concentration est souvent nécessaire.

À l'échelle industrielle, dans le traitement des eaux, la DAF se décline généralement selon le schéma proposé figure 2.18. L'eau à traiter est mise en contact, sous forte agitation, avec un coagulant qui déstabilise la suspension. La suspension déstabilisée est ensuite dirigée vers une zone moins turbulente où la floculation opère (un floculant peu être ajouté). La séparation des flocs a lieu dans une autre zone dans laquelle des eaux pressurisées sont détendues. Ces eaux pressurisées sont généralement prélevées sur les eaux traitées, on définit ici un taux de recyclage, avant d'être montées en pression dans le saturateur. En sortie de procédé, on obtient d'un côté des eaux traitées débarrassées de leurs particules et de l'autre, une boue chargée de particules.

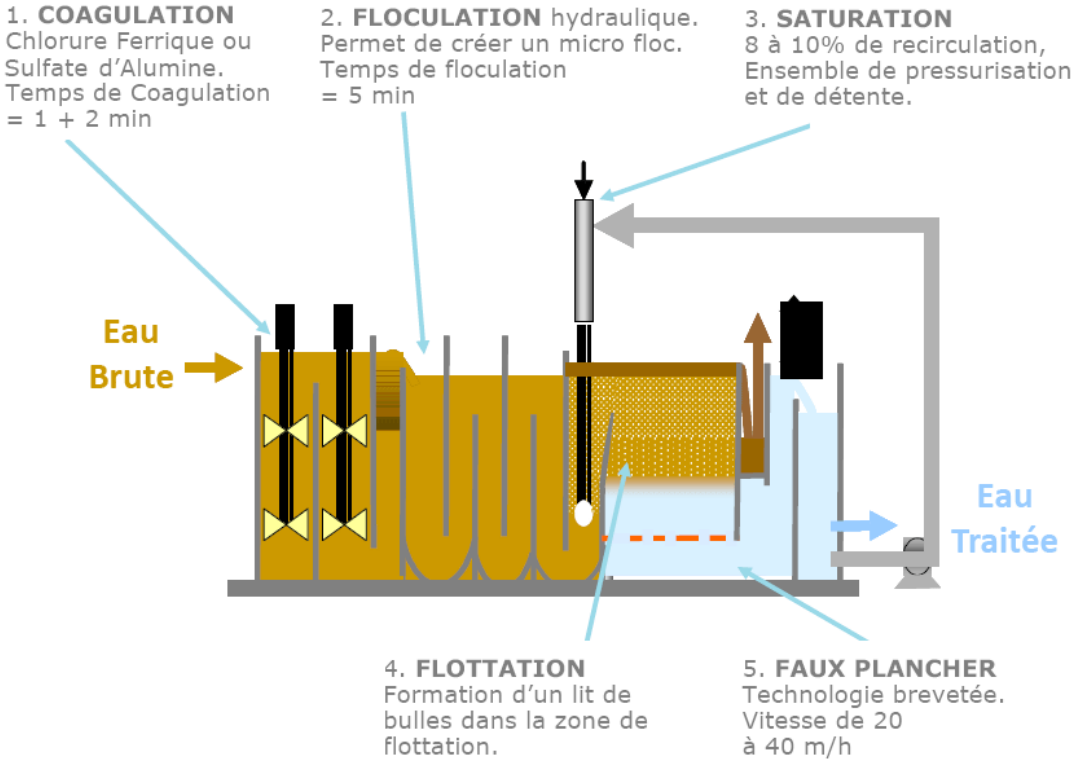


Figure 2.18 – *Principe de fonctionnement de l'Aquadaf (Degrémont - Suez Environnement).*

Des études montrent que la DAF est plus efficace que la sédimentation dans le traitement des

eaux (Edzwald, 1993; Teixeira & Rosa, 2006). L'étude de Liu *et al.* (2007) avance par exemple une efficacité plus élevée de la flottation versus la sédimentation sur une eau riche en population algale. Edzwald & Wingler (1990) postulent que la DAF est efficace sur une gamme de potentiels ζ plus large que dans le cas de la sédimentation pour *Chlorella vulgaris* et *Cyclotella*. Henderson *et al.* (2008) avancent que la DAF est le procédé de clarification le plus robuste et qu'il permet d'atteindre un taux de récupération des algues de 99,8% contre 94% pour une sédimentation post coagulation chimique par ajout de sels métalliques. Sim *et al.* (1988) montrent que la flottation est plus économique que la centrifugation, mais que l'ajout de produits chimiques, si il est nécessaire, peut condamner certaines valorisations de la biomasse.

Dans leur étude sur le couplage floculation induite par ajout d'Al^{3+}/DAF, pour récolter l'algue d'eau douce *Chlorella zofingiensis*, Zhang *et al.* (2012) montrent l'importance de la phase de croissance à laquelle la récolte est opérée (figure 2.19). La diminution des concentrations en groupes fonctionnels présents à la surface des algues au cours de la culture permet de réduire les quantités de floculant injectées pour des cultures plus âgées. L'augmentation des concentrations en DOM (Matière Organique Dissoute) lors de la culture vient par contre augmenter la consommation en floculant.

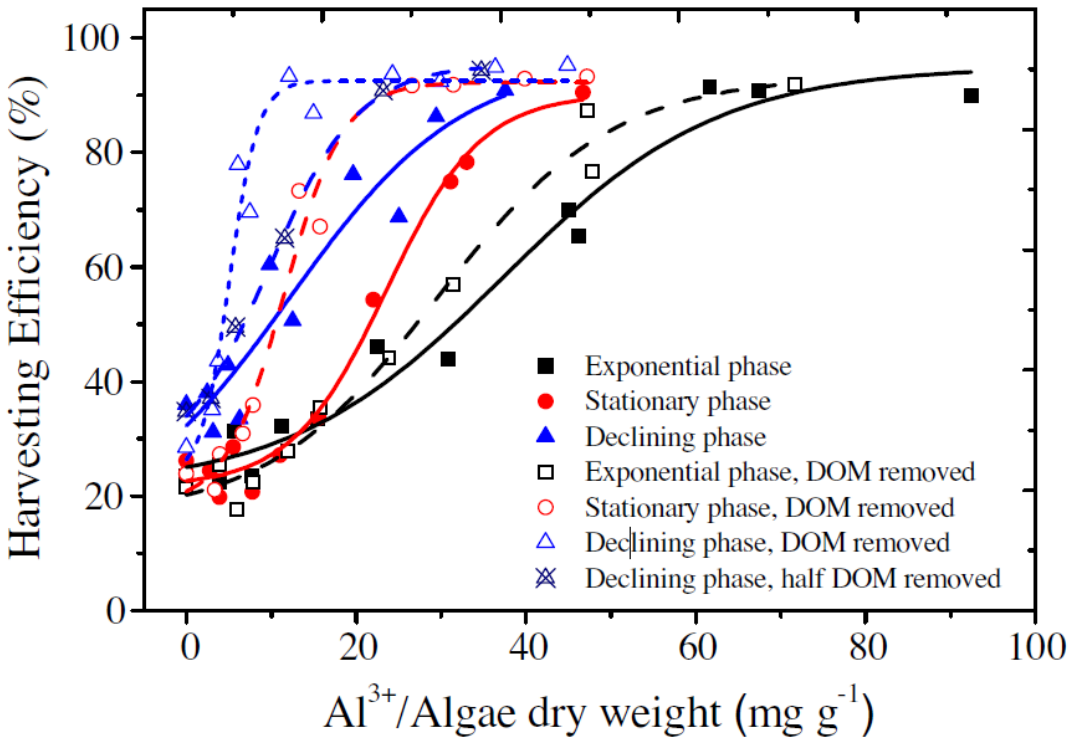


Figure 2.19 – *Influence de la phase de croissance sur la récolte par DAF en présence ou non de matière organique dissoute (DOM) dans la milieu de culture (Zhang* et al.*, 2012).*

Dans une autre étude, Henderson *et al.* (2009) s'attachent à caractériser l'influence de la modification des bulles par ajout de produits chimiques directement dans le saturateur sur la

récolte des algues. Ils montrent qu'il est possible ainsi de s'affranchir d'une étape préalable de coagulation-floculation de la biomasse.

2.6.4 Electroflottation

Ce sont les bulles d'hydrogène et d'oxygène formées par l'électrolyse de l'eau qui permettent ici la flottation des algues. Pour plus d'informations le lecteur peut se référer aux chapitres sur l'électrocoagulation (§ 2.3.4) et sur l'électrofloculation (§ 2.3.5). Les dépenses énergétiques pour ce procédé sont importantes et comme pour la DAF les concentrations algales envisageables nécessitent souvent une seconde étape de concentration avant extraction.

2.6.5 Flottation à air suspendu (SAF)

Les bulles sont ici obtenues par le seul ajout de surfactant (Heron MicroFroth™ cationic surfactant) sans besoin de compresseur ou saturateur. Selon Wiley *et al.* (2009), cette nouvelle technique permet d'obtenir, sur certaines algues d'eaux usées préalablement déstabilisées, de meilleures performances de récolte qu'avec la DAF. Selon les auteurs, les échantillons à traiter sont moins dilués par les eaux de flottation que dans les cas d'une DAF. La taille de bulles obtenue est similaire à la DAF mais la surface active des bulles permet des liaisons plus solides entre bulles et algues. L'utilisation de produits chimiques reste problématique (Wiley *et al.*, 2011).

2.6.6 Autoflottation

Les bulles sont formées suite à la fermentation de matière organique ou à l'acidification de solutions de carbonates ou bicarbonates. On peut aussi classer dans cette catégorie l'autoflottation provoquée par l'oxygène dissous issu de la photosynthèse pratiquée par les algues. L'autoflottation couplée à une floculation préalable peut se montrer efficace pour la récolte de certaines algues (Koopman & Lincoln, 1983). Dans cette étude, les boues flottées atteignent 6% de matières sèches. Des concentrations en oxygène dissout de 14 à 16 $mg.L^{-1}$ sont nécessaires (Arbelaez *et al.*, 1983). Cette méthode est donc difficilement envisageable en production continue car à de tels taux d'oxygène dissous, la croissance microalgale est limitée.

2.7 Filtration

La filtration est surtout adaptée pour les microalgues filamenteuses, vivant en colonie ou pour les algues de diamètre supérieur à 70 µm. La filtration sur soies est par exemple utilisée pour la récolte de Spiruline. Selon de nombreux travaux, la filtration est utilisable sans floculation préalable (Oswald, 1991; Ferguson *et al.*, 1995; Saidam & Butler, 1996; Downing *et al.*, 2002) mais une étape de floculation préalable peut parfois être appliquée.

Les technologies de filtration les plus communément utilisées pour la récolte des algues sont énumérées dans la suite. Le passage de la suspension à travers le filtre s'effectue par gravité, pression ou sous vide. Certaines technologies permettent une filtration continue. Il est parfois utile d'ajouter en suspension ou directement sur le filtre des « facilitateurs » de filtration qui permettent de structurer le gâteau pour augmenter les performances de séparation. Cet ajout ne doit pas limiter les valorisations de la pâte algale et doit être peu coûteux.

Pour des algues de l'ordre de grandeur de *Dunaliella salina* la filtration sur filtre sable, sur fibre de cellulose et sur beaucoup d'autres supports n'est pas efficace. Seules exceptions la filtration sur terre de diatomées brevetée en Australie (Ruane, 1976) et les procédés membranaires.

2.7.1 Procédés membranaires

Dans les procédés membranaires, la filtration peut être tangentielle ou frontale. La filtration dite frontale force la totalité du débit à traiter à traverser la barrière filtrante sur laquelle s'accumule rapidement un gâteau de particules. La filtration membranaire frontale est très peu utilisée à l'échelle industrielle pour la récolte de microalgues. Les problèmes de colmatage amputent de manière trop significative les performances de séparation. En ce qui concerne la filtration dite tangentielle, les barrières filtrantes sont agencées de manière à permettre un balayage de ces dernières par une partie du débit entrant. La force de cisaillement induite par la circulation de la suspension permet de limiter l'accumulation du dépôt et donc de maximiser les performances de filtration par réduction du colmatage. Ce mode permet de limiter la pression transmembranaire mais entraîne des coups de pompage. Il faut noter que la biomasse peut aussi subir un stress au passage dans les pompes (Schlipalius, 1991; Vandanjon *et al.*, 1999).

L'ultrafiltration peut être efficace pour les plus petites microalgues, mais des problèmes sérieux de colmatages des filtres (Benemann *et al.*, 1980), principalement provoqués par l'adsorption de la matière organique algale (AOM), viennent amputer son bilan global (Rossignol *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2010). Des prétraitements (coagulation, traitement à l'ozone) peuvent permettre de réduire ce colmatage (Babel & Takizawa, 2011). Les coûts des remplacements fréquents des

membranes et de pompages sont aussi des freins au développement de cette technique (Pittman *et al.*, 2011).

La microfiltration membranaire tangentielle est plutôt destinée à dépolluer les eaux plutôt qu'à concentrer les algues pour leur récolte. Cependant, cette technique peut être intéressante pour des molécules à parois fragiles même si son utilisation à grande échelle semble difficilement envisageable. Hung & Liu (2006) montrent notamment que la filtration à flux tangentiel est plus performante que celle à flux frontal et permet de moins endommager les cellules de *Chlorella*.

En eau douce, Petrusevski *et al.* (1995) constatent sur certaines algues des taux de récupération de la matière algale allant jusqu'à 89%. Les études ne s'accordent pas forcément sur les facteurs de concentration atteignables avec la filtration tangentielle. Des études de filtration membranaire sur membranes céramiques ou organiques ont montré qu'il était possible de pré-concentrer la suspension jusqu'à des facteurs de concentration 20 (Rossi *et al.*, 2005). Danquah *et al.* (2009) avancent eux des facteurs de concentration de 148.

L'utilisation de membranes de micro (pores de 100 nm à 10 µm) ou d'ultrafiltration (pores de 1 à 100 nm) selon la taille des cellules à filtrer permet d'obtenir une bonne rétention des microalgues. Rossignol *et al.* (1999) mettent en évidence que l'ultrafiltration est moins sensible au colmatage que la microfiltration. Le colmatage est principalement provoqué par le lien réalisé par les EPS entre les algues et qui compacte le dépôt (Morineau-Thomas *et al.*, 2002). Pour réduire le colmatage, il est possible de jouer sur la pression transmembranaire, sur le cisaillement à la membrane, sur la géométrie des modules et sur l'ajout d'une phase gaz en prenant toujours soin de conserver l'intégrité des algues. Des études de filtration dynamique sont aussi en cours pour tenter d'améliorer les performances de filtration (Frappart *et al.*, 2008, 2011). Quoi qu'il en soit, il est nécessaire de régénérer régulièrement les membranes.

2.7.2 Filtration frontale gravitaire (tamisage)

La filtration frontale gravitaire, baptisée « tamisage » pour les algues, permet de traiter des cellules d'un diamètre supérieur à 40 µm. C'est un procédé très simple dans sa mise en œuvre. Il est notamment utilisé pour la récolte de la spiruline. Il nécessite une gestion du gâteau régulière pour maintenir les performances de filtration. Le gâteau obtenu est généralement pressé pour le concentrer, mais les gradients de pression restent faibles et sont souvent obtenus de manière artisanale (stockage sous poids). Il est possible d'atteindre ainsi des taux en matière sèche élevés. Les consommations énergétiques sont modérées. On retrouve dans la mise en œuvre technique du tamisage principalement des tables d'égouttage.

2.7.3 Filtre tambour rotatif

Les filtres tambours rotatifs sont une évolution du système de tamisage précédemment cité. Ici, un tambour sous vide, recouvert d'un média filtrant trempe dans la suspension. Le perméat traverse la toile et les algues restent dans le filtrat. Le gâteau obtenu sur le filtre est régulièrement raclé lors des rotations du tambour. Il existe de nombreuses technologies de tambours rotatifs en fonction du filtre, du racleur, du degré de vide, de la vitesse de rotation et de la suspension d'alimentation choisis.

2.7.4 Filtre à bande

Cette technologie nécessite une préconcentration de la biomasse voire une floculation préalable. Le filtre circule sur des rouleaux qui l'entrainent à vitesse variable. L'épaississement des boues intervient par drainage de l'eau et passage de cette dernière à travers le média filtrant sous l'effet de la gravité. Cette technologie ne permet pas de concentrer les boues à plus de 7%.

Il est possible de combiner cette technologie de filtre à bande par gravité avec une seconde bande filtrante dans laquelle la boue est mise sous pression par contact direct avec les rouleaux. Avec ce type de technologie combinée il est possible d'atteindre des taux de matière sèche bien supérieurs.

2.7.5 Filtres presses

Ils sont composés d'une suite de filtres mis en série dans lesquels la suspension s'écoule perpendiculairement aux filtres. La filtration est assurée par les filtres mais aussi et surtout par les gâteaux formés sur les filtres. Ils sont peu utilisés pour la récolte des algues du fait de l'aspect discontinu de leur décharge.

2.8 Adsorption

C'est la méthode utilisée pour récolter *Dunaliella salina* dans le procédé industriel développé en Australie à partir de cultures diluées en étangs à bas-fonds. *Dunaliella salina* a tendance à

devenir hydrophobe au-delà d'une concentration en NaCl de 3 M soit environ 174 $g.L^{-1}$. Curtain & Snook (1985) se sont inspirés de cette caractéristique pour proposer une méthode de récolte qui met en contact la suspension algale et un adsorbant ayant une surface hydrophobe. Dans le brevet en question, ils prévoient aussi la désorption de l'algue par lavage à l'eau douce ou avec une saumure de moindre salinité. Ils protègent aussi une méthode intégrée de traitement de la matière algale. Cette dernière consiste à récupérer le contenu des algues durant leur adhésion aux surfaces hydrophobes, par la mise en contact de l'attelage et d'un solvant. Ce solvant permet la rupture de la membrane microalgale et l'extraction des composés d'intérêt, notamment du β-carotène. D'un point de vue technologique, la suspension algale peut traverser un lit de particules hydrophobes, on parle alors de filtration hydrophobe. Les algues sont retenues dans le lit et éluées séquentiellement par ajout d'eau ou de saumure moins concentrée. Autre méthode, l'adsorption sur les particules de faible densité suivie d'une récupération par flottation et de l'extraction par solvant.

Les adsorbants référencés dans le brevet de Curtain & Snook (1985) sont les suivants : polyéthylène, polypropylène, nylon, polyesters, polyacrylate, poly-acrylonitrile, téflon, laine et perle de verre silanisées, chalcopyrite, rutile, hématite, ilménite, magnétite, pyrolusite, graphite et anthracite. Ces adsorbants sont préférentiellement sous forme de poudres ou fibres pour disposer d'une large surface de contact. La magnétite présente en plus l'avantage d'être séparable par magnétisme. Plusieurs solvants sont ensuite proposés pour permettre la rupture membranaire et l'extraction des composés d'intérêt : chlorure de méthylène, chloroforme, tétrachlorure de carbone, trichlorure d'éthylène, hydrocarbures aromatiques ou mélanges d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques. Le CO_2 liquide est aussi reconnu comme solvant efficace pour l'extraction du β-carotène et permet même une bonne conservation de ce dernier pendant le process.

2.9 Autres techniques de récolte

Il existe d'autres méthodes de récolte pour certaines algues. On parle notamment de cultures fixées, la croissance des algues se fait sur un matériau facilement récupérable (Johnson & Wen, 2010). Christenson & Sims (2011) soutiennent que leur méthode de cultures fixées permet de récolter plus facilement certaines algues en récupérant et traitant le substrat plutôt que les algues suspendues.

Certains chercheurs osent aussi parler de bio-récolte de prédateurs. Plutôt que de récolter directement l'algue, il s'agirait ici de capturer les prédateurs ayant préalablement assimilé les composés d'intérêt (ciliés, crevettes, ...). Aucune étude sérieuse n'est à l'heure actuelle référencée sur ce sujet.

2.10 Séchage

Les procédés de récolte présentés ci-dessus ne permettent pas d'augmenter le taux de matière sèche au-dessus de 25%. Pour sécher la biomasse il existe de nombreuses technologies mais toutes sont très énergivores. De la chaleur peut être récupérée sur une usine voisine mais le coût des infrastructures est élevé. Le séchage solaire peut être envisagé mais de très larges surfaces sont nécessaires.

Afin de minimiser les coûts de production de matière algale il est nécessaire d'optimiser les techniques de bioraffinage en milieu humide pour s'affranchir de cette étape de séchage. De nombreux travaux sont en cours sur ce sujet, notamment dans le cadre du projet Salinalgue. L'objectif est d'appliquer directement l'extraction des composés d'intérêt sur des pâtes algales en sortie de centrifugation, voire même sur des boues de flottation.

2.11 Procédés brevetés de récolte de microalgues

Dans cette section, les brevets précédemment cités sont rappelés et de nouvelles sources sont ajoutées si nécessaire. Cette liste ne se veut pas exhaustive. De très nombreux brevets sont actuellement déposés sur le sujet de la récolte de microalgues et une étude d'antériorité spécifique doit être réalisée avant chaque entame de recherches sur un procédé particulier.

2.11.1 Procédés brevetés spécifiques à *Dunaliella salina*

Outre le brevet d'adsorption sur particules hydrophobes de Curtain & Snook (1985) présenté dans le paragraphe 2.8, d'autres brevets spécifiques à *Dunaliella salina* doivent être considérés.

Ruane (1976) a très tôt déposé un brevet de filtration de *D. salina* sur terre de diatomées.

Bloch *et al.* (1982) ont constaté que si de l'eau douce est ajoutée en surface d'un bassin de culture de *Dunaliella salina*, il se crée en surface une couche d'eau moins concentrée en sel (c'est le cas lors d'intempéries par exemple). La microalgue se déplace alors à l'interface de ces deux couches de fluides. Bloch et Ginzburg ont breveté le fait d'utiliser ce gradient de concentration en sel pour la récolte.

Guelcher et Kanel ont déposé une série de brevets concernant la séparation de la *Dunaliella*

salina dans le cas où la finalité est la récupération du β-carotène. Plusieurs méthodes sont utilisées comme la filtration en profondeur (Guelcher & Kanel, 1998a), la flottation en colonne à bulle (Guelcher & Kanel, 1998b) ou en cellule de Jameson (Guelcher & Kanel, 1998c), la microfiltration (Kanel & Guelcher, 1998). Ces méthodes sont toutes précédées par une étape de fractionnement des cellules. L'étape de fractionnement consiste à faire passer la suspension au travers de l'étranglement d'une boucle de pompage à une pression et un pourcentage de recyclage suffisants pour briser les membranes de cellules. Le fait de briser leur membrane favoriserait la flottation et la filtration. Il faut tout de même noter qu'une perte de métabolites ou de certaines de leurs propriétés peut être à craindre avec ce fractionnement de cellules.

2.11.2 Procédés brevetés pour la récolte d'autres microalgues

Radaelli *et al.* (2009) ont déposé une méthode de floculation par ajout de polymères organiques. Zhang & Crowell (2011) ont plus récemment protégé un principe de récolte de microalgues adsorbées sur des particules magnétiques, suite à la déstabilisation de la suspension par modification du pH.

Une méthode couplant floculation avec additif, colonne télescopique de flottation et déshydratation est brevetée par Borodyanski & Konstantinov (2002). Il faut noter que dans ce brevet la flottation peut être réalisée avec des bulles de dioxyde de carbone (ou d'air), un mélange eau-dioxyde de carbone étant compressé à 6 atm. L'étude montre la possibilité de séparer les microalgues aux parois fragiles sans nécessairement rompre les cellules.

Rene *et al.* (2008) présentent aussi un procédé breveté de colonne à tête sous dépression, n'ayant pas pour objectif premier la récolte d'algues, mais qui a présenté des caractéristiques intéressantes de flottation algale. Ce procédé sera testé, en collaboration avec les inventeurs, lors du projet Salinalgue.

Des liquides hydrophobes, de densité inférieure à celle de la phase aqueuse algale (exemple : Ester méthylique d'acides gras), sont utilisés pour récolter certaines algues par flottation liquide/liquide. Le passage des algues dans la phase hydrophobe couplé à la séparation des phases permet de concentrer les algues (Berry *et al.*, 2011).

Dodd (1976) a très tôt breveté un dérivé de récolte par filtration tambour. Plus récemment, (Fournier, 2008) a déposé une méthode de filtration tangentielle avec conservation de l'intégrité des algues. (Dong *et al.*, 2010) ont eux breveté un procédé de récolte sur membrane céramique.

2.12 Choix des procédés de récolte étudiés dans la présente étude

Le choix du procédé de récolte commence par la considération de l'état de la culture en amont du procédé de récolte et des exigences des procédés avals d'extraction notamment. Dans le cadre du projet Salinalgue, la culture devant s'effectuer en étangs à bas-fonds, les concentrations maximales de matière sèche algale attendues sont très faibles, inférieures à 0,5 $g_{MS}.kg^{-1}_{suspension}$ (0.05%). Les partenaires chargés de la partie « bioraffinerie » du projet Salinalgue devant mettre au point des procédés capables de fonctionner en voie humide, il est fixé des objectifs de concentration massique de 200 $g_{MS}.kg^{-1}_{suspension}$ (20%), soit un facteur de concentration à atteindre durant cette étape d'environ 400.

La centrifugation et la filtration peuvent permettre ce genre de concentration. Cependant, pour la centrifugation, les coûts de traitement des quantités d'eau énormes ne permettent d'envisager son utilisation unique que pour des valorisations de produits à très haute valeur ajoutée (cas de la filière industrielle en Israël). En ce qui concerne la filtration, ce sont les forces de cisaillement imposées aux algues et le colmatage induit par les matières algales exsudées qui limitent son utilisation à grande échelle.

L'adsorption est prometteuse, elle est d'ailleurs utilisée avec succès en Australie. Elle a été rapidement testée dans cette étude par la mise en contact d'une suspension de *Dunaliella salina* avec du Polytétrafluoroéthylène (PTFE de marque Téflon™), connu pour ses propriétés hydrophobes. Les essais n'étant pas concluant du fait des caractéristiques particulières des souches de *Dunaliella salina* cultivées dans le projet Salinalgue et des salinités de cultures utilisées, cette méthode n'a pas été retenue pour plus d'investigations.

Les autres procédés de récolte ne permettant pas d'atteindre les concentrations en matière sèche escomptées, c'est donc vers un procédé multi-étagé que s'est dirigée cette étude. Une ou plusieurs étapes permettent d'épaissir la suspension algale, pour atteindre des concentrations massiques pouvant aller jusqu'à 7% et sont suivies d'une étape de déshydratation, qui porte le taux de matière sèche au-dessus de 20%. Il faut noter que si les procédés d'extraction en voie humide abaissent leurs exigences de concentration, les étapes d'épaississement pourraient s'avérer suffisantes. C'est l'objectif minimal à atteindre pour commencer à envisager la rentabilité des biocarburants algaux.

Plusieurs étapes d'épaississement sont envisageables. Le sédimentation gravitaire (étudiée dans la section 5.3) est séduisante de par les faibles coûts qu'elle met en jeu, mais la littérature indique que les concentrations finales obtenues sont faibles. La flottation, plus consommatrice d'énergie mais qui permet d'atteindre des taux de matière sèche plus importants, est alors une alternative crédible. On peut aussi envisager un couplage des deux procédés avec une pré-concentration par sédimentation et un épaississement des boues par flottation.

Il est rapidement constaté qu'en conditions normales de culture, une étape de déstabilisation de la suspension algale doit être ajoutée pour envisager toute séparation. Cette étape ne devant pas amputer les valorisations possibles de la microalgue, certaines méthodes de déstabilisation sont dès le début du projet écartées. On pense ici à la coagulation-floculation par ajout de composés inorganiques et à l'électrocoagulation. Pour des raisons environnementales et économiques, la pré-oxydation des algues et le traitement préalable aux ultrasons sont aussi recalés. En ce qui concerne l'électrofloculation les très fortes concentrations en magnésium et calcium dans les eaux de culture laissent présager des encrassements très rapides de la cathode.

Restent alors la déstabilisation par ajout d'un floculant organique, qui sera rapidement étudiée avec le cas du chitosane (section 6.1), l'augmentation de la salinité du milieu de culture pour rendre les algue hydrophobes (section 6.2), et les procédés de biofloculation ou d'autofloculation. Ces derniers seront privilégiés dans cette étude (section 6.3 et chapitres 7, 8 et 9).

En ce qui concerne l'étape de déshydratation, étant données les quantités plus faibles de fluide à traiter, la centrifugation redevient envisageable. Cette dernière est donc rapidement étudiée dans ce projet (section 5.2). Il n'est par contre pas considéré de procédé de séchage.

Chapitre 3

Mise au point de la plateforme analytique

Pour permettre l'étude de la récolte de microalgues, nouvelle thématique au LISBP, de nombreux travaux préliminaires ont dû être effectués. Le suivi des cultures de microalgues et la caractérisation des efficacités de récolte nécessitent en effet la mise en place et la maîtrise de nombreuses méthodes d'analyse. Les procédures, voire même l'appareillage, de la plupart de ces méthodes n'étaient pas disponibles en début de projet.

La mise en place de la plateforme analytique orientée microalgue au LISBP s'est faite pour les méthodes d'évaluation de la concentration algale à partir d'un stage d'observation aux côtés de Loïc Le Déan et Noémie Coulombier au laboratoire PBA de l'Ifremer Nantes, un des laboratoires partenaires du LISBP dans le projet Salinalgue. La méthode de caractérisation du ratio caroténoïdes/chlorophylles a été intégrée grâce aux échanges avec Hubert Bonnefond et Olivier Bernard du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, autre laboratoire partenaire dans Salinalgue. Pour le reste, les méthodes sont issues de l'analyse et de l'interprétation de la littérature et parfois de méthodes similaires utilisées sur d'autres milieux au LISBP.

Il faut noter que les salinités rencontrées dans les cultures de *Dunaliella salina* (entre 7% et 23% dans cette étude) compliquent l'application de nombreuses méthodes d'analyse. C'est pourquoi chacune des méthodes, même les plus classiques, a été testée, caractérisée et validée avant toute utilisation de routine. Des protocoles spécifiques, clairs et concis, ont été mis en place pour faciliter le transfert des compétences acquises vers d'autres opérateurs. Certaines méthodes, comme le test d'hydrophobie ou le comptage cellulaire automatique par compteur de particules, ont été rejetées, mais sont tout de même référencées dans ce chapitre pour comprendre les raisons de ces rejets et éviter de reproduire certaines erreurs dans les travaux à venir.

Sommaire

3.1 Évaluation de la salinité **79**
3.1.1 Généralités sur la salinité 79
3.1.2 Évaluation de la salinité par réfractométrie 80
3.1.3 Influence de la température sur l'évaluation de la salinité 81
3.1.4 Influence de la présence de microalgues sur l'évaluation de la salinité . . 81
3.1.5 Conclusions sur l'évaluation de la salinité par réfractométrie 83
3.2 Comptage cellulaire **83**
3.2.1 Compteurs de particules 84
3.2.2 Comptage de microalgues sur cellule de Malassez 84
3.2.3 Conclusions sur le comptage cellulaire 88
3.3 Spectrophotométrie **89**
3.3.1 Prise en compte du changement de pigmentation 90
3.3.2 Procédure de dilution des suspensions concentrées 91
3.3.3 Vérification de la répétabilité et de la reproductibilité de l'évaluation de la concentration microalgale par comptage cellulaire ou par spectrophotométrie 92
3.3.4 Relation entre la densité optique et la concentration cellulaire mesurée sur cellule de Malassez 96
3.3.5 Conclusions sur l'utilisation de la spectrophotométrie 98
3.4 Caractérisation du ratio caroténoïdes/chlorophylles **98**
3.5 Évaluation de la matière sèche **99**
3.5.1 Évaluation de la matière sèche dans les cultures de *D. salina* 99
3.5.2 Évaluation de la matière sèche dans des suspensions concentrées de *D. salina* 101
3.6 Caractérisation du pH dans les solutions hypersalines **102**
3.6.1 Échelle de pH considérée 102
3.6.2 Matériels et méthodes de mesure du pH 103
3.7 Chromatographie ionique - Dionex **103**
3.8 Évaluation du caractère hydrophobe des microalgues **104**
3.9 Macrophotographie **104**
3.10 Conservation des échantillons avant analyse **107**

3.1 Évaluation de la salinité

La salinité est au centre de nombreuses considérations lorsque l'on parle de la culture de *Dunaliella salina*. Comme ceci sera vu plus loin, elle a également une influence importante sur la récolte de cette microalgue. Pour cette étude, il était donc nécessaire de pouvoir accéder à une évaluation simple de cette salinité.

3.1.1 Généralités sur la salinité

La salinité se définit théoriquement comme étant « la quantité totale de résidus solides (en grammes) contenue dans 1 kg d'eau de mer, quand tous les carbonates ont été transformés en oxydes, le brome et l'iode remplacés par le chlore et que toute la matière organique a été oxydée. » L'évaluation de cette salinité théorique ainsi décrite étant compliquée, des échelles pratiques ont été définies.

Depuis 1978, l'échelle pratique de salinité publiée par l'Unesco impose une définition de la salinité en terme de rapport de conductivité. La salinité pratique (S), d'un échantillon d'eau, est définie en fonction du rapport K de la conductivité électrique de cet échantillon d'eau à 15°C et à la pression atmosphérique normale, et de celle d'une solution de chlorure de potassium dans laquelle la fraction en masse de KCl est 0,0324356, à la même température et même pression. Une valeur de K égale à 1 correspond à une salinité pratique égale à 35.

Si l'on considère cette définition pratique, étant donnée la gamme de validité des conductimètres classiques, de nombreuses dilutions sont nécessaires pour évaluer la salinité des eaux hypersalines rencontrées dans ce projet. Étant donné le temps disponible pour le suivi des cultures et la nécessité de pratiquer ces mesures en conditions extérieures, il a été décidé d'opter plutôt pour une évaluation de la salinité par réfractométrie. La salinité est alors exprimée en pourcentage massique de sel dans la suspension ($kg_{sel}/kg_{suspension}$ noté % dans ce manuscrit).

Des salinités exprimées en grammes de sels totaux par litre de suspension sont aussi proposées parfois dans ce manuscrit.

3.1.2 Évaluation de la salinité par réfractométrie

L'indice de réfraction d'un milieu dépend de la salinité, de la température, de la pression du milieu et de la longueur d'onde utilisée (Copin-Montegut, 2002). Si les trois derniers paramètres sont fixés, il est alors possible d'évaluer la relation entre l'indice de réfraction et la salinité.

Dans cette étude, un réfractomètre d'Abbe de précision $3T$ a été utilisé pour évaluer l'indice de réfraction d'une eau permutée dans laquelle différentes concentrations de NaCl sont ajoutées. La figure 3.1 montre que l'indice de réfraction est une fonction linéaire croissante de la salinité dans la gamme considérée pour cette étude. Cette figure montre aussi que les variations relatives de l'indice de réfraction en fonction de la salinité sont faibles, ce qui explique le manque de précision de la méthode par rapport à la conductimétrie directe.

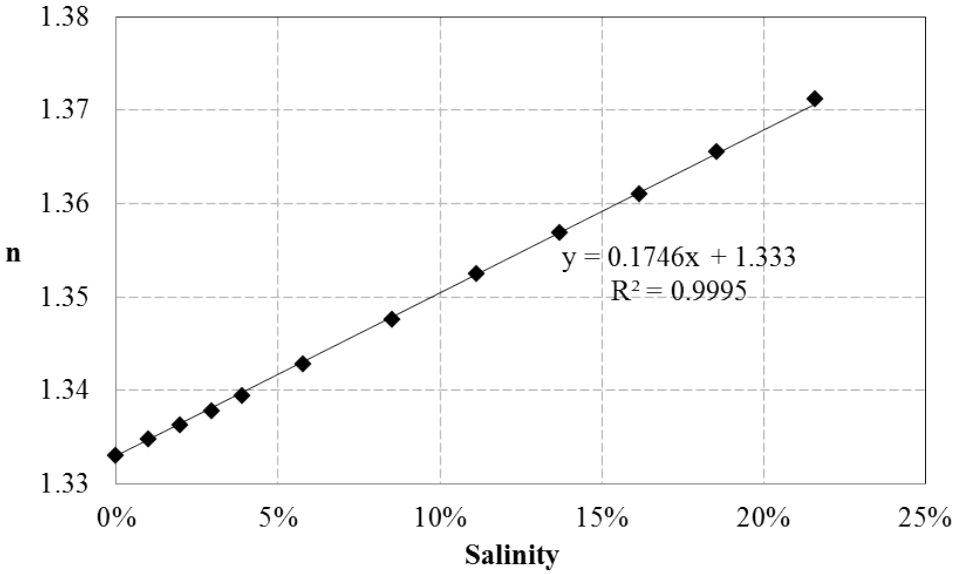


Figure 3.1 – *Indice de réfraction en fonction de la salinité réelle d'une eau salée (en* $kg_{NaCl}.kg^{-1}_{solution}$*).*

Pour des raisons pratiques, le réfractomètre Abbe de précision n'a pu être utilisé sur les suivis de routine. Pour ces derniers, un réfractomètre ATC à salinité a été utilisé. Ce réfractomètre est gradué directement en pourcentage massique de sel dans la solution, sur une gamme 0 – 28% (±0,2%). Plusieurs tests ont été réalisés pour valider son utilisation.

3.1.3 Influence de la température sur l'évaluation de la salinité

Pour tester cette influence, des solutions de salinités connues ont été préparées. Ces solutions ont été conservées dans un bain thermostaté pour les porter successivement aux températures désirées. La figure 3.2 présente les salinités obtenues par évaluation au réfractomètre ATC, en fonction des salinités réelles des eaux, pour trois températures différentes.

Sur cette expérience, en moyenne, le réfractomètre sous-évalue très légèrement la salinité réelle. La sous-évaluation semble s'accroître avec l'augmentation de la température. Il faut noter que le zéro du réfractomètre était étalonné à 20°C, ce qui explique sûrement cette légère dérive avec la température. Dans la suite des travaux, dans la mesure du possible, le zéro du réfractomètre a été réalisé sur une eau permutée, à la température des échantillons à caractériser.

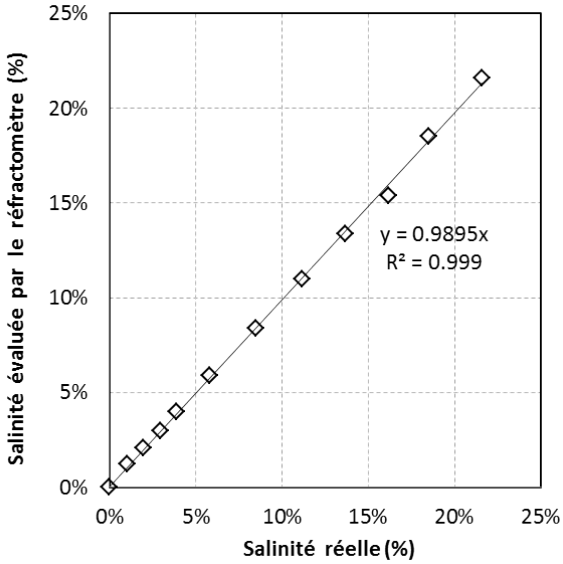
En appliquant cette procédure, une autre manipulation est réalisée sur trois eaux de salinités connues, représentatives des eaux caractérisées dans cette étude (9,0%, 12,0% et 15,0%). Ces eaux témoins sont portées à 25°C et 6 mesures indépendantes sont réalisées à l'aide du réfractomètre sur chacune des eaux. La moyenne des erreurs relatives obtenues est inférieure à 1,25% quelle que soit la salinité testée. La plus grande erreur relative obtenue est de 2.2%. Cette erreur relative maximale constatée, représente pour une eau de salinité réelle 12%, une erreur absolue d'environ 0,25% sur la salinité. Ceci est acceptable pour les besoins de cette étude.

Avec la procédure d'étalonnage du zéro à température des eaux caractérisées, les valeurs relevées sur le réfractomètre seront donc considérées directement, sans correction.

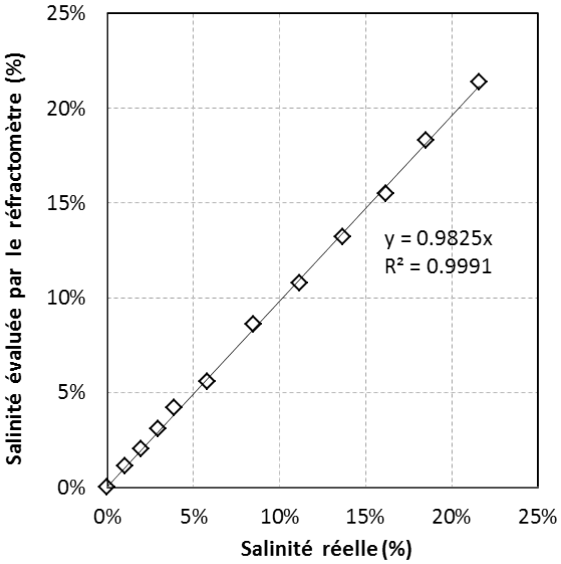
3.1.4 Influence de la présence de microalgues sur l'évaluation de la salinité

Une autre source possible de perturbations est la présence de microalgues dans la solution caractérisée. Pour vérifier cette influence, des cultures de *Dunaliella salina* ont été réalisées à différentes salinités. Une fois suffisamment concentrées (DO_{800} des cultures supérieures à 0,4), des échantillons de ces cultures ont été prélevés. Leur salinité a été évaluée avec les microalgues puis ces échantillons ont été centrifugés à $4000g$ pendant 5 min pour retirer les algues. Une nouvelle mesure de salinité a alors été effectuée sur chaque échantillon débarrassé de microalgue.

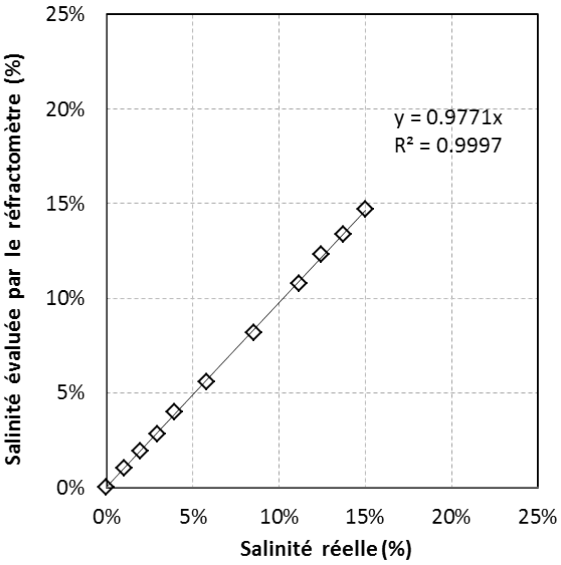
Le tableau 3.1 présente les salinités évaluées avec et sans microalgues. La présence de microalgues, même concentrées, ne perturbe visiblement pas la mesure de salinité par réfractométrie. L'erreur absolue maximale constatée est en effet de 0,2%.



(a) 20 °C



(b) 25 °C



(c) 30 °C

Figure 3.2 – *Évaluation au réfractomètre ATC des salinités de plusieurs solutions connues. Résultats présentés pour* 3 *températures différentes.*

Salinités évaluées (en %)	
Avec algues	**Sans algues**
0,0	0,0
1,8	2,0
2,8	3,0
4,0	4,1
5,5	5,6
6,5	6,5
7,6	7,6
8,9	8,9
10,1	10,0
10,9	11,0
12,1	12,1
13,1	13,2
14,4	14,3

Tableau 3.1 – *Influence de la présence de microalgues (DO_{800} des cultures supérieures à* 0,4*) sur la mesure de salinité par réfractométrie. Température de la suspension :* 22,5° *C.*

3.1.5 Conclusions sur l'évaluation de la salinité par réfractométrie

Étant données les validations précédentes et sauf mention contraire, les salinités mentionnées dans ce manuscrit ont été évaluées par le réfractomètre ATC. La seule précaution retenue est l'étalonnage du zéro avec une eau permutée, de température équivalente aux eaux à caractériser. Plusieurs réfractomètres du même modèle ont été utilisés en fonction du lieu de manipulation.

3.2 Comptage cellulaire

L'évaluation de la concentration microalgale est essentielle pour le suivi des cultures et la caractérisation des performances de récolte obtenues sur une suspension microalgale. Cette concentration microalgale peut notamment être évaluée par comptage cellulaire. Dans ce cas, elle est généralement exprimée en nombre de microalgues par millilitre.

Cette section rend compte des travaux de prise en main et d'optimisation du comptage cellulaire. Plusieurs techniques de comptages cellulaires sont testées et comparées. La plus performante

des techniques évaluées, le comptage sur cellule de Malassez automatisé par macro ImageJ, sera comparée dans la section 3.3.3, à la spectrophotométrie, autre méthode d'évaluation de la concentration microalgale.

3.2.1 Compteurs de particules

Pour faciliter le comptage des microalgues, il a d'abord été envisagé d'utiliser un compteur de type Chemtrac $PC2400$. Ce type de compteur est habituellement utilisé pour dénombrer les particules résiduelles dans les procédés de traitement de l'eau potable.

Les premiers tests ont montré que ce compteur ne pouvait pas caractériser des échantillons contenant plus de 15000 particules/mL. Les cultures de *D. salina* peuvent atteindre plusieurs millions de cellules par millilitre. Il s'avère donc nécessaire de diluer fortement les échantillons.

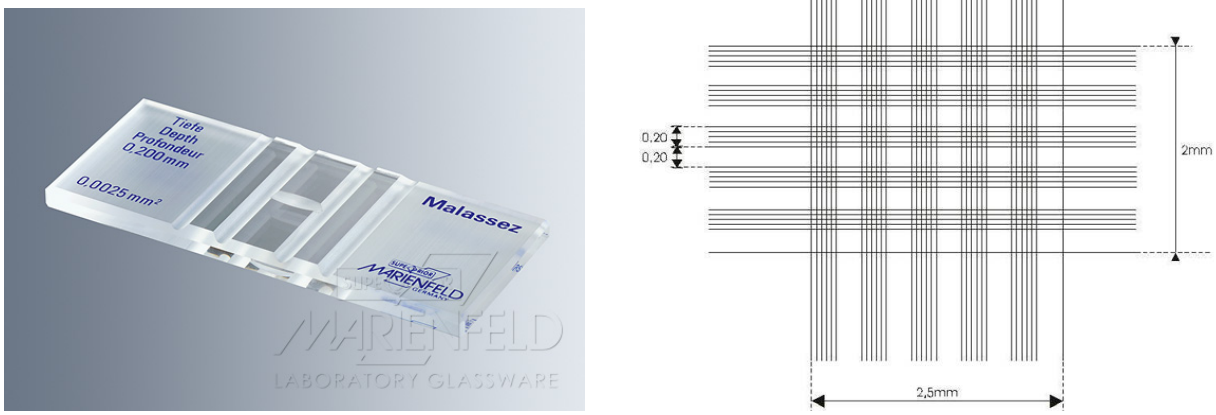
Or, l'eau salée utilisée pour la dilution des échantillons contient, selon le compteur Chemtrac, plus de 10000 particules/mL qu'il ne peut différencier des microalgues. Devant ce constat, l'idée de caractériser la concentration cellulaire par compteur Chemtrac a été rapidement abandonnée.

3.2.2 Comptage de microalgues sur cellule de Malassez

Le comptage de microalgues peut s'effectuer sur des lames de verre quadrillées baptisées hématimètre, c'est la méthode choisie dans cette étude. Il existe plusieurs type de quadrillages. Les lames quadrillées utilisées dans ce projet sont plus précisément nommées cellules de Malassez (figure 3.3). Elles sont recouvertes de lamelles dédiées, permettant d'assurer l'exactitude de la profondeur entre lame et lamelle. Ceci permet de pouvoir remonter à un nombre de microalgues contenu dans un volume connu ou en d'autres termes, à une concentration cellulaire.

L'observation de la lame se fait sous un microscope LEICA $DM1000$ équipé d'une caméra couleur CCD Guppy PRO (Allied Vision Technologies, 14 bits, 1292964 pixels, 31 fps). Les clichés sont récupérés à l'aide du logiciel d'acquisition AVTCamera (Allied Vision Technologies, Germany).

Le protocole de comptage manuel sur ces cellules de Malassez est proposé en annexe A. Pour faciliter l'opération, deux méthodes d'automatisation du dénombrement des cellules sur la lame sont proposées dans la suite. Ces dernières ne peuvent s'affranchir de la préparation manuelle de la cellule de Malassez, mais facilitent et accélèrent l'opération de comptage.



(a) Cellule de Malassez

(b) Quadrillage de Malassez

Figure 3.3 – *Cellule de Malassez utilisée pour le comptage de Dunaliella salina.*

3.2.2.1 Automatisation du comptage

3.2.2.1.1 Programme Matlab

Afin d'accélérer la procédure de comptage, un programme Matlab permettant d'évaluer la concentration des échantillons observés a été implémenté (Annexe B). Ce programme utilise les fonctionnalités de la toolbox « image processing ».

Le protocole de préparation de la cellule de Malassez reste identique (voir annexe A). Plutôt que de compter manuellement les algues sur les diagonales du quadrillage, l'opérateur photographie plusieurs zones de l'échantillon contenu entre lame et lamelle. Pour ne pas perturber le traitement automatique, ces photos sont prises dans les zones non quadrillées de la cellule de Malassez.

L'opérateur fournit ensuite au logiciel le nombre de photos qu'il souhaite analyser pour évaluer la concentration d'un échantillon (minimum 5 photos selon l'étude de répétabilité). Le résultat renvoyé à l'opérateur est une concentration moyenne sur les photos fournies. D'autres critères comme la surface apparente des microalgues ou leur sphéricité peuvent aussi être obtenus.

3.2.2.1.2 Macro ImageJ

Pour des raisons de non disponibilité de licence Matlab ou de la toolbox sur les sites de manipulations hors LISBP, une macro ImageJ a aussi été implémentée durant ce projet. Cette dernière permet une excellente évaluation du nombre de microalgues sur une prise de vue. La séquence de traitement comprend les étapes suivantes :

1. La sélection de l'image à traiter.
2. Sa conversion en format 8-bits niveau de gris.
3. Un seuillage sur l'échelle des gris, modifiable selon la qualité des prises de vues.
4. Une discrimination en taille des particules, modifiables selon le grossissement utilisé.
5. Une discrimination en circularité des particules, modifiable selon la forme des microalgues et des particules à discriminer.
6. Une évaluation du nombre de microalgues et de leur surface en $pixels^2$.

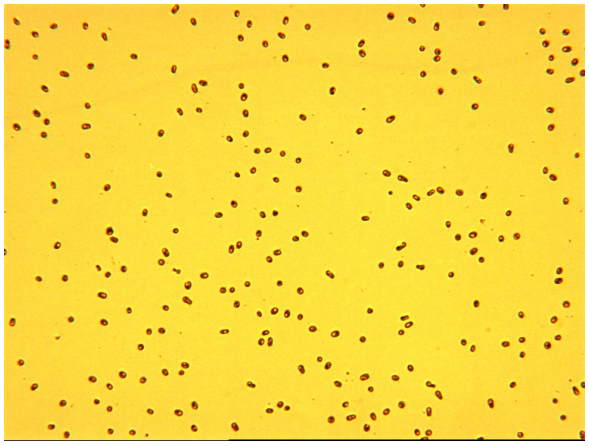
Un exemple d'application de cette séquence de traitement est proposé dans la figure 3.4. On remarque que les étapes de discrimination en taille et circularité des particules sont essentielles à un bon dénombrement. Les critères de discrimination devront être choisis en fonction de la population microalgale caractérisée.

L'opérateur obtient avec cette macro ImageJ le nombre de microalgues sur la photo. Connaissant le volume balayé par cette dernière (étalonnage préalable avec le quadrillage de Malassez), il en déduit la concentration cellulaire, en prenant soin de tenir compte de la dilution au Lugol. Il est aussi possible d'obtenir la surface apparente des microalgues et leur sphéricité.

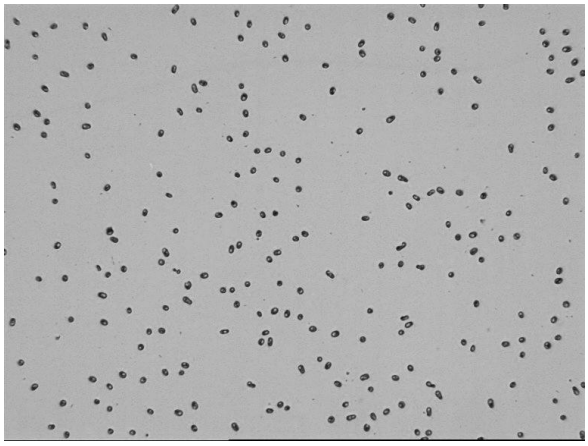
Un test de validation a été effectué sur un échantillon de 10 photos (voir tableau 3.2). Le nombre de microalgues sur chaque photo a d'abord été évalué par un comptage manuel classique (comptage rapide et sans marquage des cellules comptées), puis par utilisation de la macro ImageJ et enfin par un comptage minutieux (avec marquage des cellules comptées).

On constate des différences relatives inférieures à 1% entre un comptage minutieux à la main et un comptage automatique. Pour le comptage manuel classique, on constate des différences relatives pouvant atteindre jusqu'à 2%.

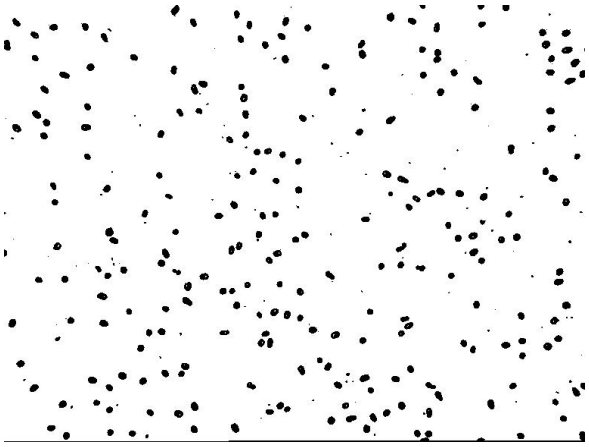
Plus rapide et plus précis, le comptage sur cellule de Malassez assisté par la macro ImageJ est la méthode privilégiée dans cette étude. Une vérification des critères de discrimination est tout de même effectuée lors des changements caractéristiques de population microalgale (changement de souches, mise en carence, salinités très importantes).



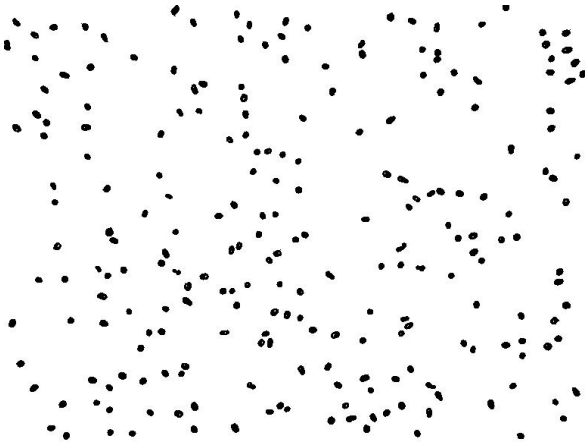
(a) Sélection de l'image à traiter



(b) Conversion 8-bits niveau de gris



(c) Seuillage et binarisation



(d) Discrimination des autres particules

Figure 3.4 – *Séquence de traitement ImageJ d'une prise de vue microscopique sur cellule de Malassez. Comptage manuel* = 225 *; Comptage ImageJ* = 227 *(sans les étapes de discrimination, comptage ImageJ* = 476*).*

Photo numéro	Comptage minutieux	Comptage ImageJ	Comptage manuel rapide	Erreur comptage ImageJ	Erreur comptage manuel
1	**465**	467	460	0.43%	1.08%
2	**386**	384	380	0.52%	1.55%
3	**437**	441	432	0.92%	1.14%
4	**423**	425	415	0.47%	1.89%
5	**389**	391	396	0.51%	1.80%
6	**503**	499	494	0.80%	1.79%
7	**475**	475	485	0.00%	2.11%
8	**462**	458	465	0.87%	0.65%
9	**397**	398	391	0.25%	1.51%
10	**485**	484	480	0.21%	1.03%

Tableau 3.2 – *Comparaison des résultats obtenus sur l'évaluation du nombre d'algues sur une photo, par comptage automatique et par comptage manuel. Le comptage minutieux sert de référence.*

3.2.3 Conclusions sur le comptage cellulaire

Du fait de sa précision et de sa rapidité, le comptage sur cellule de Malassez avec utilisation d'une macro ImageJ a été privilégié dès que possible au comptage manuel. Si l'utilisation de la macro ImageJ limite l'erreur due à l'opérateur sur le dénombrement des microalgues sur une lame, de nombreuses autres causes peuvent venir entacher la précision de cette mesure.

La figure 3.5 montre que lors de la dilution d'une suspension par des solutions sans microalgues, le comptage cellulaire n'est pas proportionnel au facteur de dilution (les comptages reportés sont la moyenne de 2 comptages réalisés sur les 2 quadrillages d'une même cellule de Malassez). Pour des eaux douces ou des eaux de mer, ceci pourrait s'expliquer par la lyse de certaines cellules lors de la dilution. Pour la saumure, une eau de même salinité est ajoutée, il n'y a pas de modification de pression osmotique et donc pas de lyse cellulaire. Malgré cela, le comptage cellulaire n'est pas proportionnel au facteur de dilution.

Cette non proportionnalité constatée sur la figure 3.5 est en réalité la conséquence d'une dispersion importante de l'évaluation de la concentration algale par comptage cellulaire. En effet, un nombre bien plus important de comptages d'un même échantillon est nécessaire pour obtenir un résultat cohérent. Ceci sera mis en évidence par les tests de répétabilité et reproductibilité, présentés dans le paragraphe 3.3.3, en parallèle des tests réalisés sur la spectrophotométrie. Ces tests montreront les limites de la méthode de comptage par rapport à une évaluation de la

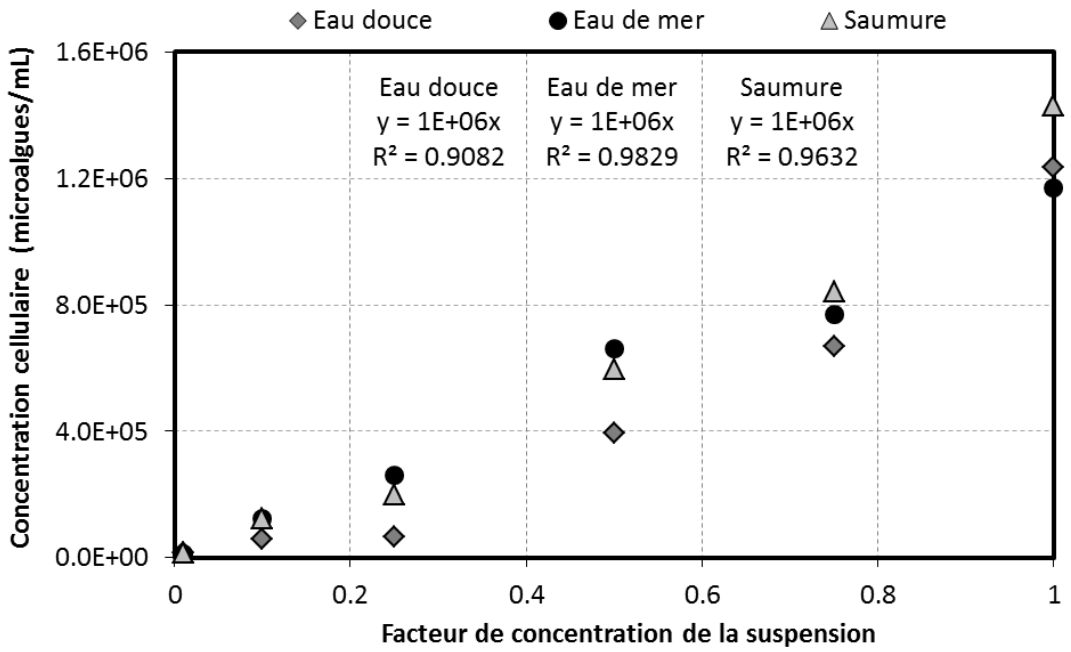


Figure 3.5 – *Comptage cellulaire sur une suspension de D. salina progressivement diluée avec de l'eau douce, de l'eau de mer ou une saumure de même salinité et régression linéaire pour chacune des eaux de dilution.*

concentration microalgale par spectrophotométrie.

Du fait du nombre important de comptages nécessaires pour obtenir une évaluation suffisamment précise de la concentration microalgale, le comptage sera peu utilisé. Certains comptages seront tout de même réalisés pour échanger avec d'autres partenaires, ou pour valider les résultats obtenus par spectrophotométrie.

3.3 Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative, utilisée notamment pour déterminer la concentration de certaines substances en solution. En effet, selon la relation de Beer-Lambert, à une longueur d'onde λ donnée caractéristique de la substance dissoute, la densité optique d'une solution est proportionnelle à la longueur du trajet optique et à la concentration de la substance dissoute. Un simple étalonnage peut donc permettre de remonter à des concentrations inconnues.

Dans la littérature, la spectrophotométrie est utilisée fréquemment pour mesurer indirectement et de manière non destructive, l'évolution de la concentration microalgale dans une suspension.

Malgré le caractère particulaire des microalgues, la relation de Beer-Lambert semble en effet vérifiée sur une gamme assez large de concentrations. Pour les algues vertes, la mesure de densité optique à 680 nm (DO_{680}), longueur d'onde correspondant au pic d'absorption de la chlorophylle a, est principalement utilisée. Cette DO_{680} est généralement corrélée linéairement à la concentration microalgale sur une gamme de DO_{680} allant jusqu'à 1, ce qui est souvent suffisant pour caractériser les cultures microalgales sans dilution des échantillons.

Plusieurs spectrophotomètres ont été utilisés durant l'étude. Les expériences réalisées au LISBP ont été caractérisées par un spectrophotomètre $V-530$ (Jasco, France). Pour les expériences réalisées sur le site de démonstration, un spectrophotomètre Spectroquant™ Pharo 100 (Merck, Allemagne) a été utilisé.

3.3.1 Prise en compte du changement de pigmentation

La méthode d'évaluation de la concentration microalgale par spectrophotométrie a été validée par de très nombreux auteurs pour des microalgues d'eau douce ou d'eau de mer et dont la pigmentation ne varie pas fortement pendant une culture. Ce changement de pigmentation est le principal point limitant son utilisation sur *Dunaliella salina*. Une méthode alternative est applicable pour intégrer les modifications de cette composition pigmentaire caractéristique de cette microalgue.

Dans leur étude sur une microalgue dont la composition pigmentaire varie durant la culture, Griffiths *et al.* (2011) recommandent de caractériser la concentration cellulaire par absorption d'une longueur d'onde hors des gammes d'absorption des pigments. En procédant ainsi, il est possible de trouver des longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption reste proportionnelle à la concentration microalgale, et ce, malgré des changements de pigmentation.

Dans Salinalgue, le choix d'une longueur d'onde de 800 nm a été fait en collaboration avec l'ensemble des partenaires. Cette longueur est hors des gammes d'absorption de la chlorophylle et des caroténoïdes, principaux pigments présents dans *D. salina*. Pour chaque échantillon, la DO_{800} est toute de même complétée par une DO_{680} pour vérifier la pertinence de la mesure en cas de résultats improbables.

3.3.2 Procédure de dilution des suspensions concentrées

La figure 3.6 met en évidence la proportionnalité de la DO_{800} avec le facteur de dilution d'un échantillon (facteur de concentration inférieur à 1). Ceci ne signifie par forcément que la DO_{800} est proportionnelle à la concentration microalgale. En effet, d'autres substances que les microalgues, aussi présentes dans la suspension, pourraient influencer sa DO_{800}. Dans la procédure utilisée pour diluer l'échantillon, ces éventuelles substances étant aussi diluées, il se pourrait que ce soit la concentration de ces substances que l'on caractérise.

Il est donc montré que la spectrophotométrie remplit une condition nécessaire pour être validée comme méthode d'évaluation de la concentration microalgale, mais cette condition n'est pas suffisante. Le problème est qu'aucune méthode quantitative n'est validée pour évaluer la concentration microalgale dans des échantillons. Il n'est donc pas possible de confronter la spectrophotométrie pour définitivement valider son utilisation. Ceci sera réalisé dans la section 3.3.4, grâce aux résultats mis en évidence dans la section 3.3.3.

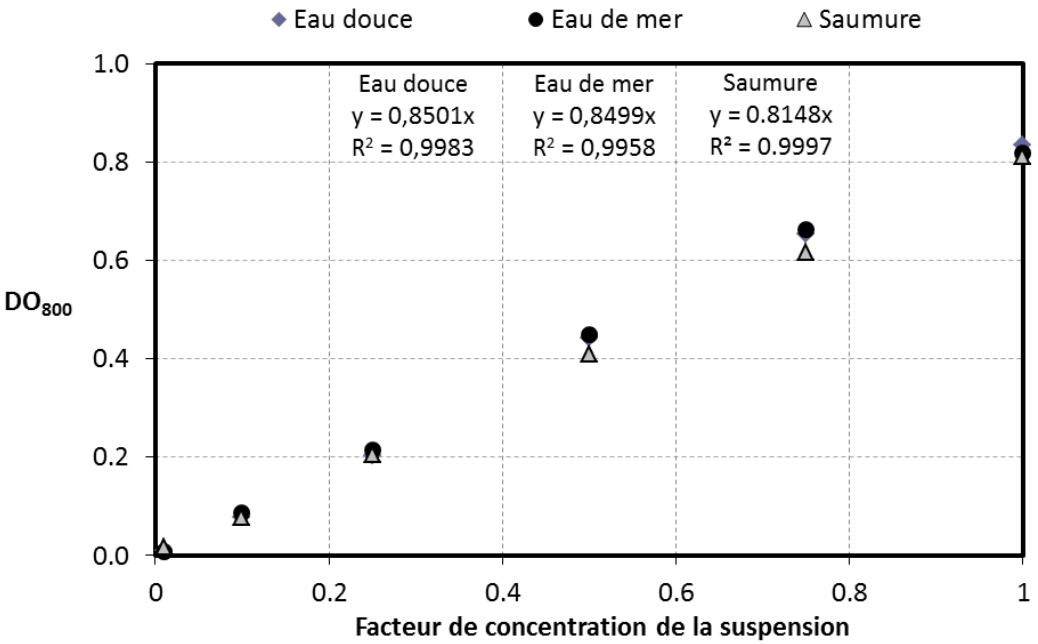


Figure 3.6 – *Densité optique à 800 nm d'une suspension de D. salina progressivement diluée avec de l'eau douce, de l'eau de mer ou une saumure de même salinité et régression linéaire pour chacune des eaux de dilution.*

Si les mesures reportées sur la figure 3.6 ne valident pas définitivement l'utilisation de la spectrophotométrie pour caractériser la concentration cellulaire, elles n'interdisent pas par contre l'utilisation de la dilution des échantillons à l'eau de douce, à l'eau de mer ou à l'aide d'une saumure de même salinité, pour se ramener si nécessaire dans la gamme de la linéarité de la loi

de Beer-Lambert. Il est en effet montré que quel que soit le type d'eau utilisé, la DO_{800} reste proportionnelle au taux de dilution.

Toutefois, des observations microscopiques ont mis en évidence la lyse de la plupart des cellules lors de dilutions importantes avec de l'eau douce. Les mesures proposées sur la figure 3.6 ayant été réalisées dans les 30 *min* suivant la dilution, il se peut que le processus de dégradation n'ait pas eu le temps d'influencer les résultats. Pour éviter tout problème, les dilutions, si nécessaires, sont effectuées avec des eaux de salinité proche de la suspension à caractériser.

3.3.3 Vérification de la répétabilité et de la reproductibilité de l'évaluation de la concentration microalgale par comptage cellulaire ou par spectrophotométrie

Pour tester la répétabilité et la reproductibilité du comptage et de la spectrophotométrie, une suspension de *Dunaliella salina* de souche Gruissan (voir section 4.1 pour plus d'explications sur les souches) dans une eau synthétique Ifremer de salinité 10% (voir section 4.2.1 pour plus d'explications sur le milieu de culture) a été utilisée.

3.3.3.1 Répétabilité de l'évaluation de la concentration microalgale

Pour la répétabilité, le même opérateur a photographié 10 zones différentes d'une même cellule de Malassez et dénombré les algues sur chaque photo par comptage ImageJ (NB : si on traite 10 fois la même photo sous ImageJ on obtient 10 fois le même comptage et donc une répétabilité parfaite, c'est pourquoi les zones ont été variées pour tester la répétabilité). Pour la spectrophotométrie l'opérateur a utilisé 10 fois la même cuve qu'il a agitée entre chaque mesure.

Le tableau 3.3 référence les valeurs obtenues. Avec le matériel utilisé, les écarts types relatifs aux moyennes traduisent que la mesure de densité optique est beaucoup plus répétable que la mesure de comptage au sens défini ici. Si l'on considère la bonne répétabilité de l'opération de comptage par macro ImageJ, on peut déduire que l'homogénéité de l'échantillon sur la cellule de Malassez est le principal facteur amputant la répétabilité de l'opération globale de comptage.

En pratique, on voit clairement des différences de concentrations algales sur la cellule de Malassez. Selon la zone où est prise la photo, la concentration obtenue diffère. Le choix des zones de comptage par l'opérateur influence donc le résultat obtenu pour un faible nombre de clichés caractérisés.

Mesure	DO_{800}	Moyenne cumulée des mesures 1 à i	Erreur relative entre la moyenne cumulée et la moyenne générale	Comptage ($\mu algues/mL$)	Moyenne cumulée des mesures 1 à i	Erreur relative entre la moyenne cumulée et la moyenne générale
1	0.834	0.834	0.13%	1235000	1235000	4.82%
2	0.830	0.832	0.11%	1170000	1202500	7.32%
3	0.833	0.832	0.07%	1430000	1278333	1.48%
4	0.835	0.833	0.01%	1210000	1261250	2.79%
5	0.834	0.833	0.04%	1450000	1299000	0.12%
6	0.829	0.833	0.05%	1250000	1290833	0.51%
7	0.837	0.833	0.03%	1310000	1293571	0.30%
8	0.833	0.833	0.03%	1400000	1306875	0.72%
9	0.834	0.833	0.04%	1340000	1310556	1.01%
10	0.830	0.833	0.00%	1180000	1297500	0.00%
Moyenne (M)	**0.833**	**-**	**-**	**1297500**	**-**	**-**
Ecart type (σ)	**0.003**	**-**	**-**	**103903**	**-**	**-**
σ/M	**0.30%**	**-**	**-**	**8.01%**	**-**	**-**

Tableau 3.3 – *Test de répétabilité des méthodes d'analyse de comptage cellulaire et de spectrophotométrie pour l'évaluation de la concentration cellulaire d'une suspension microalgale.*

Si l'on multiplie le nombre de clichés réalisés sur une même lame, le choix des zones photographiées influencera de moins en moins le résultat moyenné obtenu. On finira par obtenir une évaluation juste de la concentration microalgale caractéristique de cette lame. C'est ce que traduit l'erreur relative entre la valeur de la moyenne cumulée pour un test i et celle de la moyenne générale sur l'ensemble des essais. Même si on peut penser que le nombre total de clichés est ici légèrement insuffisant pour être assuré que la moyenne ait convergé, si l'on fixe par exemple une limite acceptable sur cette erreur relative à 2%, il faudrait a minima 5 clichés sur une lame pour évaluer correctement la concentration microalgale sur cette lame. C'est ce qui a été choisi comme nombre de clichés par lame dans cette étude, car de toute façon, il était compliqué d'en prendre un nombre plus conséquent. Pour la DO_{800}, une seule mesure suffira.

Après quelques tests complémentaires sur le comptage, il a été remarqué que lâcher brusquement la lamelle sur la lame permettait de limiter les répartitions préférentielles des microalgues et d'améliorer la répétabilité des mesures. Cette précaution a été rajoutée au protocole et intégrée pour les tests de reproductibilité.

3.3.3.2 Reproductibilité de l'évaluation de la concentration microalgale

En ce qui concerne la reproductibilité, 2 opérateurs ont préparé chacun 5 lames de Malassez à partir de la même culture, pris 5 photos de chacune des lames et estimé la concentration sur chacune de leurs lames en moyennant les comptages des 5 clichés. En procédant ainsi, on peut considérer d'après la section précédente que la concentration sur chaque lame est évaluée de manière juste (pour une limite sur l'erreur relative de 2%).

Il est constaté sur le tableau 3.4 que pour la spectrophotométrie, la reproductibilité des résultats est satisfaisante. Sur ce test, les opérateurs obtiennent les mêmes moyennes personnelles et l'écart type relatif à la moyenne se limite à 1,1%. La simplicité de la préparation d'un échantillon, simple prélèvement, explique cette bonne reproductibilité.

Le tableau 3.4 montre aussi que la dispersion sur l'évaluation de la concentration des 10 lames par comptage est importante. L'écart type relatif à la moyenne est de 13%. Les moyennes obtenues par chaque opérateur sur leurs 5 lames diffèrent aussi de manière importante. Le prélèvement et la préparation de la lame semblent donc influencer grandement la reproductibilité des résultats de comptage. Le nombre d'échantillons caractérisés n'est pas suffisant pour estimer à partir de quel nombre de mesures, le résultat obtenu sera considéré comme reproductible.

Le principal point incriminé pour justifier le manque de reproductibilité de la mesure de comptage est l'étape de mélange au lugol. En effet, lors de ces tests de reproductibilité, le mélange était réalisé dans des tubes de très faible volume qui ne permettaient donc pas un mélange optimal

Opérateur	DO800	Comptage
1	0.834	1235000
1	0.819	1170000
1	0.811	1530000
1	0.820	1110000
1	0.835	1550000
2	0.813	1350000
2	0.837	1510000
2	0.819	1280000
2	0.826	1600000
2	0.830	1550000
Moyenne globale (M)	**0.824**	**1388500**
Moyenne opérateur 1	**0.824**	**1319000**
Moyenne opérateur 2	**0.825**	**1458000**
Ecart type global (σ)	**0.0094**	**180679**
Ecart type opérateur 1	**0.0106**	**206652**
Ecart type opérateur 2	**0.0094**	**136638**
σ/M global	**1.1%**	**13.0%**

Tableau 3.4 – *Test de reproductibilité des méthodes d'analyse de comptage cellulaire et de spectrophotométrie pour l'évaluation de la concentration cellulaire d'une suspension microalgale.*

du lugol et de l'échantillon. Pour les comptages réalisés après cette étude de reproductibilité, des tubes de volume plus important ont été utilisés et un soin particulier a été porté à l'homogénéisation de la suspension fixée avant prélèvement et dépose sur la lame.

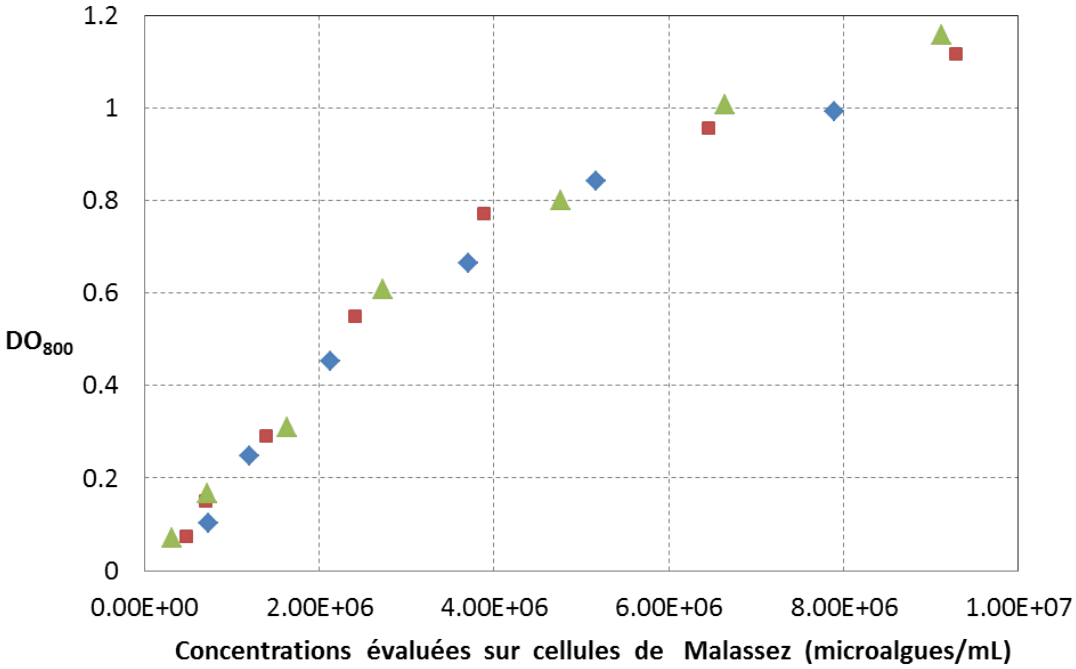
3.3.4 Relation entre la densité optique et la concentration cellulaire mesurée sur cellule de Malassez

Trouver une méthode directe d'évaluation de la concentration microalgale reproductible pour valider la mesure indirecte par spectrophotométrie n'est pas chose aisée. Dans la section 3.3.3, il est montré qu'en multipliant les clichés sur une lame, il est possible d'obtenir par comptage cellulaire, une évaluation répétable de la concentration microalgale caractéristique d'une lame. Pour obtenir une mesure reproductible de la concentration microalgale dans l'échantillon, il faut ensuite multiplier le nombre de lames préparées à partir de cet échantillon et moyenner les valeurs obtenues.

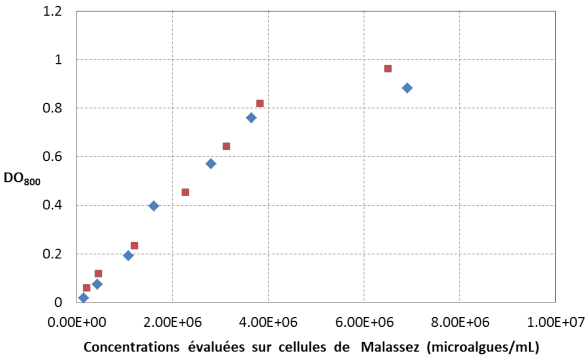
C'est ce qui a été fait dans l'expérience retranscrite sur la figure 3.7, réalisée sur 3 cultures d'une souche Gruissan à différentes salinités. Il a en plus été tenu compte des améliorations du protocole proposées dans la section 3.3.3. Chaque comptage reporté sur les graphiques est la moyenne a minima de $5 * 6$ comptages, 5 étant le nombre de comptages par lame et 6 le nombre de lames préparées. Le nombre de lames préparées n'est pas considéré comme suffisant pour obtenir une reproductibilité de la mesure à moins de 2% d'erreur relative. Le comptage étant déjà très chronophage, il ne sera pas effectué de multiplication systématique du nombre de lames par échantillon. Des lames supplémentaires seront préparées seulement pour les échantillons dont l'écart type des concentrations sur les 6 lames initiales est important. Une seule mesure de densité optique à 800 nm est réalisée pour chaque échantillon.

Sur les graphiques de la figure 3.7, la densité optique semble bien être, dans les conditions considérées, une fonction linéaire de la concentration en microalgue jusqu'à des DO_{800} de 0,8. Les très hautes salinités testées ne semblent pas perturber cette linéarité. Seule une régression linéaire est présentée pour plus de clarté, mais toutes présentent des coefficients R^2 supérieurs à 0,99. Cette expérience valide l'utilisation de la spectrophotométrie pour évaluer la concentration microalgale d'une suspension, dans une gamme de DO_{800} allant de 0 à 0,8 et pour une large gamme de salinités.

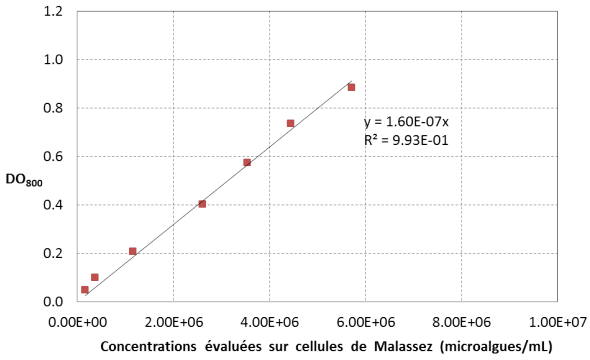
Pour des DO_{800} supérieures à 0,8, la linéarité n'est plus constatée. Pour les échantillons dont la DO_{800} franchit ce seuil, il devra donc être pratiqué une dilution à l'aide d'une saumure de salinité équivalente (procédure validée dans la section 3.3.2).



(a) Salinité totale = $150g/L$



(b) Salinité totale = $180g/L$



(c) Salinité totale = $210g/L$

Figure 3.7 – *Densité optique et concentration cellulaire dans une suspension. Les symboles différents marquent des comptages effectués à différents jours.*

3.3.5 Conclusions sur l'utilisation de la spectrophotométrie

Étant données les certitudes présentées par la méthode d'évaluation de la concentration microalgale par spectrophotométrie et sa facilité de mise en œuvre, c'est cette méthode d'analyse qui est essentiellement utilisée pour suivre les cultures et caractériser les performances de récolte. Une longueur d'onde de 800 nm est sélectionnée pour s'affranchir du problème de changement de pigmentation des algues. S'ils présentent des DO_{800} supérieures à 0,8, les échantillons sont dilués avec une saumure sans algues de salinité équivalente.

3.4 Caractérisation du ratio caroténoïdes/chlorophylles

Le ratio caroténoïdes/chlorophylles a été choisi pour caractériser l'état de carence des cultures de *Dunaliella salina*. Pour évaluer ce ratio, la méthode proposée par Lichtenthaler (1987) a été sélectionnée par l'ensemble des partenaires Salinalgue. Le protocole exact utilisé au LISBP est proposé en annexe C. Ce protocole se base sur l'extraction à l'acétone des pigments et sur l'évaluation des concentrations en caroténoïdes et chlorophylles par estimation de plusieurs densités optiques représentatives des pics d'absorption des pigments. Des formules empiriques sont proposées dans l'article de Lichtenthaler (1987), pour remonter aux concentrations de pigments extraits à partir des densités optiques.

La reproductibilité de la méthode d'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles a été testée sur une même suspension de *Dunaliella salina* de souche LOV (voir les caractéristiques de cette souche § 4.1), cultivée dans une eau prélevée directement dans les salins et de salinité 14%. Le protocole d'évaluation du ratio a été mené sur 6 prélèvements différents effectués par 2 opérateurs différents (opérateur 1 : échantillons a, b et c ; opérateur 2 : échantillons d, e et f). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.5.

La reproductibilité de l'analyse est tout à fait satisfaisante en ce qui concerne l'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles. La moyenne des ratios obtenus est de 0,33 avec un écart type de seulement 0,01. Ce n'est pas le cas en ce qui concerne l'évaluation des concentrations de chaque pigment dans la suspension. Pour ceci, une attention particulière doit être donnée au volume filtré et à celui d'acétone ajouté. Dans cette étude, étant donné que seul le ratio est utilisé, les volumes ont été prélevés approximativement et c'est pourquoi l'évaluation des concentrations de chaque pigment n'est pas reproductible.

Échantillons :	**1a**	**1b**	**1c**	**1d**	**1e**	**1f**	**Moyenne**	**Écart type**
DO à 470 nm	1.63	1.34	1.25	1.42	0.98	1.73	-	-
DO à 644,8 nm	0.55	0.48	0.43	0.50	0.34	0.61	-	-
DO à 661,6 nm	0.77	0.68	0.62	0.73	0.51	0.87	-	-
DO à 700 nm	0.02	0.01	0.04	0.02	0.03	0.06	-	-
$[Chla]$	*7.50*	*6.62*	*6.14*	*7.15*	*5.01*	*8.50*	*6.82*	*1.20*
$[Chlb]$	*7.82*	*6.75*	*6.12*	*6.97*	*4.71*	*8.59*	*6.83*	*1.35*
$[Chl]$ $(a+b)$	*15.33*	*13.38*	*12.26*	*14.11*	*9.71*	*17.09*	*13.65*	*2.54*
$[Car]$	*5.25*	*4.22*	*4.00*	*4.52*	*3.16*	*5.49*	*4.44*	*0.86*
$[Car]$ / $[Chl]$	**0.34**	**0.32**	**0.33**	**0.32**	**0.33**	**0.32**	**0.33**	**0.01**

Tableau 3.5 – *Test de reproductibilité de l'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles. Concentrations exprimées en µg/mL d'acétone.*

3.5 Évaluation de la matière sèche

Évaluer le taux de matière sèche d'une suspension microalgale hypersaline n'est pas chose aisée. Les cultures microalgales autotrophes peuvent atteindre des concentrations de matière sèche de l'ordre du gramme par litre. Or, le milieu de culture de *Dunaliella salina* présente des salinités de l'ordre de la centaine de grammes par litre. Lors de l'évaluation du taux de matière sèche, cette salinité se retrouve dans les eaux résiduelles post-filtration de l'échantillon. Si les filtres sont séchés sans précaution, les sels des eaux résiduelles précipiteront et viendront biaiser l'évaluation du taux de matière sèche lors de la pesée. Un protocole classique d'évaluation des MES-MVS-MMS (Matière En Suspension - Matière Volatile en Suspension - Matière Minérale Sèche) est a minima nécessaire pour évaluer le taux de matière sèche organique des échantillons.

3.5.1 Évaluation de la matière sèche dans les cultures de *D. salina*

Les faibles concentrations algales dans la suspension par rapport à la salinité des eaux résiduelles n'autorisent pas l'utilisation directe d'un protocole d'évaluation des MES-MVS-MMS, l'erreur sur la mesure serait trop élevée. Zhu & Lee (1997) proposent une méthode de détermination du poids sec des cultures de plusieurs microalgues marines. Pour s'affranchir du problème de la salinité résiduelle, ils préconisent de laver les échantillons préalablement filtrés avec une certaine quantité de formiate d'ammonium ou de bicarbonate d'ammonium. Une fois ce lavage effectué,

le protocole d'évaluation des MES-MVS-MMS peut alors être appliqué.

Ce protocole de lavage n'a pas été utilisé au LISBP, mais par les partenaires culture du projet Salinalgue (Ifremer Nantes et LOV). Ces derniers ont modifié la concentration du formiate d'ammonium préconisée dans la publication de Zhu & Lee (1997), pour s'adapter aux salinités supérieures rencontrées dans le cas de la culture de *D. salina*. Ils proposent des corrélations reliant DO, concentrations cellulaires et poids secs pour les 2 souches principales cultivées dans le cadre du projet Salinalgue. Les corrélations différencient l'état de carence de la culture. Elles seront utilisées dans ce manuscrit pour donner un ordre d'idée des poids secs avant récolte.

Les corrélations proposées pour la souche Gruissan sont issues de travaux réalisés au laboratoire PBA de l'Ifremer Nantes (Noémie Coulombier et Loïc Le Déan). 2 cultures dans des eaux hypersalées Ifremer ont été utilisées. Le tableau 3.6 présente les caractéristiques des cultures ayant servi à proposer les corrélations Ifremer pour la souche Gruissan.

Souche Gruissan	**Diamètres des algues**	**Ratio car/chl**
Culture non carencée	$4-6\ \mu m$	0,45
Culture carencée	$6-8\ \mu m$	1,28

Tableau 3.6 – *Caractéristiques des cultures ayant servi à proposer les corrélations Ifremer sur le poids sec, le comptage et la DO des suspensions de souche Gruissan (sources : Noémie Coulombier et Loïc Le Déan)*

Pour une souche Gruissan non carencée, on a alors si C_c est la concentration de microalgues (en cellules/mL) et MS le taux de matière sèche (en mg/L) :

$$DO_{800} = 1{,}54 \cdot 10^{-7} \cdot C_c + 1{,}80 \cdot 10^{-2} \tag{3.1}$$

$$MS\ (en\ mg/L) = 1{,}29 \cdot 10^{-7} \cdot C_c + 1{,}19 \cdot 10^{-1} \tag{3.2}$$

Pour une souche Gruissan carencée, ces corrélations deviennent :

$$DO_{800} = 1.96 \cdot 10^{-7} \cdot C_c + 2.06 \cdot 10^{-2} \tag{3.3}$$

$$MS\ (en\ mg/L) = 1{,}55 \cdot 10^{-7} \cdot C_c + 2{,}47 \cdot 10^{-2} \tag{3.4}$$

Les corrélations proposées pour la souche LOV sont issues de travaux réalisés au LOV (Hubert Bonnefond et Olivier Bernard). Le tableau 3.7 présente les caractéristiques des cultures ayant servi à proposer les corrélations LOV pour la souche du même nom.

Souche LOV	Diamètres des algues	Ratio car/chl	Concentration microalgale (cell/mL)
Culture non carencée	8,8 μm	0,52	1800000
Culture carencée	11,0 μm	13,20	796000

Tableau 3.7 – *Caractéristiques des cultures ayant servi à proposer les corrélations LOV sur le poids sec, le comptage et la DO des suspensions de souche LOV (sources : Hubert Bonnefond et Olivier Bernard)*

Pour une souche LOV non carencée, on a alors si C_c est la concentration de microalgues (en cellules/mL) et MS le taux de matière sèche (en mg/L) :

$$DO_{800} = 4{,}66 \cdot 10^{-7} \cdot C_c + 0{,}0157 \tag{3.5}$$

$$MS\ (en\ mg/L) = 1{,}72 \cdot 10^{-7} \cdot C_c + 0{,}15 \tag{3.6}$$

Pour une souche LOV carencée, ces corrélations deviennent :

$$DO_{800} = 2{,}32 \cdot 10^{-6} \cdot C_c + 0{,}0467 \tag{3.7}$$

$$MS\ (en\ mg/L) = 1{,}25 \cdot 10^{-6} \cdot C_c + 0{,}19 \tag{3.8}$$

3.5.2 Évaluation de la matière sèche dans des suspensions concentrées de *D. salina*

Dans les boues algales, les concentrations de matière sèche microalgale sont du même ordre de grandeur que la salinité des eaux résiduelles. Il est dans ce cas raisonnable d'appliquer directement un protocole classique d'évaluation des MES-MVS-MMS, la matière volatile en suspension étant assimilée à la matière sèche microalgale.

Dans ce protocole, il s'agit de filtrer un volume connu de suspension sur un filtre préalablement brûlé à 550°C et pesé. Après filtration, le filtre est mis à sécher pendant 24 h à 105°C et de nouveau pesé pour évaluer le taux de MES. Le filtre est ensuite placé pendant 2 h dans une étuve à 550°C pour calciner la matière volatile de l'échantillon. On évalue alors le taux de MVS, assimilé au taux de matière sèche, grâce à la différence de poids du filtre après et avant calcination. Le taux de MMS est la différence entre le taux de MES et celui de MVS.

Ce protocole est utilisé pour évaluer les taux de matière sèche des boues de récolte.

3.6 Caractérisation du pH dans les solutions hypersalines

3.6.1 Échelle de pH considérée

La mesure du pH n'est pas aussi simple et précise que la résolution apparente des pH-mètres le laisse entrevoir. Le pH est une mesure opérationnelle (tributaire de la méthode de mesure) qui repose sur des conventions qu'il faut respecter pour se permettre une utilisation à des fins thermodynamiques des mesures réalisées (Aminot & Kerouel, 2004).

Il existe plusieurs échelles de pH. Historiquement, la première échelle du pH se référait à la concentration effective des ions H^+. Une deuxième échelle se référant à l'activité au sens thermodynamique des ions H^+ a ensuite été proposée. Le problème est qu'aucune des 2 grandeurs précédemment citées n'est accessible à la mesure, des échelles opérationnelles ont donc été définies. La plus classiquement utilisée est l'échelle NBS (National Bureau of Standards), fondée sur des mesures de potentiels électriques.

Dans un pH-mètre classique une électrode de verre sensible aux ions H^+ est associée à une électrode de référence. Selon la relation de Nernst, la force électromotrice entre les électrodes est fonction de l'activité des ions H^+ dans la solution considérée, de la force électromotrice (f.e.m) standard du système et des potentiels de jonctions. Pour s'affranchir de la f.e.m standard dans l'échelle NBS, on calibre le pH-mètre avec des étalons préparés selon la norme NBS (ce qui est réalisé dans cette étude).

La force ionique des étalons NBS est inférieure à 0,1. Lorsque l'on mesure des échantillons de forces ioniques voisines de celles des étalons, les potentiels de jonctions se compensent et les pH obtenus sont satisfaisants au sens thermodynamique (Copin-Montegut, 1996). Si l'on s'éloigne de cette force ionique, comme dans le cas de l'eau de mer et qui plus est des solutions hypersalines, les électrodes ne permettent alors plus de remonter à l'activité exacte des ions hydrogène du fait de la non compensation des potentiels de jonctions. Il faut alors préciser que la mesure est réalisée dans l'échelle de pH NBS et toute utilisation à des fins thermodynamiques doit être faite avec grande précaution. Copin-Montegut (1996) montre que pour une eau de mer de salinité 35 à 25°C, il y a un décalage entre le pH mesuré sur l'échelle pH NBS et le pH sur l'échelle de l'activité thermodynamique caractérisé comme suit :

$$pH_{NBS} = p_{aH} - 0.076 \tag{3.9}$$

Pour s'affranchir du problème des potentiels de jonction en eau de mer, il est nécessaire d'utiliser des tampons pH dilués dans de l'eau de mer synthétique (Dickson & Goyet, 1994). Ceci n'a pas été réalisé au LISBP pour les eaux hypersalines. Une étude spécifique serait nécessaire pour valider une telle procédure pour des forces ioniques 3 à 4 fois supérieures à celles rencontrées

dans l'eau de mer.

Dans cette étude, toutes les mesures de pH proposées seront considérées sur l'échelle NBS. Il n'est donc pas fait état de « mesure de pH »mais « d'estimation du pH ». Le décalage avec le pH thermodynamique des solutions sera considéré dans l'analyse des résultats obtenus notamment dans les simulations de précipitations en milieu hypersalin (chapitre 8.2.2).

3.6.2 Matériels et méthodes de mesure du pH

Du fait des caractéristiques « agressives » des milieux caractérisés des électrodes combinées pH/température InPro 4800/120/$PT$1000 (Mettler-Toledo) sont utilisées dans cette étude. Ces électrodes sont choisies pour leur fiabilité dans les milieux oxydants, leur faible besoin de maintenance et leur durée de vie importante. Étant données les plages de travail rencontrées, ces électrodes sont calibrées régulièrement sur 2 points avec des étalons NBS 7,01 et 10,01. Une correction est apportée selon la température des étalons lors de l'étalonnage.

Les électrodes sont reliées à une centrale d'acquisition Consort $D$130. Cette centrale est pilotée par un ordinateur portable disposant du logiciel propriétaire Consort. La fréquence des relevées de pH est fonction de l'expérience. Les données de pH et de températures sont converties via Open Office au format Excel 2010.

3.7 Chromatographie ionique - Dionex

La chromatographie ionique est utilisée pour déterminer les concentrations d'ions inorganiques dans les solutions hypersalines étudiées. La séparation s'opère par échange d'ions sur une phase stationnaire, la phase mobile étant composée de l'échantillon à caractériser et d'un éluant neutre. Selon leur affinité avec la phase stationnaire, les ions sont élués plus ou moins rapidement. La détection des ions en sortie de colonne se fait par conductimétrie. Un étalonnage préalable sur des solutions connues permet de remonter par intégration aux concentrations ioniques de l'échantillon inconnu.

Les analyses Dionex réalisées se basent sur une procédure utilisée régulièrement au LISBP. Pour obtenir une évaluation simultanée des concentrations en cations et anions, 3 modules d'analyse sont couplés (LC 30 Chromatography Oven, EG 40 Eluent Generator et IC 25 Ion Chromatograph). Un passeur d'échantillons est ajouté pour automatiser les analyses. Le logiciel Chroméléon pilote le tout.

Pour éviter tout dysfonctionnement de l'appareillage, les microalgues sont préalablement retirées des échantillons par centrifugation et/ou filtration. Les solutions à caractériser sont diluées pour obtenir un maximum de concentrations ioniques dans les gammes d'étalonnage des appareils. Des étalons et des blancs sont régulièrement ajoutés entre les différents échantillons pour repérer une éventuelle dérive de l'étalonnage. Cette précaution est prise du fait des très fortes salinités présentes dans les échantillons, même dilués.

3.8 Évaluation du caractère hydrophobe des microalgues

La flottation de particules isolées dans des eaux hypersalines est fonction notamment du caractère hydrophobe des membranes externes de ces particules. Curtain & Snook (1985) ont montré que sous des conditions particulières de salinité, *Dunaliella salina* pouvait revêtir un caractère hydrophobe. Considérant ceci, il est judicieux de disposer d'une méthode rapide permettant d'évaluer le caractère hydrophobe de *Dunaliella salina* en fonction de ses conditions de culture.

Pour ce faire, la méthode MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) proposée par Rosenberg *et al.* (1980) a été adaptée et testée. Garg *et al.* (2012) avaient déjà semble-t-il adapté avec succès cette méthode à *Chlorella* et *Tetraselmis*.

Le protocole utilisé dans notre cas est répertorié dans l'annexe D. Un test de reproductibilité de l'analyse non satisfaisant a entraîné l'invalidation du protocole et de la méthode. La fragilité de la membrane de *Dunaliella salina* ne lui permet pas de résister à la mise en contact avec l'hexane. Des observations microscopiques confirment la lyse des cellules et la perte des métabolites algaux dans le milieu de culture. Ces derniers viennent troubler la solution et l'évaluation des DO en est perturbée. Un facteur hydrophobe négatif, n'ayant pas de signification physique, est régulièrement trouvé.

Il n'a pas été testé d'autre méthode de caractérisation quantitative de l'hydrophobie des microalgues. La plateforme macrophotographique, présentée dans le paragraphe suivant, a tout de même permis la mise en place d'un test qualitatif du caractère hydrophobe d'une suspension microalgale.

3.9 Macrophotographie

L'ordre de grandeur de la taille des microalgues étudiées est de 10 µm. Pour visualiser ces objets sans les contraindre entre 2 lames sous un microscope optique, une plateforme de visualisation

macrophotographique a été développée lors de ces travaux (photo 3.8). Cette plateforme se compose d'une caméra rapide Photron $SA3$ connectée à un PC et sur laquelle un module optique complexe est ajouté. Le module en question est une mise en série de 3 bagues allonges (12, 20 et 36 mm), d'un soufflet (200 mm) et d'un objectif macro 200 mm. Le fort grossissement obtenu s'accompagne d'une perte de luminosité qui est compensée par une puissante source de lumière issue d'un rétroéclairage, disposé juste derrière la cellule d'observation. Le montage fonctionne donc en ombroscopie.

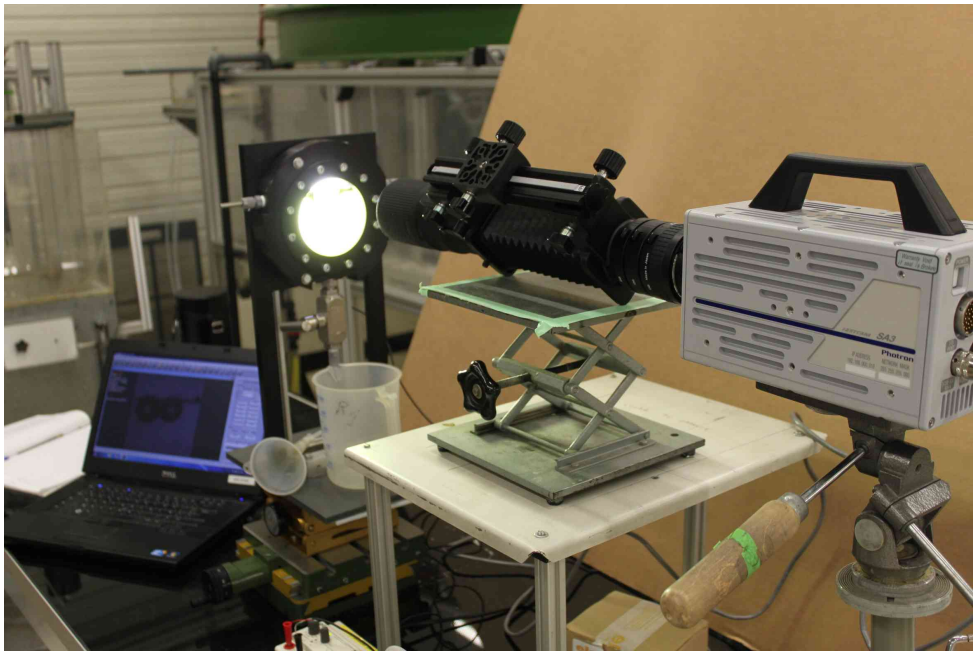
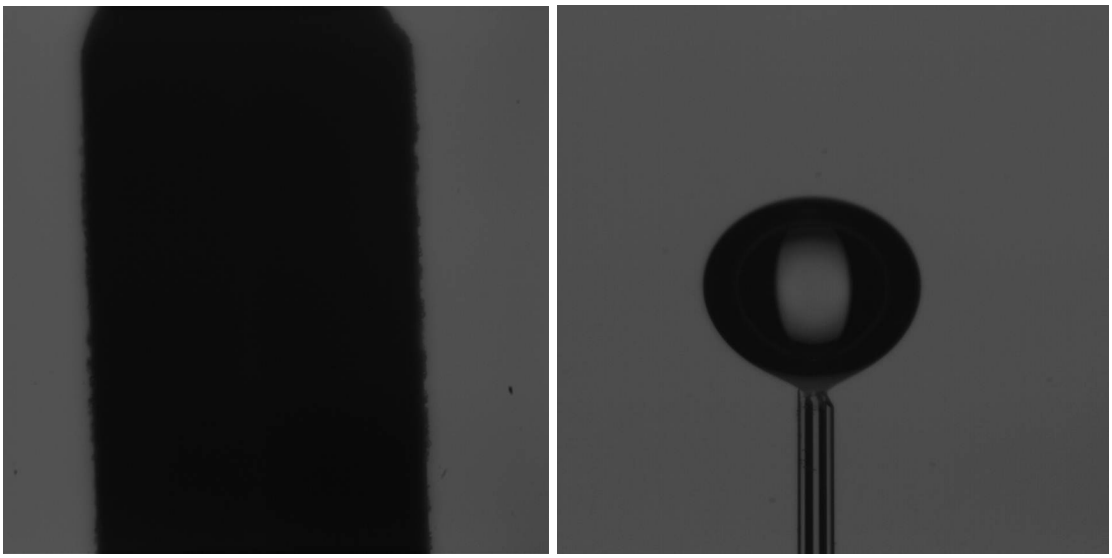


Figure 3.8 – *Plateforme de visualisation macrophotographique.*

La puissance du rétroéclairage et le réglage du temps d'exposition sont réglés en fonction de la cinétique des mécanismes à observer. Pour faciliter la mise au point, complexe aux grossissements atteints, la cellule d'observation est montée sur une table de guidage x-y-z à vis micrométrique.

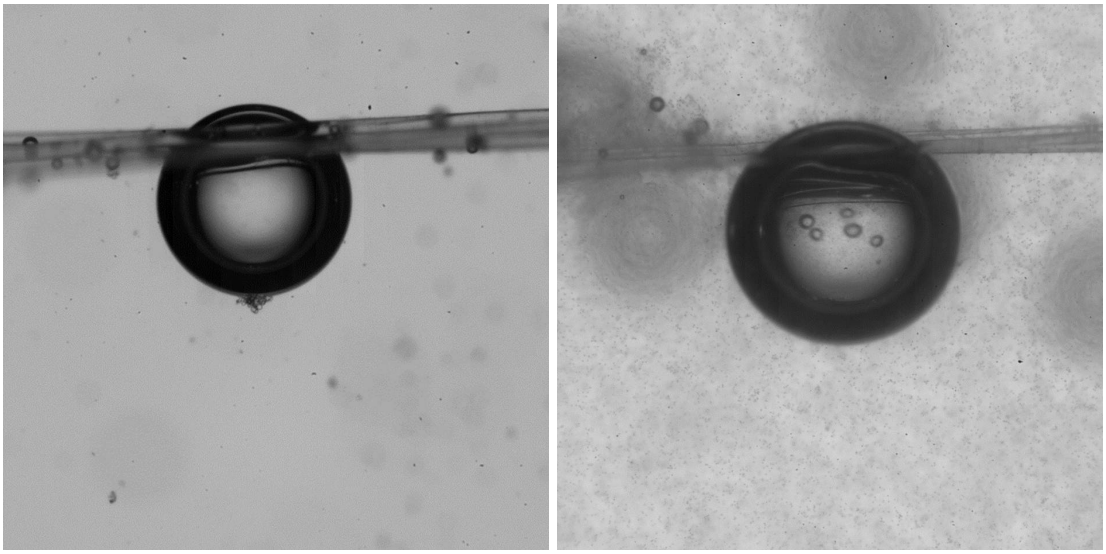
Pour une résolution de $1024*1024$, il est possible de visualiser une fenêtre d'environ $3*3$ mm, soit environ 340 pixels par mm (figure 3.9). Une cellule de *Dunaliella salina* (dimensions moyennes : 11 µm de longueur et 6 µm de largeur) apparaîtra donc sur une surface moyenne de $3*2$ pixels.

Un système de capture de microbulles, mis en place dans la thèse de Z.Huang, peut être ajouté dans la cellule de visualisation pour permettre l'observation des interactions bulle/particules (photos 3.10). Ce système se compose de 4 fils croisés reliés à des vis de réglage de leur tension. La suspension algale peut être mise en mouvement autour d'une bulle fixée, afin de simuler le phénomène de flottation et visualiser l'efficacité de capture des microalgues. L'observation d'une bulle fixée dans une suspension microalgale peut aussi permettre d'évaluer qualitativement le caractère hydrophobe des algues. En effet, si ces dernières sont hydrophobes, elles auront tendance à s'accumuler à l'interface bulle/suspension.



(a) Mire de 2 *mm* de largeur (b) Génération capillaire de bulle

Figure 3.9 – *Exemples de clichés macrophotographiques obtenus sur la plateforme mise en place au LISBP.*



(a) Capture de billes de verre de diamètre maximal 40 µm (b) Bulle d'air dans une suspension de *D. salina* souche Gruissan à une salinité de 10%

Figure 3.10 – *Visualisation macrophotographique de la capture de particules sur une bulle fixée.*

3.10 Conservation des échantillons avant analyse

Qu'il s'agisse des expériences en laboratoire ou plus encore des expériences sur le site de Gruissan (laboratoire à 500 m de la zone de manipulation), il s'avère souvent nécessaire de stocker certains échantillons pour regrouper les mesures, dans l'optique d'optimiser le temps de manipulation. Devant ce constat, une étude de conservation des propriétés des échantillons a été réalisée afin de préciser les protocoles de manipulation. Cette étude a porté sur le pH, la salinité, la DO_{680}, la DO_{800} et le comptage. 3 types de conservation ont été testés, la conservation sans précaution au soleil, la conservation dans l'obscurité et la conservation à l'obscurité dans une glacière à environ 10°C. Les tests ont été dupliqués puis moyennés étant donnée la bonne reproductibilité des résultats. Des observations microscopiques complètent ce protocole de caractérisation pour appuyer les résultats quantitatifs.

La figure 3.11 regroupe les résultats obtenus sur les 3 critères les plus importants, car servant à caractériser dans cette étude les efficacités de récolte. Les observations microscopiques montrent que lors de la conservation au soleil, une très grande partie des algues meurt durant la conservation. Ceci peut s'expliquer par une augmentation brusque de l'irradiance entraînée par la réduction de la profondeur optique lors de l'échantillonage (la température de l'échantillon qui a aussi été vérifiée n'a pas dépassé 30°C durant cette expérience). Dans l'obscurité, les observations montrent une baisse de la mobilité des cellules mais une moindre mortalité. La conservation en glacière améliore encore la conservation.

L'analyse des observations microscopiques et des résultats quantitatifs a permis d'affiner les protocoles de manipulation, en précisant que les échantillons doivent être conservés sur une durée maximale de 2 h avant caractérisation. Il est ajouté que cette conservation doit se faire à l'obscurité, dans une glacière réfrigérée.

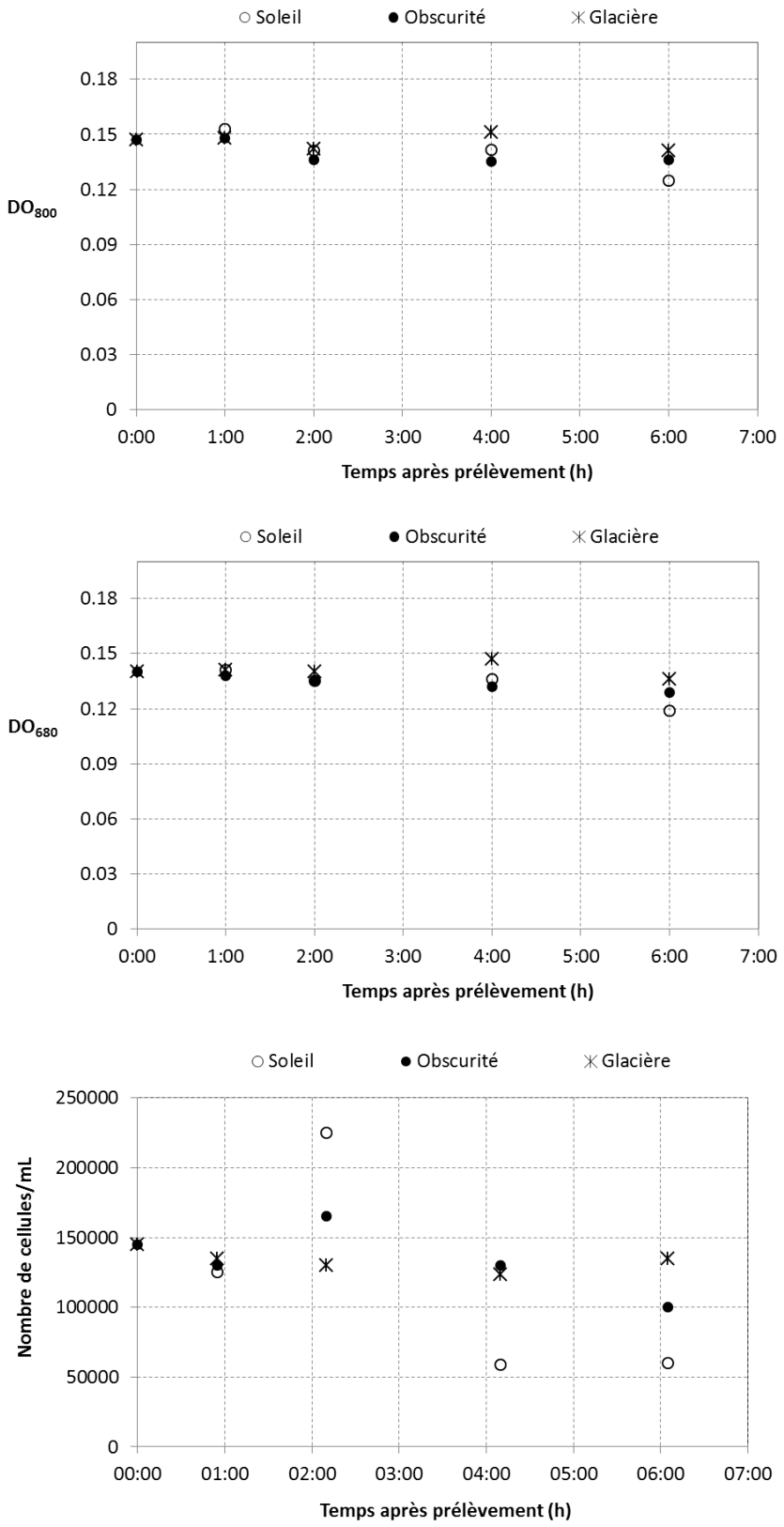


Figure 3.11 – *Vérification de la conservation des propriétés des échantillons en fonction du temps de stockage avant caractérisation.*

Chapitre 4

Culture de *Dunaliella salina*

Pour étudier la récolte de microalgues, il est avant toute chose essentiel de maîtriser la production de suspension algale, matière première nécessaire à tout travail expérimental dans le domaine. Les performances de récolte sont souvent corrélées dans la littérature aux conditions de culture des microalgues. Le parti pris de cette étude a donc été de contrôler dans un premier temps un maximum de paramètres de culture pour interpréter le plus correctement possible les résultats de récolte obtenus et les mécanismes mis en jeu. Progressivement, le nombre de paramètres contrôlés a été réduit pour arriver jusqu'aux conditions de culture extérieure rencontrées sur le site de démonstration de Gruissan.

L'ensemble des conditions de culture rencontrées sur cette étude est détaillé dans ce chapitre. Cet inventaire vient renseigner les explications synthétiques (type d'eau, salinité, souche, ...) qui seront données dans les chapitres suivants lors de la présentation et de l'interprétation des résultats de récoltes.

Les souches utilisées dans le cadre du projet Salinalgue sont d'abord introduites (section 4.1). Les milieux, synthétiques ou réels, dans lesquels ces souches ont été cultivées sont ensuite détaillés (section 4.2). Le milieu nutritif de Conway utilisé est aussi présenté (section 4.3). Le LISBP ne disposant pas de savoir-faire en culture de microalgues, une plateforme de culture en laboratoire a été développée. Une présentation de cette plateforme est proposée en section 4.4. La procédure de suivi des cultures sur cette plateforme est ensuite succinctement présentée (section 4.5). La production de biomasse ayant pour objectif d'être couplée à une phase de maturation permettant l'accumulation des métabolites valorisables, une présentation de la phase de maturation mise en œuvre sur certaines expériences est aussi proposée (section 4.6). Pour finir, les conditions de cultures extérieures rencontrées sur le site de démonstration pré-industriel de Gruissan sont exposées (section 4.7).

Sommaire

4.1 Souches de *Dunaliella salina* **111**
4.2 Milieux de culture **111**
4.2.1 Eau synthétique hypersalée IFREMER 112
4.2.2 Eaux synthétiques hypersalées LBE 112
4.2.3 Eaux réelles Gruissan 113
4.2.4 Saumures synthétiques 117
4.3 Milieu nutritif de Conway **117**
4.4 Mise en place de la plateforme de culture en laboratoire **117**
4.4.1 Photobioréacteurs 119
4.4.2 Apport de lumière 119
4.4.3 Limitation du pH 120
4.4.4 Agitation 123
4.5 Procédure de suivi des cultures en laboratoire **123**
4.6 Maturation des cultures **125**
4.6.1 Protocole de mise en carence d'azote 125
4.6.2 Suivis de cultures carencées 125
4.7 Culture extérieure de *D. salina* sur le site de Gruissan **129**
4.7.1 Le site de Gruissan 129
4.7.2 Les installations 129
4.7.3 Le protocole de culture semi-industriel 129

4.1 Souches de *Dunaliella salina*

Les souches de microalgues étudiées dans ce projet ont été isolées et sélectionnées par les partenaires culture du projet Salinalgue. Un des objectifs initiaux du projet était de cultiver une souche endémique des marais dans lesquels le site de démonstration s'est implanté.

La première souche est un consortium de plusieurs clones isolés dans les marais de l'île Saint-Martin de Gruissan (Aude, France). Elle a été mise en culture et étudiée à l'Ifremer Nantes, qui a ensuite fourni cette souche au LISBP. Dans ce manuscrit, elle apparaît sous le nom « souche Gruissan ». La faible caroténogénèse constatée sur cette souche a mené en cours de projet à l'utilisation d'une seconde souche disponible au laboratoire d'océanographie de Villefranche-sur-mer (LOV). Cette souche, qui est référencée sous l'appellation $BIOCORE-0101$, est à l'origine la souche de banque $CCAP19/18$. Dans ce manuscrit, cette souche $CCAP19/18_BIOCORE0101$ apparaît sous le nom « souche LOV ».

Récemment, pour revenir sur l'objectif d'utilisation d'une souche locale, un nouvel isolement a été réalisé sur des eaux des marais de l'île Saint-Martin de Gruissan. Une souche a été sélectionnée, notamment pour ses capacités de caroténogénèse. Elle est aujourd'hui référencée dans la « Mediteranean Culture Collection of Villefranche » sous l'appellation $MCCV - 020$. Les études en cours sur cette souche, aussi baptisée « souche $B3$ », sont introduites dans les perspectives générales des travaux présentés dans ce manuscrit.

Pour chaque souche, des inocula axéniques d'environ 100 mL ont été fournis au LISBP par les partenaires culture du projet Salinalgue pour entamer les cycles de cultures. Au cours du projet, selon les besoins, d'autres envois ont été réalisés pour repartir de cultures axéniques après contamination trop importante.

4.2 Milieux de culture

Divers milieux de culture ont été utilisés. La composition de ces milieux a évolué en fonction des conseils des autres partenaires, de l'avancée des travaux de recherches et de la caractérisation des eaux des salins utilisées pour les cultures sur le site de démonstration semi-industriel. Quel que soit le milieu de culture utilisé, il est complété avant inoculation par ajout d'un milieu nutritif. Dans le cadre du projet Salinalgue, l'ensemble des partenaires utilise le milieu de Conway (voir section 4.3).

Les principales concentrations ioniques des divers milieux utilisés sont proposées, après quelques explications sur la préparation de ces milieux, dans les tableaux 4.2 et 4.3. Il faut noter que pour

les eaux et saumures synthétiques, les sels sont dissous dans de l'eau du robinet qui contient certains oligoéléments nécessaires à la culture, absents bien entendu dans l'eau déminéralisée habituellement utilisée. Avant inoculation, les milieux synthétiques sont conservés et agités pendant au moins 48 h pour s'assurer de la dégradation du chlore résiduel de l'eau du réseau, ainsi que de la bonne dissolution des sels ajoutés.

4.2.1 Eau synthétique hypersalée IFREMER

Ce milieu de culture se base sur la formulation d'une eau de mer synthétique proposée par l'IFREMER Nantes. Pour être représentatif des salinités rencontrées dans le cas de la culture de *D. salina*, il est ajouté uniquement du NaCl. Cette préparation est celle mise en œuvre chez les partenaires culture du projet Salinalgue. Le problème est qu'en procédant ainsi, le milieu de culture obtenu n'est pas représentatif des concentrations ioniques rencontrées dans les salins.

Étant donnée l'importance de ces équilibres dans le procédé de récolte étudié, cette formulation de milieu de culture sera abandonnée au LISBP, après la première analyse d'expériences d'autofloculation. Les études retranscrites dans les chapitres 5.2, 6.1 et 7 ont tout de même été réalisées avec ce milieu de culture. Les principales concentrations ioniques rencontrées dans cette eau sont donc regroupées dans le tableau 4.2.

4.2.2 Eaux synthétiques hypersalées LBE

La première eau synthétique représentative d'une eau de salin a été formulée au LISBP à partir de mesures Dionex réalisées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de Narbonne. L'évaluation des concentrations des principaux sels a été faite sur un assemblage de saumure et d'eau de mer particulièrement peu concentré en calcium. Une étude sur l'influence de cette concentration en calcium sur les performances de récolte a poussé à formuler en plus de l'« eau synthétique LBE », une « eau synthétique LBE `Ca+` » et une « eau synthétique LBE `Ca++` », dopées en calcium. Cette étude sur ces eaux est retranscrite dans le chapitre 8.5. Les principales concentrations ioniques rencontrées dans ces eaux sont regroupées dans le tableau 4.2.

4.2.3 Eaux réelles Gruissan

Dans les salins, l'eau de mer suit un parcours d'environ 40 *km* durant lequel elle va progressivement s'évaporer. Au cours du trajet, certains sels vont précipiter, les concentrations ioniques n'augmentent donc pas toutes de manière linéaire avec le facteur de concentration. Une table de données, fournie par la Someval, permet de suivre l'évolution des concentrations ioniques (et des sels correspondants), en fonction de la masse volumique de saumures issues de l'évaporation naturelle d'une eau de mer Méditerranée. Cette table étant confidentielle, elle sera fournie en annexe, uniquement aux partenaires du projet Salinalgue. Pour permettre certaines études retranscrites dans ce manuscrit, une table équivalente, issue des travaux de Baseggio (1974), est utilisée. Cette table est retranscrite dans le tableau 4.1.

Il est possible de prélever une eau en un point du circuit des salins et d'utiliser directement cette eau de composition connue pour cultiver les microalgues. Dans ce manuscrit les eaux ainsi utilisées seront baptisées « eau circuit S% », S étant la salinité de la solution évaluée au réfractomètre.

Il est aussi possible de prélever à différents endroits dans les salins, des eaux de salinités différentes, et de les assembler pour formuler un milieu de culture naturel aux concentrations ioniques particulières. Les milieux préparés ainsi seront baptisés dans ce manuscrit « Assemblage S1/S2 », S1 et S2 étant les salinités évaluées au réfractomètre des eaux assemblées.

Cette technique de préparation des eaux par assemblage est privilégiée à l'échelle des raceways pour sa souplesse de mise en œuvre. En effet, elle permet de préparer des solutions à salinité souhaitée, sans multiplier les points de prélèvement, en modifiant seulement la part de chaque eau dans l'assemblage. Dans des salins de grande superficie, il n'est pas évident de multiplier les points de prélèvement et ceci est quoi qu'il en soit coûteux.

Pour l'assemblage « 4%/Saumure Mg » réalisé sur le site de Gruissan, la salinité de la deuxième eau utilisée, hors gamme de validité des réfractomètres, n'a pas été déterminée. La saumure étant prélevée après précipitation du NaCl sur les tables salantes, elle contient des quantités de magnésium importantes, d'où sa dénomination. Une évaluation Dionex des concentrations ioniques dans ce type d'assemblage, porté à une salinité totale de 15,4%, est proposée dans le tableau 4.3.

Les principales concentrations ioniques, évaluées par mesures Dionex, de plusieurs eaux dites « réelles » utilisées dans cette étude, sont aussi regroupées dans le tableau 4.3. Lors des manipulations en laboratoire avec des eaux réelles, elles sont préalablement autoclavées pour limiter les contaminations des cultures avant récolte.

Masse volumique	Salinité totale	Eau	Cl^-	SO_4^{2-}	Br^-	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	K^+	$CaSO_4$	$MgSO_4$	$MgCl_2$	KCl	NaBr	NaCl
$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$							$g.L^{-1}$					
1020,00	28,55	991,46	15,82	2,21	0,05	8,75	1,06	0,34	0,32	1,16	1,74	2,77	0,61	0,07	22,20
1030,00	42,40	987,60	23,49	3,28	0,08	13,01	1,57	0,50	0,47	1,71	2,60	4,08	0,90	0,10	33,01
1040,00	56,40	983,60	31,24	4,37	0,11	17,31	2,08	0,67	0,63	2,27	3,47	5,40	1,19	0,14	43,91
1050,00	70,56	979,45	39,08	5,47	0,13	21,66	2,60	0,83	0,78	2,82	4,37	6,72	1,49	0,17	54,98
1060,00	84,91	975,09	47,01	6,59	0,16	26,09	3,12	0,99	0,94	3,38	5,28	8,05	1,80	0,21	66,19
1070,00	99,41	970,59	55,03	7,73	0,19	30,55	3,65	1,16	1,10	3,93	6,21	9,37	2,10	0,24	77,53
1080,00	114,11	965,89	63,15	8,89	0,22	35,08	4,19	1,32	1,27	4,50	7,16	10,71	2,41	0,28	89,02
1090,00	128,56	961,44	71,14	10,03	0,24	39,50	4,74	1,49	1,42	5,05	8,11	12,12	2,72	0,31	100,23
1100,00	144,00	956,00	80,20	10,65	0,28	44,56	5,33	1,38	1,61	4,70	9,20	13,60	3,06	0,35	113,08
1110,00	159,52	950,48	89,29	11,29	0,31	49,64	5,93	1,28	1,79	4,36	10,29	15,07	3,41	0,39	125,96
1120,00	175,05	944,96	98,39	11,92	0,34	54,71	6,53	1,19	1,97	4,04	11,36	16,58	3,77	0,44	138,85
1130,00	190,64	939,36	107,50	12,57	0,37	59,81	7,13	1,10	2,15	3,75	12,43	18,05	4,11	0,47	151,78
1140,00	206,33	933,67	116,70	13,21	0,40	64,92	7,74	1,02	2,34	3,54	13,51	19,64	4,46	0,52	164,76
1150,00	222,06	927,94	125,90	13,88	0,43	70,04	8,36	0,93	2,52	3,17	14,58	21,19	4,81	0,56	179,09
1160,00	237,79	922,21	135,10	14,55	0,46	75,14	8,98	0,85	2,71	2,90	15,59	22,74	5,16	0,60	190,72
1170,00	253,68	916,32	144,50	15,22	0,50	80,20	9,60	0,78	2,89	2,63	18,74	24,35	5,52	0,64	203,53
1180,00	269,90	910,11	153,90	15,91	0,53	85,55	10,23	0,70	3,08	2,37	17,83	25,94	5,88	0,68	217,11
1190,00	285,54	904,46	163,10	16,59	0,56	90,54	10,86	0,62	3,27	2,23	18,81	27,64	6,23	0,72	230,02
1200,00	302,05	897,95	172,60	17,29	0,59	96,07	11,50	0,55	3,46	1,86	20,03	29,18	6,59	0,76	243,81

Tableau 4.1 – *Compositions ioniques et salines de saumures issues de l'évaporation naturelle d'une eau de mer des caraïbes (à 22,2°C). Données extraites des extrapolations proposées dans l'étude expérimentale de Baseggio (1974).*

	Eau synthétique hypersalée IFREMER	**Eau synthétique LBE**	**Eau synthétique LBE** `Ca+`	**Eau synthétique LBE** `Ca++`	**Saumure synthétique** 10%	**Saumure synthétique** 17,7%	**Saumure synthétique** 22,6%
Na^+	42.12	34.54	34.54	34.54	32.61	60.42	79.07
Cl^-	67.08	66.09	66.25	66.50	59.46	110.15	144.05
SO_4^{2-}	1.87	8.04	8.04	8.04	8.02	12.96	15.11
Mg^{2+}	0.95	5.77	5.77	5.77	4.09	7.57	9.90
Ca^{2+}	0.39	0.16	0.25	0.39	1.20	1.42	1.06
K^+	0.04	1.81	1.81	1.81	1.12	2.08	2.72
Bore total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Br^-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.35	0.46
Sels totaux	**112.45**	**116.40**	**116.65**	**117.04**	**106.70**	**194.95**	**252.37**
Salinité réfractomètre	**10.5%**	**10.9%**	**10.9%**	**11.0%**	**10.0%**	**17.7%**	**22.6%**

Tableau 4.2 – *Concentrations ioniques (en $g.L^{-1}$) des ions principaux dissous dans les milieux synthétiques préparés au LISBP. Données évaluées à partir des quantités de sels ajoutées dans de l'eau du robinet lors de la préparation des milieux.*

	Assemblage 4/saumure Mg	**Assemblage 3.6/16**	**Assemblage 3.6/26**	**Circuit 12%**	**Circuit 6.4%**	**Circuit 16%**
Na^+	16.48	41.62	43.53	41.26	21.42	57.51
Cl^-	74.07	76.36	78.59	75.22	39.49	104.09
SO_4^{2-}	27.43	8.89	7.84	9.75	4.78	12.21
Mg^{2+}	18.72	5.16	5.31	5.18	2.86	7.06
Ca^{2+}	1.23	1.35	0.68	1.68	0.87	1.73
K^+	5.52	1.44	1.46	1.46	0.82	1.98
Bore total	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03
Br^-	0.27	0.26	0.26	0.26	0.13	0.34
Sels totaux	**143.75**	**135.08**	**137.68**	**134.82**	**70.38**	**184.95**
Salinité réfractomètre	**15.4%**	**12.0%**	**12.0%**	**12.0%**	**6.4%**	**16.0%**

Tableau 4.3 – *Concentrations ioniques (en $g.L^{-1}$) des ions principaux dissous dans les eaux réelles utilisées ou préparées au LISBP. Données issues d'évaluation Dionex sur des échantillons à $20°C$.*

4.2.4 Saumures synthétiques

Il n'a pas toujours été possible de prélever des eaux réelles dans les salins de l'île Saint-Martin. Pour les besoins de certaines études, des saumures synthétiques ont donc été formulées au LISBP. Les compositions de ces eaux ont été déterminées à partir des mesures Dionex sur les eaux réelles du circuit des salins et des données fournies dans la table Someval. Ces eaux sont baptisées dans cette étude « Saumure synthétique $S\%$ »(voir tableau 4.2), S étant la salinité caractérisée au réfractomètre.

« La Saumure synthétique 10% » a remplacé les eaux synthétiques initialement utilisées (Ifremer et LBE) en tant que milieu de culture de référence. Une cuve agitée de 100 L de milieu de culture a été mise en place pour faciliter la préparation et la conservation du milieu de culture de référence au LISBP.

4.3 Milieu nutritif de Conway

Divers milieux nutritifs sont utilisés dans la littérature pour cultiver *D. salina*. Dans le projet Salinalgue, le milieu dit de « Conway » a été choisi par le consortium des partenaires. Sa formulation est proposée en annexe E. Dans ce milieu, l'azote est apportée sous forme de nitrates et le phosphore sous forme de phosphates.

La solution silicatée, réservée aux diatomées, n'est pas ajoutée pour *D. salina*. On parle de « Conway complet », si la solution principale et la solution vitaminique sont ajoutées dans les proportions annoncées en annexe E.

Dans cette étude sur la récolte, un milieu de Comway complet est utilisé, excepté lors de la mise en carence des cultures (voir section 4.6.1). Dans ce cas, on parle de « Conway N/x », x étant le facteur de division de la concentration en azote dans le milieu.

4.4 Mise en place de la plateforme de culture en laboratoire

En plus des milieux de culture et nutritif, les cultures microalgales nécessitent un contenant, de la lumière et de l'agitation. Une plateforme de culture, intégrant ces éléments, a été développée en début d'étude. Un schéma simplifié et une photo de cette plateforme sont proposés figure 4.1 et 4.2.

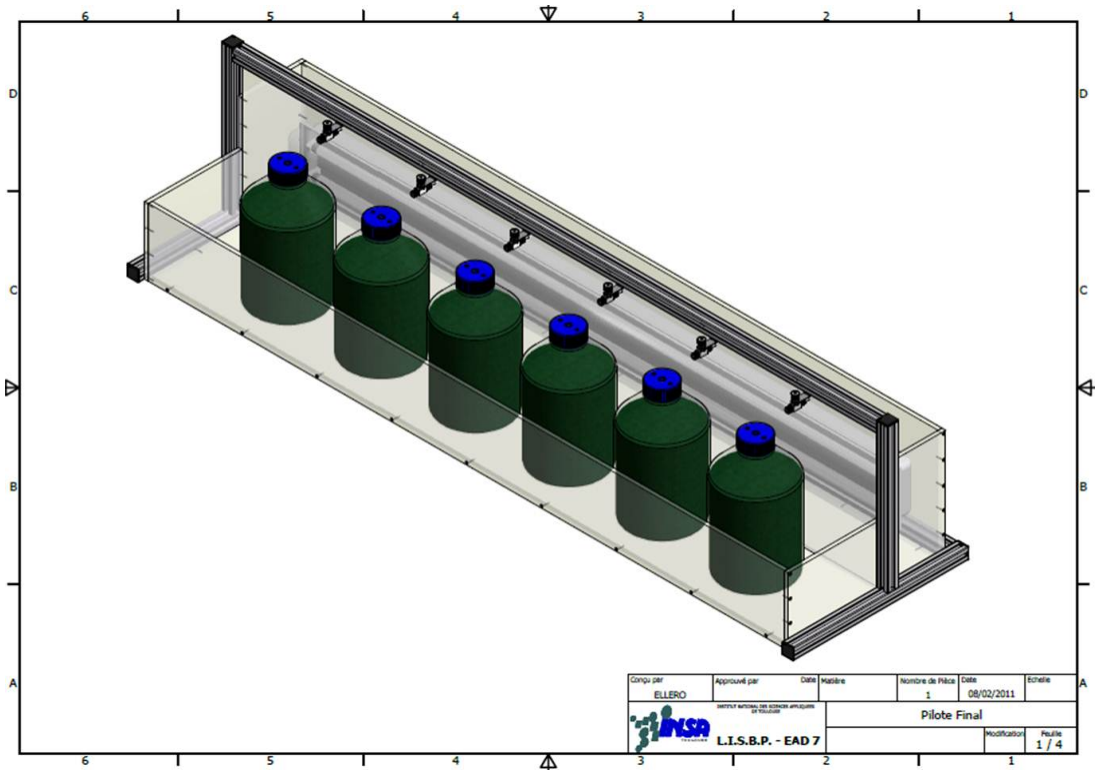


Figure 4.1 – *Schéma de la plateforme de culture composée de* 6 *photobioréacteurs (PBR) de* 5 *L agités par bullage à l'air.*

4.4.1 Photobioréacteurs

La plateforme se compose de 6 emplacements dans lesquels peuvent se loger des PBR de 1 à 10 L. Les PBR utilisés sont de simples flacons de laboratoire en verre Schott Duran™. Les plus classiques ont un volume de 2,5 ou 5 L et une profondeur optique face à la source de lumière de 10 ou 20 cm.

Les cultures réalisées au LISBP ne sont pas axéniques. Des trous sont pratiqués dans le bouchon supérieur de chaque PBR pour laisser passer, sondes, cannes de bullage, canne de CO_2 et canne de prélèvement. La culture est donc en contact avec l'environnement extérieur mais ce contact est limité. Il faut noter qu'aucune autre culture d'espèces différentes de microalgues ou d'autres microorganismes n'est pratiquée dans le bâtiment ce qui limite fortement les contaminations éventuelles.

4.4.2 Apport de lumière

L'apport de lumière est assuré par 2 tubes fluorescents « Daylight OSRAM FQ 965 Biolux » fixés sur une rampe. Ces tubes se caractérisent par un Indice de Rendu de Couleur supérieur à 98% et une température de couleur de $6500K$. Cette qualité est essentielle au bon développement de la biomasse. Les tubes doivent fournir un spectre de lumière proche de celui de la lumière solaire. Ceux de la classe « Daylight »sont connus pour être efficaces sur les cultures microalgales.

Selon la concentration des cultures, il est possible d'ajouter 2 autres tubes fluorescents identiques pour encadrer les cultures de sources de lumière (photo 4.2). Ceci permet de repousser la limitation de croissance due à l'apport de lumière.

Un programmateur permet de simuler grossièrement (on/off, pas de variation progressive) un cycle jour/nuit. Bien qu'une illumination constante soit envisageable, il est considéré que l'alternance lumineuse a une influence sur le métabolisme des algues et donc potentiellement sur leur récolte. Sur cette plateforme de culture, l'objectif est de se rapprocher des conditions de culture rencontrées en extérieur sur le site Gruissan. Des cycles « jour-14h/nuit-10h » et « jour-16h/nuit-8h » ont été programmés. Ces cycles correspondent à ce qui est rencontré aux latitudes de Gruissan en période estivale de forte production microalgale.

Figure 4.2 – *Photo de la plateforme de culture, avec la double rampe d'éclairage mais sans les dispositifs de limitation du pH.*

4.4.3 Limitation du pH

Le pH d'une suspension de *D. salina* soumise à un éclairage jour/nuit varie de manière permanente. Les suivis pH de 4 cultures d'une souche Gruissan dans des eaux hypersalées IFREMER sont proposés figure 4.3. En journée, lorsque l'activité photosynthétique prédomine sur la respiration, le pH augmente du fait de la fixation du carbone inorganique dissous. La nuit, la photosynthèse s'interrompt mais la respiration est maintenue. Le dioxyde de carbone relargué induit une diminution du pH. L'amplitude des variations journalières atteint dans cet exemple 1 à 1,5 unité pH. Sur plusieurs jours les amplitudes de variation du pH peuvent atteindre 2 unités.

Pour maximiser la productivité des cultures, il est nécessaire de maintenir les cultures autour d'un pH optimal. Au LISBP, l'objectif n'est pas de maximiser cette productivité. Ceci étant, pour se rapprocher des conditions de culture sur le site de Gruissan, la possibilité de limiter le pH a été ajoutée sur la plateforme.

Dans certaines études proposées dans ce manuscrit, le pH est automatiquement limité par un contrôleur JBL pourvu d'une électrovanne qui permet ou non l'injection de CO_2 industriel gazeux. Ce contrôleur est relié à une sonde pH/température InPro™ 4800/120/$PT$1000 (Mettler-Toledo) calibrée dans la gamme de travail avec des étalons 7,01 et 10,01. Lorsque la valeur de

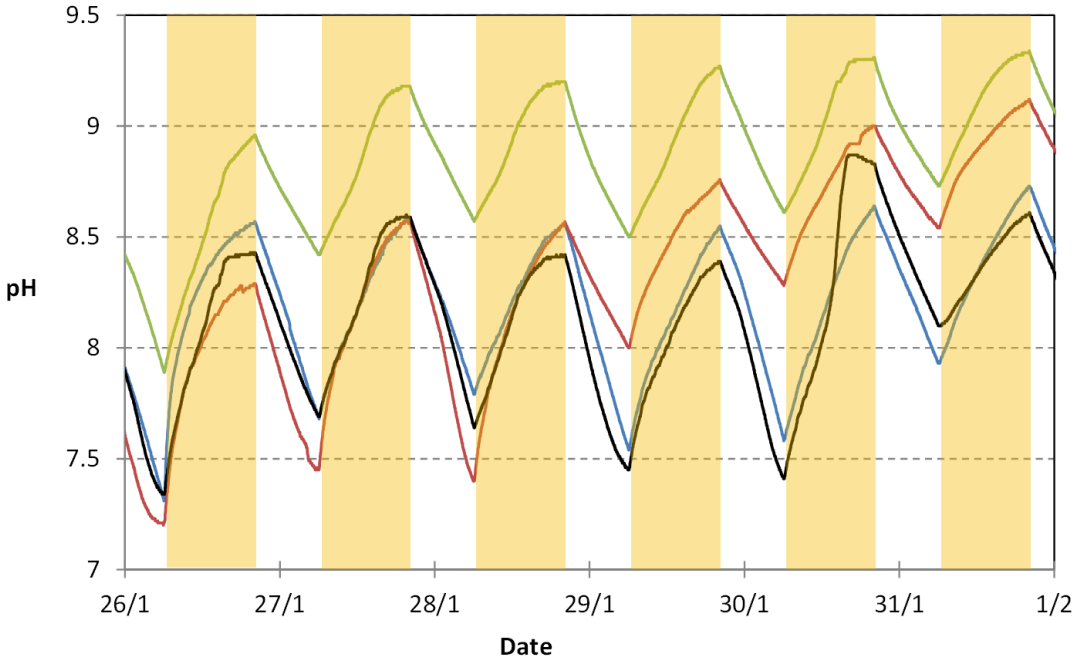
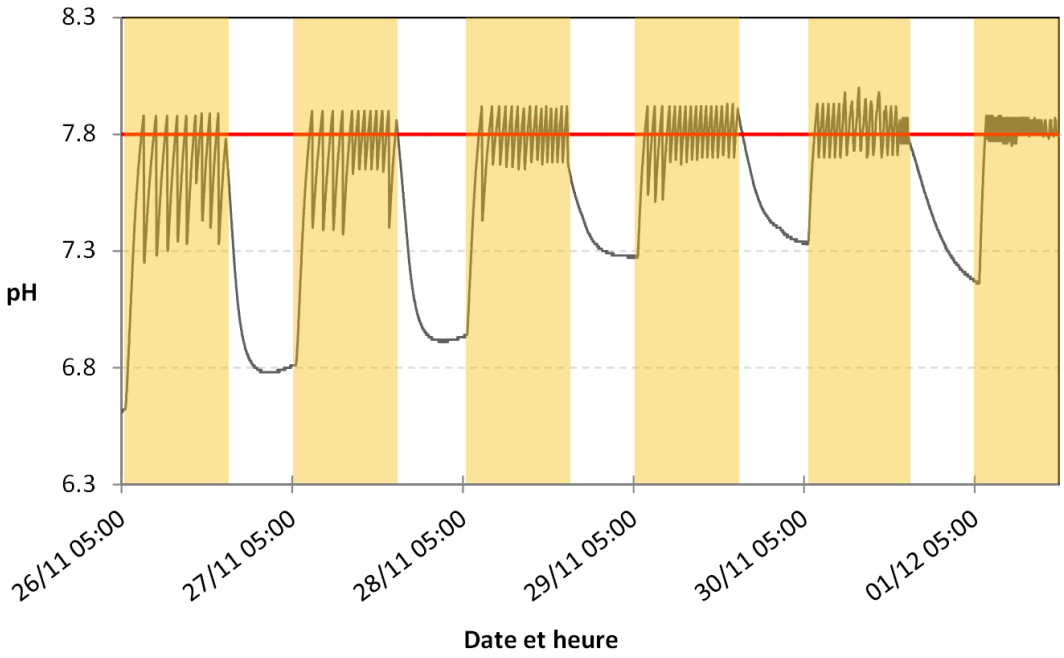


Figure 4.3 – *Suivis pH de* 4 *cultures d'une souche Gruissan dans des eaux hypersalées IFREMER. Les zones jaunes (ou grisées) correspondent aux périodes d'éclairage.*

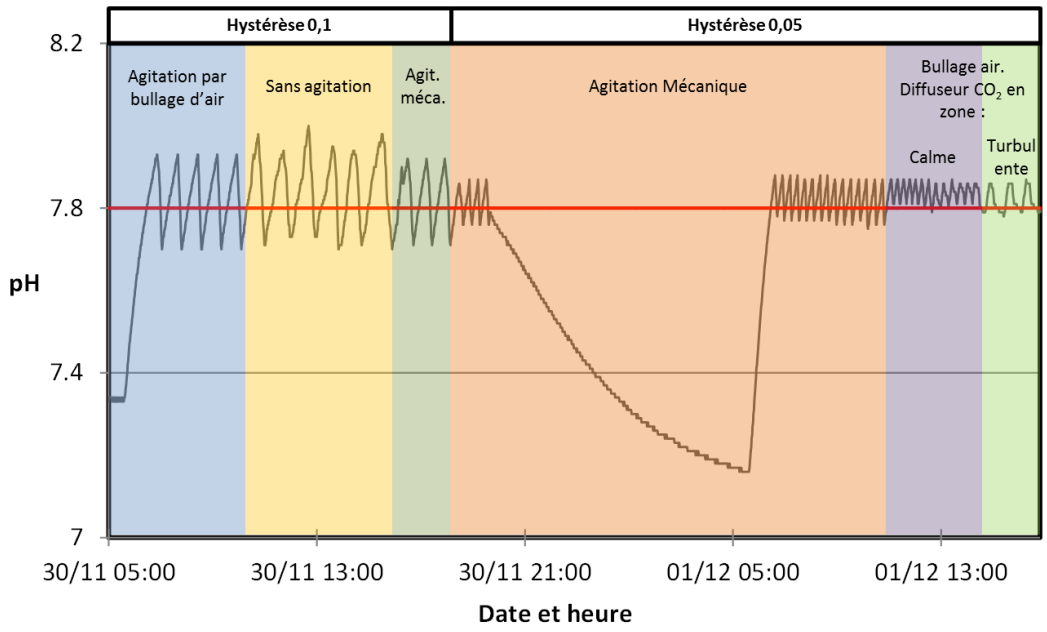
pH relevée par cette sonde dépasse le pH limite programmé, l'électrovanne s'ouvre pour laisser buller le CO_2 industriel dans la culture et abaisser le pH de cette dernière. On parle ici de limitation du pH et non de régulation. En effet, durant la phase respiratoire nocturne, malgré le dispositif utilisé le pH peut descendre bien en-deçà de la valeur programmée (figure 4.4). De plus, l'hystérèse du dispositif ne permet pas de régulation fine.

Sur la figure 4.4 on observe la phase de réglage et d'optimisation de la procédure de limitation du pH. Dans un premier temps, l'hystérèse de l'appareil JBL est réglée à 0,1. Quelles que soient les conditions opératoires, l'amplitude des variations autour du pH cible est jugée trop importante. Lorsque l'hystérèse de l'appareil JBL est affinée à 0,05, on constate que l'agitation par bullage d'air semble rendre de meilleurs résultats sur la limitation du pH. Le fait de disposer le diffuseur de CO_2 dans une zone agitée, en l'occurrence dans la zone proche du point d'injection d'air comprimé, permet d'obtenir des amplitudes de variations légèrement plus importantes que pour un placement en zone morte, mais la fréquence de ces variations est diminuée.

Dans cette étude, l'hystérèse de l'appareil JBL est réglée à 0,05, le diffuseur de CO_2 est placé dans une zone agitée (à proximité de l'injection d'air comprimé) et l'agitation est réalisée par bullage d'air.



(a) Les zones jaunes (ou grisées) correspondent aux périodes d'éclairage.



(b) Zoom sur la période de réglage des conditions de limitation du pH. Chaque zone colorée correspond à des conditions opératoires différentes, listées sur la figure.

Figure 4.4 – *Suivi du pH d'une culture de souche Gruissan dans des eaux hypersalées IFREMER limitées à un pH* 7,8*. Optimisation de la procédure de limitation du pH.*

4.4.4 Agitation

Comme avancé ci-dessus, les cultures sont agitées par bullage à l'air comprimé du réseau. Cet air est filtré à 0,2 µm, pour limiter les injections d'impuretés et d'hydrocarbures. L'injection séquentielle de CO_2 engendre aussi une légère agitation qui reste négligeable par rapport au bullage à l'air. Aucune agitation mécanique n'est ajoutée.

4.5 Procédure de suivi des cultures en laboratoire

La procédure de suivi des cultures au LISBP a été standardisée durant cette étude. Un modèle de tableur Excel regroupant l'ensemble des paramètres de suivi a été réalisé. Ce modèle de tableur se compose de plusieurs onglets contenant les informations suivantes :

1. **Inoculation** : dates et heures, souches, origines des inocula, volumes de culture, milieux de culture, milieux nutritifs, types d'agitations, d'éclairages et de PBR.
2. **Salinité** : suivis journaliers des salinités dans les PBR + graphiques.
3. **Température** : suivis des températures dans les PBR + graphiques.
4. **DO** : suivis journaliers ou plus réguliers des densités optiques à 800 et 680 nm + graphiques.
5. **Comptage** : comptages journaliers + graphiques.
6. **Lame fraîche** : Observations des cultures en lames fraîches, contaminations éventuelles, mobilités des algues, ...
7. **pH** : suivis pH permanents ou relevés journaliers + graphiques.
8. **Ratio car/chl** : Suivis des ratios caroténoïdes/chlorophylles + photos + graphiques.

Selon les besoins de l'expérience en cours et le temps disponible, cette procédure de suivi a été plus ou moins simplifiée. Un extrait d'une procédure de suivi d'une culture LOV non carencée, réalisée dans un PBR 5 L avec un cycle d'éclairage $16h/8h$, est proposé en figure 4.5. Sur ce suivi on remarque une augmentation légère mais régulière de la salinité. Sur les courbes de croissance (DO et comptage), on distingue parfaitement la phase de latence, la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Il ne manque que la phase de déclin. Il faut noter que peu de suivis se rapprochent autant du comportement théorique d'une culture batch que celui présenté.

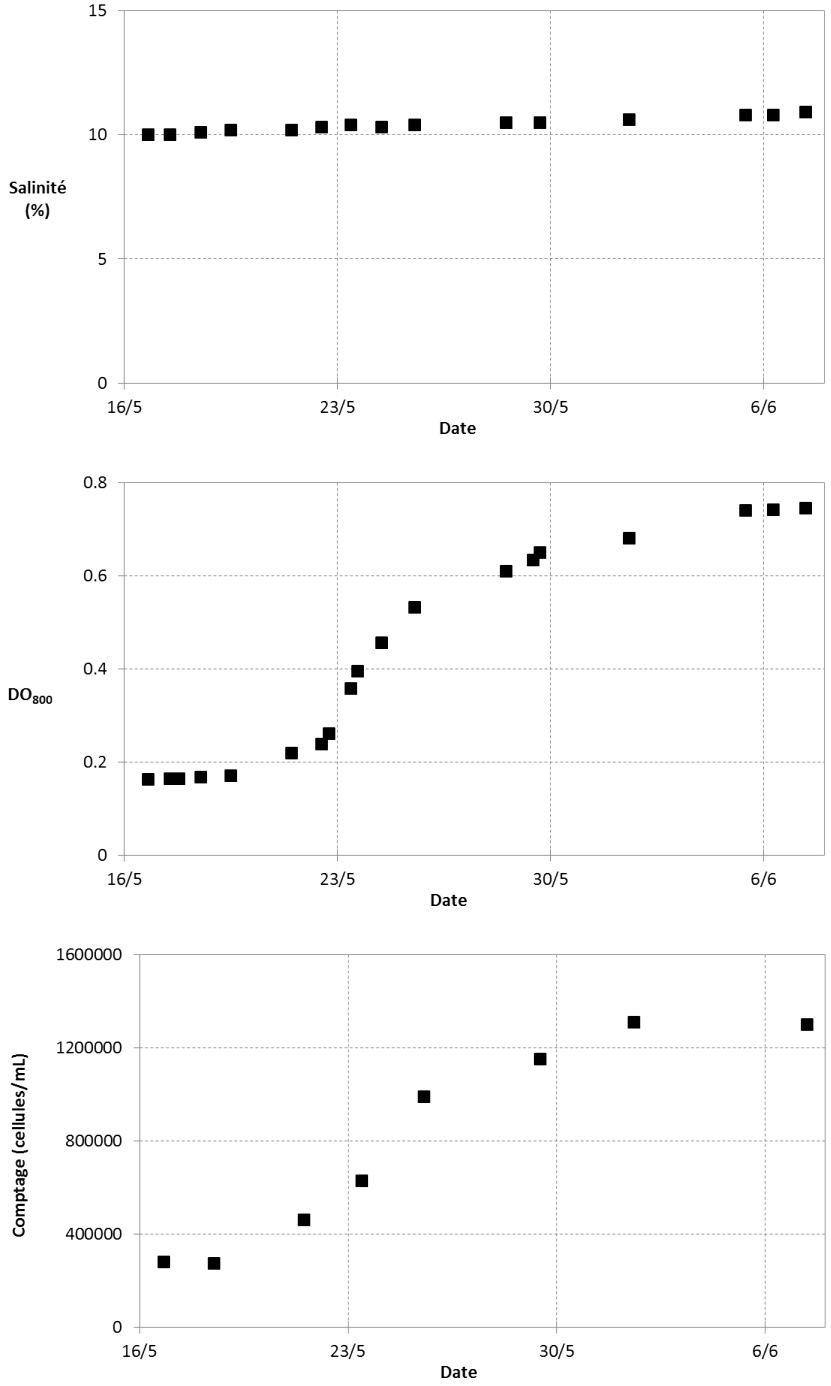


Figure 4.5 – *Extrait d'une procédure de suivi d'une culture LOV non carencée, réalisée dans un PBR* 5 *L avec un cycle d'éclairage* 16*h*/8*h*.

4.6 Maturation des cultures

Dans le chapitre 1.2.3, il a été vu que les principales voies de valorisations de *D. salina* nécessitaient une mise en carence des cultures avant récolte. Dans la littérature, la mise en carence d'azote est la plus étudiée et semble-t-il la plus efficace en ce qui concerne notamment l'accumulation de caroténoïdes.

La récolte s'effectuant après cette phase de mise en carence, il a été jugé nécessaire de maîtriser cette étape dite de maturation des cultures, dans l'optique de produire de la biomasse représentative de celle à récolter.

4.6.1 Protocole de mise en carence d'azote

Sur la plateforme de culture LISBP, en conditions normales de culture, la lumière est le critère limitant de la production de biomasse. Pour permettre la maturation des cultures, il faut rendre l'azote limitant avant la lumière. Sur les conseils des partenaires culture du projet Salinalgue, la concentration d'azote ajoutée à la culture au moment de l'inoculation est divisée par 4. Pour ce faire, un nouveau milieu de Conway baptisé « Conway N/4 » est préparé en limitant la concentration de $NaNO_3$.

L'état de stress des cultures peut être évalué par le suivi du ratio caroténoïdes/chlorophylles présenté dans le chapitre 3.4. Les microalgues carencées en azote ont en effet tendance à voir leur métabolisme s'orienter vers la production de caroténoïdes (Borowitzka, 1991).

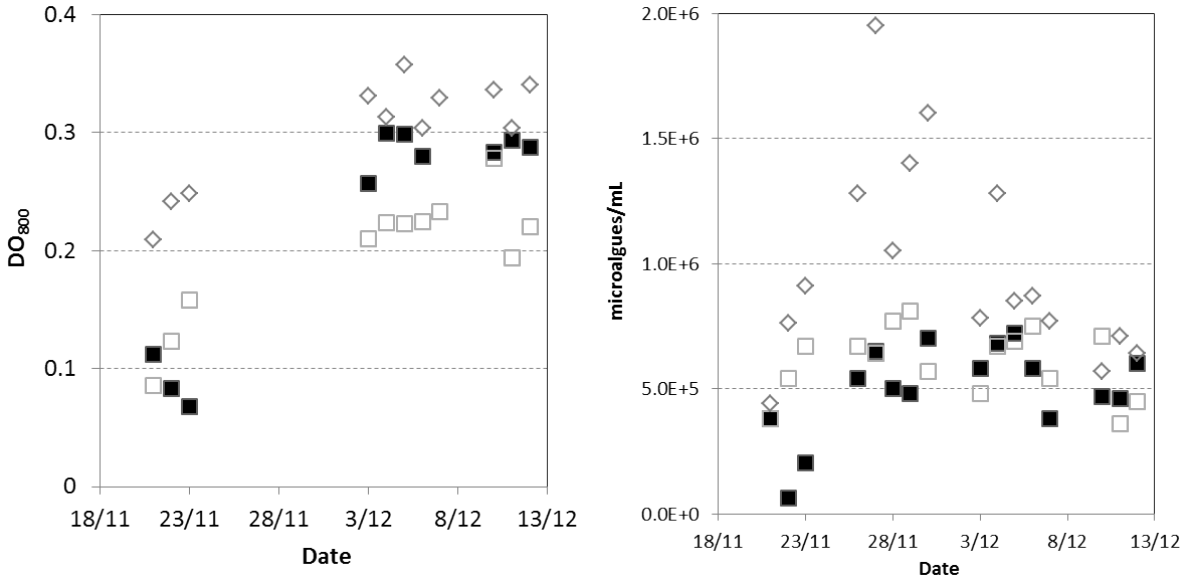
4.6.2 Suivis de cultures carencées

Un exemple de suivi d'une phase de culture avec maturation est proposé dans cette section. Dans cette expérience, 3 cultures différentes ont été inoculées à partir de 3 inocula acclimatés préalablement aux conditions de l'expérience :

- Gruissan N/4 : Souche Gruissan, Saumure synthétique 10%, Conway N/4.
- LOV N/4 : Souche LOV, Saumure synthétique 10%, Conway N/4.
- LOV N : Souche LOV, Saumure synthétique 10%, Conway N.

La croissance des cultures a été suivie par DO_{800} et comptage (figures 4.6). Un problème technique sur le spectrophotomètre n'a pas permis le suivi des densités optiques pendant 10 jours mais le comptage a été maintenu. Les 3 cultures atteignent très rapidement un plateau. La culture LOV N semble légèrement plus concentrée ce qui peut s'expliquer par sa plus forte concentration initiale en azote. Le fait que cette culture atteigne un plateau plus haut que la culture LOV N/4 traduit que cette dernière est bien limitée par l'apport en azote et non par l'apport de lumière.

La salinité des cultures a aussi été suivie de manière journalière. Du fait d'une légère évaporation, elle est passée de 10 à 11% sur les 3 semaines d'expérience.



(a) DO_{800}

(b) Comptage cellulaire

Figure 4.6 – *Suivi de la croissance microalgale dans les cultures Gruissan N/4 (■), LOV N (◇) et LOV N/4 (□).*

Sur la figure 4.7 on constate, pour la souche Gruissan, qu'après une période de relative stabilité, le ratio caroténoïdes/chlorophylles de cette culture appauvrie en azote augmente de manière très progressive. Après 20 jours de culture, il atteint la valeur de 4. Visuellement, on remarque que la culture acquiert progressivement une teinte jaune orangée. Il faut signaler que le ratio est évalué tous les jours à la même heure.

En ce qui concerne la culture LOV N, la période de stabilité du ratio est bien plus longue. La culture maintient sa teinte verte et un ratio inférieur à 1 pendant environ 12 jours. Passé ce stade, la culture emprunte des teintes verdâtres et le ratio atteint au bout de 20 jours une valeur de 3.

Pour la culture LOV disposant d'un milieu appauvri en azote (N/4), l'inoculum étant déjà carencé, la culture reverdit dans les premiers jours et abaisse son ratio car/chl jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à 2. Très rapidement l'azote disponible en début de culture batch semble consommé. La culture reprend une teinte orange vive et son ratio car/chl augmente rapidement et fortement pour atteindre 8.

Si la carence en azote semble très vite se déclarer dans les milieux appauvris, l'accumulation de caroténoïdes semble progressive pour les souches LOV et Gruissan. Le temps de maturation des cultures doit tenir compte de cette constatation. Au regard du ratio car/chl, la souche LOV semble plus appropriée pour la caroténogénèse, reste à voir si son taux de croissance est semblable à celui de la souche Gruissan et si sa robustesse lui permet d'être cultivée en extérieur (études des partenaires culture du projet Salinalgue).

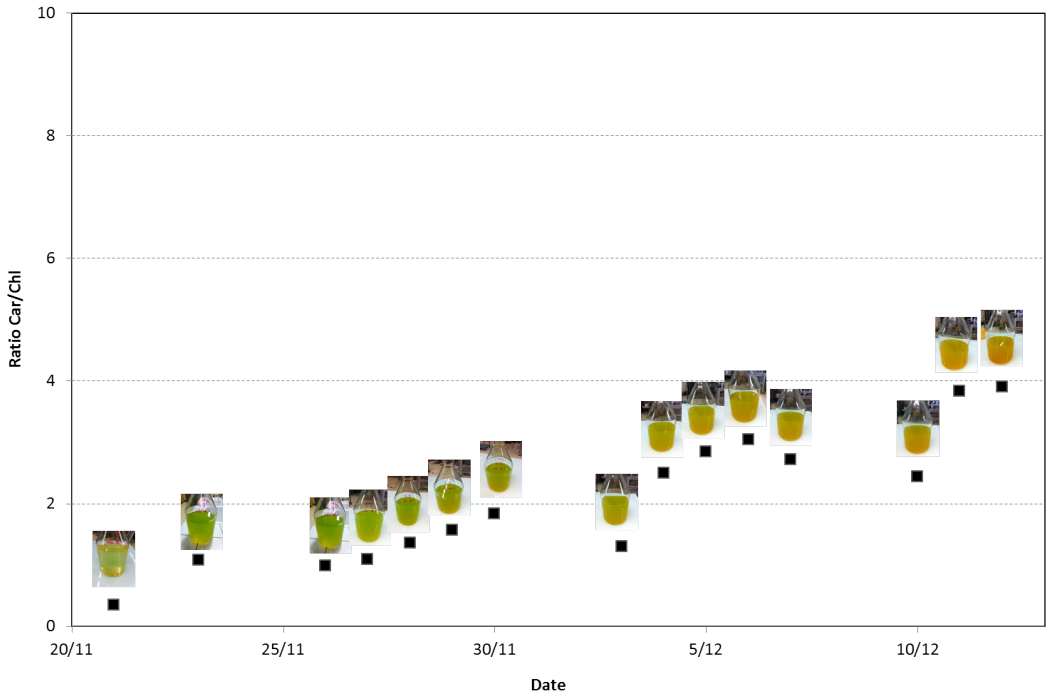
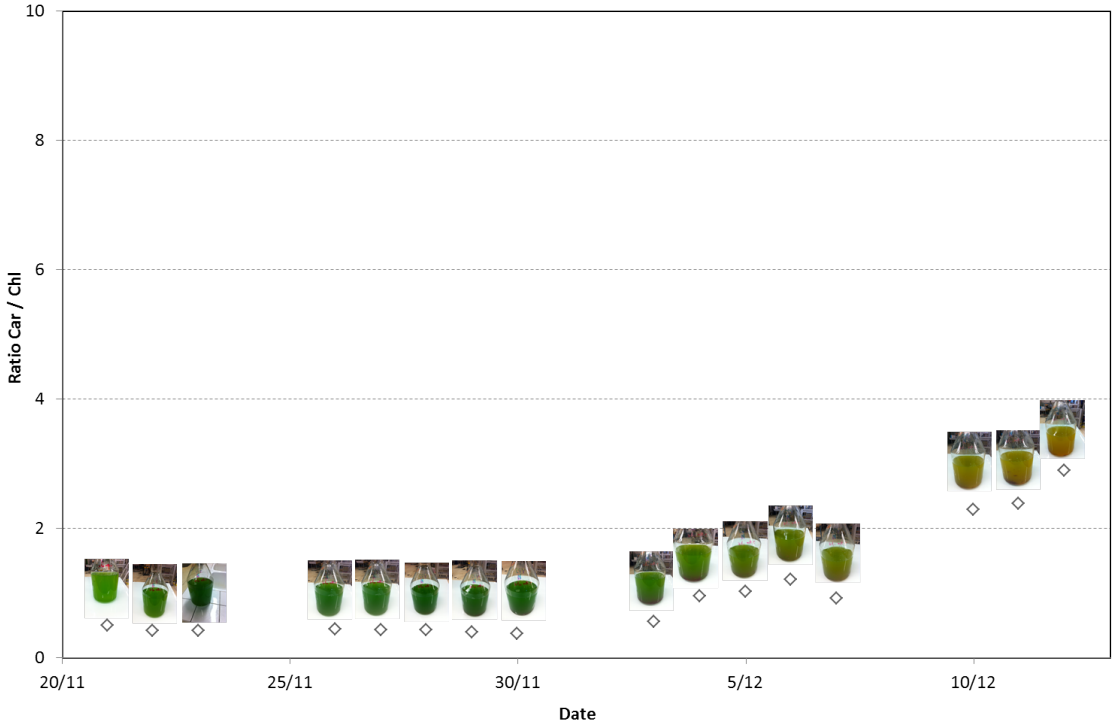
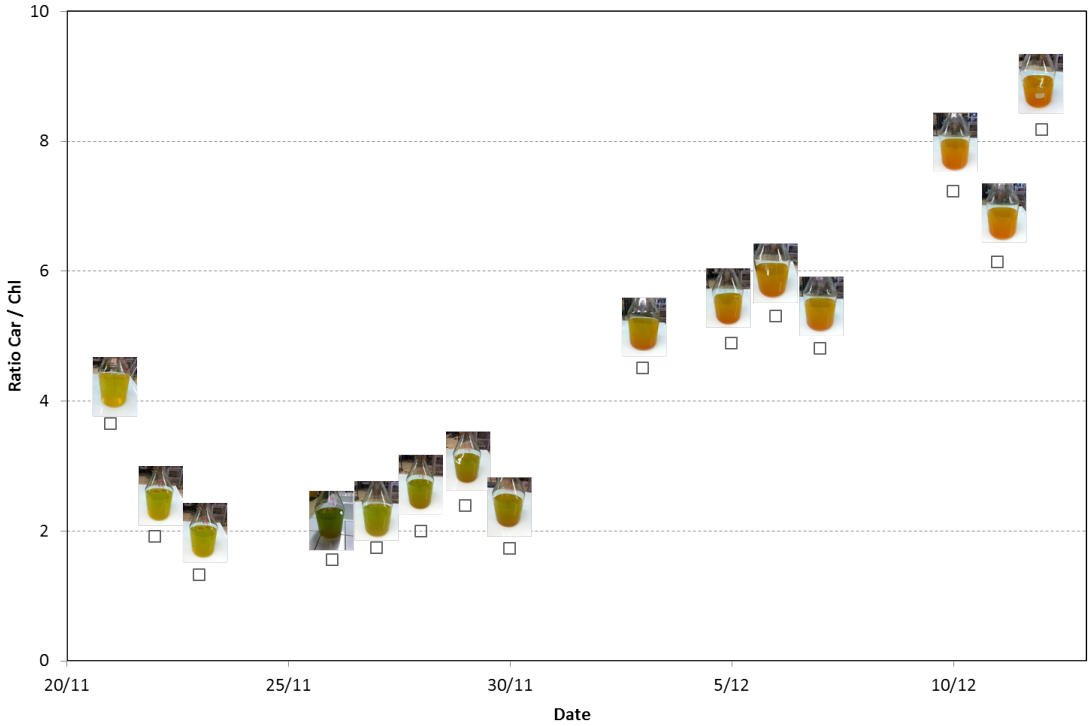


Figure 4.7 – *Suivi du ratio caroténoïdes/chlorophylles dans une culture Gruissan N/4 (■).*

Le protocole usité semble permettre une bonne maturation des cultures. Le suivi du ratio et l'observation de la couleur des cultures paraissent suffisants pour déterminer l'état de maturation d'une culture.



(a) Milieu de Conway N



(b) Milieu de Conway N/4

Figure 4.8 – *Suivi du ratio caroténoïdes/chlorophylles dans les cultures LOV N (◇) et LOV N/4 (□).*

4.7 Culture extérieure de *D. salina* sur le site de Gruissan

Sur le site de Gruissan, l'aspect culture des microalgues est pris en charge par le personnel d'IDEE Aquaculture, sous la direction de Rosine Lecomte. Les paramètres de culture testés sont la résultante de compromis entre les différents partenaires du projet.

4.7.1 Le site de Gruissan

Le site de démonstration pré-industrielle Salinalgue a été construit à Gruissan dans l'Aude, au sud-est de Narbonne. Il se situe plus précisément dans les Salins de l'île Saint Martin (plan en annexe F). Ces derniers s'étendent sur 350 hectares littoraux. *Dunaliella Salina* est naturellement présente dans les eaux concentrées des salins. L'eau permettant l'approvisionnement du circuit des salins, et donc du site de culture Salinalgue, est pompée à 150 m du littoral dans la Méditerranée.

4.7.2 Les installations

L'annexe F présente le plan des installations (voir aussi la photo aérienne 1.4). 4 raceways de 250 m^2, pouvant contenir entre 30 à 100 m^3, ont été construits durant le projet. Un bassin non agité (pas encore construit lors de la prise de vue aérienne) permet le stockage de certaines eaux et peut être utilisé avant la récolte des microalgues pour application de certains prétraitements. Une serre concentre l'ensemble des installations de récolte (description précise dans le chapitre 9.2) et certains éléments de la chaîne de culture. Un petit laboratoire placé à 500 m du site permet le suivi des cultures.

4.7.3 Le protocole de culture semi-industriel

La chaîne d'inoculation commence dans une souchotèque au laboratoire à proximité des salins. Cette souchotèque permet d'alimenter des cultures axéniques réalisées dans le laboratoire jusqu'à des volumes de 10 L. Une fois ces volumes atteints, le reste de la chaine se situe directement sur le site. L'étape suivante est réalisée dans des gaines de 50 à 100 L sous la serre (photo 4.9(a)). Lorsqu'elles sont suffisamment concentrées, ces gaines sont transférées dans d'autres gaines de

500 L disponibles soit sous la serre (photo 4.9(b)), soit en extérieur (photo 4.9(c)). Les gaines sous serre disposent d'un éclairage artificiel complémentaire si la luminosité solaire n'est pas suffisante. Un raceway est inoculé soit avec plusieurs gaines de 500 L, soit avec une partie d'un raceway précédent.

Les eaux de culture sont des assemblages de saumures de salinités d'environ 26% prélevées sur les tables salantes, avec des eaux de mer (environ 3,5%) prélevées dans un canal proche du site de culture. Ces assemblages sont tous désinfectés à l'eau de javel. Une filtration des particules en suspension et un traitement UV sont aussi opérés sur les eaux assemblées, à l'exception de celles destinées aux raceways. Un milieu de Conway complet ou carencé en azote est ajouté selon les objectifs de l'étude.

Les gaines sont agitées avec de l'air comprimé et du CO_2 est bullé pour limiter le pH à 7,4. En ce qui concerne les raceways, ils sont agités par des roues à aubes. Le pH est aussi limité à 7,4 par ajout de CO_2. Ce dernier est dissous dans une partie du milieu de culture qui est pompée par des pompes vortex et réinjectée à différents endroits dans le bassin. Ce pompage participe aussi à l'agitation du milieu. Cette technique d'injection du CO_2 permet de réduire les rejets à l'atmosphère.

Les cultures sont suivies de manière journalière par comptage, absorption à 680 nm et à 800 nm. Des observations microscopiques permettent de contrôler l'état de contamination des cultures. Des suivis de concentration en oxygène dissous et en azote sont aussi réalisés ponctuellement. Une centrale météorologique enregistre l'ensemble des conditions rencontrées par les cultures extérieures. Toutes les données relevées sont inscrites dans une base de données tenue par les opérateurs d'IDEE Aquaculture et mise à disposition des partenaires du projet.

(a) Gaines de 100 L sous serre

(b) Gaines de 500 L sous serre

(c) Gaines de 500 L en extérieur

Figure 4.9 – *Prises de vues des gaines de production de l'inoculum des raceways sur le site de démonstration de Gruissan.*

Chapitre 5

Récolte de *D. salina* sans déstabilisation assistée de la suspension

En s'appuyant sur l'état de l'art effectué chapitre 2, plusieurs procédés de récolte ont été sélectionnés pour être testés sur des cultures de *Dunaliella salina* (justification des choix dans la section 2.12). On trouve dans cette sélection deux procédés de pré-concentration ou d'épaississement utilisés classiquement pour concentrer de nombreuses microalgues, la sédimentation gravitaire et la flottation. À ces candidats vient s'ajouter un des deux procédés de déshydratation utilisés de manière industrielle pour la récolte de *Dunaliella salina*, mais dans le cadre d'une production à haute valeur ajoutée : la centrifugation.

Ces différentes méthodes de récolte ont d'abord été testées directement après culture des microalgues, sans manipulation préalable de la suspension algale. Ces travaux ont été réalisés parallèlement à des tests de déstabilisation de la suspension (chapitre 6). Le présent chapitre met en évidence que pour obtenir un procédé de récolte efficace dans les conditions opératoires testées, cette étape de déstabilisation de la suspension est nécessaire avant l'application des procédés de flottation et de sédimentation.

Ce chapitre comporte une section permettant de définir les critères d'évaluation des performances de récolte (§ 5.1). Ces critères sont utilisés dans l'ensemble du manuscrit et notamment dans l'étude sur la centrifugation de *D. salina* présentée en suivant (§ 5.2). En plus de conforter l'utilisation de la centrifugation comme étage de déshydratation, cette étude pose les bases d'un procédé de récolte par centrifugation séquentielle de la biomasse et de possibles caroténoïdes. La section suivante rassemble les résultats de différents tests de sédimentation gravitaire. Elle met en évidence l'impossibilité d'utiliser ce procédé directement après culture, tout au moins avec les souches utilisées dans le projet Salinalgue (§ 5.3). Pour finir, l'ensemble des conditions de culture dans lesquelles la flottation a été testée seule sont regroupées. Les résultats appuient le besoin de déstabilisation de la suspension dans l'optique d'une séparation efficace (§ 5.4).

Sommaire

5.1 Évaluation des performances de récolte 135
5.1.1 Efficacité de récupération (E) 135
5.1.2 Facteur de concentration (FC ou CF) 136
5.2 Centrifugation de *Dunaliella salina* 137
5.2.1 Matériels et méthodes spécifiques centrifugation 138
5.2.2 Résultats de l'étude sur la centrifugation 138
5.2.3 Conclusions et perspectives sur la centrifugation de *Dunaliella salina* . . 146
5.3 Sédimentation gravitaire 146
5.3.1 Matériels et méthodes spécifiques sédimentation 147
5.3.2 Résultats de sédimentation naturelle sur *Dunaliella salina* 150
5.4 Flottation naturelle et flottation assistée sans déstabilisation 150
5.4.1 Matériels et méthodes spécifiques flottation 152
5.4.2 Résultats de flottation naturelle et de flottation assistée sans déstabilisation sur *D. salina* 153
5.5 Conclusions sur la récolte sans déstabilisation 153

5.1 Évaluation des performances de récolte

Les performances des méthodes de récolte utilisées sont évaluées grâce à deux paramètres : l'efficacité de récupération (E) et le facteur de concentration (FC ou CF). Sauf mention contraire, les essais présentés dans ce manuscrit sont caractérisés par les formules définies dans cette section.

5.1.1 Efficacité de récupération (E)

L'efficacité de récupération évalue la quantité d'algues récupérées dans la phase concentrée par rapport à la quantité d'algues présentes dans la culture initiale. Soient les définitions suivantes :

- n_i : Nombre d'algues dans la suspension initiale (en cell)
- C_i : Concentration algale dans la suspension initiale (en cell/mL)
- V_i : Volume de la suspension initiale (en mL)
- n_f : Nombre d'algues dans la phase concentrée (en cell)
- C_f : Concentration algale dans la phase concentrée (en cell/mL)
- V_f : Volume de la phase concentrée (en mL)
- n_e : Nombre d'algues dans la phase appauvrie (en cell)
- C_e : Concentration algale dans la phase appauvrie (en cell/mL)
- V_e : Volume de la phase appauvrie (en mL)
- DO_i : Densité optique à 800 nm dans la suspension initiale
- DO_e : Densité optique à 800 nm dans la phase appauvrie

L'efficacité de récupération s'exprime alors comme suit :

$$E = \frac{n_f}{n_i} = \frac{n_i - n_e}{n_i} = 1 - \frac{n_e}{n_i} = 1 - \frac{C_e \cdot V_e}{C_i \cdot V_i} \tag{5.1}$$

Or il est montré dans le chapitre 3.3 que la densité optique évaluée à 800 nm est proportionnelle à la concentration microalgale dans la gamme considérée sur les cultures initiales et sur les phases

appauvries en microalgues (DO_{800} inférieures à 0,8). Si k est le facteur de proportionnalité, on a donc :

$$E = 1 - \frac{k \cdot DO_e \cdot V_e}{k \cdot DO_i \cdot V_i} \tag{5.2}$$

Soit l'expression qui sera utilisée dans tout ce manuscrit :

$$\boxed{E = 1 - \frac{DO_e \cdot V_e}{DO_i \cdot V_i}} \tag{5.3}$$

L'incertitude de mesure sur E est calculée par la méthode des dérivées partielles et s'exprime comme suit :

$$\Delta E = \left(\frac{DO_e}{DO_i \cdot V_i}\right) \cdot \Delta V_e + \left(\frac{V_e}{DO_i \cdot V_i}\right) \cdot \Delta DO_e + \left(\frac{DO_e \cdot V_e}{DO_i \cdot V_i^2}\right) \cdot \Delta V_i \cdots$$
$$\cdots + \left(\frac{DO_e \cdot V_e}{DO_i^2 \cdot V_i}\right) \cdot \Delta DO_i \tag{5.4}$$

Les incertitudes absolues sont déterminées en fonction du matériel utilisé. Pour les volumes elles sont de 5 mL et pour les densités optiques de 0,01.

5.1.2 Facteur de concentration (FC ou CF)

Le facteur de concentration évalue le rapport entre la concentration algale dans la phase concentrée et celle de la suspension initiale avant récolte. Il s'exprime avec les définitions précédentes :

$$FC = \frac{C_f}{C_i} \tag{5.5}$$

On a de plus :

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f + C_e \cdot V_e \tag{5.6}$$

Or on a montré dans le chapitre 3.3 que la densité optique évaluée à 800 nm est proportionnelle à la concentration algale dans la gamme considérée sur les cultures initiales et appauvries mais pas sur les cultures concentrées. On peut tout de même écrire :

$$k \cdot DO_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f + k \cdot DO_e \cdot V_e \tag{5.7}$$

Soit :

$$C_f = \frac{k \cdot DO_i \cdot V_i - k \cdot DO_e \cdot V_e}{V_f} \tag{5.8}$$

Si l'on replace C_f dans l'équation (5.5) on obtient :

$$FC = \frac{k \cdot DO_i \cdot V_i - k \cdot DO_e \cdot V_e}{V_f \cdot k \cdot DO_i} \tag{5.9}$$

Soit en simplifiant, l'expression qui sera utilisée dans tout ce manuscrit (hors essais en régime continu) :

$$\boxed{FC = \frac{DO_i \cdot V_i - DO_e \cdot V_e}{V_f \cdot DO_i}} \tag{5.10}$$

L'incertitude de mesure sur FC est calculée par la méthode des dérivées partielles et s'exprime comme suit :

$$\Delta FC = \left(\frac{1}{V_f}\right) \cdot \Delta V_i + \left|\frac{DO_e \cdot V_e}{V_f^2 \cdot DO_i} - \frac{V_i}{V_f^2}\right| \cdot \Delta V_f + \left(\frac{V_e}{V_f \cdot DO_i}\right) \cdot \Delta DO_e \cdots$$
$$\cdots + \left(\frac{DO_e}{V_f \cdot DO_i}\right) \cdot \Delta V_e + \left(\frac{DO_e \cdot V_e}{V_f \cdot DO_i^2}\right) \cdot \Delta DO_i \tag{5.11}$$

Les incertitudes absolues sont identiques à celles évaluées pour E, soient 5 mL pour les volumes et 0,01 pour les densités optiques.

5.2 Centrifugation de *Dunaliella salina*

Une partie des travaux rapportés dans cette section a été présentée sous forme d'un poster à la conférence internationale Alg'n'Chem 2012 (Montpellier, France). Ce poster est disponible en annexe G.

La centrifugation est utilisée à l'échelle industrielle pour la récolte de *D.salina* dans une optique de valorisation à haute valeur ajoutée. Ben-Amotz (1995) annonce, avec de la centrifugation en mode continu, des efficacités de récupération de 90% et l'obtention d'une pâte à 25% de matière sèche. Il évoque cependant un problème de destruction partielle des microalgues.

Cette destruction partielle des cellules peut mener à la perte des métabolites d'intérêts. Dans l'optique d'utiliser la centrifugation comme second étage de récolte, il est nécessaire de pouvoir anticiper et réduire cette éventuelle perte par lyse cellulaire. L'objectif initial de cette étude était donc de caractériser l'intégrité de la membrane de *D. salina*, en fonction des conditions de centrifugation.

En plus de cette caractérisation, les expériences réalisées permettent de suggérer un procédé de séparation séquencé, permettant de récupérer séparément caroténoïdes exsudés, biomasse et milieu de culture.

5.2.1 Matériels et méthodes spécifiques centrifugation

Cette étude a été réalisée avec une centrifugeuse Sigma 6 – 15 équipée d'un rotor 12170 pouvant accueillir des tubes de 15 mL. Les critères opératoires testés sont la force centrifuge relative (notée RCF dans ce manuscrit) et le temps de centrifugation (T_c).

Des quadriplicats de chacun des 30 couples de paramètres testés ont été réalisés à partir de 2 cultures différentes. 2 échantillons de 10 mL de la culture A et 2 échantillons de 10 mL de culture B sont prélevés 5 min avant chaque centrifugation.

Les cultures A et B sont menées dans de l'Eau synthétique hypersalée IFREMER (voir composition §4.2.1), dans lesquelles du Conway complet est ajouté avant inoculation d'une souche Gruissan (informations sur la souche dans le chapitre 4.1).

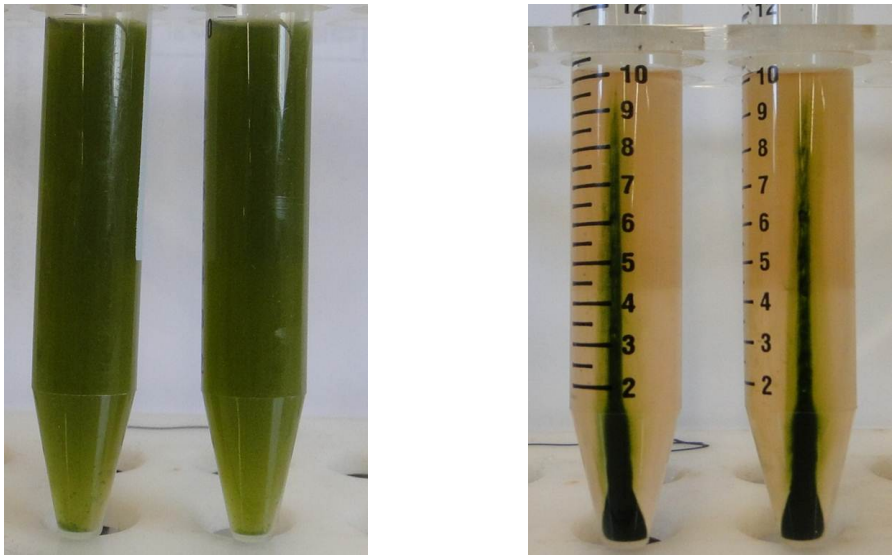
Les concentrations initiales des cultures ainsi que celles du surnageant ont été déterminées par absorption à une longueur d'onde de 800 nm. Des observations au microscope optique de « lames fraîches » des cultures, du surnageant et du concentrat ont permis d'évaluer l'impact de la centrifugation sur l'intégrité des cellules de *Dunaliella salina*.

5.2.2 Résultats de l'étude sur la centrifugation

5.2.2.1 Observations préliminaires

La figure 5.1 présente 2 réplicats d'une centrifugation réalisée à 500g pendant 5 min sur une culture non carencée de *Dunaliella salina*. La séparation de la biomasse microalgale semble efficace mais le milieu de culture reste troublé par des substances orangées. Ces dernières pourraient être des caroténoïdes malgré l'état non carencé des cultures. En effet, la couleur orangée constatée se rapproche plus des caractéristiques des caroténoïdes que de celles des halobactéries, possiblement présentes à ces salinités, mais qui donnent plutôt une coloration rosée aux eaux. Cette présence supposée de caroténoïdes dans le milieu de culture suggère un possible fractionnement de la membrane des cellules pendant la centrifugation et dans ce cas, une perte des métabolites d'intérêt dans le surnageant.

Pour vérifier ces dernières assertions, des tests de sédimentation post centrifugation modérée ont été réalisés. Les figures 5.2 mettent en évidence que les composés de couleur orange assimilés à des caroténoïdes sont présents dans le milieu de culture même sans centrifugation. Si l'on accepte l'hypothèse de l'absence d'halobactéries, il s'agirait donc de caroténoïdes exsudés lors de



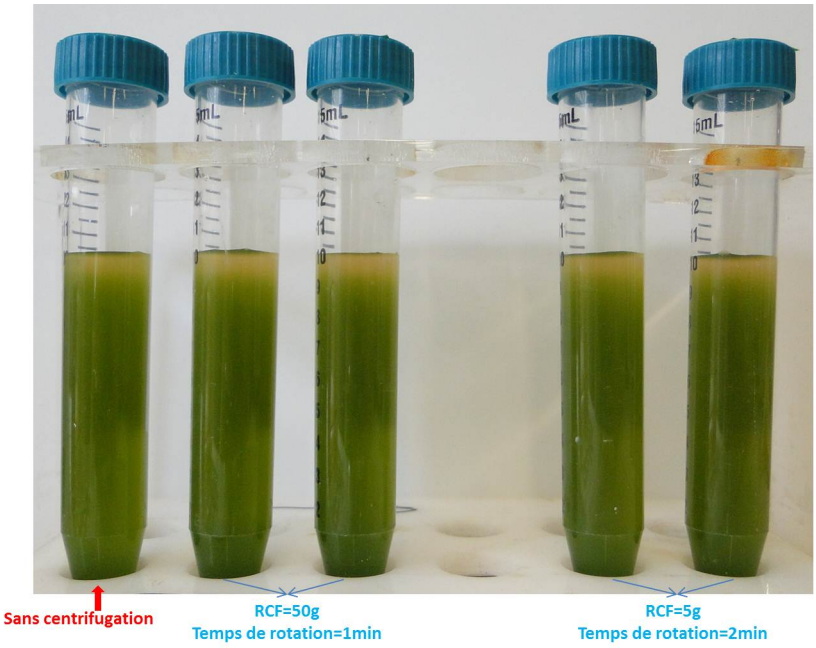
(a) Avant centrifugation (b) Après centrifugation

Figure 5.1 – *Prise de vue de* 2 *échantillons réplicats avant et après centrifugation à* 500*g pendant* 5 *min sur une culture non carencée de Dunaliella salina.*

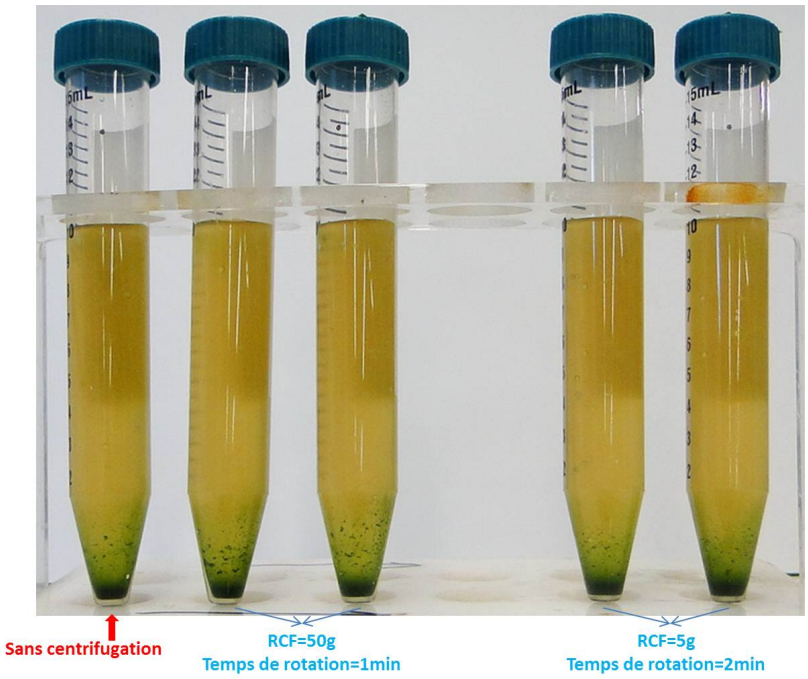
la culture et non lors de la centrifugation de *Dunaliella salina*. Cette remarque amène son lot de questions :

1. Les composés présents dans le milieu de culture sont-ils vraiment des caroténoïdes ?
2. Leur présence ici signifie-t-elle qu'ils ne sont pas dégradés par le milieu de culture ?
3. S'il ne sont pas dégradés, est-il possible de les récupérer par centrifugation ?
4. Peut-on définir des critères opératoires permettant de séparer de manière différenciée la biomasse algale et les supposés caroténoïdes ?
5. La membrane des microalgues, que l'on a cru désintégrée après les premiers tests, reste-t-elle finalement intègre lors de la centrifugation ?
6. Si cette membrane reste intègre dans cette étude, comment peut s'expliquer la désintégration régulièrement constatée dans les procédés continus de centrifugation ?

Les 2 premières questions, ne relevant pas des tâches assignées au LISBP dans le cadre du projet Salinalgue, ont été proposées aux partenaires du projet en charge de ces recherches. Ces questions n'ont à ce jour pas été réglées, c'est pourquoi dans la suite, lorsqu'il est fait mention de caroténoïdes, il faut entendre « caroténoïdes supposés ». La suite de ce chapitre permet d'apporter des éléments de réponse aux autres questions orientées récolte.



(a) $2h$ après centrifugation

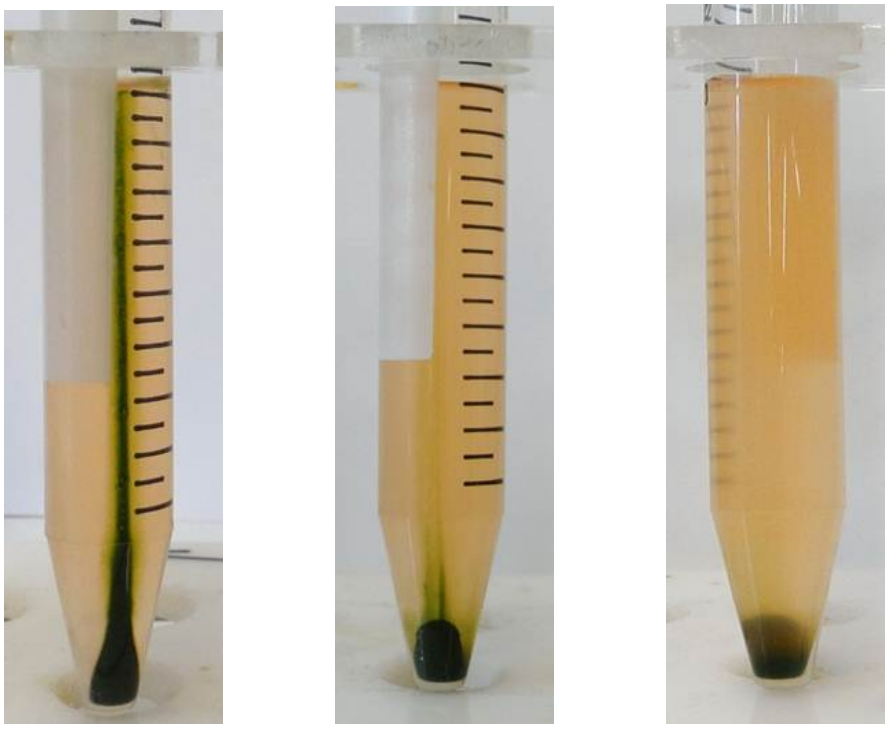


(b) $20h$ après centrifugation

Figure 5.2 – *Tests de sédimentation post centrifugation modérée sur une culture non carencée de Dunaliella salina.*

5.2.2.2 Séparation sélective par centrifugation

La figure 5.3 montre qu'une fois centrifugée à $1000g$, la biomasse continue de décanter alors que les caroténoïdes restent en solution. La figure 5.4 montre que si l'on augmente la force centrifuge et le temps de centrifugation, il est aussi possible de séparer les caroténoïdes du milieu de culture (NB : la couleur obtenue dans le fond des tubes renforce l'hypothèse de la présence de caroténoïdes mais ne nous renseigne pas sur leur état de dégradation). Ce comportement suggère la possibilité de réaliser une récolte séquencée permettant de séparer la biomasse algale après une première centrifugation douce et les caroténoïdes exsudés après une seconde centrifugation à force centrifuge relative plus importante.



(a) $30s$ après (b) $1h$ après (c) $2h$ après

Figure 5.3 – *Centrifugation à* $1000g$ *pendant* 2 *min sur une culture non carencée de Dunaliella salina.*

Suite à ce constat, l'étude s'est étoffée pour proposer un tableau à double entrée permettant de guider le choix des conditions opératoires de centrifugation (RCF et T_c) selon le type de séparation souhaitée (figure 5.5). Trois zones se distinguent dans ce tableau. Une première zone noire dans laquelle le temps de centrifugation ou la RCF imposés ne sont pas suffisants pour permettre la séparation ni de la biomasse, ni des caroténoïdes. Une seconde zone verte dans laquelle les conditions opératoires imposées permettent d'obtenir une séparation de la biomasse algale uniquement. Enfin, dans la 3ème zone orange la séparation des caroténoïdes est aussi

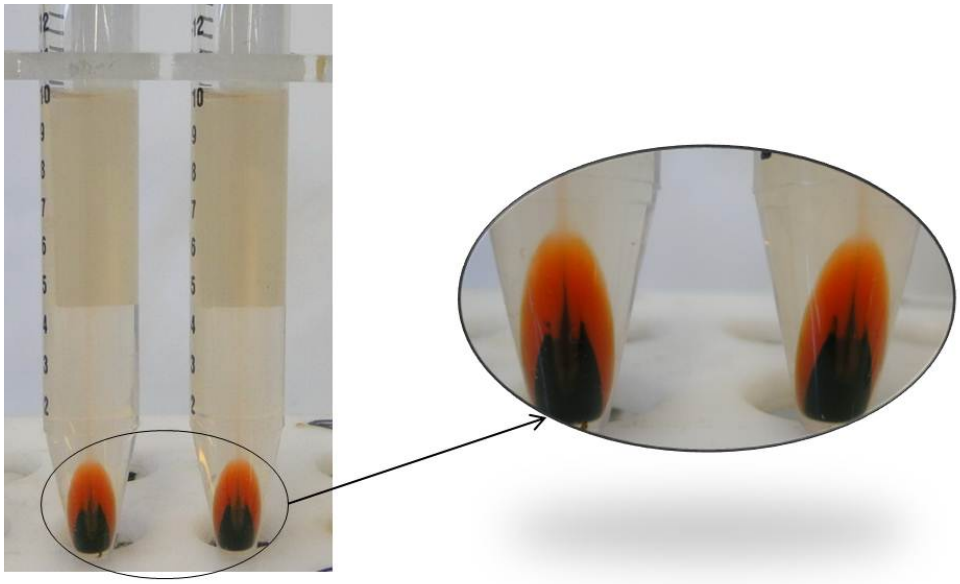


Figure 5.4 – *Centrifugation à* 5000*g pendant* 10 *min sur une culture non carencée de Dunaliella salina.*

constatée.

Il faut bien noter que les valeurs obtenues peuvent sûrement différer selon l'état de carence de la population algale, la souche et les eaux utilisées (NB : l'orientation des recherches durant la thèse n'a pas laissé le temps de vérifier et compléter cette dernière assertion). Il est conseillé à tout opérateur de faire quelques tests laboratoire avant de sélectionner les conditions opératoires imposées à l'échelle industrielle.

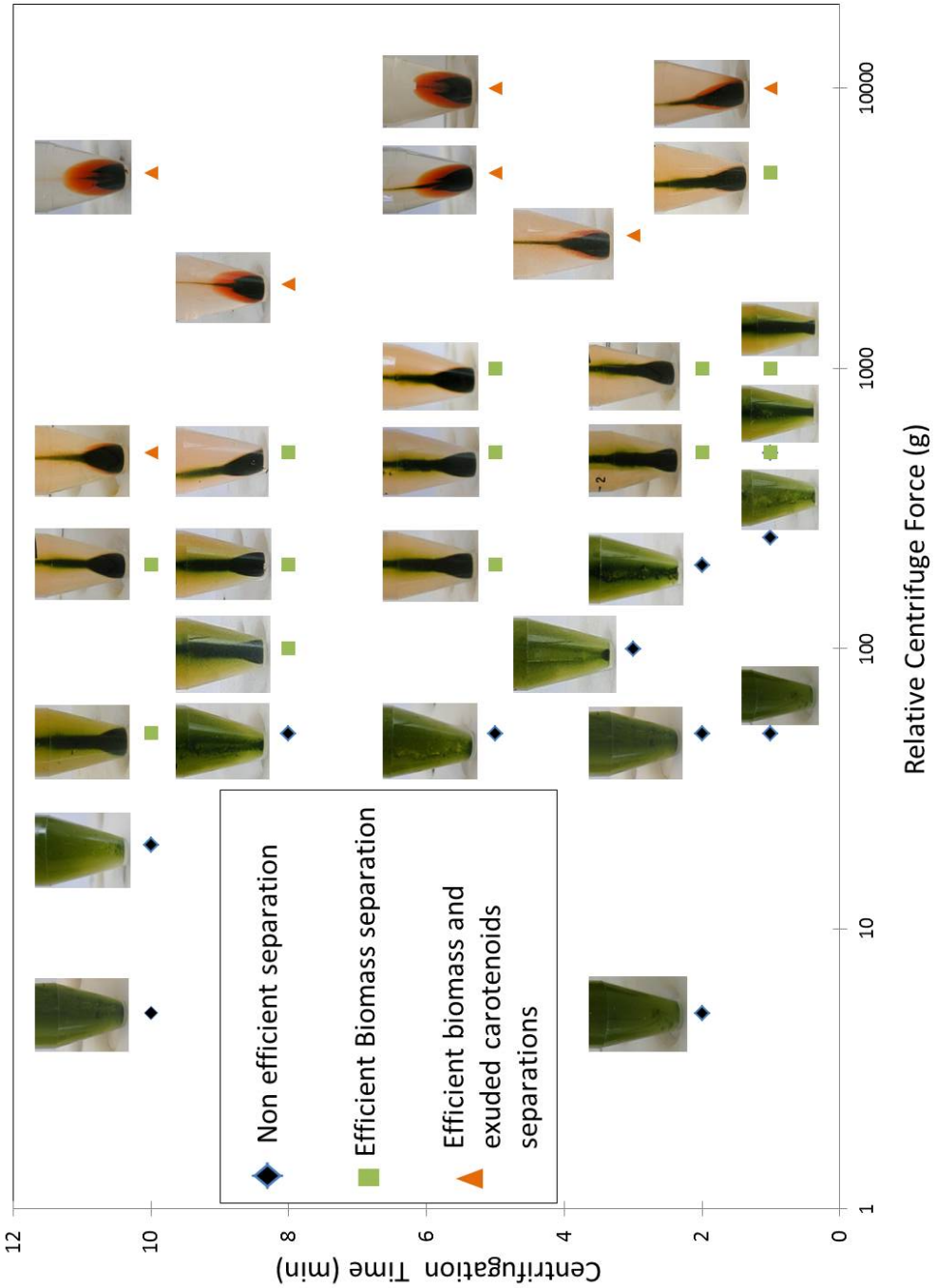


Figure 5.5 – *Outil de choix des conditions opératoires de centrifugation d'une culture non carencée de Dunaliella salina selon les produits désirés.*

5.2.2.3 Efficacité de récolte par centrifugation

Pour compléter l'outil de choix des conditions opératoires de centrifugation, l'efficacité de récolte par centrifugation de *Dunaliella salina* est évaluée. Pour ce faire, des mesures de densité optique à 800 nm sont réalisées sur les 4 réplicats. Les mesures de DO_{800} sont moyennées et les valeurs obtenues permettent d'évaluer l'efficacité de récolte d'après l'équation 5.3.

Les résultats sont présentés en fonction de la RCF et du temps de centrifugation (figure 5.6). L'efficacité de récolte augmente avec la RCF et avec le temps de centrifugation.

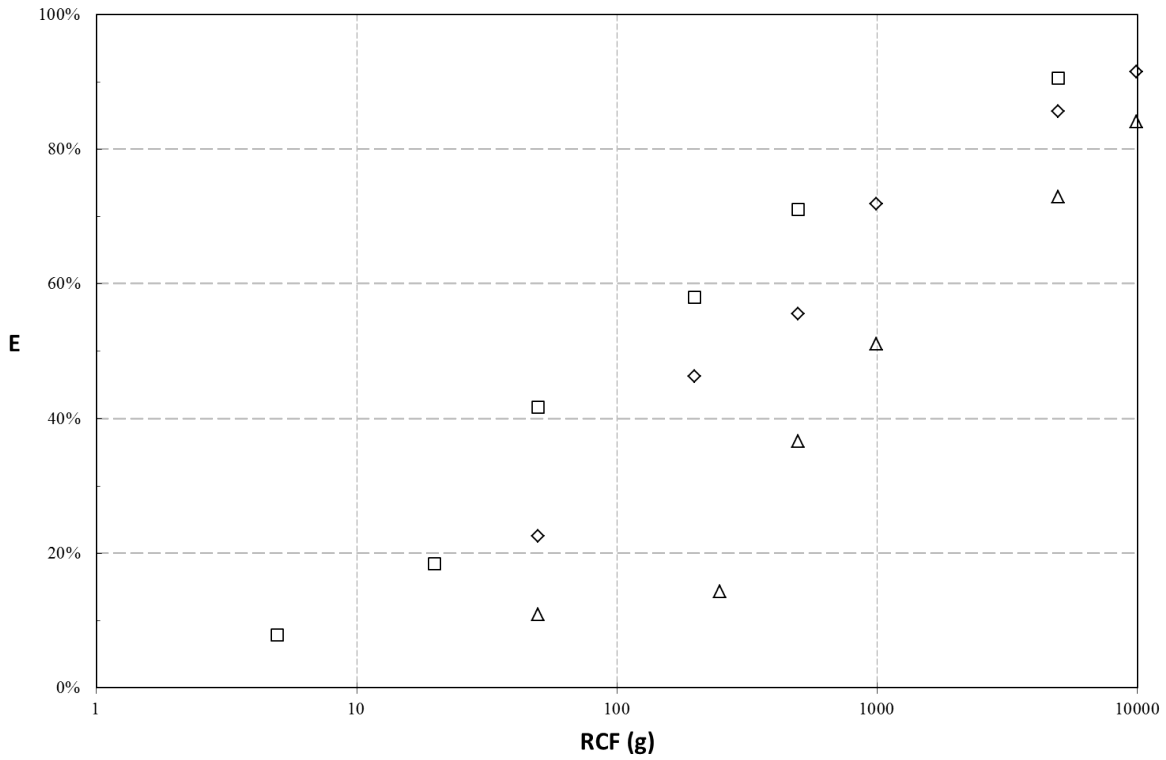
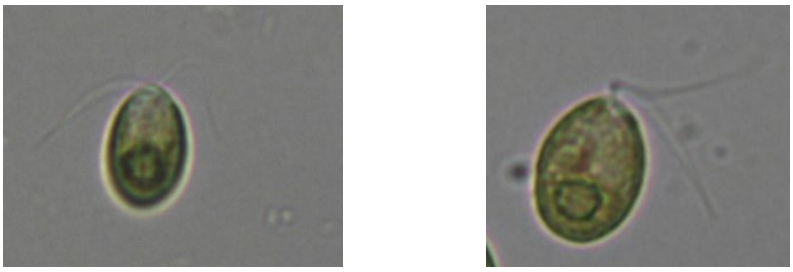


Figure 5.6 – *Efficacité de récupération par centrifugation d'une culture non carencée de Dunaliella salina en fonction de la RCF et du temps de centrifugation* T_c *(*△ *:* T_c = 1 *min ;* ◇ *:* T_c = 5 *min ;* □ *:* T_c = 10 *min).*

5.2.2.4 Conservation de l'intégrité des microalgues lors de la centrifugation

Reste à voir si l'intégrité des algues est conservée pendant la centrifugation. Pour ce faire, les échantillons soumis à 10000g pendant 5 min ont été visualisés en « lame fraîche ». La figure

5.7 montre une cellule caractéristique des états pré et post centrifugation. On constate que les cellules présentes dans le surnageant après la centrifugation conservent leur intégrité. Les vidéos indiquent même que la plupart conservent leur mobilité. En ce qui concerne les cellules obtenues dans la pâte algale, là encore elles semblent conserver leur intégrité (figure 5.8). L'encombrement ne leur permet plus par contre de se mouvoir. Des tests à 16000g pendant 10 min ont été effectués sans qu'il ne soit constaté de perte d'intégrité de la plupart des cellules.



(a) Avant centrifugation (b) Après centrifugation

Figure 5.7 – *Exemple de cellule de Dunaliella salina dans le surnageant avant et après centrifugation à* 10000g *pendant* 5 min.

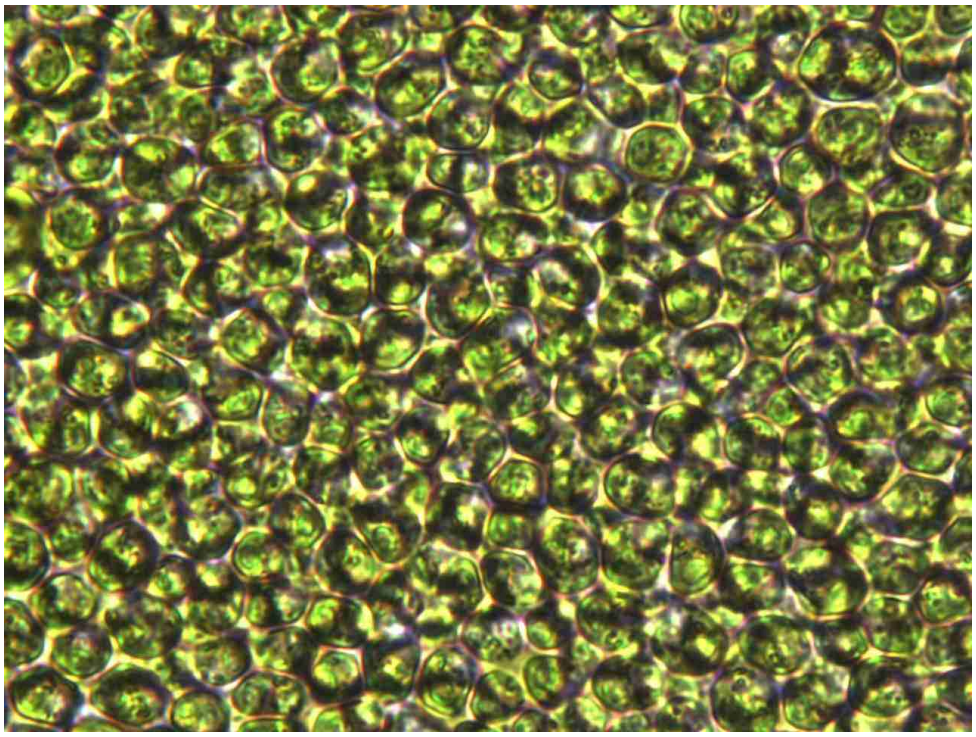


Figure 5.8 – *Observation de la pâte algale obtenue après centrifugation à* 10000g *pendant* 5 min.

5.2.3 Conclusions et perspectives sur la centrifugation de *Dunaliella salina*

Pour la souche et dans les eaux testées, la RCF et le temps de centrifugation ne semblent pas être les facteurs pouvant expliquer la perte d'intégrité des cellules, parfois constatée lors de la centrifugation continue. Les centrifugations étant réalisées dans cette étude en mode batch, il se pourrait alors que les systèmes de décharge des centrifugeuses continues soient la cause de la rupture des membranes cellulaires. Pour Ben-Amotz (1995), cette rupture est la conséquence d'une entrée d'air dans les bols de centrifugation continue.

Cette étude ne ferme pas la porte à l'utilisation de la centrifugation comme procédé de déshydratation, pour surconcentrer des boues algales, et ouvre même d'autres perspectives. En effet, si la présence de caroténoïdes valorisables hors des microalgues est confirmée, la séparation sélective mise en évidence pourrait être valorisée de différentes manières.

Pour un fonctionnement continu, une centrifugation progressive pourrait par exemple permettre de recycler les microalgues (viables selon l'expérience) vers le milieu de culture et de récupérer les caroténoïdes à valoriser. En batch, une centrifugation séquentielle pourrait permettre de récupérer et valoriser la biomasse à faibles RCF, avant de séparer les caroténoïdes du milieu recyclable en augmentant la force de centrifugation.

Comme avancé précédemment, les choix d'axes de recherches privilégiés n'ont pas laissé le temps suffisant de poursuivre les investigations sur la centrifugation, mais ces perspectives restent intéressantes à explorer.

5.3 Sédimentation gravitaire

Si la sédimentation naturelle d'une microalgue peut être problématique lors de sa phase de culture, elle est a contrario l'alliée de sa récolte. La séparation par sédimentation gravitaire est un procédé relativement simple à mettre en œuvre à l'échelle industrielle. Elle présente de faibles coûts d'investissement et de fonctionnement, ce qui la rend attractive dans l'optique de la mise en place d'une filière microalgale à faible valeur ajoutée.

Malheureusement, peu de microalgues présentent des vitesses de sédimentation suffisantes pour que cette caractéristique soit exploitée. Le procédé de sédimentation est alors souvent précédé d'une étape de coagulation/floculation permettant d'accélérer la vitesse de sédimentation de la biomasse.

Dans ce chapitre, il n'est question que de sédimentation gravitaire naturelle (pas de couplage

avec de la coagulation/floculation ou tout autre procédé de déstabilisation de la suspension). De nombreux tests ont été réalisés au cours de ce projet pour voir si les souches cultivées pouvaient, dans certaines conditions contrôlables, sédimenter naturellement.

5.3.1 Matériels et méthodes spécifiques sédimentation

Pour tester la sédimentation naturelle, 2 protocoles très simples ont été utilisés. Le premier consiste juste à stopper le bullage, et donc l'agitation et la régulation du pH, dans les PBR de culture pour observer le comportement des algues. Comme il n'est pas toujours possible de perturber ainsi la culture des microlagues, un autre protocole a été utilisé. Pour ce dernier, un échantillon d'une culture est prélevé dans une simple éprouvette graduée. L'échantillon est ensuite soit laissé dans une zone lumineuse, soit mis dans l'obscurité pour interrompre la photosynthèse.

Les cultures dans les PBR ou les échantillons dans les éprouvettes sont régulièrement observés et si un front de sédimentation apparaît, sa vitesse peut être évaluée. Si la biomasse sédimente, il est aussi possible de déterminer une efficacité de récupération et un facteur de concentration en relevant, la DO initiale et celle dans le surnageant final, le volume initial et celui de la phase algale sédimentée en fin d'expérience. Il faut noter que ces tests permettent de tester à la fois la sédimentation naturelle mais aussi la flottation naturelle si les microalgues ont plutôt tendance à flotter. Le tableau 5.1 reprend l'ensemble des conditions dans lesquelles la sédimentation naturelle a été testée.

Souches	Carence en azote	Milieu de culture	Salinités	Sédimentation ou Flottation naturelle	Flottation assistée sans déstabilisation	Flottation assistée post-déstabilisation
Gruissan	Non	Eau synthétique Ifremer	10 – 11%	Non constatées	Non efficace	§§ 7 et 8.2
LOV	Non	Assemblage naturel 4/saumure Mg	13%	Non constatées	Non efficace	§ 8.3.1.1
LOV	Non	Eau du circuit	12%	Non constatées	Non efficace	§§ 8.6.2 et 8.7 et 8.8
LOV	Non	Assemblage naturel 3,6/16	12%	Non constatées	Non efficace	§ 8.7
LOV	Non	Assemblage naturel 3,6/26	10 – 15%	Non constatées	Non efficace	§§ 8.3.2 et 8.7
LOV	Non	Eau du circuit	7,5%	Non constatées	Non efficace	§ 8.6.2
LOV	Non	Eau du circuit	15,2%	Non constatées	Non efficace	§ 8.6.2
Gruissan	Non	Eau du circuit	12%	Non constatées	Non efficace	§ 8.8
Gruissan	Non	Eau synthétique LBE	13%	Non constatées	Non efficace	§ 8.5
Gruissan	Non	Eau synthétique LBE `Ca+`	11,5%	Non constatées	Non efficace	§ 8.5
Gruissan	Non	Eau synthétique LBE `Ca++`	12,8%	Non constatées	Non efficace	§ 8.5
Gruissan	Non	Saumure synthétique	10%	Non constatées	Non efficace	§ 8.9
Gruissan	Oui	Saumure synthétique	10%	Non constatées	Non efficace	§ 8.9
LOV	Non	Saumure synthétique	10 – 11%	Non constatées	Non efficace	§§ 8.4.1 et 8.9
LOV	Oui	Saumure synthétique	10 – 11%	Non constatées	Non efficace	§§ 8.4.2 et 8.6.1 et 8.9
LOV	Oui	Saumure synthétique	17,7%	Non constatées	Non efficace	§ 8.6.1
LOV	Oui	Saumure synthétique	22,6%	Non constatées	Non efficace	§ 8.6.1
Gruissan	Non	Assemblage naturel 3,6/26	10 – 15%	Non constatées	Non efficace	9

Suite en page suivante...

Souches	Carence en azote	Milieu de culture	Salinités	Sédimentation ou Flottation naturelle	Flottation assistée sans déstabilisation	Flottation assistée post-déstabilisation
		... suite de la page précédente.				
Gruissan	Oui	Assemblage naturel 3,6/26	10 – 15%	Non constatées	Non efficace	9
LOV	Non	Assemblage naturel 3,6/26	10 – 15%	Non constatées	Non efficace	9
LOV	Oui	Assemblage naturel 3,6/26	10 – 15%	Non constatées	Non efficace	9

Tableau 5.1 – *Récapitulatif des conditions de culture testées et des résultats obtenus lors des études sur la sédimentation naturelle, flottation naturelle et la flottation assistée. Liens vers les expériences de flottation assistée post-déstabilisation.*

5.3.2 Résultats de sédimentation naturelle sur *Dunaliella salina*

La figure 5.2 présentée dans l'étude sur la centrifugation est le résultat le plus satisfaisant obtenu sur la sédimentation naturelle des souches de *Dunaliella salina* cultivées dans le projet Salinalgue (hors travaux en cours sur la souche B3 récemment isolée). La biomasse microalgale contenue dans l'échantillon témoin pour lequel aucune centrifugation n'est appliquée sédimente, mais très lentement. Bien que la biomasse ait totalement sédimenté au bout de 20 h, la vitesse du front de sédimentation dans les 2 premières heures n'excède pas 2 mm/h. Ceci est très insuffisant pour envisager une séparation industrielle efficace.

De nombreuses autres expériences ont traduit la non sédimentation naturelle des souches de *Dunaliella salina* cultivées dans le projet Salinalgue (voir tableau 5.1). Une de ces expériences est imagée sur la figure 5.9. Des échantillons de cultures de souches LOV et Gruissan sont prélevés dans des gaines intérieures sur le site Gruissan (concentrations cellulaires proches de 10^6 $cellules/mL$). Une éprouvette de 500 mL par souche est laissée au soleil et une deuxième est placée à l'obscurité sous un seau opaque. Des observations et photographies sont réalisées toutes les heures.

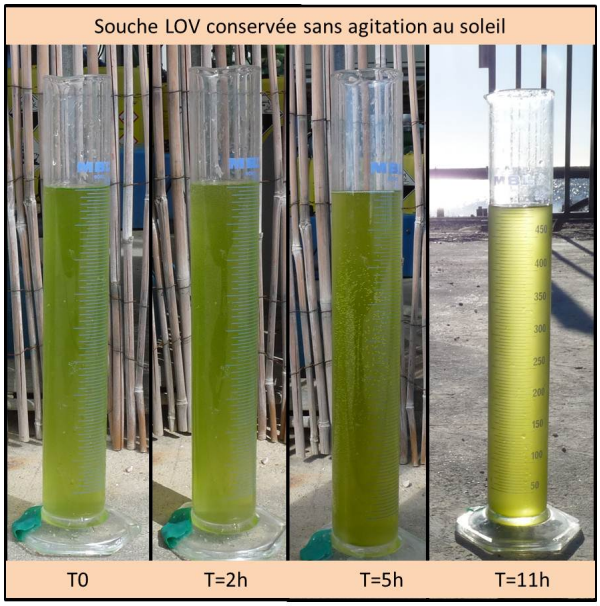
Qu'il s'agisse de la souche Gruissan ou de la LOV, ni sédimentation naturelle, ni flottation naturelle ne sont constatées 11 h après prélèvement des échantillons et par la même occasion, interruption du bullage. Ce résultat est identique pour les échantillons conservés au soleil et pour ceux conservés à l'obscurité.

Le fait que *D. salina* soit pourvue de flagelles et puisse donc se mouvoir, suffit à contrecarrer la différence de densité entre l'algue et son milieu de culture. Pour permettre la sédimentation de *Dunaliella salina*, il faut donc a minima perturber sa mobilité et sûrement induire sa floculation pour accélérer le processus. La déstabilisation des suspensions sera traitée dans le chapitre 6.

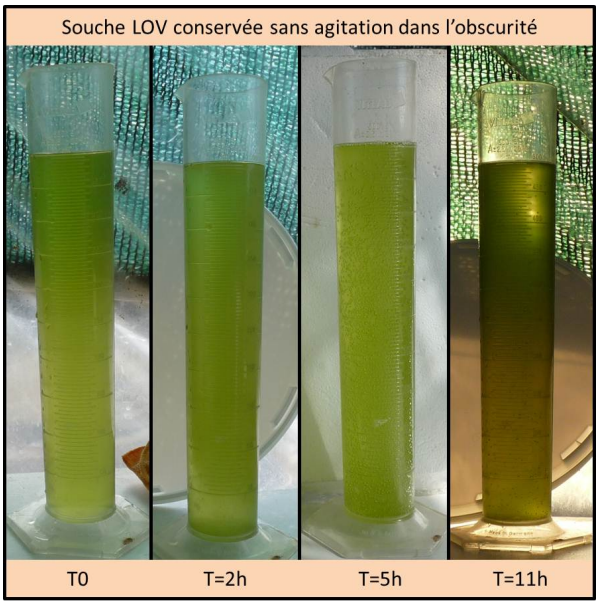
5.4 Flottation naturelle et flottation assistée sans déstabilisation

Les résultats de flottation recensés dans cette section sont l'agrégation de résultats obtenus lors d'études sur des conditions de culture différentes de *D. salina*, menées tout au long des travaux de thèse. Les conditions testées sont répertoriées dans le tableau 5.1.

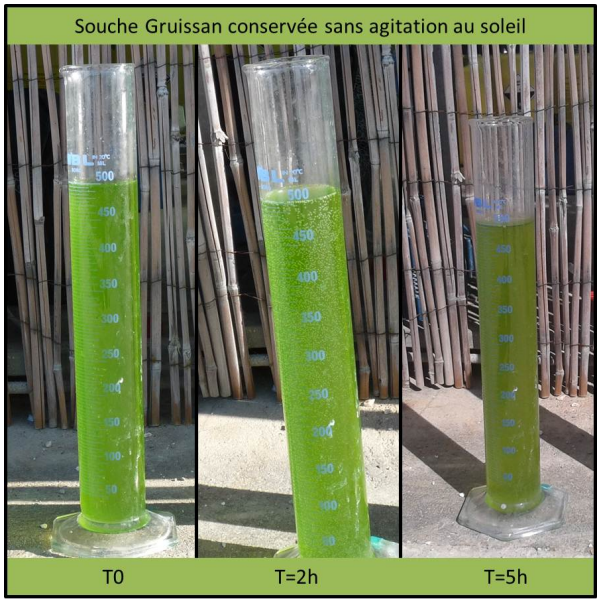
Lorsque l'on aborde la flottation de particules solides dans un milieu liquide, on distingue la flottation naturelle, la flottation assistée sans déstabilisation et la flottation assistée post-déstabilisation. On parle de flottation naturelle lorsqu'aucun composé chimique et aucune bulle ne sont ajoutés pour amener les particules, en l'occurence, les microalgues à la surface. La flottation



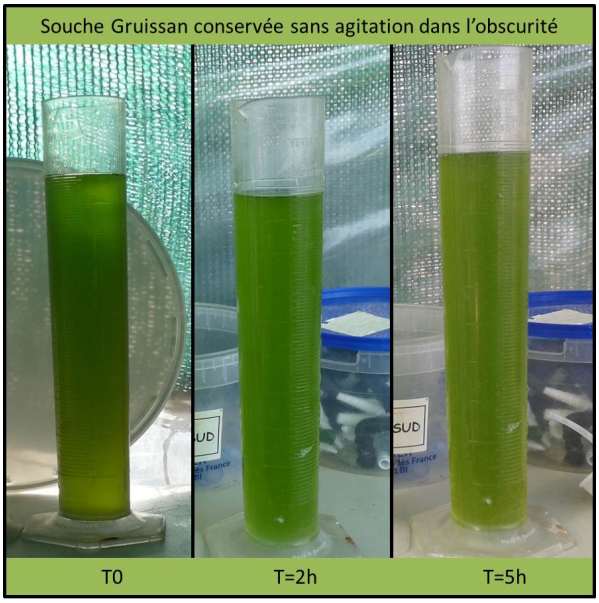
(a) Souche LOV au soleil



(b) Souche LOV dans l'obscurité



(c) Souche Gruissan au soleil



(d) Souche Gruissan dans l'obscurité

Figure 5.9 – *Expérience de sédimentation naturelle réalisée sur* 2 *souches différentes de Dunaliella salina cultivées en gaines de* 100 *L dans des eaux de salins à* 12% *et limitées à un pH de 7,4.*

assistée sans déstabilisation résulte d'un ajout artificiel de bulles sans déstabilisation préalable de la suspension microalgale. On entend enfin par flottation assistée post-déstabilisation, le couplage d'un procédé de coagulation/flottation artificiel avec un procédé de flottation. Cette section est consacrée à la flottation naturelle et à la flottation assistée sans déstabilisation.

5.4.1 Matériels et méthodes spécifiques flottation

Les protocoles de test de la flottation naturelle ont déjà été rapportés dans la section 5.3.1 sur la sédimentation naturelle.

En ce qui concerne la flottation assistée, étant donnée la taille des cellules de *Dunaliella salina*, la flottation à air dissous (DAF) est privilégiée. L'ensemble des essais à l'échelle laboratoire de DAF ont été réalisés avec un flottatest Orchidis™ FTH3 (figure 5.10). L'appareillage a été renouvelé à l'identique durant la thèse. Pour permettre la pressurisation des eaux, le réseau d'air comprimé du LISBP a été utilisé en laboratoire et remplacé par un compresseur sur le site de démonstration de Gruissan. Du milieu de culture propre, de salinité équivalente aux échantillons testés, a été pressurisé à 6 *bars* pour permettre la génération des bulles lors de la dépressurisation de ce milieu dans l'échantillon de culture à flotter.

Le protocole de caractérisation de la flottation dans le flottatest Orchidis™ est proposé en annexe H. Il est simplifié dans le cas d'une simple flottation assistée sans déstabilisation.

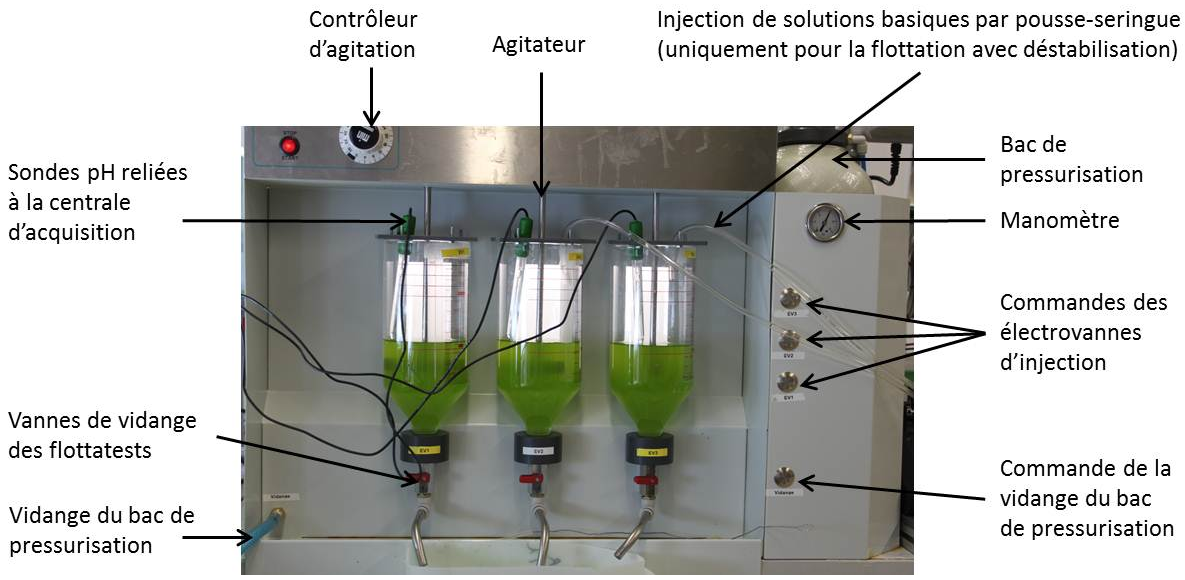


Figure 5.10 – *Flottatest Orchidis FTH3 équipé pour une manipulation de caractérisation de l'autofloculation/flottation de Dunaliella salina.*

5.4.2 Résultats de flottation naturelle et de flottation assistée sans déstabilisation sur *D. salina*

Le tableau 5.1 synthétise les conditions de culture testées lors des recherches sur la flottation naturelle et assistée. Aucun des essais menés durant ces travaux n'a pu mettre en évidence la flottation naturelle des souches de *Dunaliella salina* utilisées, quels que soient l'état de carence des cultures, la salinité et l'origine des milieux de culture (hors travaux en cours sur la souche B3 récemment isolée).

En ce qui concerne la flottation assistée sans déstabilisation, une très légère séparation est constatée sur certains essais mais il semble que cette dernière soit limitée aux débris de culture (cellules en décomposition,...).

Contrairement à ce qui pouvait être supposé vu le caractère hydrophobe de *D. salina* cultivée au-delà d'une salinité de $3M$, rapporté dans le brevet de Curtain & Snook (1985), aucune flottation efficace n'a été mise en évidence pour des salinités même supérieures à celle avancée. Ceci peut s'expliquer par le caractère déterminant de la souche de *Dunaliella salina* utilisée dans le cas d'une flottation sans déstabilisation. Étant donné le choix fait par le consortium des partenaires du projet Salinalgue, de maintenir l'utilisation des souches LOV et Gruissan, cette étude s'est donc nécessairement centrée par la suite sur les méthodes de déstabilisation des suspensions de microalgues avant de se recentrer sur les procédés de séparation post déstabilisation.

5.5 Conclusions sur la récolte sans déstabilisation

Il a été mis en évidence dans ce chapitre, que dans les conditions testées, les souches de *Dunaliella salina* cultivées ne se séparent pas naturellement de leur milieu de culture. La flottation assistée de ces souches, sans déstabilisation préalable des suspensions, ne s'est pas non plus montrée efficace. Pour permettre d'envisager une séparation par sédimentation ou flottation, une étape de déstabilisation de la suspension peut être ajoutée. Dans cette optique, plusieurs méthodes de déstabilisation sont présentées et étudiées dans le chapitre 6 suivant.

La centrifugation peut par contre être envisagée sans déstabilisation. Si son utilisation comme procédé de récolte mono-étagé a été rapidement écartée, les résultats obtenus ne remettent pas en cause son utilisation en tant que procédé de déshydratation. Des forces centrifuges importantes ne semblant pas engendrer de destruction des microalgues, l'attention sera plutôt portée sur la technologie utilisée, qui définira a priori l'état de la biomasse récoltée.

Le caractère souche-dépendant de ces conclusions doit être souligné. Cette prudence est justifiée

par des travaux en cours, qui seront introduits dans les perspectives générales de ce manuscrit et dans lesquels un caractère auto-floculant est décelé sur une nouvelle souche de *D. salina* isolée.

Chapitre 6

Déstabilisation assistée de la suspension algale

Les expériences retranscrites dans le chapitre 5 précédent ont mis en évidence la nécessité de déstabiliser les suspensions de *D. salina* avant application des procédés de pré-concentration par sédimentation ou flottation. Afin d'assister cette déstabilisation non constatée de manière naturelle, plusieurs solutions ont été envisagées à l'issue de l'analyse bibliographique (voir les conclusions § 2.12).

Même si son inefficacité en eaux hypersalées peut être soupçonnée, la déstabilisation par le chitosane a été testée sur une suspension de *D. salina* (§ 6.1). Ce biopolymère est l'un des coagulants-floculants organiques les plus utilisés pour la récolte de microalgues. La culture dans des eaux proches de la saturation en NaCl et l'évaporation des eaux pour augmenter la salinité en amont de la récolte ont aussi été essayées (§ 6.2). Enfin, la déstabilisation induite par modification du pH de culture, constatée dans d'autres milieux de culture et sur des microalgues différentes, a été testée et mise en œuvre pour *D. salina* (§ 6.3).

Sommaire

6.1 Coagulants-floculants organiques - cas du chitosane 157

6.1.1 Bibliographie spécifique chitosane 157

6.1.2 Test de récolte de *D. salina* par ajout de chitosane 159

6.1.3 Conclusion sur la déstabilisation d'une suspension de *D. salina* par ajout de chitosane 159

6.2 Propriétés hydrophobes de *D. salina* à très hautes salinités 160

6.2.1 Culture de *D. salina* à très hautes salinités 160

6.2.2 Ajustement de la salinité par évaporation avant récolte 161

6.2.3 Conclusion sur la déstabilisation d'une suspension de *D. salina* à très hautes salinités 162

6.3 Floculation induite par modification assistée du pH 163

6.4 Conclusion 166

6.1 Coagulants-floculants organiques - cas du chitosane

L'analyse bibliographique des études sur les coagulants-floculants organiques est proposée dans le chapitre 2.3.2.2. Dans la présente section, le chitosane est sélectionné comme objet d'étude représentant cette classe des coagulants-floculants organiques.

6.1.1 Bibliographie spécifique chitosane

Le chitosane (figure 6.1) est un biopolymère qui suit le comportement d'un polyélectrolyte cationique. Des études ont montré l'efficacité du chitosane notamment en fin de phase exponentielle de croissance (Figure 2.7(b)) sur la floculation de microalgues d'eau douce (Lavoie *et al.*, 1984; Divakaran & Pillai, 2002). Dans ces études, la floculation est observée à des concentrations inférieures à 20 $mg.L^{-1}$ de chitosane dans la suspension. Les auteurs notent qu'une trop grande concentration en chitosane a pour effet d'augmenter la viscosité du milieu, ce qui gêne alors la sédimentation.

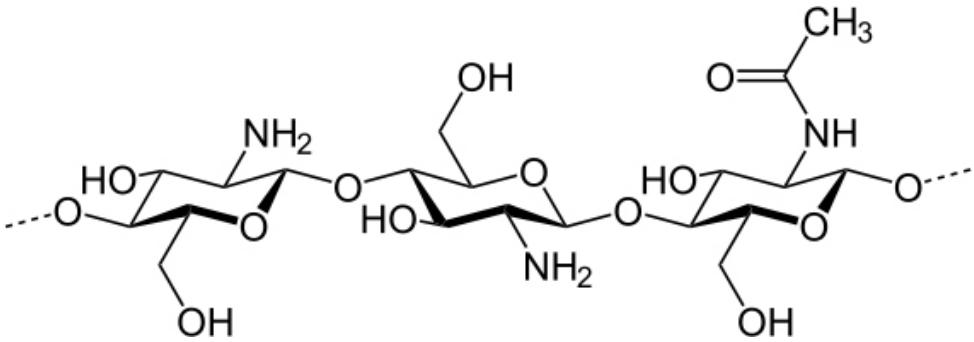


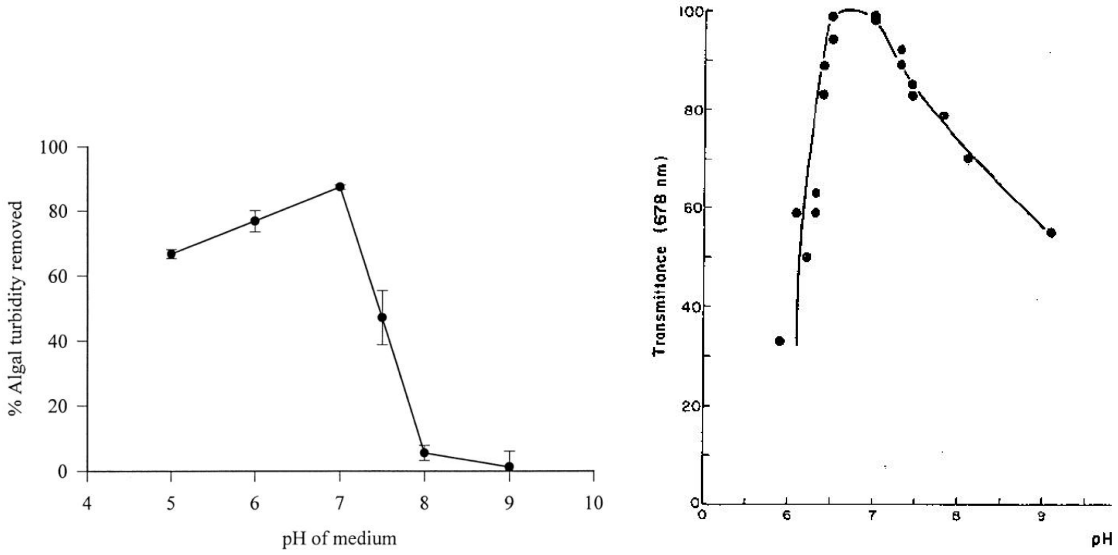
Figure 6.1 – *Unité de base du biopolymère chitosane.*

Rashid *et al.* (2013b) montrent que l'efficacité de séparation de *C. vulgaris* induite par l'ajout de chitosane dépend du solvant dans lequel ce chitosane est dissous. Les meilleures performances sont obtenues dans leur étude avec de l'acide chlorhydrique (autres solvants testés par ordre décroissant d'efficacité de séparation : acide phosphorique, acide nitrique et acide citrique) et pour des concentrations de chitosane de 30 $mg.L^{-1}$. Dans une autre étude des mêmes auteurs, la concentration en chitosane la plus efficace s'avère être 120 $mg.L^{-1}$ (Rashid *et al.*, 2013a).

L'évaluation de la concentration optimale de chitosane permettant la floculation paraît compliquée. En plus des chiffres précédemment cités, pour Riano *et al.* (2012), la plus grande efficacité de floculation est obtenue à des concentrations de 214 $mg.L^{-1}$. Pour Xu *et al.* (2013), la concentration optimale est de l'ordre de 10 $mg.L^{-1}$. Pour Beach *et al.* (2012), avec une dose

optimale de 100 $mg.L^{-1}$ et d'après une analyse de cycle de vie comparative, la floculation au chitosane est plus efficace, d'un point de vue des critères économiques et environnementaux, que la floculation au sulfate de fer, la centrifugation et la filtration en chambre presse.

Outre le solvant utilisé pour dissoudre le chitosane, le pH se révèle aussi être un paramètre essentiel de l'efficacité de floculation (Figure 6.2). Dans l'étude de Divakaran & Pillai (2002), le pH des suspensions est modifié par ajout d'acide chlorhydrique avant la mise en contact avec le chitosane. L'efficacité de récupération est alors maximale pour un pH 7. D'après les auteurs, les flocs produits pour de faibles concentrations en algues sont peu denses et ont tendance à flotter. Ils précisent aussi que les cellules résistent à ce type de floculation et peuvent être de nouveau mises en culture.



(a) (Divakaran & Pillai, 2002) (b) (Lavoie *et al.*, 1984)

Figure 6.2 – *Effet du pH sur l'efficacité de suppression d'algues d'eau douce lors d'une floculation au chitosane.*

Dans une autre étude, la floculation au chitosane de *Chlorella* est maximale à pH 8, les autres pH testés étant 5,5 et 7 (Cheng *et al.*, 2011b). Il est aussi suggéré que de grandes concentrations en polysaccharides membranaires sont dans ce cas favorables à la floculation. La présence de forces intermoléculaires type liaison hydrogène est supposée pour expliquer la floculation qui ne serait pas ici, la résultante du phénomène de neutralisation de charge. Il n'existe en réalité pas de vrai consensus sur le mécanisme de floculation induit par l'ajout de chitosane. Tenney *et al.* (1969) parlent de neutralisation de charges de surface et/ou de pontage entre les algues.

Comme précisé précédemment, l'efficacité de récolte avec les polyélectrolytes cationiques chute avec l'augmentation de la force ionique (Figure 2.8). Étant données les forces ioniques rencontrées dans les cultures de *D. salina*, l'analyse bibliographique ne laisse que peu d'espoir en ce qui concerne la déstabilisation de cette microalgue par ajout de chitosane.

6.1.2 Test de récolte de *D. salina* par ajout de chitosane

Pour ce test, 100 mg de chitosane sont dissous dans 10 mL d'acide chlorhydrique à 0,1M. La solution obtenue est complétée avec de l'eau déminéralisée pour atteindre 100 mL, soit une concentration pour la solution de chitosane préparée de 1 $g.L^{-1}$. 6 jartests contenant 350 mL d'une suspension algale de *D. salina* (souche Gruissan cultivée dans une eau synthétique hypersalée Ifremer) sont préparés. Le pH de la suspension avant tentative de récolte est de 7,5.

Initialement, la gamme de concentrations de chitosane ajouté s'étale entre 5 $mg.L^{-1}$ et 50 $mg.L^{-1}$ de suspension initiale. La solution de chitosane est donc ajoutée dans différentes proportions dans chacun des jartests, une agitation à 100 RPM est maintenue pendant 3 min, puis interrompue pour observer les déstabilisations et séparations éventuelles.

Sur la gamme initiale testée, ni floculation, ni séparation ne sont observées. La solution de chitosane restante est alors ajoutée progressivement au jartest le plus concentré. Au-delà de 100 $mg.L^{-1}$, une très légère floculation de ce qui semble être des déchets de culture est observée. Ces quelques flocs décantent mais la séparation globale reste négligeable. La concentration en chitosane dans la suspension est portée jusqu'à 150 $mg.L^{-1}$, sans que de séparation caractérisable ne soit constatée.

Les échantillons portés à 20 $mg.L^{-1}$ et 150 $mg.L^{-1}$ sont placés dans le flottatest (voir matériel et méthodes spécifiques flottation § 5.4.1). Aucune flottation n'est observée après injection de milieu de culture pressurisé à 6 $bars$. La suspension n'est pas déstabilisée par ajout de chitosane dans ces proportions.

6.1.3 Conclusion sur la déstabilisation d'une suspension de *D. salina* par ajout de chitosane

La déstabilisation des suspensions hypersalines de *D. salina* par ajout de chitosane ne peut être envisagée. En effet, aucune déstabilisation n'a été constatée jusqu'à des concentrations de 150 $mg.L^{-1}$ de suspension initiale. Sachant qu'une culture extérieure autotrophe de *D. salina* n'excède par 0,5 $g_{MS}.L^{-1}$, la concentration maximale en chitosane testée représente déjà une consommation de 300 mg de chitosane par gramme de matière sèche récoltée. Dans l'éventualité où une déstabilisation serait constatée pour des concentrations en chitosane supérieures à 150 $mg.L^{-1}$, le procédé ne serait pas économiquement envisageable. En effet, le prix du marché du chitosane tourne autour de 10 – 20$/$kg$ en 2013, soit 3,3 – 6,6$/$kg_{MS}$ minimum si la séparation s'avère efficace.

6.2 Propriétés hydrophobes de *D. salina* à très hautes salinités

Dans le brevet de Curtain & Snook (1985), le caractère hydrophobe des souches de *D. salina* cultivées est mis en évidence pour des cultures à salinité supérieure à $3M$ en NaCl. Le même caractère hydrophobe est rencontré lors de l'ajustement de la salinité de la suspension au-dessus de $3M$ (soit environ 175 $g.L^{-1}$) avant la récolte. Ces deux possibilités de déstabilisation ont été testées dans cette étude.

6.2.1 Culture de *D. salina* à très hautes salinités

Pour cette expérience, trois saumures synthétiques ont été préparées, « Saumure synthétique 10% » « Saumure synthétique 17,7% » et « Saumure synthétique 22,6% ». Les quantités de sels ajoutées à de l'eau du robinet ont été définies grâce à des mesures Dionex réalisées au LISBP sur des eaux naturelles et à une table des concentrations de saumures (confidentielle). Les concentrations des eaux préparées sont rappelées dans la table 4.2. Pour assurer une dissolution maximale des sels proches de la saturation pour certains, une agitation de 30 h a été nécessaire. Les quelques sels non dissous suite à cette période d'agitation ont été retirés par décantation, pour réduire la turbidité des saumures et faciliter ainsi la culture des microalgues.

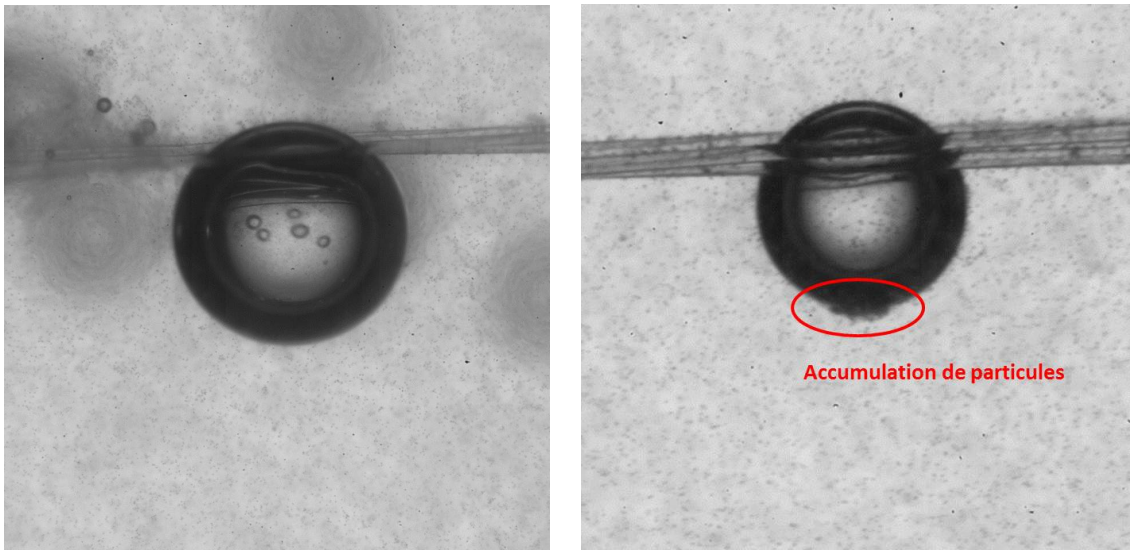
Le choix des salinités n'est pas anodin. Pour éviter les erreurs d'interprétation du brevet de Curtain & Snook (1985) qui parle de « saumure » en caractérisant uniquement la concentration en NaCl, il a été décidé de préparer une saumure dont la concentration en NaCl était supérieure à $3M$ (3,4M en l'occurrence pour une salinité totale de 22,6%) et une saumure dont la concentration en NaCl était légèrement inférieure à $3M$ (2,6M pour une saumure de salinité totale 17,7%). Cette dernière saumure a par contre une salinité totale supérieure à la salinité d'une solution contenant uniquement du NaCl à $3M$. La saumure à 10% sert de témoin.

3 cultures de souche LOV, carencées en azote, sont menées dans des PBR de 2,5 L, agités par un léger bullage d'air. Ces cultures ne disposent pas de régulation automatique du pH (ajout ponctuel de CO_2 si pH trop important).

En fin de culture, les salinités respectives des suspensions étaient de 11%, 20,3% et 23,3%, à cause d'une légère évaporation. Les ratios respectifs car/chl des suspensions avant tentative de récolte étaient de 5,8, 3,0 et 1,8. Les tests de récolte ont été réalisés lorsque les DO_{800} des suspensions étaient comprises entre 0,3 et 0,5.

Des observations macrophotographiques (voir description du dispositif § 3.9) de l'interaction bulle/microalgues ont laissé dans un premier temps penser que les algues pouvaient être

hydrophobes à des salinités de 22,6%. En effet, sur la figure 6.3 on remarque dans la zone inférieure de la bulle mise en contact 30 minutes plus tôt avec la suspension à 22,6%, une accumulation de particules non reproduite sur le témoin à 10%. Ces particules ont finalement été identifiées comme étant des débris de culture, nombreux dans la suspension à 22,6%.



(a) Culture témoin 10%

(b) Saumure 22,6%

Figure 6.3 – *Observations macrophotographiques de l'interaction bulle/microalgues dans des cultures de salinités différentes. Prises de vues* 30 *min après la mise en contact, diamètre des bulles* 1 *mm.*

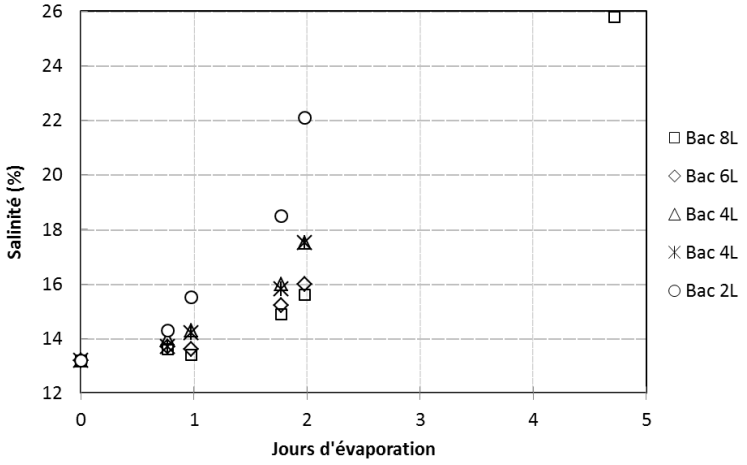
Lors d'expériences réalisées en flottatest (voir matériel et méthodes § 5.4.1), ni décantation naturelle, ni flottation naturelle, ni flottation assistée (excepté de quelques débris de culture), n'ont été observées sur les 3 cultures. La flottation étant connue pour sa capacité à séparer les particules hydrophobes, ce résultat semble indiquer que le caractère hydrophobe constaté dans le brevet Australien pourrait être souche-dépendant.

6.2.2 Ajustement de la salinité par évaporation avant récolte

Cette expérience a été réalisée en extérieur, sur le site de Gruissan, pendant la période estivale. Une culture carencée de souche LOV dans un assemblage d'eaux des salins à 13% a été prélevée dans une gaine de culture de 500 L. 5 bacs de couleur noire en polyéthylène ont fait office de bac d'évaporation (photo 6.4(a)). Des volumes de 2, 4, 6 et 8 L de suspension algale ont été ajoutés dans les bacs respectifs en début d'expérience (plus un réplicat pour 4 L). Ces bacs ont été placés à l'extérieur et soumis aux conditions naturelles d'ensoleillement et de vent. Les bacs étant identiques, il s'agissait de faire des expériences avec des hauteurs différentes de suspension

algale. Le débit d'évaporation surfacique étant a priori identique pour tous les bacs, l'idée était de faire varier la vitesse d'augmentation de la salinité.

(a) Bacs d'évaporation



(b) Salinité dans les différents bacs

Figure 6.4 – *Expérience sur l'ajustement de la salinité par évaporation avant récolte.*

De nombreux paramètres ont été relevés sur chaque bac durant l'expérience, au cas où la déstabilisation s'avèrerait effective : hauteur d'eau, salinité, DO_{680}, DO_{800}, comptage, pH, température bac, température extérieure, vitesse du vent, taux d'humidité, observation lame fraîche.

La déstabilisation n'étant pas observée quelles que soient les conditions testées, il a été choisi de ne présenter ici que la salinité des différents bacs en fonction du nombre de jours d'évaporation (figure 6.4(b)). Des tests de flottation ont été effectués le premier jour sur la culture initiale, le jour 2 et le jour 5 sur tous les bacs. Le jour 2, seul le bac de 2 L avait passé le seuil de salinité avancé dans le brevet de Curtain & Snook (1985). Tous les bacs avaient dépassé ce seuil le jour 5.

Aucune flottation effective n'a été constatée sur cette expérience. Ceci vient appuyer les conclusions précédentes sur le facteur souche-dépendant du caractère hydrophobe.

6.2.3 Conclusion sur la déstabilisation d'une suspension de *D. salina* à très hautes salinités

Les expériences menées dans cette étude confrontées à celles retranscrites dans le brevet de Curtain & Snook (1985), poussent à conclure que le caractère hydrophobe de *D. salina* à très hautes salinités est souche-dépendant. Les 2 souches étudiées jusqu'à présent dans le cadre du

projet Salinalgue ne présentent pas ce caractère.

2 choix s'offrent alors : sélectionner une souche présentant un caractère hydrophobe passé certaines salinités ou se tourner vers une autre méthode de déstabilisation. Le premier choix n'ayant pas été sélectionné par l'ensemble des partenaires Salinalgue (du moins pas avant l'isolement de la souche baptisée « $B3$ » en cours d'étude), c'est vers une autre méthode de déstabilisation que s'est tournée cette étude.

6.3 Floculation induite par modification assistée du pH

De nombreux travaux antérieurs sur la floculation induite par modification du pH ont été présentés dans le chapitre 2.3.3. Dans les études de décantation et de flottation naturelles recensées dans les chapitres 5.3.2 et 5.4.2, il n'a pas été observé de floculation induite par modification naturelle du pH. Cette expérience porte donc sur la modification assistée du pH dans une suspension de *D. salina*.

Pour cette première expérience présentée ici, la plateforme de culture étant en cours de mise en place au LISBP, la suspension algale utilisée a été fournie par l'entreprise Greensea. Il n'a pas été possible d'obtenir la composition exacte du milieu de culture, ni la description exacte de la souche. Le fournisseur a tout de même assuré que cette dernière aurait été isolée sur les salins de Gruissan et cultivée dans une eau de mer dopée en NaCl. La salinité relevée au réfractomètre est de 13%. Le pH des suspensions n'étant pas encore limité, il varie entre 7,87 et 9,06 selon l'heure et le jour de prélèvement des échantillons de 300 mL.

Ce pH est modifié par ajout d'une solution mère de NaOH à $1M$ sous agitation mécanique dans le flottatest (voir matériel et méthodes § 5.4.1). La figure 6.5 présente l'évolution du pH en fonction de la quantité de soude ajoutée par litre de suspension initiale. Le pH de la suspension atteint très rapidement des valeurs supérieures à 10. Un effet tampon est ensuite observé. Le pH augmente avec l'ajout de soude, mais de manière beaucoup plus progressive. Si le pH initial varie selon les jours et les heures de manipulation, il semble que le pH de la phase tamponnée ne soit pas fonction du jour ou de l'heure de manipulation.

Des flocs se forment instantanément avec l'ajout de soude. Lors de l'interruption de l'agitation, ces flocs décantent rapidement dans un premier temps mais lorsque beaucoup de soude est ajoutée, la décantation se complique. Plus la quantité de soude ajoutée est importante, plus la phase microalgale décantée est volumineuse.

De l'eau synthétique hypersalée Ifremer pressurisée à 6 *bars* est ajoutée dans chacun des échantillons pour atteindre un volume final de 500 mL. De même que lors de la décantation, les flocs flottent rapidement lorsque peu de soude est ajoutée à l'échantillon et cette flottation se

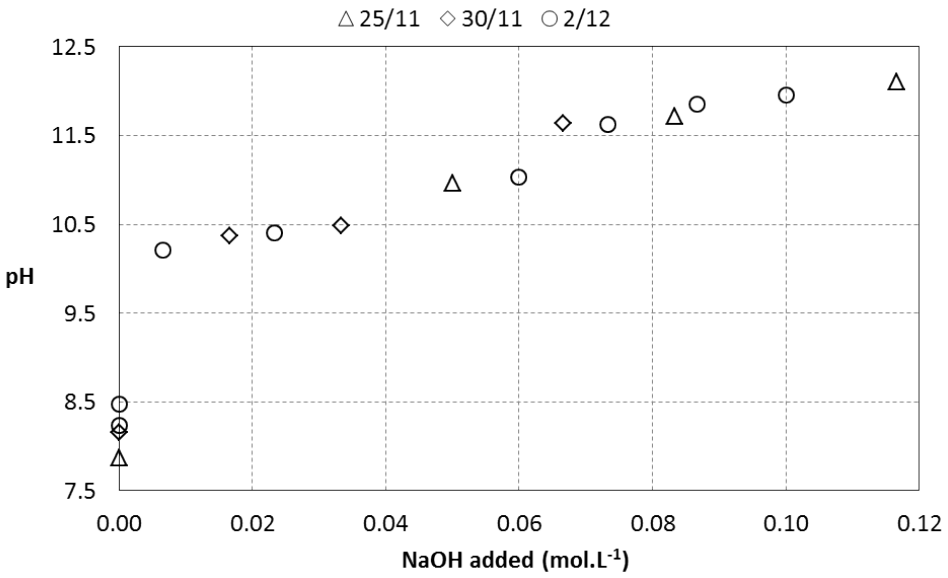


Figure 6.5 – *Évolution du pH d'une suspension de D. salina lors de l'ajout de soude. Tests classés par jour de réalisation.*

complique pour les échantillons plus concentrés. Plus la quantité de soude ajoutée est importante, plus la phase microalgale flottée est volumineuse.

Les performances de flottation sont caractérisées en fonction du pH avant flottation et de la concentration de soude ajoutée par échantillon (figures 6.6). En effet, étant données la présence d'un effet tampon sur l'augmentation du pH et les difficultés de caractérisation de ce dernier en eaux hypersalées, il est apparu judicieux de ne pas présenter les résultats qu'en fonction du pH (contrairement à ce qui est proposé dans la littérature). De plus, la caractérisation du facteur de concentration, souvent oublié dans la littérature, paraît essentielle pour une bonne caractérisation des performances de séparation.

L'efficacité de récupération augmente très rapidement pour atteindre des valeurs supérieures à 90% à partir de 0,03 $mol.L^{-1}$ de soude ajoutée et d'un pH de 10,5. Le facteur de concentration décroît lui rapidement lorsque la concentration en soude augmente. Ces résultats quantitatifs confirment les observations qualitatives proposées ci-dessus. Il est possible de définir une « concentration optimale de soude » pour laquelle la quantité souhaitée de microalgue est récupérée (à définir selon le recyclage ou non du milieu de culture) et concentrée dans un volume minimal.

La déstabilisation induite par modification assistée du pH est donc bien efficace sur la suspension de *D. salina* traitée. Reste à voir si cette déstabilisation peut être reproduite sur les suspensions de *D. salina* produites dans le cadre du projet Salinalgue. Il faudra ensuite optimiser son utilisation pour essayer de réduire la quantité de base injectée dans l'opération.

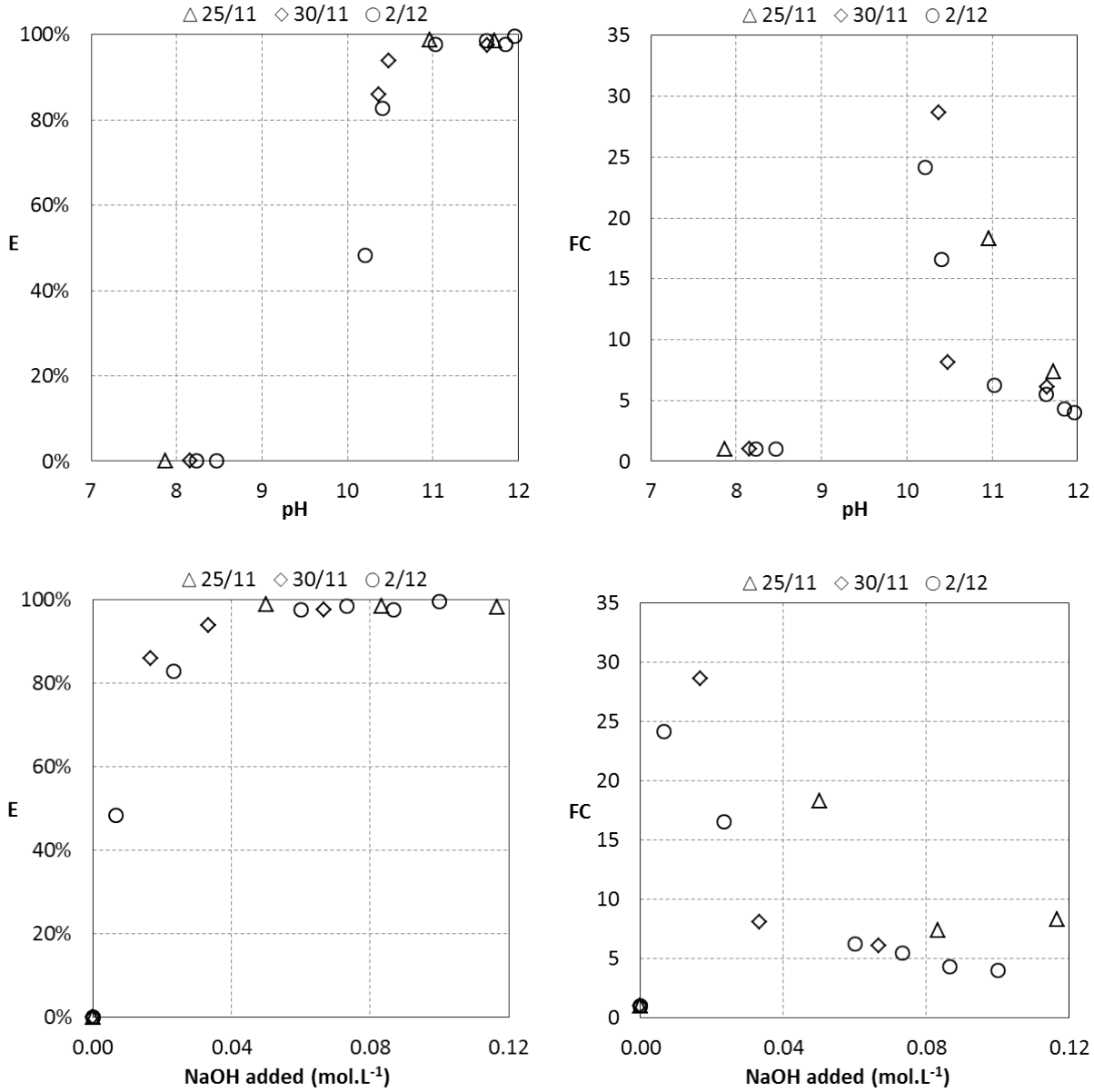


Figure 6.6 – *Performances de flottation post modification assistée du pH par ajout de soude. Tests classés par jour de réalisation.*

6.4 Conclusion

Suite à l'analyse bibliographique des méthodes de déstabilisation envisageables et à la confrontation aux impératifs de valorisation du projet Salinalgue, plusieurs méthodes avaient déjà été écartées (§ 2.12). Restaient alors pour parvenir à la déstabilisation des suspensions de *D. salina*, l'ajout de floculant organique, la récolte en milieux de culture à très hautes salinités ou la modification assistée du pH. Suite à cette phase de tests expérimentaux, le choix s'est affiné.

Comme anticipé dans l'analyse bibliographique, l'ajout de chitosane s'est révélé non efficace aux forces ioniques rencontrées dans les milieux de culture de *D. salina*. Les souches utilisées dans le cadre du projet Salinalgue n'ont pas révélé de caractère hydrophobe à très haute salinité. A contrario, la floculation induite par modification assistée du pH, s'est avérée très efficace et son couplage avec une étape de flottation très prometteur.

Dans la suite du manuscrit, les travaux s'attacheront dans un premier temps à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans ce couplage (§§ 7 et 8). Les pistes d'optimisation du procédé global seront ensuite explorées en observant l'influence de plusieurs paramètres opératoires sur les performances de récolte (§ 8), pour finalement permettre la mise en œuvre à l'échelle semi-industrielle de ce couplage floculation-flottation (§ 9).

Chapitre 7

High-pH-induced flocculation-flotation of the hypersaline microalga *D. salina*

Ce chapitre est une reprise exacte de la publication de Besson & Guiraud (2013). Il est rédigé en anglais, seules une introduction et une conclusion sont proposées en français. Le lecteur ayant déjà pris connaissance du chapitre 1 et de la section 2.3.3 peut directement commencer la lecture à partir de la section 7.3, les sections 7.1 et 7.2 étant un condensé de ce qui a déjà été lu.

Dunaliella salina est l'une des principales espèces de microalgues produites en bassins ouverts dans le monde. Elle est essentiellement cultivée pour sa capacité à produire du β-carotène, une molécule à haute valeur ajoutée. Dans l'optique de valoriser d'autres métabolites de cette microalgue, l'optimisation de l'étape de récolte de *D. salina* s'avère essentielle.

Actuellement *D. salina* est récoltée à l'échelle industrielle par centrifugation ou par adsorption sur particules hydrophobes. Il a été vu plus tôt dans ce manuscrit, que le premier procédé ne pouvait être utilisé seul que dans le cas d'une valorisation à haute valeur ajoutée. Pour le second, les souches étudiées dans le cadre du projet Salinalgue ne semblent pas revêtir les caractéristiques nécessaires pour permettre une adsorption efficace sur des particules hydrophobes. D'autres procédés doivent donc être explorés. *D. salina* ne flottant ou ne sédimentant pas naturellement, une déstabilisation préalable de la suspension est nécessaire pour permettre une séparation efficace.

Suite aux expériences décrites dans le chapitre 6, la floculation induite par augmentation du pH lors de l'ajout de soude a été choisie dans cette étude pour permettre la flottation. Les performances de floculation-flottation obtenues dans des eaux hypersalines sont présentées ici. En s'appuyant sur des observations macroscopiques, des suivis de pH, des analyses ioniques du milieu et des observations au microscope électronique à balayage, une explication des

mécanismes mis en œuvre est proposée. Dans l'optique de transférer le procédé à l'échelle industrielle, l'influence de la cinétique d'injection de base est caractérisée et la possibilité de recycler le milieu de culture est envisagée.

Sommaire

7.1 Introduction **169**
7.2 Background on pH-induced flocculation **170**
7.2.1 Natural or chemical pH-induced autoflocculation 171
7.2.2 pH-induced autoflocculation in wastewater treatment 171
7.2.3 pH-induced flocculation for freshwater and seawater microalgae harvesting 172
7.3 Materials and methods **173**
7.3.1 Strain and culture conditions 173
7.3.2 Flotation experiments 174
7.3.3 pH-induced flocculation-flotation by NaOH addition 174
7.3.4 Evaluation of flotation performance 175
7.3.5 Flocculation-flotation mechanism 175
7.3.6 Influence of the flow rate of NaOH addition 176
7.4 Results and discussion **177**
7.4.1 Preliminary observations 177
7.4.2 High-pH-induced flocculation-flotation performances 179
7.4.3 High-pH-induced flocculation-flotation mechanism in hypersaline waters 181
7.4.4 Influence of flow rate of NaOH addition 185
7.5 Conclusions **185**
7.6 Reprise des conclusions et perspectives **186**

7.1 Introduction

Microalgae can grow on non-arable land and in non-potable water, with a high rate of biomass production. Their CO_2 fixation capacity and their ability to generate various valuable bioproducts make them of interest in attempts to reduce the environmental footprint of mankind.

The hypersaline microalga *Dunaliella salina* is one of the main strains of microalgae currently cultivated in open ponds, in particular for its ability to produce β-carotene. This mobile unicellular green microalga can also accumulate lipids, and can thus provide an interesting alternative to fossil fuels (Mishra *et al.*, 2008). However, although *D. salina* cultivation is already cost-effective for high-value products, the global production process of the bulk product as biodiesel requires optimization to reach the break-even point.

Harvesting the biomass induces most of the production cost of microalgae products, so improvement in this field is of paramount importance. Only low cell densities can be achieved in open pond culture and the large volumes of suspension that have to be treated increase the difficulty of downstream processes. In consequence, a multi-step process, with a low-cost pre-concentration step, needs to be implemented for the harvesting of microalgae. Their small size (around 10 μm for *D. salina*) and the electrostatic repulsion due to their negative charge complicate the concentration of microalgae (Shelef *et al.*, 1984). Furthermore, *D. salina* lacks a rigid polysaccharides cell wall (Jin & Melis, 2003) and its elastic plasma membrane is sensitive to shear force (Borowitzka, 1991).

Recently, Hosseini Tafreshi & Shariati (2009) reviewed harvesting methods of *D. salina*. Continuous centrifugation with automatic discharge used in Israel is effective but investment and operational costs limit its use to high value products or in second-step concentration (Ben-Amotz & Avron, 1990). In Australia, recovery by adsorption on an hydrophobic solid material is used with success in large-scale and dilute culture (Curtain, 2000). In laboratory raceway scale, Fernandes *et al.* (1997) used a mild method of pre-concentration by freshwater addition patented by Bloch *et al.* (1982). Coagulation-flocculation using multivalent metal salts could also be efficient, but the presence of the flocculating chemicals in the algal sludge de facto excludes some valuations as in aquaculture (Molina Grima *et al.*, 2003).

Considering the characteristics mentioned above, pH-induced flocculation-flotation is presented in this study as a solution to pre-concentrate the biomass while maintaining the integrity of non-harvested cells and preserving the products of interest in the sludge. This leaves the possibility of a new culture inoculated with non-harvested biomass and allows avoiding oxidation of β-carotene during recovery step. Flocculation of many strains of microalgae can be induced by increasing the pH. The pH of the culture can increase naturally due to inorganic carbon consumption by the photosynthetic activity of the microalgae, and this phenomenon can be used to harvest them at low cost. Several recent studies have looked into flocculation induced by increasing the

pH, followed by sedimentation (Castrillo *et al.*, 2013; Schlesinger *et al.*, 2012; Sirin *et al.*, 2012; Vandamme *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). The mechanism of pH-induced flocculation has been investigated in freshwater, seawater and wastewater (see background in section 7.2) but no study has been reported on the hypersaline waters in which *D. salina* is cultivated, neither are there any studies on the coupling of pH-induced flocculation and flotation. Considering that gravitational drainage of the liquid in the flotation foam gives a better concentration of the algal biomass than is obtained by sedimentation (Coward *et al.*, 2013), this coupling may be interesting. Savings made by reducing the volumes of suspension to be treated in downstream processes may be greater than the cost of bubble production.

Horiuchi *et al.* (2003) used successfully pH-induced flocculation-sedimentation on *Dunaliella tertiolecta* cultivated in seawater medium, but this method has yet not tested for *D. salina* and no test was realized with flotation. According to the results of recent study that supports the importance of the magnesium concentration (Vandamme *et al.*, 2012), the high magnesium concentration in the *D. salina* culture medium (4 times higher than those used by in Horiuchi et al.) could improve recovery efficiency.

In this study, the pH of suspension samples was adjusted with sodium hydroxide solution (NaOH). The performances of pH-induced flocculation-flotation in a hypersaline culture of *D. salina* were investigated, considering the recovery efficiency and the concentration factor of the biomass. The underlying mechanism of flocculation-flotation induced was investigated using ionic species mass balances and Scanning Electron Microscope analysis with Energy-Dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) in order to characterize the precipitate formed during NaOH addition. Finally, the influence of flow rate of NaOH was characterized to assess the feasibility of using the natural pH increase that occurs slowly due to photosynthetic activity. The result can also be used to anticipate the use of the NaOH pretreatment on an industrial scale.

7.2 Background on pH-induced flocculation

Golueke & Oswald (1965) first mentioned natural floc formation in microalgae that were photosynthetically active in shallow pond during warm, sunny days. Many authors have studied this phenomenon since then, initially in the field of water treatment and more recently with the aim of harvesting microalgae.

Two different mechanisms have been proposed to explain this microalgal flocculation with pH increase. Flocculation can be caused by the precipitation of inorganic compounds from the culture medium, in which case the phenomenon is often called autoflocculation, or by changing the physiology of algae or species in co-culture (Lee *et al.*, 2009; Salim *et al.*, 2012; Zhang & Hu, 2012; Markou *et al.*, 2012), which is often referred to as bioflocculation. Concerning

bioflocculation, extracellular polymeric substances (EPS) exuded in stress condition by algae or other species are presented as flocculants of the biomass. Considering the results of the present study, bioflocculation will not be treated here.

7.2.1 Natural or chemical pH-induced autoflocculation

pH increase and the resultant flocculation of microalgae can be induced naturally or by adding a base, depending on the species and environments considered. Sukenik & Shelef (1984) found that natural flocculation of *Scenedesmus dimorphus* was obtained simply by ceasing pond agitation and cutting off the CO_2 supply in an outdoor culture. In a recent study, it was shown that the diatom *Phaeodactylum tricornutum* could naturally increase the pH of a culture to higher than its pH of flocculation (Spilling *et al.*, 2011). Different behaviour was observed with the green microalga, *Scenedesmus obliquus* : the pH of the culture could increase but not enough to achieve flocculation, for which the addition of a base remained necessary (Lavoie & Delanoue, 1987; Spilling *et al.*, 2011). In all cases, the amount of chemical inputs could be reduced by judicious use of the photosynthetic activity of microalgae. Bearing this in mind, the terminology autoflocculation is conserved in this study even if a base is added.

7.2.2 pH-induced autoflocculation in wastewater treatment

Initial studies concerning autoflocculation focused on the removal of algae for water treatment purposes. In this case, the increase in pH was usually obtained by adding lime to sewage, thus inducing precipitation of calcium carbonate, calcium orthophosphate and magnesium hydroxides. Folkman & Wachs (1973) showed that the positively charged magnesium hydroxide was the main factor in a microalgal flocculation process by charge neutralization, while negatively charged calcium carbonate had little influence. In the study performed by Leentvaar & Rebhun (1982), both $CaCO_3$ and $Mg(OH)_2$ were considered effective for wastewater clarification. However, it was proposed that $CaCO_3$ acted by the sweep coagulation mechanism affecting large colloidal material and that $Mg(OH)_2$ acted by an adsorptive coagulation mechanism affecting stable organic colloids such as microalgae.

Other bases than lime can be added to induce autoflocculation in water treatment. Interesting results have been reported for the use of dolomite in softening water and removing algae by adsorption on calcium carbonate and magnesium hydroxide (Dziubek & Kowal, 1989). Sodium hydroxide and calcium hydroxide have also been successfully for solid abatements in wastewater

(Yahi *et al.*, 1994).

Semerjian & Ayoub (2003) have reviewed high-pH-magnesium coagulation-flocculation in wastewater treatment. All studies conclude on the importance of magnesium concentration and magnesium hydroxide precipitation in the wastewater treatment process by increased pH. The natural concentration of magnesium in seawater or brine means that its addition to wastewater can improve the flocculation of microalgae by pH increase (Elmaleh *et al.*, 1991). This is interesting for the present study, in which the alga *D. salina* is grown in brine with high magnesium concentration.

7.2.3 pH-induced flocculation for freshwater and seawater microalgae harvesting

Gradually, studies have started to focus on the harvest of microalgae for multiple value-added products. In this field, many studies assume that the flocculation of algae in freshwater and seawater is also caused by the precipitation of a positively-charged compound.

Initially, Sukenik & Shelef (1984) showed that the concentrations of calcium and orthophosphate were correlated with the efficiency of microalgae autoflocculation in the freshwater under study. They considered positively-charged calcium phosphate precipitates as the flocculating agent that neutralized the negatively charged surface of the algae and promoted aggregation. More recent studies have suggested that precipitation of calcium and magnesium occurs in freshwater after the increase in pH, but only magnesium hydroxide precipitation is capable of inducing flocculation of *Chlorella* by charge neutralization (Vandamme *et al.*, 2012). In their patent, Zhang & Crowell (2011) use this precipitation of magnesium hydroxide and the adsorption of negatively-charged microalgae and magnetic particles to harvest the biomass.

In addition to the often cited charge neutralization phenomenon after magnesium hydroxide precipitation, a sweeping flocculation phenomenon was proposed to explain the good efficiencies of freshwater and seawater microalgae harvesting (Wu *et al.*, 2012). Microalgae were enmeshed in the growing precipitate and formed sediment, which considerably improved the flocculation efficiency. A recent study assumes that the concentration of base necessary is a logarithmic function of the concentration of algae in the medium. It is therefore proposed that the flocculation is not only the result of the neutralization of algae by positively-charged precipitate but that the probability of collision between cells also affects the efficiency of flocculation (Schlesinger *et al.*, 2012).

In addition to an understanding the phenomenon of flocculation, the choice of the base used to induce flocculation is essential to improve the separation efficiency. Sodium hydroxide is often

used at laboratory scale for practical reasons. However, Vandamme *et al.* (2012) suggested that considering cost, risk and flocculation efficiency, slaked lime would be preferable to sodium hydroxide, potassium hydroxide and magnesium hydroxide for the industrial process. Better performance with slaked lime was confirmed in a recent study, but the presence of $CaCO_3$ in the microalgal sludge complicates the downstream processes of biofuel production (Castrillo *et al.*, 2013). The addition of ammonia in cultures is less common but also effective to harvest different freshwater and seawater algae strains (Chen *et al.*, 2012).

Knuckey *et al.* (2006) have shown that hydroxides precipitated during flocculation are dissolved slowly after the neutralization of algal sludge with acid, which could have consequences for downstream processing. For many studies, a pH-induced flocculation method allows the flocculated medium to be reused after neutralization (Chen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012), but magnesium will need to be added to the medium to compensate for its gradual depletion due to precipitation (Castrillo *et al.*, 2013; Vandamme *et al.*, 2012).

In a study of high-pH-induced flocculation for *Dunaliella tertiolecta*, Horiuchi *et al.* (2003) obtained recovery rates of algae of over 90% and concentrations of up to 15 $g.L^{-1}$ of dry matter after sedimentation. They also showed that the non-harvested microalgae could serve as inoculum for a new culture. The fact that *D. salina* is grown in waters with high magnesium concentrations (see § 7.3.1), together with these results on a species of the same genus, justify the use of pH-induced flocculation to destabilize the suspension before flotation. Furthermore, with flotation it is possible to achieve higher concentration of dry matter than in the case of sedimentation thanks to the gravitational drainage of the liquid in the foam.

7.3 Materials and methods

7.3.1 Strain and culture conditions

The strain of *D. salina* was isolated from ponds of the Gruissan salt marshes (Aude, France). The alga was acclimatized and grown in a hypersaline synthetic salt-marsh water (SSW) containing the following components : NaCl (107 $g.L^{-1}$) ; MgSO4.7H2O (4.8 $g.L^{-1}$) ; MgCl2.6H2O (4.0 $g.L^{-1}$) ; CaCl2 (1.1 $g.L^{-1}$) ; KCl (0.1 $g.L^{-1}$) dissolved in dechlorinated tap water. A complete Conway culture medium was added. This non-axenic monoculture was achieved in a 10-L glass photobioreactor. The culture was continuously aerated and mixed by the gentle bubbling of $0.2-\mu m-filtered$ atmospheric air (2 $L.min^{-1}$). Illumination was provided by daylight fluorescent tubes (OSRAM FQ 965 Biolux) with a 16 h light/8 h dark cycle. The pH was automatically limited to 8 by a JBL™ pH controller using CO_2 bubbling and connected to a Mettler Toledo

pH electrode for oxidizing media (InPro™ 4800/120/$PT$1000), calibrated with buffers of pH 7.01 and 10.01. The temperature of the culture was regulated by air-conditioning at 21 ± 3 °C.

Growth of the microalgae was monitored by evaluating the absorbance at 800 nm to prevent possible modification of *D. salina* pigmentation (Griffiths *et al.*, 2011). A preliminary study had shown that, under the conditions considered, the optical density at 800 nm was proportional to the *D. salina* cell concentration evaluated with a Malassez hemocytometer.
Flocculation-flotation tests were performed after reaching the stationary phase. After each sampling of algal suspension, the same volume of new culture medium (SSW + Conway medium) was added to complete the photobioreactor.

7.3.2 Flotation experiments

Dissolved Air Flotation (DAF) experiments were achieved in a Multiplace Orchidis™ Flottatest. Three flotation-test beakers were run simultaneously, in which $600 - mL$ samples were collected from the algal culture and added to each beaker. The assays were carried out at dry biomass concentrations between 0.4 and 0.6 $g.L^{-1}$. This is the concentration range expected in open pond cultures.
The depressurization at atmospheric pressure of culture medium (SSW + Conway) free of algae and saturated by air at 6 bars induced the formation of bubbles. Free culture medium was pressurized for 15 minutes before injection into the beakers. The injection was controlled by a solenoid valve and 200 mL of pressurized culture medium was added to each beaker sample (Recycle Ratio = pressurized culture medium volume/initial sample volume = 33%).

A preliminary study showed that, under the previously described culture conditions, this strain of *D. salina* did not float without destabilization, even if CO_2 injection was stopped under favourable light conditions to allow natural pH increase. Consequently, a pH-induced flocculation step was added to the general flotation set-up.

7.3.3 pH-induced flocculation-flotation by NaOH addition

Before flotation, addition of sodium hydroxide to samples of microalgae culture induces floc production. NaOH solutions were prepared with deionized water at the required concentrations (0.1 to 1 M depending on the rate of NaOH addition, see § 7.3.6). A syringe pump controlled the flow rate at which NaOH solutions was added. Mechanical mixing (40 rpm) allowed the suspension to be homogenized and was stopped 2 minutes after the end of NaOH addition to

observe the behaviour of flocs. Pressurized free culture medium was added, at the bottom of the beaker, 5 minutes after the end of NaOH addition to allow flotation of flocs. Mixing induced by pressurized culture medium injection caused the re-suspension of the flocs and bubble formation caused their flotation.

A pH data logger, connected to a Mettler Toledo pH electrode for oxidizing media calibrated with pH 7.01 and 10.01 buffers, continuously measured the pH of the suspension during the addition of NaOH.

7.3.4 Evaluation of flotation performance

Recovery efficiency (E) and concentration factor (CF) based on optical density measurements were determined to evaluate flotation performances. E represents the quantity of algae floated compared to the amount in the initial suspension. CF represents the ratio between the algal concentration in floated phase and the concentration in the initial suspension. E and CF were evaluated according the following equations :

$$E(\%) = (1 - \frac{OD_a V_a}{OD_i V_i}) \times 100 \tag{7.1}$$

$$CF = \frac{OD_i V_i - OD_a V_a}{OD_i V_c} \tag{7.2}$$

where OD_i and V_i are the initial optical density at 800 nm and the volume of algal suspension (before NaOH addition and flotation), OD_a, V_a and V_c are respectively the optical density at 800 nm of the aqueous phase, the volume of the aqueous phase and the volume of the floating phase, 10 minutes after injection of pressurized culture-free medium. Calibrated graph paper stuck onto the beaker was used to evaluate the volumes.

7.3.5 Flocculation-flotation mechanism

Understanding the mechanisms governing the process of pH-induced flocculation-flotation is essential in order to optimize the harvest of microalgae in a hypersaline environment. To determine what type of mechanism, autoflocculation or bioflocculation, can explain the pH-induced flocculation-flotation of *D. salina*, tests were performed in culture medium free of algae. The equipment described in section 7.3.3 was used to characterize the typical pH evolution during continuous injection of sodium hydroxide in a sample of culture medium (SSW+Conway) without

microalgae. This evolution was compared to that obtained in a sample of microalgae culture.

Classic flocculation-flotation experiments with NaOH addition were performed on several samples of culture medium without algae. A floated phase of precipitates was obtained, taken from the beaker, filtered through a GF6 Whatman™ glass fibre filter, air-dried and fixed with carbon. The solid floated phase was investigated by scanning electron microscopy (SEM) experiments and energy-dispersive X-ray (EDX) analysis. Atomic concentrations of O, Ca, Cl, Mg, Na, S, C, P and Si were evaluated in several separate areas of the precipitates.

Observations on culture-free medium helped to guide the subsequent experiments on the microalgae cultures. During classic flocculation-flotation experiments on microalgae cultures, ion chromatography measurements were performed on the initial culture and on the clear liquid phase after separation. Samples were taken from the initial culture before NaOH injection and in the clear liquid phase 12 minutes after the production of bubbles. Initial and final concentrations of Mg^{2+} and Ca^{2+} were evaluated in order to look for significant changes and determine which precipitates could induce flocculation-flotation of *D. salina* in hypersaline waters.

7.3.6 Influence of the flow rate of NaOH addition

The influence of the flow rate of sodium hydroxide addition is studied to anticipate the constraints related to the industrialization of this process and to evaluate if natural increase of culture pH by photosynthetic activity could allow autoflocculation.

The utilization of a syringe pump to inject NaOH into the microalgae suspension allowed the influence of flow rate of NaOH addition to be characterized. Two final concentrations of added NaOH (0.0085 $mol.L^{-1}$ and 0.0167 $mol.L^{-1}$) were selected to evaluate this influence on the flocculation-flotation performance. The range of flows tested simulated, at one extreme, the slow increase of pH due to photosynthetic activity of microalgae culture and, at the other, the abrupt addition of sodium hydroxide. Profiles of the pH evolution at 3 different NaOH flow rates are shown in figure 7.1.

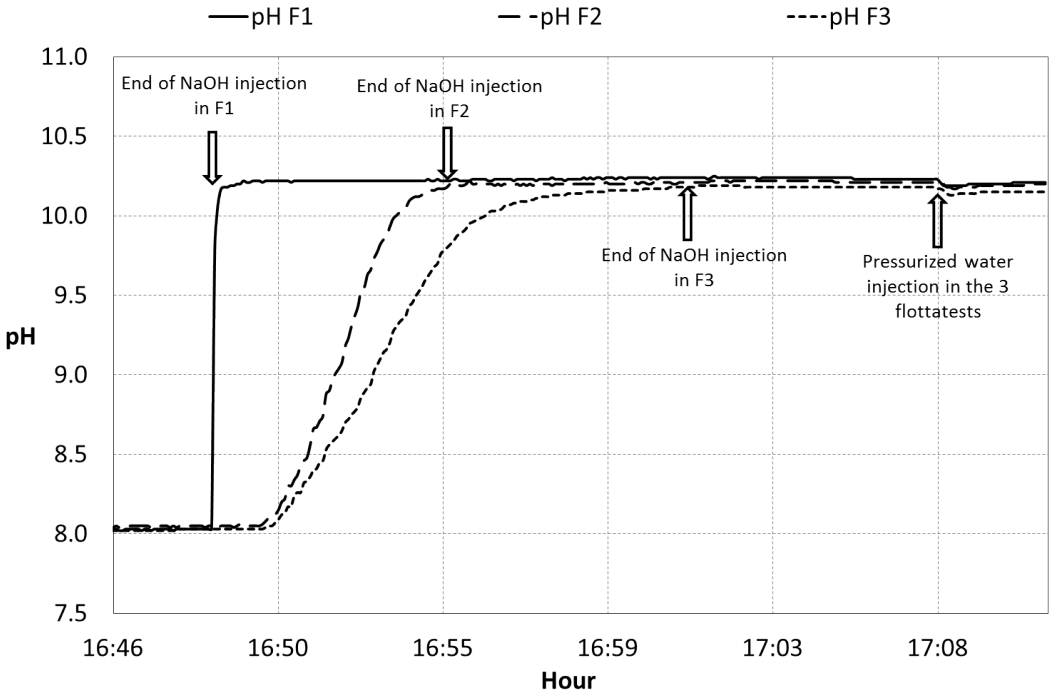


Figure 7.1 – *pH evolutions during sodium hydroxide injection at* 3 *different flow rates, in syntetic Ifremer hypersaline water with Gruissan strain.*

7.4 Results and discussion

7.4.1 Preliminary observations

A preliminary study showed that flotation separation without pretreatment of the suspension was not effective. Neither direct flotation at the pH of regulation nor natural pH-induced autoflocculation-flotation after the maximum pH increase due to the photosynthetic activity was observed. In consequence, chemical destabilization of the suspension was necessary to achieve separation. NaOH addition induced this destabilization and led to the progressive formation of algal flocs. The flocs settled when small amounts of NaOH were added. With larger quantities of NaOH, the solution behaved like a gel and no sedimentation was observed. When pressurized medium was added and therefore bubbles were produced in the suspension, the flocs floated quickly for small amounts of added NaOH. But, the more NaOH was injected, the more complicated and slow this flotation separation became due to the gelification.

For small amounts of added NaOH, when pressurized medium was added and therefore bubbles were produced, the flocs floated quickly. The more NaOH was injected, the more complicated and slow separation became. The suspension seemed to be re-stabilized and behaved like a gel. Under

these conditions, a larger quantity of pressurized medium may be necessary to allow flotation. In all the cases, when separation occurred, the floating phase was stable.

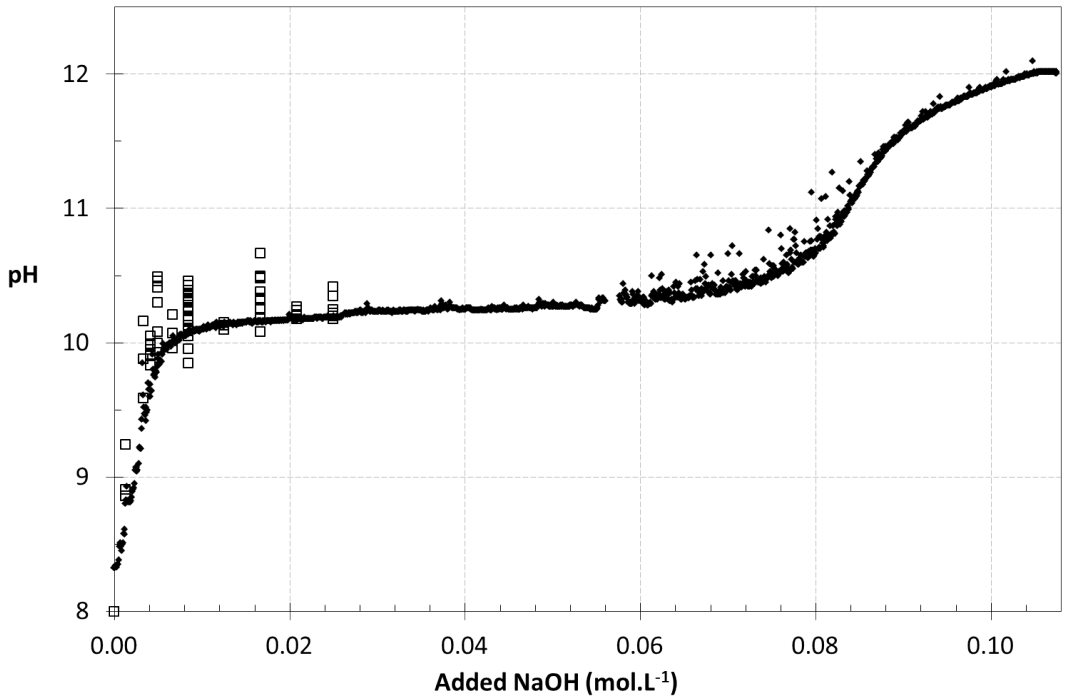


Figure 7.2 – (◆) *: pH evolution in* 600 *mL D. salina suspension sample during continuous injection of NaOH* 1*M* (0.5 $mL.min^{-1}$)*;* (▫) *: pH in* 600 *mL D. salina suspensions after NaOH addition and before each flotation test.*

Figure 7.2 shows the typical pH evolution in hypersaline culture of *D. salina* during continuous injection of sodium hydroxide. The pH increases sharply to 10 and a buffer effect is found from this value on. After addition of 0.07 $mol.L^{-1}$ of sodium hydroxide, the pH increases rapidly again. Note that the quantity of NaOH added before reach the buffer zone mentioned above increases with the total inorganic carbon dissolved in the culture. The bicarbonate-carbonate buffer effect explains this comportment. Explanations for the other buffer effect found from pH 10 are given later in this study.

The formation of flocs and effective separation seem to be correlated with the appearance of the pH buffer zone. Along the buffer zone, where the pH remains almost constant despite the addition of NaOH, the separation performance seems to change. Considering this qualitative difference of separation at equivalent pH, in this study, flotation performances are presented versus the amount of sodium hydroxide added per volume of initial suspension and not versus the pH. This is also the reason why there is no mention of pH adjustment in this study. This term is replaced by high-pH-induced, that best reflects the phenomenon studied here.

For each pH-induced flocculation-flotation test, the pH after NaOH addition and before flotation is also shown in figure 7.2. The dispersion of the points highlights the difficulty of assessing the

pH of hypersaline waters.

7.4.2 High-pH-induced flocculation-flotation performances

Flotation recovery efficiency (E) versus the quantity of NaOH added to the suspension is presented in figure 7.3. Fairly good accuracy can be achieved on the E measurement. The error bars reflect only the accuracy on the evaluation of volumes and optical densities for the calculation of E. The slight variation in some replicates can be explained by the difference in age of the culture at sampling time or by the quality of bubble generation in the flottatest.

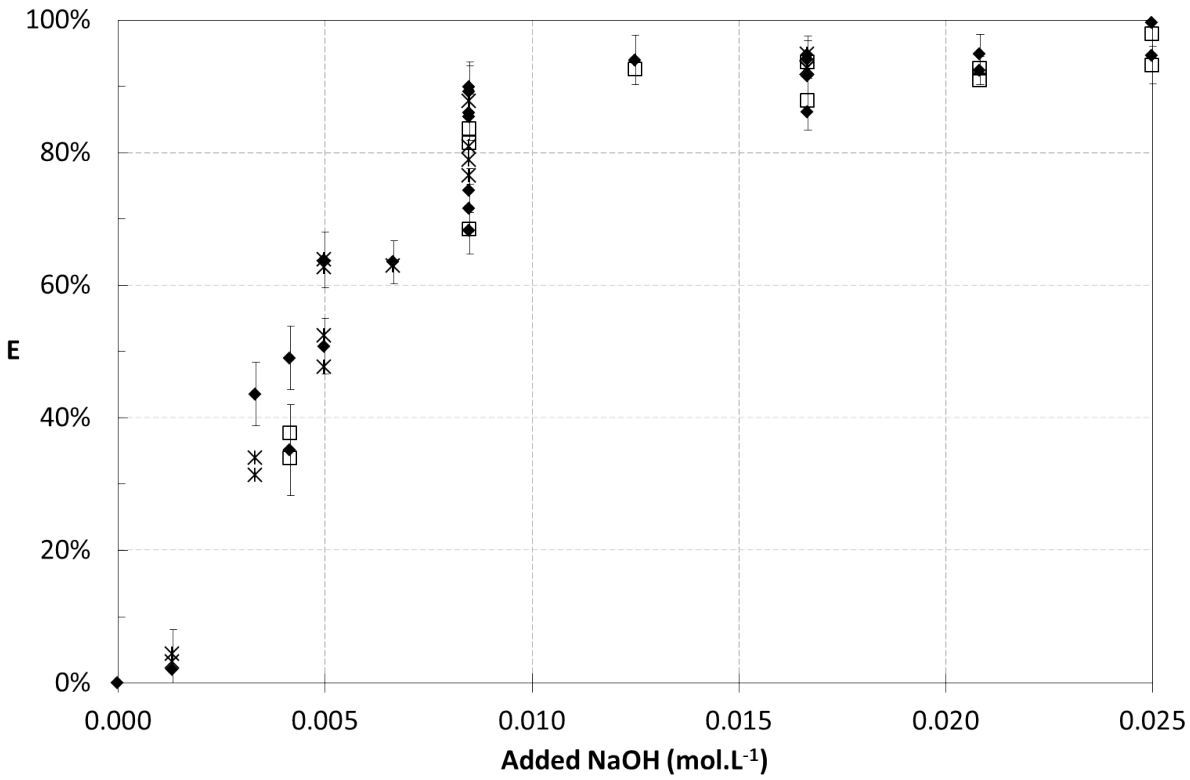


Figure 7.3 – *Dunaliella salina recovery flotation efficiency (E) versus NaOH added to culture samples.* (◆) *: abrupt injection of NaOH;* (□) *: Flow rate of NaOH addition =* 0.0017 $mol.L^{-1}.min^{-1}$ *;* (∗) *: Flow rate of NaOH addition <* 0.0005 $mol.L^{-1}.min^{-1}$*. Error bars reflect accuracy in the evaluation of volumes and optical densities (for readability they only appear on abrupt injection tests).*

No flotation is observed without addition of sodium hydroxide to the pH-regulated culture. Flotation is effective from a minimum amount of NaOH added, corresponding to the formation of algae flocs and to the beginning of the pH buffer zone. Beyond this minimum amount of

NaOH, recovery efficiency increases sharply to achieve and maintain values above 90%. This general behaviour is reminiscent of previous studies on pH-induced flocculation-sedimentation for other strains of microalgae and in other types of culture medium (Castrillo *et al.*, 2013; Sirin *et al.*, 2012; Vandamme *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Horiuchi *et al.*, 2003). No significant difference was observed for the different flow rates of NaOH injection ; three of them are presented in figure 7.3. This last observation will be verified in section 7.4.4.

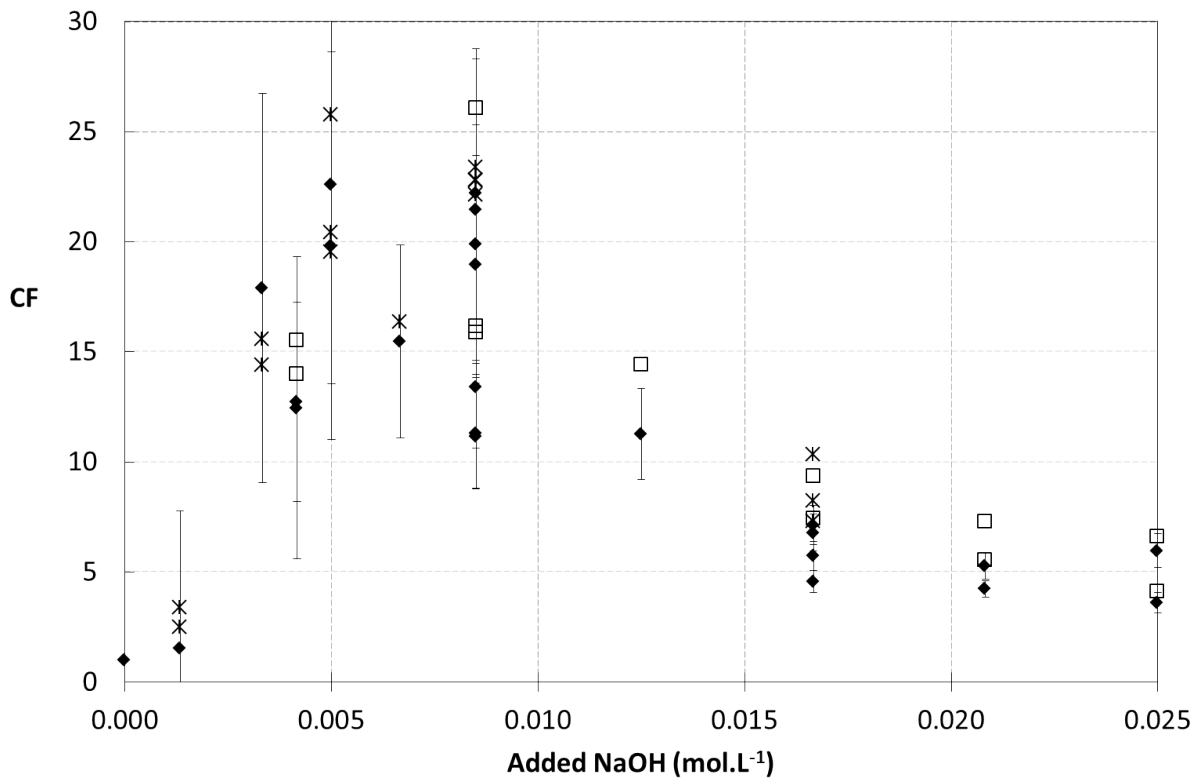


Figure 7.4 – *Concentration factor (CF) of Dunaliella salina culture as a function of NaOH added to culture samples.* (◆) *: abrupt injection of NaOH ;* (□) *: Flow rate of NaOH addition* = 0.0017 $mol.L^{-1}.min^{-1}$ *;* (∗) *: Flow rate of NaOH addition* < 0.0005 $mol.L^{-1}.min^{-1}$. *Error bars reflect accuracy in the evaluation of volumes and optical densities (for readability they only appear on abrupt injection tests).*

Concentration factor (CF) versus the NaOH quantity added in the suspension is presented in figure 7.4. Note that CF measurement error can be large when the volume of the floating phase V_c is low. At small quantities of added NaOH (< 0.005 $mol.L^{-1}$), CF increases with NaOH addition and reaches a maximum around 20 for concentrations of added NaOH between 0.005 and 0.010 $mol.L^{-1}$. For higher amounts of NaOH, the concentration factor appears to decrease with the addition of NaOH. This observation is in agreement with a previous study on the seawater Phaeodactylum tricornutum (Sirin *et al.*, 2012). The floating phase seems cluttered with other components than algae. It has been noted that, for larger amounts of added NaOH (> 0.025 $mol.L^{-1}$), separation of microalgae by flotation requires a recycle ratio higher than 33%.

This could be the result of an increase in the mass of the flocs. CF seems to decrease slightly for abrupt injection of NaOH. This observation will be verified in section 7.4.4.

Considering the recovery efficiency and the concentration factor, an optimal amount of NaOH can be defined. Under the experimental conditions used, an addition of 0.0085 $mol.L^{-1}$ of NaOH to the *D. salina* culture led to recovery efficiency around 80% and concentration factor around 20. Laboratory tests have shown that the non-harvested biomass can serve as inoculum for a new batch culture of *D. salina* (figure 7.5). This concentration of added NaOH could enable both an interesting harvest and immediate resumption of batch biomass production.

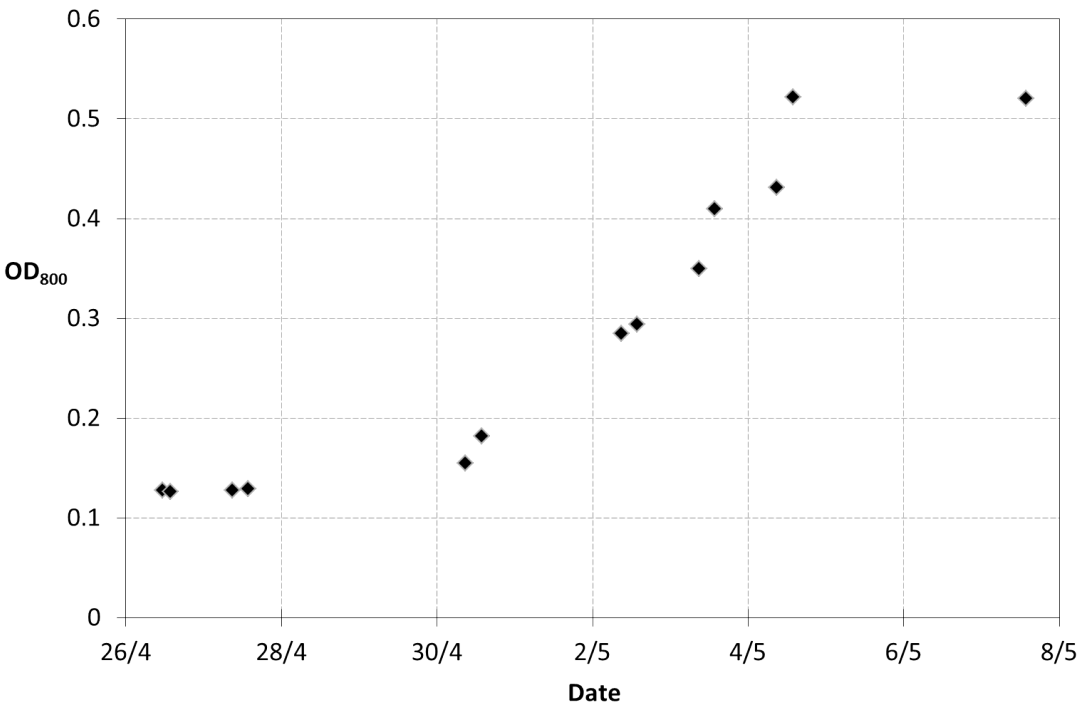


Figure 7.5 – *Optical density of a Dunaliella salina culture inoculated with non-harvested cells after pH-induced autoflocculation-flotation.*

7.4.3 High-pH-induced flocculation-flotation mechanism in hypersaline waters

7.4.3.1 Tests on culture medium without algae

The typical pH evolution in a mixed hypersaline culture of *D. salina* during continuous injection of sodium hydroxide shown in figure 7.2 was confirmed without algae. Along the buffer zone,

a milky, whitish precipitate was formed, and this precipitation may explain the stagnation of the pH. The precipitate settled slowly when no bubbles were added and floated quickly when pressurized medium, and thus bubbles, was added to the samples. The volume of floating precipitate phase increased with the amount of sodium hydroxide added. This suggests that the flocculation was caused by the precipitation of one or more compounds from the culture medium. Moreover, the stagnation of pH suggests that precipitation concerned hydroxides.

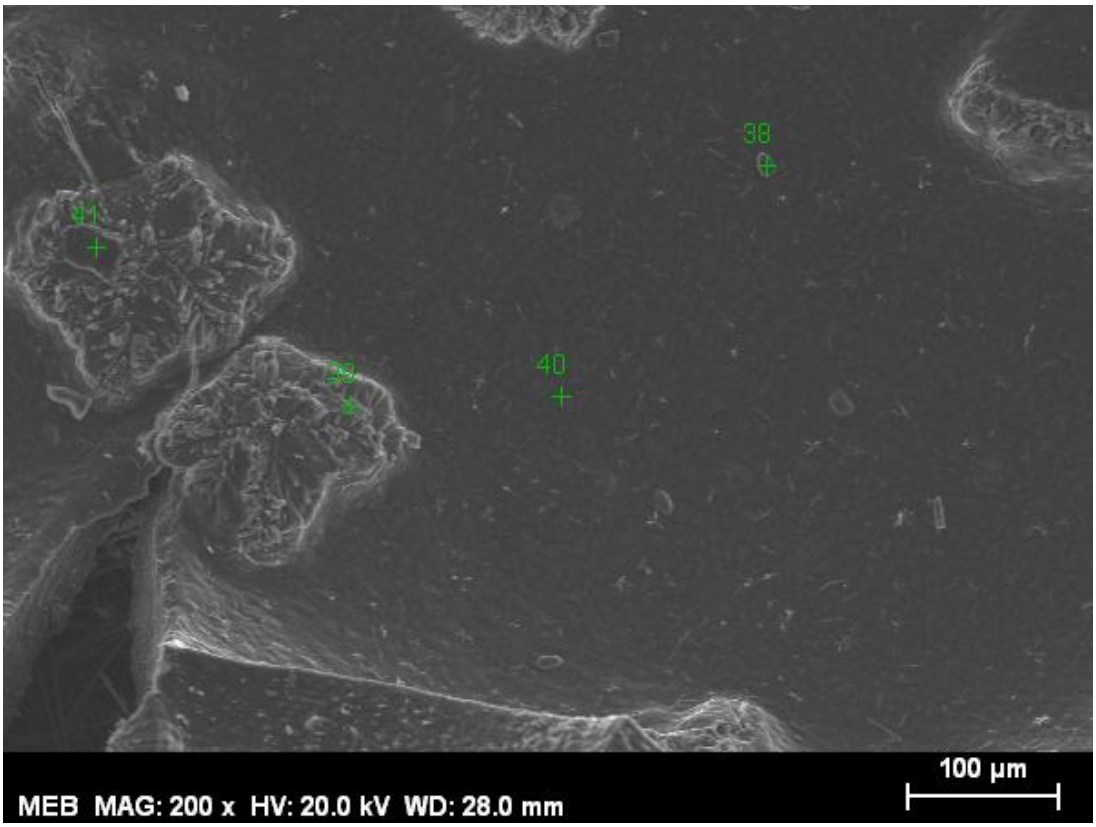


Figure 7.6 – *SEM observation of precipitates formed during NaOH addition in hypersaline culture medium.*

Scanning electron microscopy (SEM) with energy-dispersive X-ray analysis (EDX) was performed on isolated precipitate. Figure 7.6 shows an SEM picture of a precipitate isolated from the floated compounds as an example. The atomic concentrations at the points marked on the picture were measured by EDX and are reported in table 7.1. This analysis suggested the formation of magnesium hydroxide and calcium carbonate precipitates during the NaOH addition. Traces of NaCl could appear during drying of precipitates.

	[*Atomic percentages*]			
	Area 38	**Area 39**	**Area 40**	**Area 41**
O	30.9	61.8	40.4	56.4
Ca	11.8	0.1	0.1	0.2
Cl	31.4	1.3	10.4	3.0
Mg	6.0	16.1	10.5	16.0
Na	6.8	7.9	17.9	7.6
S	1.1	0.2	0.3	0.2
C	12.0	12.0	20.1	15.9
P	0.0	0.3	0.3	0.3
Si	0.0	0.3	0.2	0.3
Propable precipitates	$CaCO_3$	$Mg(OH)_2$	$NaCl$ $Mg(OH)_2$	$Mg(OH)_2$

Tableau 7.1 – *EDX analyses of precipitates formed during NaOH addition in hypersaline culture medium. Areas correspond to those mentioned in figure 7.6.*

7.4.3.2 Tests on microalgae cultures

Ion chromatography experiments were performed on the initial suspension and after flocculation-flotation in order to look for significant changes in Mg^{2+} and/or Ca^{2+} concentrations and confirm which precipitates were formed. The results are plotted on figure 7.7 as the ratio of final concentration to initial concentration versus the quantity of NaOH added. As shown for freshwater and marine microalgae cultures (Wu *et al.*, 2012), Mg^{2+} concentration decreases regularly with NaOH addition. The stagnation of pH can then be explained by the formation of magnesium hydroxide. The pH buffer zone is maintained during the addition of about 0.075 $mol.L^{-1}$ of NaOH, which allows most of the 0.039 $mol.L^{-1}$ of Mg^{2+} available in the culture medium to precipitate.

Ca^{2+} concentration decreases slightly before 0.0085 $mol.L^{-1}$ of added NaOH and remains constant in the range considered. It is postulated that, immediately after NaOH addition, a small amount of calcium precipitates with the small amount of inorganic carbon dissolved in the culture (and maybe with magnesium to form dolomite), which could explain the traces of calcium found in the EDX analysis. Note that before NaOH addition, inorganic carbon is mainly bicarbonate. The consumption of hydroxides to form carbonates before precipitation of calcium

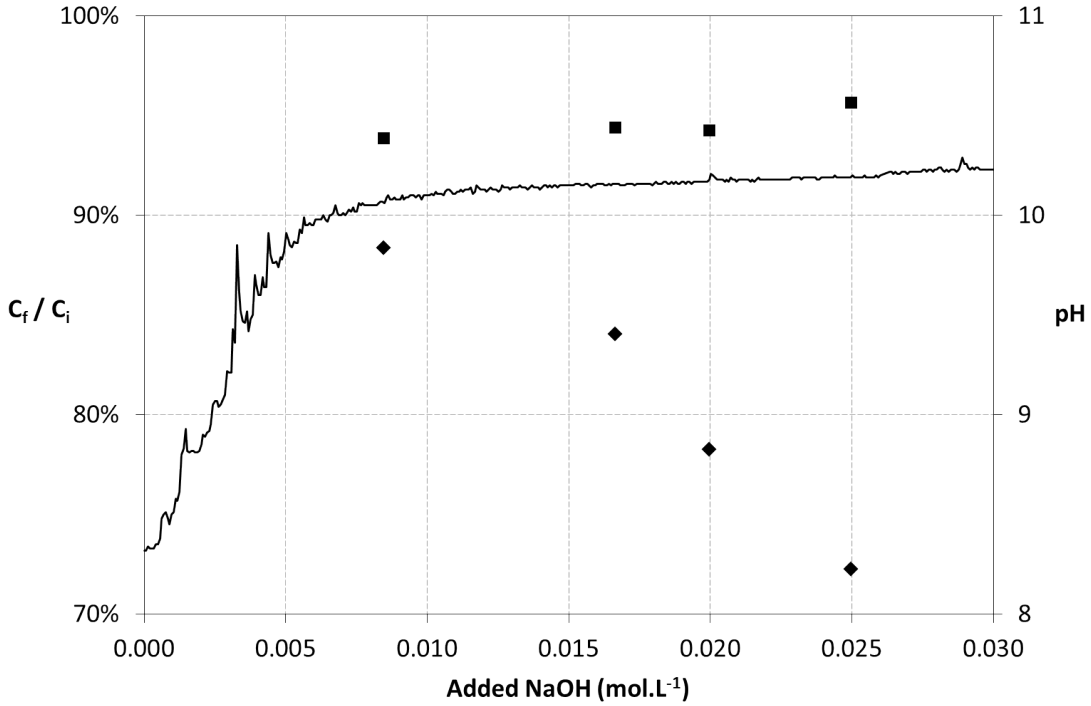


Figure 7.7 – *Ratio of final concentration to initial concentration of* Mg^{2+} (◆) *and* Ca^{2+} (■) *in aqueous phase after NaOH addition and flotation.* C_i *: ion concentration before NaOH addition and flotation,* C_f *: ion concentration in aqueous phase after flotation. The curve shows pH evolution in the suspension during NaOH addition.*

carbonates could be reduced in limiting the amount of inorganic carbon in the culture before recovery.
After the inorganic carbon consumption, the concentration of dissolved calcium remains constant. Therefore, the increase in recovery efficiency between 0.0085 $mol.L^{-1}$ and 0.0125 $mol.L^{-1}$ of added NaOH cannot be explained by calcium carbonate precipitation.

It is postulated that the flocculation of microalgae is the consequence of the formation of magnesium hydroxide precipitate. The gelatinous magnesium hydroxide induces a sweep flocculation process which allows the flotation of the microalga. The more NaOH is added, the more magnesium hydroxide is precipitated and the more efficient microalgae recovery is becomes, up to a maximum amount of recovery. The decrease of concentration factor can be explained by the increase of volume occupied by the magnesium hydroxide precipitate in the floating phase.

7.4.4 Influence of flow rate of NaOH addition

Recovery efficiency and concentration factor versus the flow rate of NaOH addition are presented in figure 7.8. The final concentration of NaOH added in all the tests presented in figure 7.8 is 0.0085 $mol.L^{-1}$. Under the mixing conditions considered in this study, it appears that the flow rate of NaOH addition has no significant influence on the recovery efficiency, even when the total amount of NaOH is added abruptly. Concerning CF, the flow rate of NaOH addition has no significant influence in the range considered in figure 7.8. For abrupt injections (not shown on the figure), CF decreased by an average of 20%. Equivalent behaviour was obtained for 0.0167 $mol.L^{-1}$ of NaOH added.

These results suggest that the natural increase of pH by photosynthetic activity may be used to reduce the total amount of base added in the harvesting process by pH-induced flocculation-flotation. They also suggest that an injection of base at different points of the flotation apparatus, to limit the flow rate of base addition, could increase the harvesting performance in terms of concentration factor.

7.5 Conclusions

Natural increase of pH by photosynthetic activity is not sufficient to induce flocculation and flotation of *D. salina*. Addition of a base is necessary, but its amount can be limited if the CO_2 injection in culture is stopped under favourable light irradiation. The flow rate of NaOH addition has an effect only on the concentration factor and for abrupt injection. The pH increase

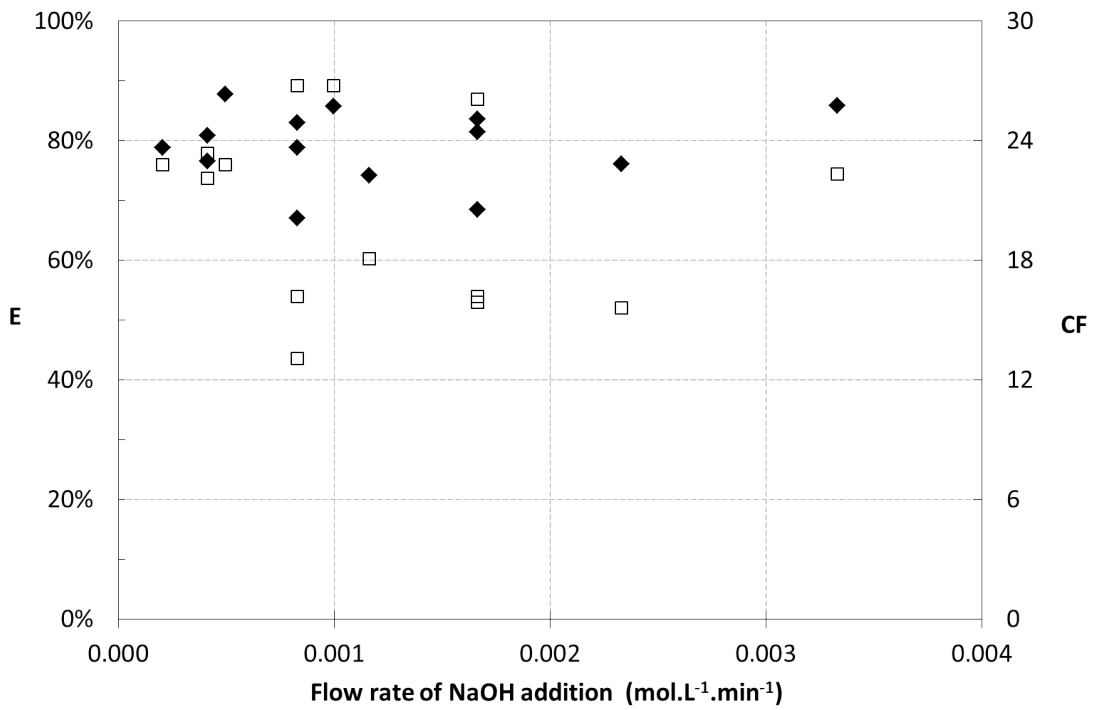


Figure 7.8 – *Recovery efficiency* (◆) *and concentration factor* (□) *versus flow rate of NaOH addition in* $600 - mL$ *samples for a final concentration of added NaOH of* $0.0085\ mol.L^{-1}$.

induces the precipitation of magnesium hydroxide and the sweeping of the *D. salina* cells by this precipitate. The flocculation-flotation harvesting method is effective in the waters with high magnesium concentrations where *D. salina* grows.

7.6 Reprise des conclusions et perspectives

L'augmentation naturelle du pH due à l'activité photosynthétique n'est pas suffisante pour induire la floculation-flottation de *D. salina*. L'addition d'une base pour forcer le pH reste nécessaire. Dans le cas de l'utilisation de la soude, un mécanisme d'autofloculation avec précipitation de $Mg(OH)_2$ est proposé pour expliquer la floculation par balayage de *D. salina*.

Des efficacités de récupération supérieures à 90% et des facteurs de concentration autour de 20 sont atteints dans les eaux hypersalées de type Ifremer. Le débit d'injection de soude n'a pas d'effet sur l'efficacité de récupération des algues et réduit légèrement le facteur de concentration, seulement pour les injections abruptes. L'augmentation naturelle du pH de culture par l'intermédiaire de l'activité photosynthétique pourrait permettre de réduire le taux de base consommé. Les cellules non récoltées restent en vie malgré l'augmentation du pH et peuvent être

utilisées comme inoculum d'une nouvelle culture.

Le procédé d'autofloculation-flottation mis en œuvre ici semble prometteur, d'autant plus si l'on considère la composition des milieux de culture réels de *D. salina*. En effet, les concentrations en magnésium plus importantes dans les eaux des salins que dans l'eau synthétique Ifremer laissent augurer de très bonnes performances de récolte, si l'on en croit le mécanisme caractérisé. Le produit de solubilité de l'hydroxyde de magnésium étant atteint pour des quantités d'ions hydroxydes plus faibles, la précipitation de $Mg(OH)_2$ et par la même occasion la floculation des microalgues devraient être facilitées. Le chapitre 8 permettra de montrer que ceci n'est pas évident et que le mécanisme d'autofloculation est plus complexe qu'il n'y paraît.

Chapitre 8

Caractérisation de la récolte de *D. salina* par autofloculation-flottation

Dans le chapitre précédent, le couplage d'une autofloculation assistée et d'une flottation affiche des performances intéressantes pour la récolte de *D. salina* en eaux synthétiques. Il est postulé suite à plusieurs analyses, que l'ajout de soude induit la production d'hydroxyde de magnésium. Les algues sont adsorbées ou « balayées » par ce précipité gélatineux et l'attelage décante naturellement. L'ajout de microbulles vient perturber la décantation de l'attelage, les bulles s'emprisonnent dans le précipité et le complexe algue/précipité/bulle flotte.

Centre de ce nouveau chapitre, le procédé d'autofloculation/flottation est étudié plus en détail. L'un des premiers objectifs est de confirmer le mécanisme proposé ci-dessus. Pour ce faire, une modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins est mise en œuvre sur le logiciel libre Phreeqc (§ 8.1). En s'appuyant sur ce nouvel outil, le mécanisme de séparation proposé est confirmé (§ 8.2).

Pour affiner encore la compréhension du processus de séparation, les influences de plusieurs critères opératoires sur les performances de récolte sont caractérisées et analysées. Cet inventaire des critères opératoires se structure autour des 3 acteurs principaux du procédé : la base ajoutée, le milieu de culture et la microalgue.

Dans un premier temps, les études se centrent donc sur la base ajoutée pour déstabiliser les suspensions algales. Les quantités de base injectées (§ 8.2), les conditions d'injection de cette base (§ 8.3) et un panel de différentes bases (§ 8.4) sont ainsi successivement considérés.

L'attention se porte ensuite sur les critères qui concernent les milieux de culture des microalgues. Sa concentration en calcium (§ 8.5), sa salinité totale (§ 8.6), et sa technique de préparation (§ 8.7), sont étudiées.

Pour clôturer cet inventaire, la robustesse du procédé au type de souche (§ 8.8) et à l'état de

carence en azote de cette souche (§ 8.9) est évaluée.

Chacune de ces études a été réalisée dans l'optique du transfert à l'échelle semi-industrielle du procédé de récolte. Les résultats d'expériences effectuées à cette échelle ne sont pas reportés ici, mais font l'objet du chapitre 9.

Sommaire

8.1 Modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins 191
8.1.1 Le modèle d'interaction ionique spécifique de Pitzer 191
8.1.2 Modélisation des équilibres ioniques dans les saumures 192
8.1.3 Validation du programme sur une simulation d'évaporation 197
8.1.4 Conclusions sur la modélisation 199
8.2 Influence de la quantité de base et mécanisme d'autofloculation-flottation 202
8.2.1 Travaux expérimentaux 202
8.2.2 Simulation de l'ajout de soude dans une eau synthétique IFREMER . . 204
8.3 Influence des conditions d'injection de la base 210
8.3.1 Expérience préliminaire 210
8.3.2 Importance du type d'injection de base 213
8.3.3 Influence de la concentration de la solution de base ajoutée 216
8.3.4 Conclusions sur les conditions d'injection de la base 218
8.4 Influence de la base utilisée pour déstabiliser la suspension algale . 221
8.4.1 Détermination des bases et de leur gamme de concentration efficace . . . 221
8.4.2 Autofloculation-flottation induite par ajout de soude et de chaux 223
8.4.3 Simulation de l'ajout de chaux et de soude dans une saumure synthétique 226
8.4.4 Conclusions sur les bases utilisées pour déstabiliser les suspensions . . . 227
8.5 Influence de la concentration en calcium des eaux de culture 228
8.6 Influence de la salinité des eaux de culture 231
8.6.1 Étude préliminaire en milieux synthétiques 231
8.6.2 Étude sur des eaux prélevées dans les salins 233
8.6.3 Conclusions sur l'influence de la salinité des eaux de culture 236
8.7 Influence de la préparation des eaux de culture 238
8.8 Influence de la souche de *D. salina* récoltée 240
8.9 Influence de l'état de carence en azote sur la récolte 242
8.10 Conclusions sur la récolte par autofloculation-flottation 244

8.1 Modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins

Afin d'évaluer l'état d'équilibre des solutions hypersalines dans lesquelles *D. salina* est cultivée et comprendre les phénomènes de précipitation mis en jeu lors de la récolte de cette algue, il est nécessaire d'évaluer l'activité des espèces en solution. Ceci passe par l'évaluation de coefficients d'activité qui permettent de traduire l'écart à l'idéalité de la solution. Ces coefficients tiennent compte des diverses interactions ioniques dans ces milieux complexes.

Les modèles de calcul de ces coefficients d'activité s'appuient généralement sur le couplage de la théorie de Debye-Hückel, qui traduit les interactions ioniques électrostatiques, et de la théorie de l'association ionique, qui tient compte des interactions ioniques à courte distance. Ces modèles se montrent efficaces sur des solutions dont la force ionique I n'excède pas celle d'une eau de mer classique ($I \approx 0{,}7$). La culture de *D. salina* étant effectuée en milieu hypersalin, les forces ioniques rencontrées dans les milieux d'intérêts excèdent largement les domaines de validité des différents modèles d'association ionique (pour une saumure de salinité 10% : $I \approx 2{,}3$). Les modélisations obtenues avec ces descriptions théoriques de la thermodynamique des eaux salines ne sont donc pas satisfaisantes pour des eaux concentrées type salins. Il faut dans ce cas mettre en œuvre d'autres types de modèles, connus sous l'appellation de modèles d'interaction ionique spécifique, comme par exemple celui proposé par Pitzer.

8.1.1 Le modèle d'interaction ionique spécifique de Pitzer

Pour permettre d'évaluer les coefficients d'activité dans des solutions de forces ioniques supérieures à celle de la mer, Pitzer a développé un modèle d'interaction ionique spécifique (Pitzer, 1973; Pitzer & Mayorga, 1973, 1974; Pitzer & Kim, 1974; Pitzer, 1975). Ce modèle, dit de Pitzer, est fondé sur une approche thermodynamique différente de celle des modèles d'association ionique, même si les interactions électrostatiques restent évaluées par une fonction du type Debye-Hückel. Plusieurs études ont montré la cohérence du modèle de Pitzer pour l'évaluation des propriétés thermodynamiques de solutions hypersalines (Harvie & Weare, 1980; Gueddari *et al.*, 1983; Harvie *et al.*, 1984; Gueddari, 1984).

Pour bien saisir les bases sur lesquelles se construit ce modèle, le lecteur est invité à se référer à l'annexe I. Elle recense dans sa première partie les grandeurs thermodynamiques et les relations fondamentales d'équilibre entre minéraux et solution, nécessaires à l'étude de solutions aqueuses d'électrolytes. Cette annexe revient ensuite sur les principales théories menant aux calculs des coefficients d'activité. Dans cette deuxième partie de l'annexe I, le propos est centré sur la théorie de Pitzer, et les équations de son modèle d'interaction ionique spécifique sont détaillées.

Ces équations de Pitzer font intervenir plusieurs paramètres ajustables, tabulés par de nombreux auteurs. On retrouve les paramètres d'électrolytes simples, $\beta^{(0)}_{MX}$, $\beta^{(1)}_{MX}$, $\beta^{(2)}_{MX}$ et $C^{(\varphi)}_{MX}$ ainsi que les paramètres de mélange, θ_{ij} et ψ_{ijk}.

8.1.2 Application du modèle de Pitzer à la modélisation des équilibres ioniques dans les saumures

Dans cette étude, l'objectif est de modéliser les équilibres ioniques lors de l'injection de bases, dans des saumures produites par évaporation d'une eau de mer Méditerranée. Ceci doit permettre de prévoir les phénomènes de précipitation soupçonnés d'être à la base du processus de floculation des microalgues. L'outil doit être efficace sur une large gamme de salinité allant de la salinité de l'eau de mer aux saumures saturées en NaCl. La sélection des paramètres du modèle est alors essentielle à la réussite de la mise en œuvre de ce dernier, quel que soit le code utilisé pour résoudre les équilibres.

8.1.2.1 Paramètres d'électrolytes simples

La plupart des paramètres d'électrolytes simples utilisés dans cette étude sont tirés des travaux de Pitzer et Mayorga (Pitzer & Mayorga, 1973, 1974). Ils sont référencés et validés dans l'étude de Harvie *et al.* (1984). Les paramètres $\beta^{(2)}_{MX}$ ne sont employés que pour les électrolytes de type $2-2$ ou de valence supérieure, ils sont nuls dans les autres cas. Les paramètres proposés sont évalués à 25 °C.

8.1.2.2 Paramètres de mélange

Dans cette étude la théorie du mélange asymétrique est prise en compte. La plupart des paramètres de mélange sont issus des travaux de Pitzer et Kim (Pitzer & Kim, 1974; Pitzer, 1975). Ils sont aussi référencés et validés dans l'étude de Harvie *et al.* (1984). Les paramètres proposés sont évalués à 25 °C.

8.1.2.3 Mise en œuvre sous Phreeqc

8.1.2.3.1 Généralités sur le logiciel Phreeqc et la base de données « pitzer.dat »

Le logiciel libre Phreeqc version 3 est utilisé dans l'objectif de simuler les équilibres thermodynamiques en eaux hypersalines. Phreeqc est un logiciel actuellement programmé en langage `C` et `C++`, issu des travaux initiaux de Parkhurst *et al.* (1980) sur le logiciel Phreeqe et sur les versions précédentes de Phreeqc. La version 3 de ce logiciel peut être utilisée pour calculer entre autres les indices de saturation, la distribution des espèces en solution aqueuse, la densité et la conductance spécifique d'une solution.

Plusieurs types de modèles sont disponibles sous Phreeqc et alimentés par diverses bases de données modifiables, énumérées entre parenthèses :

- Modèles d'association ionique (Lawrence Livermore National Laboratory = llnl.dat ; wateq4f.dat ; phreeqc.dat ; minteq.dat)
- Modèle SIT (sit.dat)
- Modèle SIT basé sur les équations de Pitzer (pitzer.dat)

La base de données « pitzer.dat » proposée avec le logiciel est présentée par les programmeurs comme étant la plus rigoureuse des bases disponibles (Parkhurst & Appelo, 2013). Elle inclut un nombre limité d'éléments (Na-K-Mg-Ca-H-Cl-S-O-C-Fe-Mn-Ba-Sr-B-Li-Br), mais ces derniers sont suffisants pour décrire correctement des eaux typiques des salins méditerranéens. Cette base de données est dérivée des travaux sur le programme PHRQPITZ (Plummer *et al.*, 1988). Elle intègre l'ensemble des paramètres d'électrolytes simples et de mélange spécifiés ci-dessus.

8.1.2.3.2 Programme développé sous Phreeqc

L'unité de base utilisée dans Phreeqc étant la molalité, les compositions ioniques des milieux de culture ont été évaluées dans cette échelle. Le programme implémenté commence par la description de la solution initiale dans l'échelle des molalités. Les précipités envisageables avec les composés initiaux présents dans les eaux sont ensuite déclarés pour être pris en compte : anhydrite, aragonite, arcanite, bischofite, bloedite, brucite, burkeite, calcite, carnallite, dolomite, epsomite, gaylussite, glaserite, glauberite, gypse, halite, hexahydrite, kainite, kalicinite, kieserite,

eugsterite, leonhardite, leonite, magnesite, mirabilite, misenite, nahcolite, natron, nesquehonite, pentahydrite, pirssonite, polyhalite, portlandite, schoenite, sylvite, syngenite, trona et thenardite.

L'évaporation d'eau est simulée par une suite de « réactions batch », durant lesquelles une portion d'eau est retirée. L'ajout de base est simulé par ajouts successifs d'ions Na^+ ou Ca^{2+}, respectivement pour la soude et la chaux éteinte. Pour respecter l'électroneutralité, des ions hydroxydes sont alors automatiquement ajoutés lors des calculs, ce qui simule bien l'ajout de $NaOH$ ou de $Ca(OH)_2$.

Lors de l'ajout d'une base ou de l'évaporation de l'eau de mer, les équilibres initiaux entre les espèces sont déplacés. Certains composés précipitent, l'équilibre du CO_2 atmosphérique avec le carbone inorganique total dissous est également modifié. Le transfert de CO_2 vers ou depuis l'atmosphère joue alors un rôle important. Ce transfert est lent par rapport à une précipitation et rapide par rapport à l'évaporation. Afin de rendre compte de ces effets cinétiques, certaines parties du programme sont modifiées. Par exemple, pour simuler l'évaporation d'eau dans des marais, la cinétique d'évaporation étant lente par rapport au transfert de CO_2, il est considéré que la saumure est en équilibre avec le CO_2 atmosphérique. À l'inverse, lors de l'injection rapide d'une base dans la solution, la cinétique de transfert du CO_2 atmosphérique vers la solution étant plus lente que la cinétique de précipitation des composés, la solution est considérée en équilibre avec une atmosphère dépourvue de CO_2. Cette dernière hypothèse sera vérifiée dans la section 8.2.2.

En plus de la simulation, des blocs de code prédéfinis, intégrés dans le programme, permettent d'exporter directement les résultats vers un tableur Excel ou de tracer des graphiques pendant la simulation.

Lors de la simulation de l'évaporation d'une eau de mer, des tests préliminaires ont permis de mettre en évidence la non influence de la méthode de discrétisation de l'évolution des variables d'entrée sur l'évaluation des concentrations ioniques dans les saumures (figure 8.1), et sur la quantité de sels précipités durant l'évaporation (figure 8.2). 3 types de discrétisation ont été testés : une discrétisation linéaire durant l'ensemble du processus d'évaporation, une discrétisation non linéaire à pas affiné quand on s'approche de précipitation et une discrétisation intermédiaire avec une réduction du pas dans une gamme à multiples précipitations.

Les figures 8.1 et 8.2 montrent que les concentrations ioniques en solution et les quantités de sels précipités, évaluées par simulation, sont identiques pour les 3 discrétisations. Seuls les résultats pour 2 ions et 2 sels sont présentés ici, mais les conclusions sont identiques pour Cl^-, SO_4^{2-}, Ca^{2+}, K^+, Br^- et tous les sels résultant de ces ions.

Les simulations étant très rapides quel que soit le type de discrétisation et la discrétisation linéaire étant plus simple à mettre en œuvre, cette dernière a été sélectionnée pour l'ensemble des études. Pour première validation du programme développé, il faut remarquer que les phases de précipitation du NaCl ou du gypse obtenues par simulation (figure 8.2) correspondent

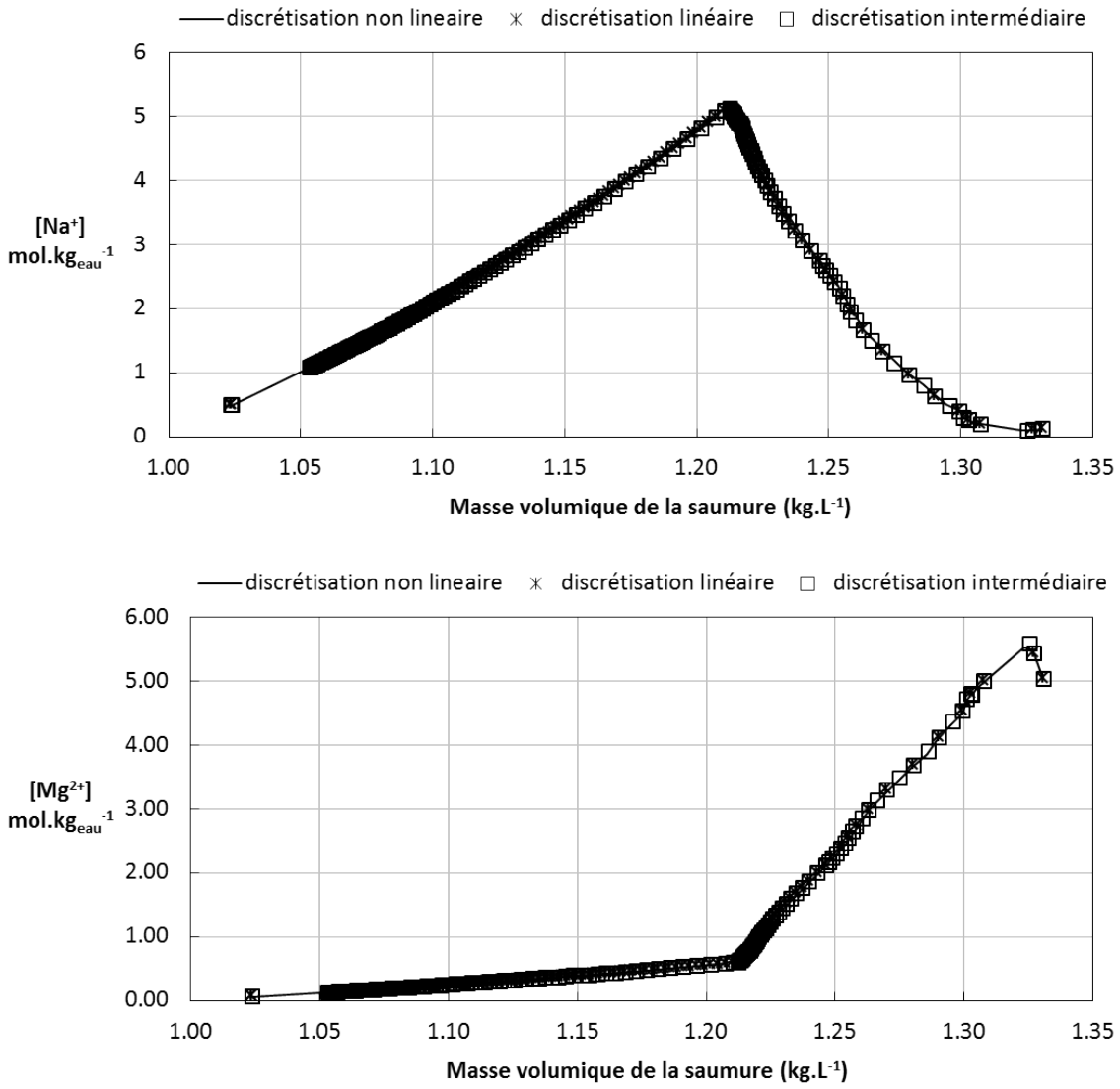


Figure 8.1 – *Influence de la discrétisation, sur l'évaluation des concentrations ioniques en* Na^+ *et* Mg^{2+} *lors de la simulation de l'évaporation d'une eau de mer Méditerranée.*

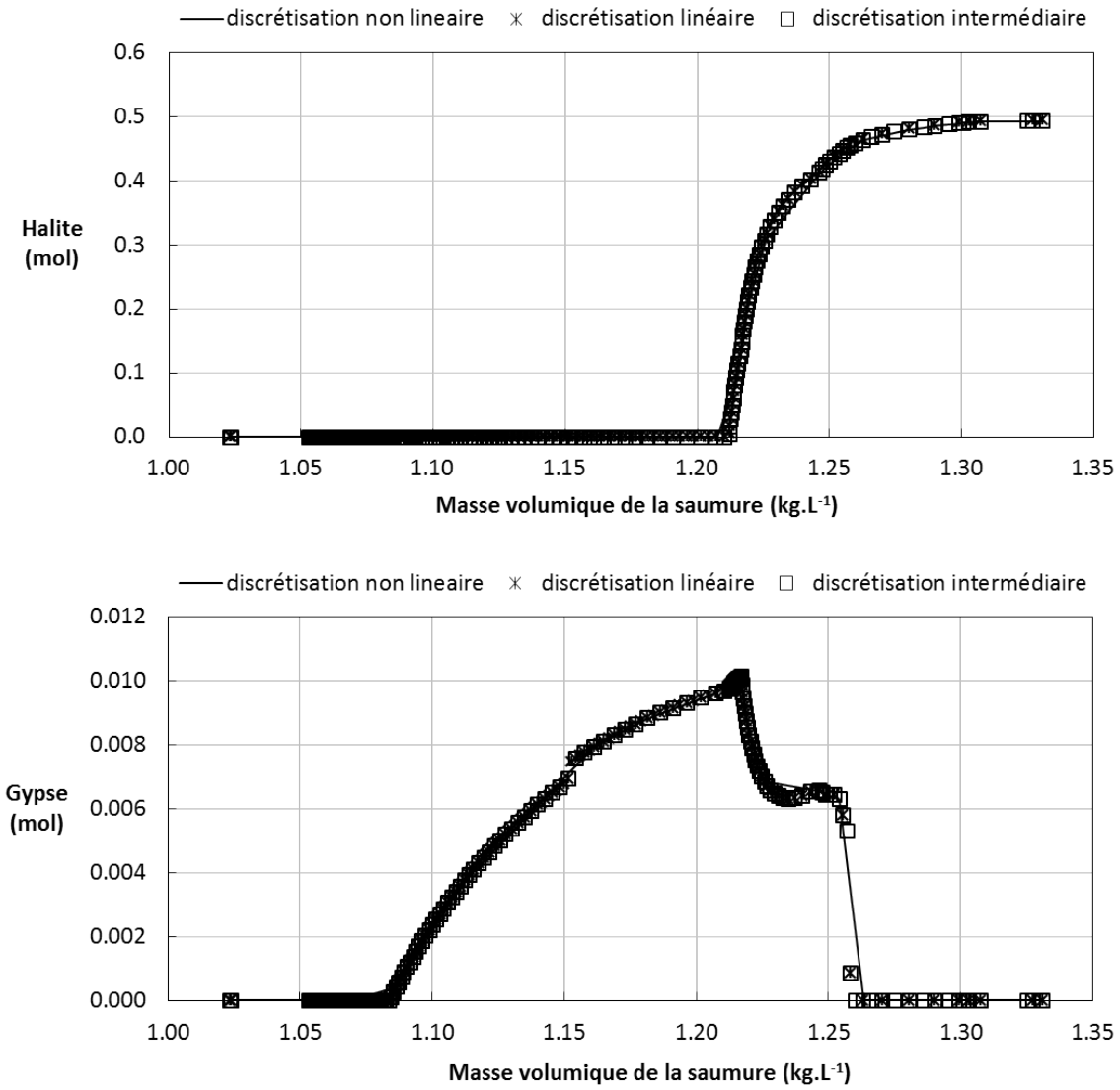


Figure 8.2 – *Influence de la discrétisation, sur l'évaluation des quantités de sels précipités lors de la simulation de l'évaporation d'une eau de mer Méditerranée.*

parfaitement à ce qui est constaté sur les tables de Baseggio (1974), issues de l'expérience.

8.1.3 Validation du programme développé sur la simulation d'évaporation d'une eau de mer

Il existe peu de données expérimentales permettant de caractériser correctement les eaux hypersalées. En effet, il a déjà été vu dans ce manuscrit que les techniques analytiques classiques sont rarement satisfaisantes à fortes forces ioniques. Conséquence directe, la littérature sur ces eaux est peu développée. Ceci ne rend pas simple la validation du modèle mis en œuvre sous Phreeqc dans cette étude. Cette validation est pourtant nécessaire, dans l'optique d'utiliser l'outil programmé pour interpréter les résultats expérimentaux, ou prédire le comportement des milieux durant la culture et la récolte de microalgues.

8.1.3.1 Données expérimentales sélectionnées et autre modèle pour comparaison

L'un des seuls mécanismes mentionnés dans la littérature sur les eaux hypersalines est leur évaporation naturelle. Les données récupérables ne sont pas récentes mais sont fiables. C'est donc à partir d'une étude sur la composition des saumures durant l'évaporation d'une eau de mer, que l'outil programmé dans cette étude est validé.

Cette étude de Baseggio (1974) a été réalisée sur une eau de la mer des Caraïbes. L'origine des eaux n'est pas dérangeante, car les concentrations ioniques initiales de cette eau de mer sont proportionnelles à celles d'une eau de mer Méditerranée.

Les résultats obtenus avec le modèle de Pitzer sont comparés aux données expérimentales extrapolées de Baseggio (1974) et à une autre simulation, réalisée dans les mêmes conditions, mais avec un programme intégrant un modèle classique d'association ionique. Pour ce dernier, la base de données utilisée sous Phreeqc est celle compilée par le Lawrence Livermore National Laboratory « llnl.dat ».

Il faut noter que le modèle a aussi été comparé avec succès à une autre étude expérimentale sur l'évaporation d'une eau de mer Méditerranée. Les tables de concentrations ioniques de cette étude devant rester confidentielles, cette comparaison n'est pas présentée dans ce manuscrit.

8.1.3.2 Conditions initiales de la simulation

Les caractéristiques de l'eau initiale utilisées dans le modèle sont regroupées dans le tableau 8.1. Les concentrations sont exprimées dans l'échelle des molalités ($mmol.kgw^{-1}$ ou $mmol.kg_{eau}^{-1}$). L'ensemble des précipités envisageables avec les composés présents dans cette eau sont considérés par le programme (liste exhaustive dans la section 8.1.2.3.2). Pour rappel, étant donnée la lenteur du processus d'évaporation naturelle, pour toutes les étapes de la simulation, la saumure est considérée en équilibre avec le CO_2 atmosphérique.

En début de simulation, on considère 1 kg d'eau, soit un peu plus de 55,5 $moles$. Pour chacune des 110 étapes successives d'évaporation considérées, les équilibres sont réévalués, après avoir retiré 0,5 $mole$ de H_2O à la solution précédemment caractérisée. La simulation est réalisée pour une température de 25°C.

Concentrations ioniques	en $mmol.kgw^{-1}$
Na^+	493,12
K^+	9,96
Mg^{2+}	58,26
Ca^{2+}	10,79
Cl^-	581,86
SO_4^{2-}	29,48
Br^-	0,84
Alcalinité totale	2,4
Température	25 °C
pH	8,22

Tableau 8.1 – *Concentrations en principaux ions et caractéristiques moyennes d'une eau de mer Méditerranée.*

8.1.3.3 Résultats obtenus sur l'évaporation d'eau de mer

Les résultats obtenus sont exprimés en fonction de la densité des saumures (figure 8.3) et en fonction du facteur de concentration par rapport à l'eau de mer initiale (figure 8.4). Tous les résultats ne sont pas présentés ici mais les conclusions proposées sont similaires quels que soient les ions considérés.

La figure 8.3, montre que les 2 modèles testés donnent une très bonne évaluation des

concentrations ioniques en Na^+ jusqu'au seuil de précipitation du NaCl. Passé ce seuil, seul le modèle de Pitzer donne des résultats satisfaisants (concentrations légèrement inférieures aux données de Baseggio). Les bons résultats obtenus avec un modèle d'association ionique pour Na^+ (et Cl^-), en-dessous du seuil de cristallisation de NaCl, sont soulignés dans le notice d'utilisation de Phreeqc. Pour les autres ions, les modèles d'association ionique sont réputés bien moins performants.

Pour Ca^{2+} par exemple, dès lors que la salinité excède celle d'une eau de mer, le modèle d'association ionique s'éloigne des valeurs expérimentales. Ce n'est pas le cas du modèle de Pitzer, qui donne d'excellents résultats même au-delà des seuils de cristallisation du gypse et du NaCl.

Pour Mg^{2+} là encore, le modèle de Pitzer donne d'excellents résultats jusqu'au seuil de précipitation du NaCl et conserve une bonne évaluation après ce seuil. Ce n'est pas le cas du modèle d'association ionique qui diverge très tôt et ne tient pas compte de la précipitation du NaCl dans son évaluation de la masse volumique de la saumure.

Les conclusions se répètent pour chacun des ions, que leurs molalités soient exprimées en fonction de la densité de la saumure ou en fonction du facteur de concentration par rapport à l'eau de mer initiale.

Le modèle de Pitzer donne donc d'excellents résultats sur l'évaluation des concentrations ioniques dans des milieux hypersalins. Il permet de reproduire le cycle des évaporites renseigné dans la littérature (Cojan & Renard, 2006). En effet, la simulation vérifie que le carbonate de calcium est en sur-saturation dans l'eau de mer caractérisée. Elle prévoit que ce dernier va précipiter sous forme de dolomite. Elle montre aussi que cette première précipitation sera suivie lors de l'évaporation progressive de l'eau, par celle du gypse, du NaCl et de sels de magnésium. L'évaluation des masses volumiques de la saumure auxquelles ces sels vont commencer à précipiter correspond parfaitement aux données expérimentales.

8.1.4 Conclusions sur la modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins

La simulation mise en œuvre sous Phreeqc, à partir du modèle d'interaction ionique spécifique de Pitzer, donne des évaluations des concentrations ioniques lors de l'évaporation d'une eau de mer en très bonne adéquation avec les données expérimentales disponibles. Cette adéquation se prolonge même au-delà du seuil de cristallisation du NaCl et ceci, pour les principaux ions présents dans l'eau de mer.

Les précipitations de sels marins lors de l'évaporation naturelle d'une eau de mer sont

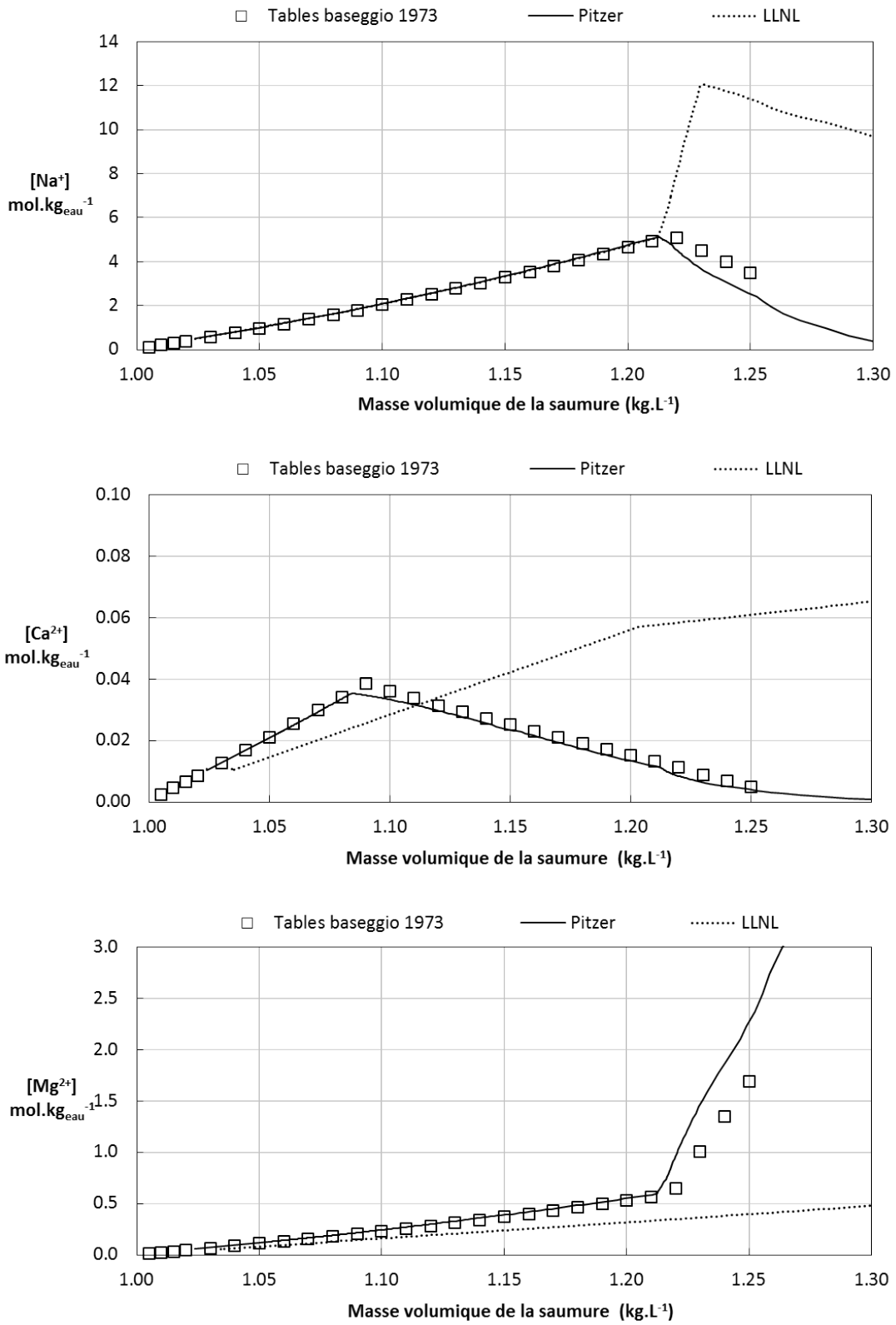


Figure 8.3 – *Molalités des principaux cations de l'eau de mer évaluées selon des méthodes différentes en fonction de la densité de la saumure caractérisée.*

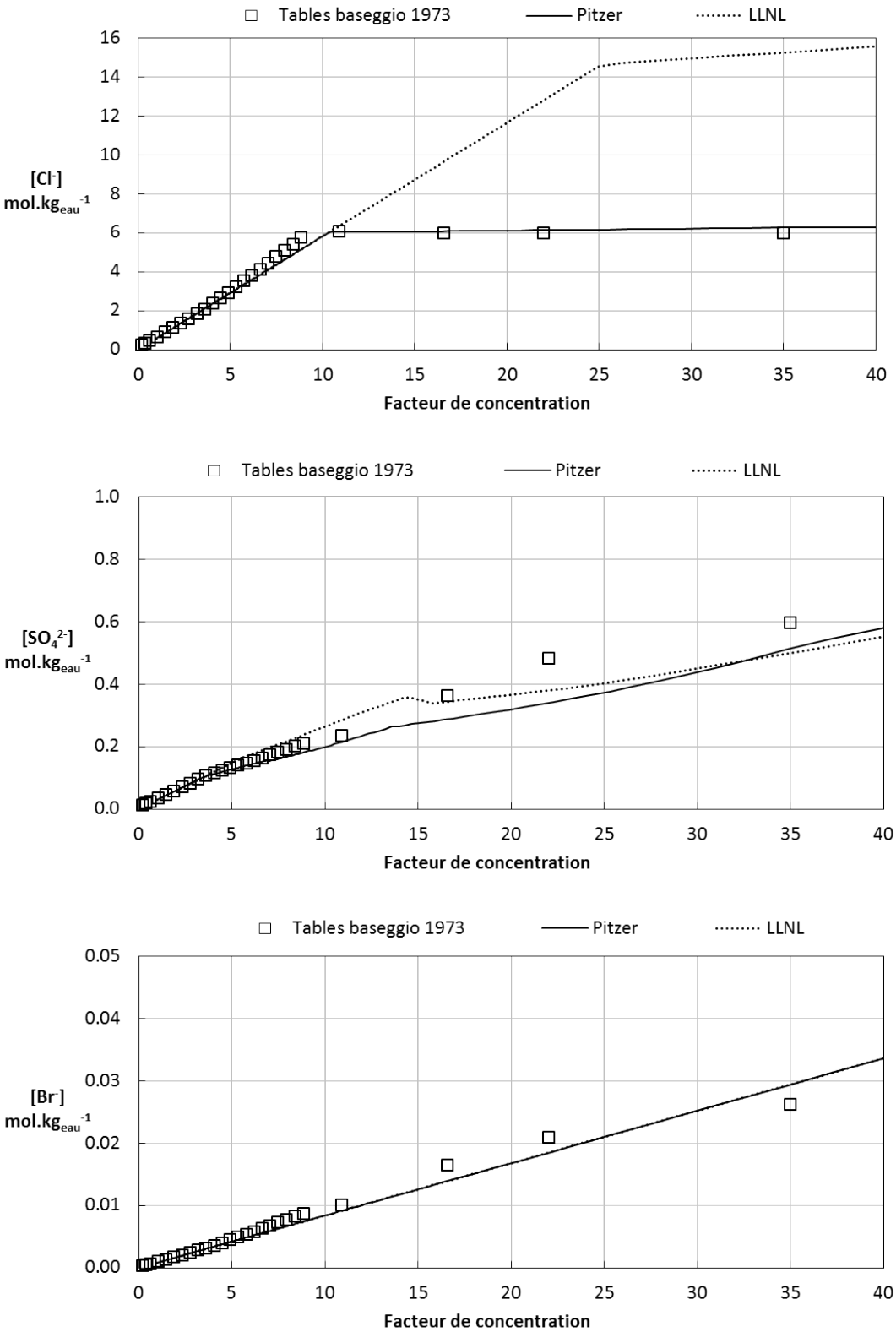


Figure 8.4 – *Molalités des principaux anions de l'eau de mer évaluées selon des méthodes différentes en fonction du facteur de concentration par rapport à l'eau de mer initiale (Facteur égal à* 1 *pour l'eau de mer).*

parfaitement simulées. On peut donc légitimement penser que la simulation pourra servir à confirmer voire préciser le mécanisme d'autofloculation proposé dans le chapitre 7.

Par contre, il sera vu dans la suite que la simulation mise en œuvre doit être utilisée avec prudence pour la prédiction des performances de récolte de *D. salina* par autofloculation-flottation. En effet, elle ne considère que les équilibres thermodynamiques des saumures caractérisées. Elle ne tient pas compte de la cinétique de formation des précipités, dont l'influence indirecte importante sur les performances de récolte sera mise en évidence dans la suite de ce chapitre.

8.2 Influence de la quantité de base ajoutée et confirmation du mécanisme d'autofloculation-flottation

Cette section reprend les conclusions principales des sections 7.4.1, 7.4.2 et 7.4.3 du chapitre précédent. Celles-ci sont complétées et appuyées notamment par la modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins.

8.2.1 Travaux expérimentaux

Dans la section 7.4.1, en s'appuyant sur la figure 7.2, le choix de présenter les performances de récolte en fonction de la quantité de base ajoutée et non du pH est justifié. En effet, lors de l'ajout de base dans une suspension hypersaline de *D. salina*, on observe une zone dans laquelle le pH est tamponné, alors que les performances de récolte varient fortement. Ce constat, ajouté au fait que l'évaluation du pH de solutions hypersalines est compliquée (voir section 3.6), montre qu'il est préférable de présenter les performances de récolte en fonction de la quantité de base ajoutée.

Pour preuve, sur la figure 8.5, on observe une très grande dispersion des performances de récolte lorsqu'elles sont exprimées en fonction du pH mesurédes suspensions. Pour un pH mesuré de 10,2 par exemple, les efficacités de récolte varient de 30 à 98% et les facteurs de concentration de 5 à 25. Cette dispersion n'est pas retrouvée quand E est présentée en fonction de la quantité de NaOH ajoutée. Dans la suite, seules les performances d'autofloculation-flottation en fonction de la quantité de soude ajoutée seront présentées.

Pour une culture de souche Gruissan non carencée, ayant atteint des $D0_{800}$ moyennes de 0,47 (soit environ 0,5 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation Ifremer), dans des eaux synthétiques hypersalées Ifremer, il faut ajouter une quantité de soude supérieure à 0,002 $mol.L^{-1}$ pour obtenir une

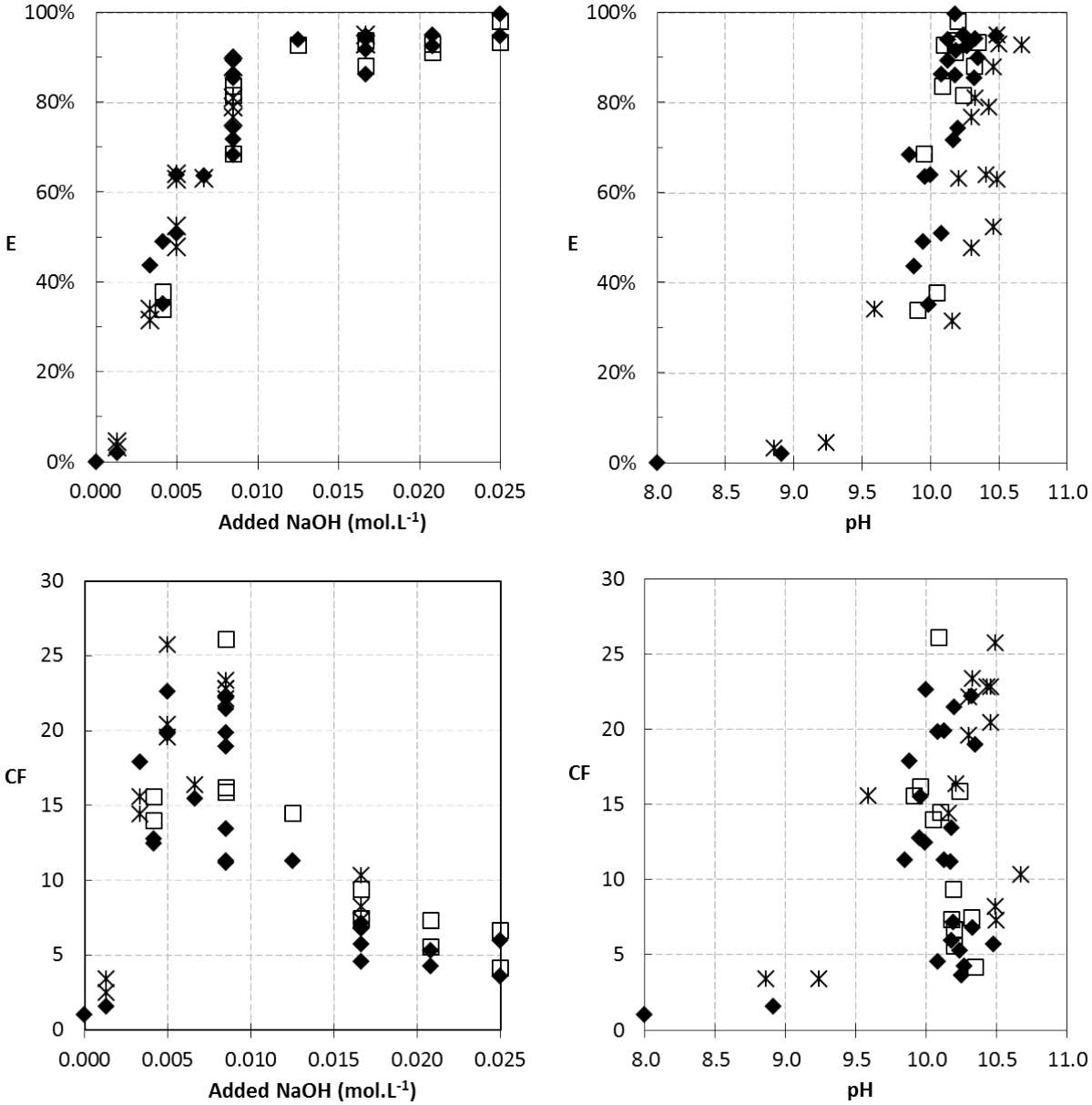


Figure 8.5 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) en fonction de la quantité de base ajoutée et du pH dans une suspension de D. salina.* (◆) *: injection abrupte de NaOH ;* (□) *: Débit d'injection de NaOH =* $0.0017\ mol.L^{-1}.min^{-1}$ *;* (∗) *: Débit d'injection de NaOH <* $0.0005\ mol.L^{-1}.min^{-1}$.

séparation efficace (figure 8.5). À partir de cette concentration, l'efficacité de récupération (E) augmente fortement pour atteindre des valeurs supérieures à 90% à 0,012 $mol.L^{-1}$ de soude ajoutée. Pour le facteur de concentration (CF), lorsque E augmente, il semble rester plus ou moins constant. Dès lors que E est maximale, il semble qu'il ne fasse que décroître avec l'ajout de soude.

Ce comportement suggère qu'il est possible de déterminer une concentration de soude ajoutée optimale, pour laquelle E et FC sont maximisés. Pour l'expérience retranscrite sur la figure 8.5, cette concentration optimale se situe entre 0,008 $mol.L^{-1}$ et 0,012 $mol.L^{-1}$, selon le choix du recyclage ou non des eaux traitées (conservation d'un inoculum ou récolte totale).

Un rapide calcul économique sur une concentration de 0,010 $mol.L^{-1}$ de soude ajoutée peut être réalisé. Pour cette concentration, environ 90% des microalgues sont récoltés. Pour un litre de suspension à 0,5 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ (concentration constatée sur l'expérience et envisagée sur les cultures extérieures), 0,45 g_{MS} est récupéré avec 0,4 g de soude. Il faut donc dans les conditions considérées, 0,9 g de soude pour récolter 1 g de matière sèche algale. Sachant que le marché de la soude industrielle tourne autour de 0,32 €/kg en 2013, le coût en floculant pour récolter 1 kg de biomasse dans une culture extérieure serait d'environ 0,28 €.

Un autre ordre de grandeur intéressant est la part massique de microlagues obtenue dans la phase solide. Pour une concentration de 0,010 $mol.L^{-1}$ de soude ajoutée, si l'on considère que l'ensemble des ions hydroxydes ajoutés sont fixés sous forme d'hydroxyde magnésium, il se forme au maximum alors 0,005 mol de précipité d'hydroxyde de magnésium, soit 0,29 g par litre de suspension initiale. Étant donné que l'on récupère 0,45 g_{MS} par litre de suspension initiale, la phase solide finale sera composée au minimum de 60% massique de microalgues et au maximum de 40% de précipité d'hydroxyde de magnésium.

8.2.2 Simulation de l'ajout de soude dans une eau synthétique IFREMER

Dans le chapitre 7.4.3, après analyse expérimentale des concentrations ioniques et observations MEB de la phase flottée, il est postulé que l'ajout de soude induit la production d'hydroxyde de magnésium. Les algues sont adsorbées ou « balayées » par ce précipité gélatineux et l'attelage décante naturellement. La simulation a pour buts de vérifier la formation de précipité, de valider son identification et d'anticiper les cas dans lesquels cette formation sera favorisée pour optimiser la récolte.

Plusieurs hypothèses sur la prise en compte du carbone inorganique dans les simulations ont été testées. Dans la première, il est considéré que durant l'ajout de soude, il n'y a pas de transfert de CO_2 atmosphérique vers la saumure mais qu'une quantité de carbone inorganique est initialement

dissoute dans la saumure (figure 8.6(b)). Pour la seconde, on conserve la même quantité de carbone inorganique dissoute initialement mais cette fois, la saumure est considérée à l'équilibre avec le carbone atmosphérique (figure 8.6(c)). Pour la dernière, aucune dissolution de carbone inorganique n'est considérée (figure 8.6(d)).

L'objectif est de déterminer l'hypothèse qui permet de décrire le plus fidèlement possible la réaction du milieu à l'ajout de base. Pour ce faire, l'évolution expérimentale du pH est comparée qualitativement à celles obtenues par simulation. Aucune comparaison quantitative (ou superposition de courbe) n'est effectuée, car comme précisé dans la section 3.6, les pH expérimentaux relevés sont exprimés sur l'échelle NBS et ne sont que des estimations biaisées des pH thermodynamiques considérés par les modélisations.

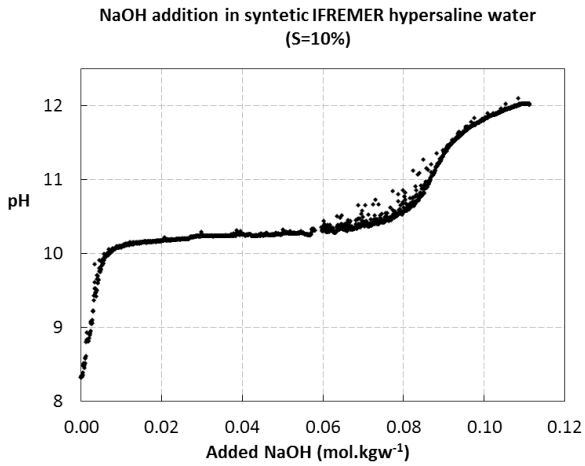
8.2.2.1 Simulations sans transfert de CO_2 atmosphérique vers la saumure

Lors de l'ajout de soude dans une saumure synthétique Ifremer, l'évolution du pH obtenu avec la première simulation (figure 8.6(b)) semble en très bonne adéquation avec les résultats expérimentaux rappelés sur la figure 8.6(a). En début d'ajout de soude, la concentration apparente d'hydroxyde dissous et par la même occasion le pH augmentent. Ces augmentations sont tamponnées par la présence d'ions hydrogénocarbonates qui en se transformant en carbonates fixent des hydroxydes. La part des carbonates sur le carbone inorganique total dissous augmente alors jusqu'à ce que le produit de solubilité de la dolomite ($MgCa(CO_3)_2$) soit atteint. Chaque ajout supplémentaire de soude engendre alors la précipitation de dolomite.

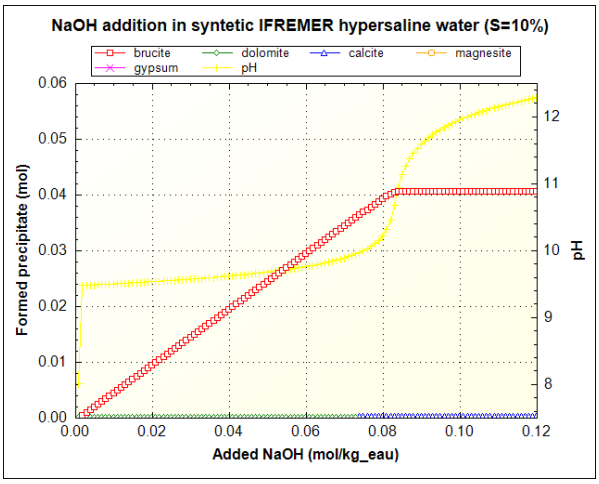
Cette précipitation induit la fixation de carbonates et donc la diminution du carbone inorganique total dissous. La diminution de la concentration en ions hydrogénocarbonates entraîne la dissipation de l'effet tampon. La concentration en hydroxyde dissous augmente rapidement jusqu'à atteindre le produit de solubilité de la brucite ($Mg(OH)_2$). À partir de ce moment, la quasi intégralité des hydroxydes injectés (modulo la diminution de la concentration en Mg qui implique une très légère augmentation du pH), est fixée sous forme de brucite. Le pH reste quasi stable jusqu'à ce que le magnésium dans la saumure soit consommé.

Pour la troisième simulation (figure 8.6(d)), le comportement observé est identique à la première, à la différence que l'absence de bicarbonates entraîne la disparition du tampon pH initial et donc une précipitation plus rapide de la brucite. C'est a priori vers ce cas que l'on souhaite tendre, en laissant la population microalgale fixer un maximum de carbone inorganique par photosynthèse, pour réduire la quantité de soude injectée avant précipitation d'hydroxyde de magnésium.

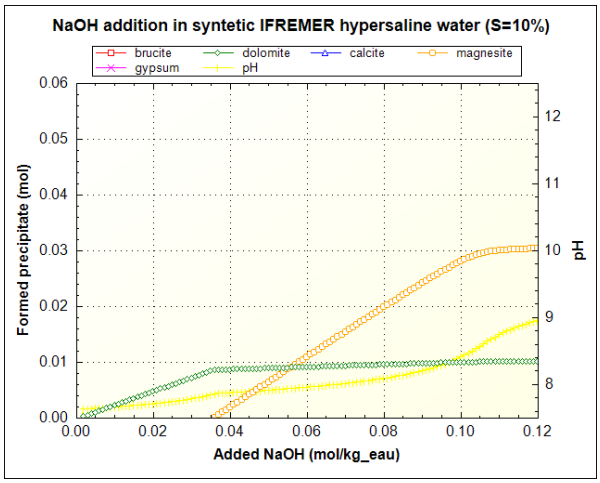
Sur les figures 8.6(b) et 8.6(d), on constate que le plateau pH durant lequel l'hydroxyde de magnésium précipite se situe à des pH inférieurs aux pH relevés expérimentalement. Comme



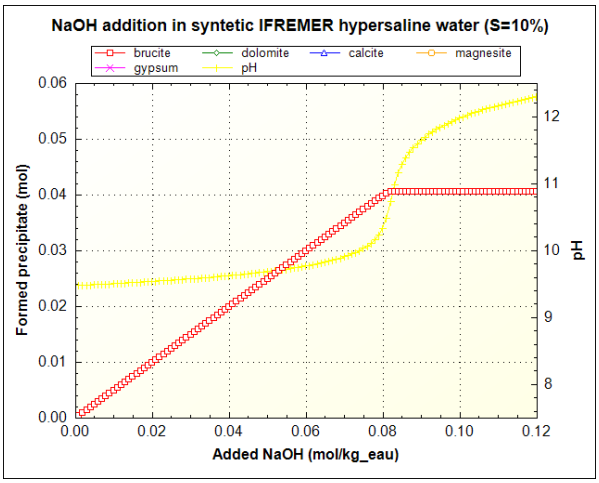
(a) Résultats expérimentaux



(b) Simulation sans transfert de CO_2 atmosphérique mais avec carbone dissous initialement



(c) Simulation avec transfert de CO_2 atmosphérique et avec carbone dissous initialement



(d) Simulation sans transfert de CO_2 atmosphérique et sans carbone dissous initialement

Figure 8.6 – *Comparaisons expériences/simulations sur le suivi du pH lors de l'ajout de soude dans une eau synthétique Ifremer. Simulations pour différentes conditions sur le carbone inorganique dissous.*

exprimé dans le chapitre 3.6, la caractérisation expérimentale du pH dans les eaux hypersalines est compliquée. Il a été conclu dans le chapitre 3.6 que les valeurs estimées expérimentalement dans cette étude ne pourraient faire office de valeurs vraies. Il n'est donc pas envisagé ici de redéfinir certains paramètres du modèle de Pitzer pour faire coïncider les simulations aux valeurs expérimentales.

Autre légère différence entre la simulation rapportée figure 8.6(b) et les expériences, la zone dans laquelle l'influence des carbonates semble se faire sentir, en début d'injection de soude (pour des concentrations ajoutées inférieures à 0,01 mol/L), est plus importante dans les expériences que pour la simulation. Il sera mis en évidence dans la section 8.3.2 que ceci peut s'expliquer en partie par un manque d'agitation des échantillons durant l'ajout de soude. En effet, la faible agitation utilisée (40 RPM) ne permet pas d'obtenir expérimentalement l'équivalent du réacteur parfaitement mélangé simulé sous Phreeqc. Lors de l'ajout de soude dans les échantillons, on trouve des zones dans lesquelles des concentrations en hydroxyde importantes entraînent une précipitation d'hydroxyde de magnésium. Le lecteur peut se référer à la section 8.3.4 pour une explication plus complète.

Cette fixation d'ion hydroxyde va donc accentuer l'effet tampon pH constaté initialement durant les expériences. Elle peut aussi expliquer pourquoi les efficacités de récupération deviennent non nulles, avant que le pH de la suspension n'atteigne le plateau théorique de précipitation des hydroxydes de magnésium.

8.2.2.2 Simulation avec transfert de CO_2 atmosphérique vers la saumure

Pour la deuxième simulation (figure 8.6(c)), il apparaît clairement que les phénomènes simulés ne correspondent pas à l'observation expérimentale. En effet, en faisant l'hypothèse que le milieu est en équilibre immédiat avec l'atmosphère, on suppose que le CO_2 consommé en solution est remplacé par le transfert de CO_2 atmosphérique vers la saumure, ce qui permet une réalimentation permanente en carbone inorganique. Il se formerait alors de la dolomite ($MgCa(CO_3)_2$) jusqu'à ce que la concentration en ion Ca^{2+} soit suffisamment faible. À partir de là, de la magnesite ($MgCO_3$) précipiterait. Le pH ne suit pas du tout le comportement constaté expérimentalement.

Si le transfert de CO_2 atmosphérique semble devoir être négligé lors de l'ajout de soude artificielle, les dernières observations n'excluent pas son importance dans le cadre de l'augmentation photosynthétique du pH. Cette dernière se produit en effet sur des durées bien plus importantes que l'ajout de soude.

8.2.2.3 Simulations pour différentes teneurs initiales en carbone total

Les simulations présentées sur la figure 8.7 confirment que plus la concentration en carbone inorganique est importante avant l'ajout de soude, plus la formation de dolomite sera importante et plus celle d'hydroxyde de magnésium sera retardée. Ces simulations ont permis d'évaluer la quantité théorique de carbone total dissous dans la saumure avant injection de la soude.

En considérant le pH initial de 8 imposé par la régulation, la concentration de carbone total est estimée à 0,00021 $mol.kgw^{-1}$. Cette teneur en carbone total, 10 fois inférieure à celles constatées dans les eaux de mer de surface (Viecelli, 1984), peut être expliquée. En effet, le carbone inorganique se dissout moins facilement dans les eaux hypersalées, et l'activité photosynthétique intense constatée dans une culture en PBR, diminue la teneur apparente en carbone dans les suspensions microalgales.

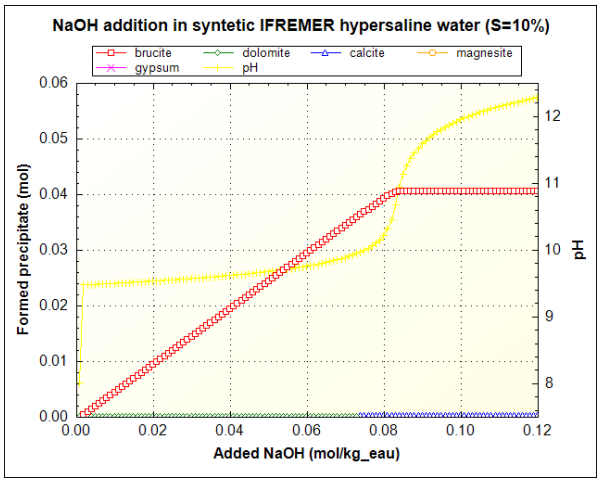
8.2.2.4 Conclusions sur la simulation de l'ajout de soude dans une eau synthétique IFREMER

Le programme réalisé à partir du modèle de Pitzer semble permettre de simuler avec succès l'influence sur les équilibres ioniques d'un ajout de soude dans une eau synthétique IFREMER. La simulation confirme les résultats entrevus et les mécanismes avancés après interprétation des expériences du chapitre 7.

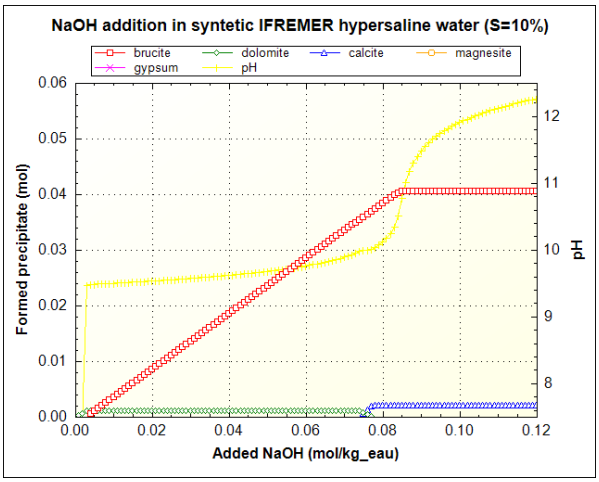
Le CO_2 n'a pas le temps de transférer vers la saumure pendant l'injection de soude. En conséquence, le carbone total dissous est rapidement consommé lors de la précipitation de sels de carbonates. La forme a priori dominante de ces sels serait de la dolomite. Son produit de solubilité est en effet atteint plus rapidement que ceux de la calcite ou de l'aragonite (polymorphes du carbonate de calcium) et que celui de la magnésite (carbonate de magnésium).

La précipitation de dolomite est bien suivie d'une précipitation d'hydroxyde de magnésium, qui selon les conditions d'agitation, pourrait se produire dans certaines zones de manière anticipée. Plus la teneur en carbone total dissous est réduite, plus l'apparition d'hydroxyde de magnésium se fait rapidement, au sens des équilibres thermodynamiques.

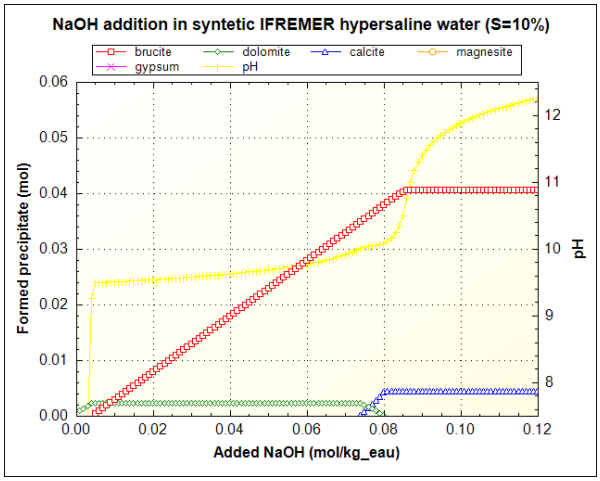
L'influence de la dolomite sur les performances de récolte n'est à ce jour pas complètement élucidée. Selon les figures 7.3 et 7.7 du chapitre précédent, l'efficacité de récolte augmente jusqu'à l'ajout d'environ 0,01 $mol.L^{-1}$ de soude. Selon les simulations, la dolomite précipite bien avant cette concentration, elle a intégralement précipité avant l'ajout de 0,001 $mol.L^{-1}$ de soude. Entre ces 2 valeurs, la quantité d'hydroxyde de magnésium précipitée augmente régulièrement. On peut



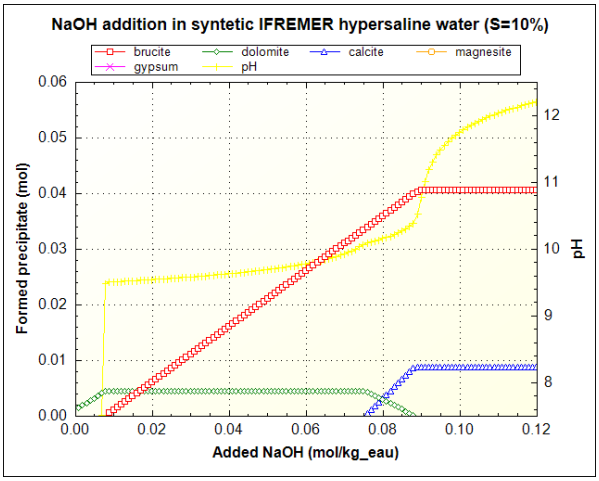
(a) $C_T = 0.00021\ mol/kgw$



(b) $C_T = 0.00240\ mol/kgw$



(c) $C_T = 0.00500\ mol/kgw$



(d) $C_T = 0.01000\ mol/kgw$

Figure 8.7 – *Simulations de l'ajout de soude dans une eau synthétique Ifremer avec différentes concentrations de carbone inorganique dissous initialement.*

donc légitimement penser que l'hydroxyde de magnésium est le principal agent floculant des microalgues.

8.3 Influence des conditions d'injection de la base

Dans le chapitre 7.4.4, il a déjà été mis en évidence que la cinétique d'ajout de la quantité de soude n'a pas d'influence sur les performances de récolte (une très légère baisse du FC est tout de même constatée pour les injections brusques). Mais cette cinétique d'ajout n'est pas le seul critère opératoire concernant l'injection de base. La concentration apparente de la solution de base injectée est un paramètre négligé dans l'ensemble des études sur l'autofloculation assistée, qui peut avoir des conséquences très importantes sur l'efficacité de récolte.

8.3.1 Expérience préliminaire

Cette expérience n'avait pas pour but initial de caractériser l'influence des conditions d'injection de la solution de base, mais son interprétation a montré que la concentration en soude joue un rôle sur l'efficacité de récolte.

8.3.1.1 Performances de flottation sur un « assemblage 4/saumure Mg »

Cette expérience est réalisée en flottatest, sur une souche LOV non carencée cultivée en gaine extérieure de 500 L. La culture a été menée dans un « assemblage 4/saumure Mg » de salinité totale 13%. On trouve dans le tableau 4.3, la caractérisation Dionex de la composition de ce milieu après une légère évaporation. Aucune mesure de concentration ionique n'a été réalisée sur ce milieu. On peut cependant déduire de celle effectuée à 15,4%, que la saumure utilisée pour compléter l'eau de mer dans l'assemblage avait franchi le seuil de cristallisation du NaCl. Dans ce milieu de culture, la concentration en Na^+ est donc anormalement basse au regard de la salinité totale constatée et celles en Mg^{2+}, K^+ et SO_4^{2-} sont anormalement hautes.

Des échantillons de 600 mL de la culture ayant atteint une DO_{800} moyenne de 0,25 (soit environ 0,2 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV) sont prélevés et injectés dans différents flottatests. Le protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). Une solution de soude $1M$ est ajoutée dans chaque flottatest sous agitation

à 40 RPM. 200 mL d'un « assemblage 4/saumure Mg » sans algue et pressurisé à 6 $bars$, sont injectés dans chaque échantillon.

Les performances de récolte obtenues sont rapportées sur la figure 8.8. L'efficacité de récupération est loin d'atteindre celles qui avaient été observées pour des conditions opératoires quasi similaires dans une eau synthétique Ifremer. Pour des quantités de soude 10 fois supérieures à celles utilisées dans les eaux synthétiques, la récupération des algues atteint à peine 70%. Les facteurs de concentration sont aussi bien moins importants que dans la manipulation initiale.

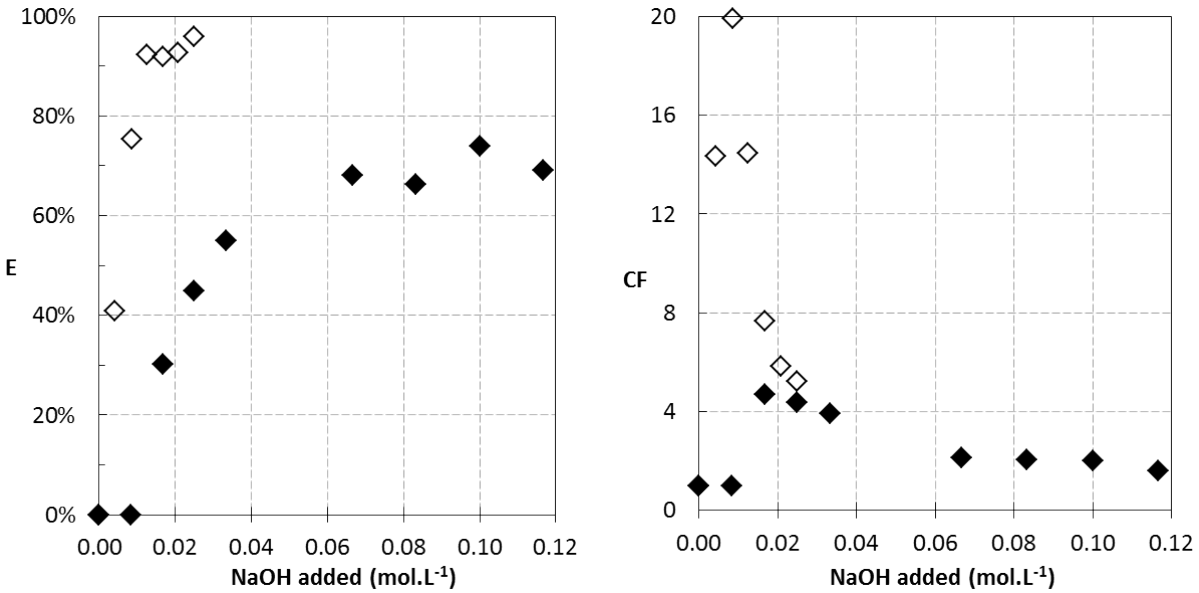


Figure 8.8 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV dans un « assemblage 4/saumure Mg »* (◆)*, en comparaison des résultats obtenus sur une eau synthétique Ifremer* (◇).

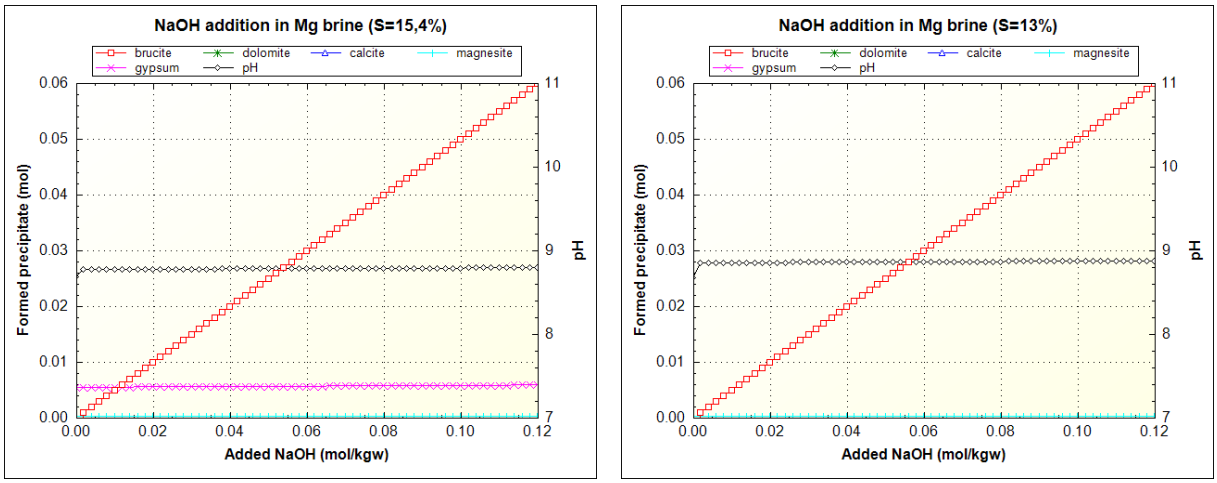
Il a été longtemps soupçonné que les différents équilibres ioniques constatés entre les 2 milieux de culture pouvaient être la cause de ces différences flagrantes de performances. En effet, des précipités d'aspect blanchâtre apparaissent de manière instantanée lors de l'ajout de soude dans un « assemblage 4/saumure Mg ». Ces derniers n'induisant pas de récolte efficace, il a été alors supposé légitimement qu'ils sont différents de ceux formés dans de l'eau synthétique Ifremer, ce qui est possible étant données les concentrations ioniques différentes dans les 2 milieux.

C'est en partie pour vérifier cette hypothèse que la modélisation des équilibres ioniques en milieux hypersalins a été mise en œuvre dans cette étude. Les simulations viendront en l'occurrence infirmer cette première hypothèse formulée.

8.3.1.2 Simulation de l'ajout de soude dans un « assemblage 4/saumure Mg »

La première difficulté pour simuler l'expérience précédente, réside dans la non électroneutralité résultante du regroupement de mesures Dionex pour caractériser le milieu de culture (8% de charges négatives en excès si l'on considère les concentrations du tableau 4.3). Plusieurs simulations sont réalisées en corrigeant différemment la neutralité électrique de la solution. La simulation témoin, réalisée avec une eau respectant les concentrations évaluées par Dionex sans corriger l'électroneutralité, met en évidence une précipitation immédiate de gypse, dont la quantité ne varie plus ensuite. Les autres composés en solution ne sont pas affectés. Les charges négatives étant en excès, il est décidé de présenter les résultats de la simulation pour laquelle la concentration en sulfates est réduite pour obtenir l'électroneutralité (figure 8.9(a)). Le fait que lors de la mesure Dionex, les sulfates soient en limite de gamme de validité appuie ce choix.

La deuxième difficulté réside dans la considération de la salinité expérimentale. Pour ramener la salinité de 15,4% à 13%, une simple règle de 3 a été appliquée à partir de la solution préalablement équilibrée en charge par réduction de la concentration en sulfates. La simulation obtenue est présentée figure 8.9(b).



(a) Salinité totale 15,4%

(b) Salinité totale 13%

Figure 8.9 – *Simulation de l'ajout de soude dans un « assemblage 4/saumure Mg »à différentes salinités.*

Il faut noter que quelles que soient les hypothèses faites pour corriger l'électroneutralité de la solution et/ou la salinité, les résultats obtenus lors des simulations ne diffèrent guère de ceux proposés comme exemple dans la figure 8.9.

Pour la solution à 15,4%, on constate une production initiale légèrement plus importante de gypse. Lors de l'ajout de soude, des traces de magnésite apparaissent jusqu'à consommation du carbone dissous. Il se forme surtout en quantité bien plus importante un précipité d'hydroxyde

de magnésium. Pour la solution à 13%, le gypse est cette fois juste à saturation (NB : si de l'eau est évaporée, du gypse précipitera dans la culture). Des traces de magnésite et un précipité d'hydroxyde de magnésium apparaissent aussi lors de l'ajout de soude.

Cette simulation ne plaide donc pas pour la première hypothèse formulée dans la section 8.3.1.1, pour expliquer les baisses de performances de récolte dans les eaux considérées, à savoir la précipitation de composés différents. En effet, si les conditions hydrodynamiques permettent la bonne atteinte des équilibres chimiques, il se forme a priori le même précipité d'hydroxyde de magnésium que lors de l'ajout de soude dans des eaux Ifremer. Les algues devraient donc floculer efficacement, ce qui n'est pas le cas. Il semble donc important de considérer les conditions de précipitation de l'hydroxyde de magnésium qui pourraient influencer sa capacité à capter les algues par balayage.

En reprenant précisément les conditions opératoires de cette expérience, il a été décelé que la solution mère de soude injectée titrait à $1M$. Or, contrairement à d'autres expériences où la même concentration de solution mère avait été utilisée, sur cette expérience, les volumes de solution mère nécessaires ont été injectés dans les suspensions algales, sans dilution préalable dans un volume d'eau déminéralisée. Une trop forte concentration apparente de la solution de soude injectée pourrait donc être la cause d'une modification de la phase de précipitation de l'hydroxyde de magnésium. Ceci pourrait être à l'origine des baisses de performances de récolte sur cette expérience. Les expériences décrites dans les sections 8.3.2 et 8.3.3 ont pour objectif de vérifier cette hypothèse.

8.3.2 Importance du type d'injection de base

Cette expérience est réalisée sur une culture non carencée de souche LOV, dans un assemblage 3,6/26, en gaine de 100 L. Avant récolte, la DO_{800} est en moyenne de 0,45 (soit environ 0,3 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV) et la salinité de 13%.

Le protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). 2 méthodes d'injection de soude à $1M$ sont testées, une méthode dite « classique » et une « directe » (figure 8.10). La vitesse d'agitation lors de l'injection est maintenue à 40 RPM.

Un bien meilleur balayage des algues est observé dans le cas de l'injection classique. Ceci est constaté aussi bien lors de la décantation avant l'ajout de bulle, que lors de flottation. Sur l'encart photographique de la figure 8.11, il apparaît clairement que l'injection classique permet une meilleure flottation des microalgues. Ces observations qualitatives se traduisent quantitativement par les efficacités de récolte rapportées sur la figure 8.11. Lors d'une injection directe de la solution

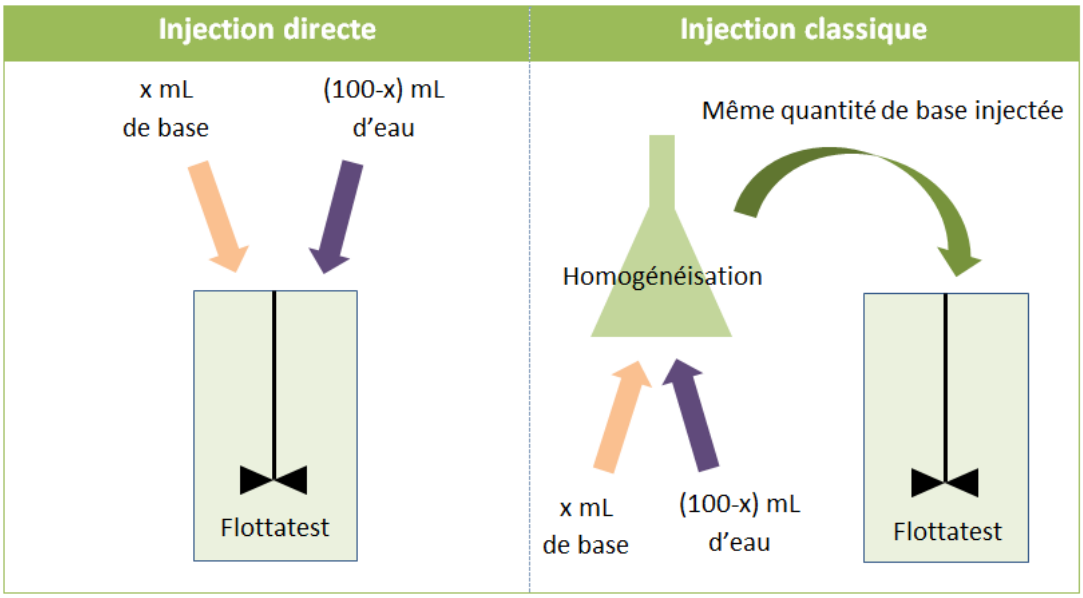


Figure 8.10 – *Schémas de principe des injections de base dites « directe » et « classique ».*

mère de soude à $1M$, les efficacités de récolte sont très inférieures à celles constatées par injection classique de la même quantité de soude. C'est bien ce phénomène qui avait été mis en évidence de manière involontaire dans l'étude retranscrite dans la section 8.3.1.1, pour laquelle une solution de soude concentrée à $1M$ a été injectée de manière directe.

Comme dans l'étude retranscrite dans la section 8.3.1.1, lors de l'injection directe de soude, il se forme instantanément un précipité blanchâtre. Ce précipité décante si l'agitation est interrompue et flotte si des bulles sont générées. Dans les 2 cas, il semble ne capturer qu'une très faible partie des microalgues. De nouvelles simulations (figures non présentées car similaires aux précédentes) confirment que ce précipité devrait être de l'hydroxyde de magnésium, reconnu comme étant à l'origine de l'autofloculation des microalgues dans de nombreux travaux (Zhang & Crowell, 2011; Vandamme *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012), ainsi que dans les expériences présentées au chapitre précédent.

Ces observations semblent aller dans le sens des hypothèses formulées après la simulation dans la section 8.3.1.2. La phase de précipitation de l'hydroxyde de magnésium semble déterminer l'efficacité de capture des microalgues. L'action de capture pourrait se concentrer essentiellement durant la phase de formation du précipité. L'efficacité de capture pourrait être fonction du nombre d'algues rencontrées par le précipité durant sa formation et dépendrait donc des conditions d'agitation. En effet, une agitation faible engendre une distribution non homogène de la soude qui entraîne une précipitation uniquement locale, par conséquent moins efficace en termes de capture de microalgues.

La figure 8.12 présente le relevé des pH post injection de soude, dans les cas d'une injection directe et d'une classique. Il apparaît clairement que pour une même quantité de soude ajoutée dans

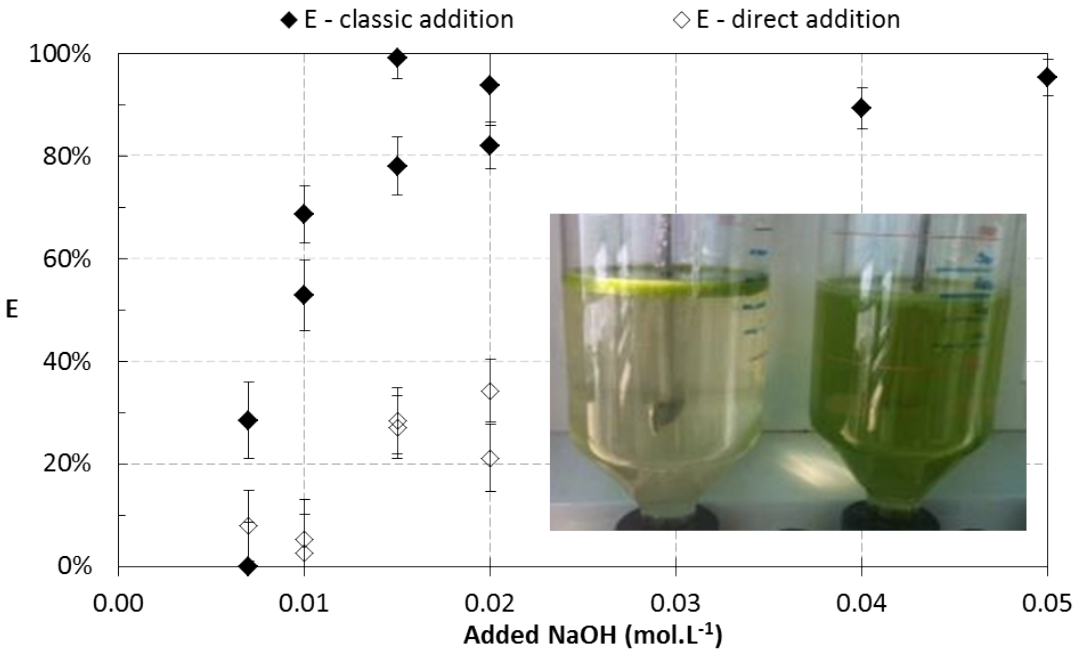


Figure 8.11 – *Performances d'autofloculation-flottation obtenues avec des modes d'injection de soude différents. L'encart photographique représente le résultat d'autofloculation-flottation post injection classique de soude (à gauche) et post injection directe de soude (à droite), pour une concentration en soude ajoutée dans les échantillons de* 0,02 $mol.L^{-1}$.

un échantillon, le pH atteint après injection directe est plus faible qu'après injection classique. En plus de faire écho à ce qui avait été envisagé suite aux simulations de la section 8.2.2.1, ce résultat va dans le sens de ce qui vient d'être avancé. En effet, la fixation d'hydroxydes dans le processus de précipitation localisée, caractéristique de l'injection directe, se traduit par un effet tampon sur le pH du reste de la suspension. Plus la concentration apparente de la soude injectée sera importante, plus le phénomène de précipitation localisée sera conséquent et donc plus ce phénomène de tampon pH sera flagrant.

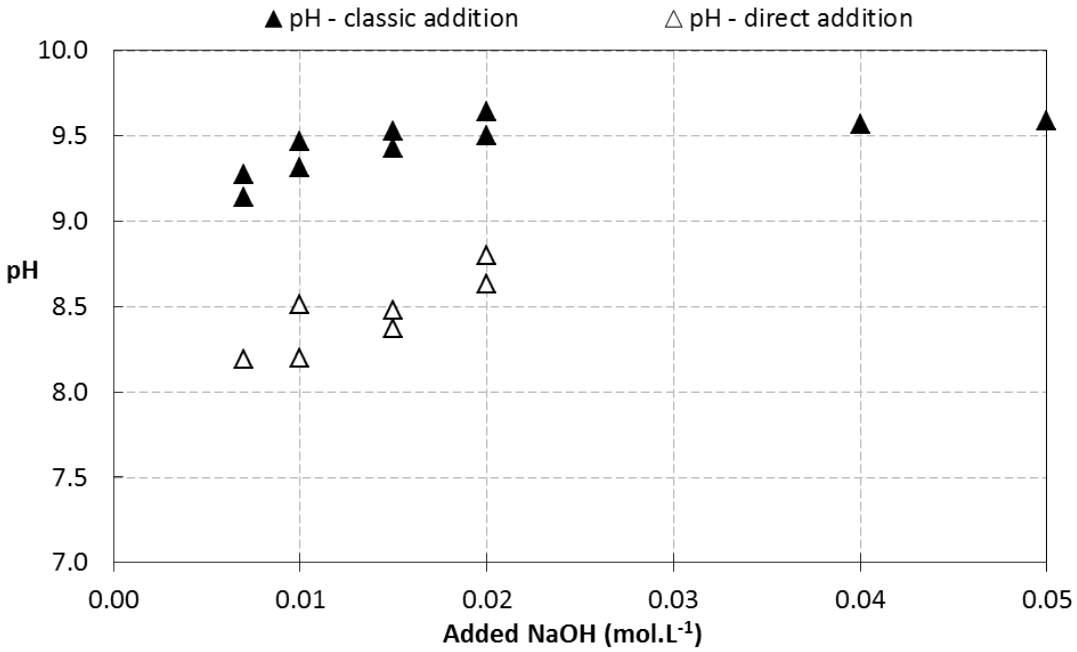


Figure 8.12 – *Relevés des pH après injection de soude dans un assemblage 3,6/26, pour les deux types d'injection.*

La concentration apparente de la solution de base ajoutée est un paramètre opératoire déterminant, qui couplé aux conditions d'agitation, déterminera les performances de récolte par autofloculation-flottation. Il est intéressant pour la maîtrise du procédé de pouvoir estimer sur quelles gammes de variation ce critère peut influer. Ceci permettra de vérifier l'interprétation des résultats de manipulations antérieures et d'affiner les protocoles opératoires des manipulations postérieures.

8.3.3 Influence de la concentration de la solution de base ajoutée

Cette expérience est réalisée dans le prolongement de celle présentée dans la section 8.3.2. La même suspension algale a été utilisée (culture non carencée souche LOV, assemblage 3,6/26,

gaine de 100 L, DO_{800} moyenne avant récolte 0,45, salinité 13%).

Le protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). 2 quantités totales de soude ajoutée par litre de suspension initiale ont été sélectionnées : 0,01 $mol.L^{-1}$ et 0,02 $mol.L^{-1}$. Ces concentrations ont été choisies pour que la stagnation des efficacités des récolte observées au-dessus de 90% ne masque pas le phénomène à mettre en évidence. Plusieurs solutions de soude, de concentrations différentes, ont ensuite été préparées. La quantité nécessaire de chacune de ces solutions pour atteindre les mêmes concentrations finales a été ajoutée de manière directe dans les échantillons.

Les pH obtenus après injection de soude (figure 8.13) sont en accord avec les hypothèses effectuées précédemment. Plus la concentration de la solution de soude est importante, moins les ions hydroxydes restent dissous. Il sont a priori fixés sous forme d'hydroxyde de magnésium, ce qui entraîne cet effet tampon constaté sur le pH.

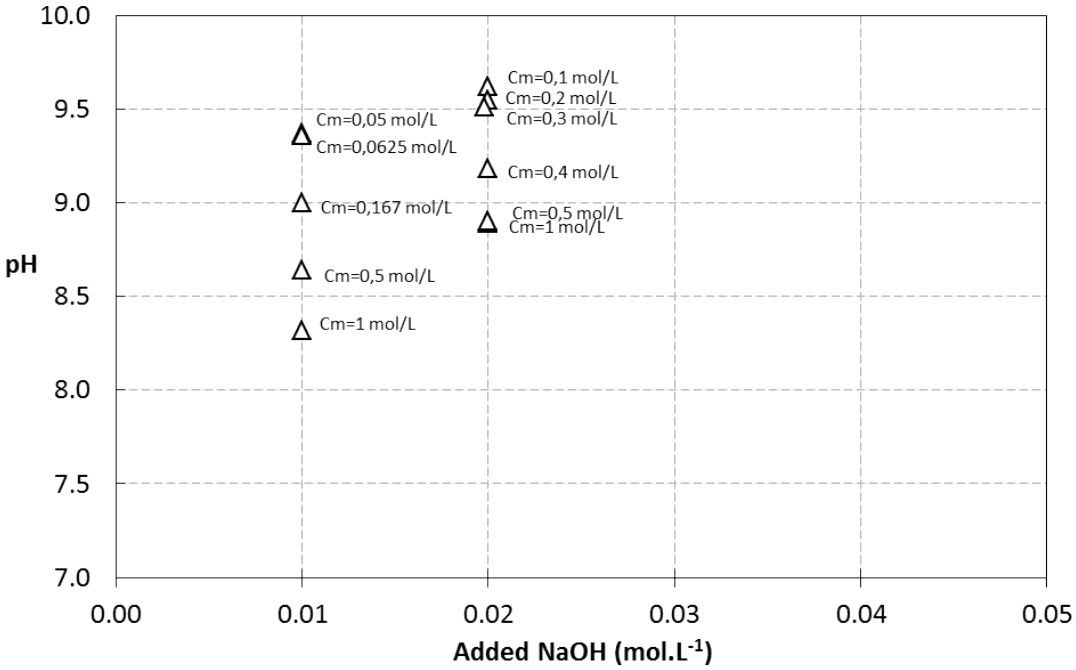


Figure 8.13 – *Relevés des pH dans un assemblage 3,6/26, après injection de solutions de soude de concentrations différentes.*

La figure 8.14 présente les efficacités de récolte obtenues. Il est confirmé que plus la concentration apparente de la solution de soude injectée est importante, moins l'efficacité de récupération est bonne. La gamme de variation est très importante. Pour une quantité finale de 0,02 $mol.L^{-1}$ de soude ajoutée par litre de suspension, l'utilisation d'une solution mère de soude de 0,5 $mol.L^{-1}$ mènera par exemple à des efficacités d'environ 25%, alors qu'en diluant 5 fois cette solution mère, il sera possible d'atteindre des efficacités de 80%. Il faut rappeler que selon les explications données à ces observations, ces résultats sont dépendants de l'agitation du milieu, ici gardée

constante.

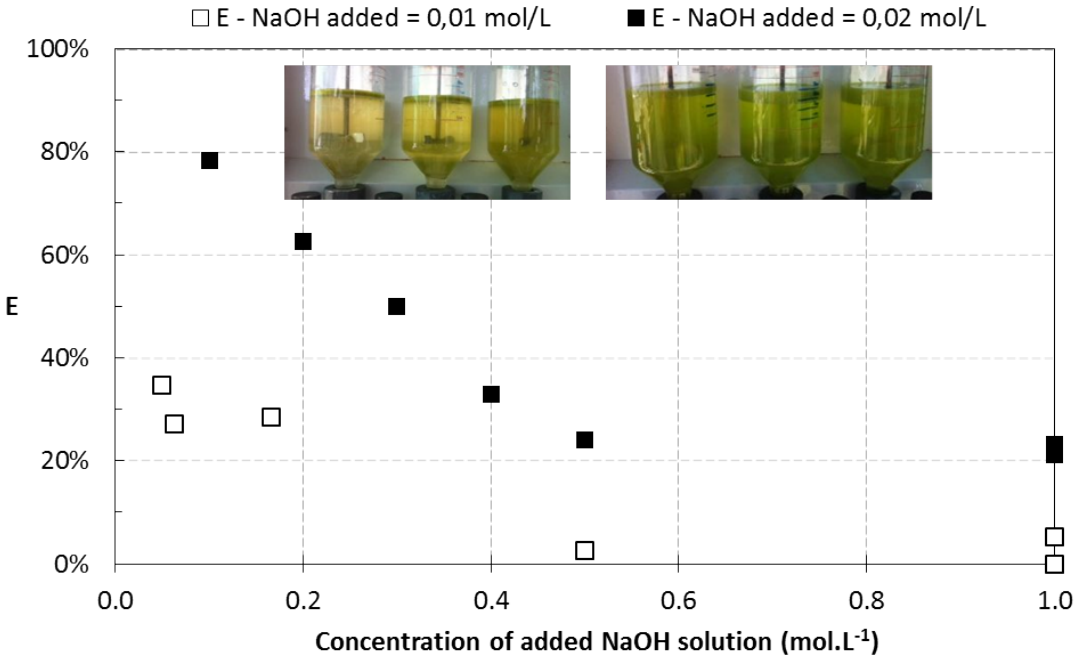


Figure 8.14 – *Efficacités de récolte pour* 2 *quantités finales de soude ajoutée par litre de suspension initiale, en fonction de la concentration des solutions de soude ajoutée dans l'échantillon. L'encart photographique présente les* 6 *conditions testées pour une quantité finale de soude ajoutée par litre de suspension initiale de* 0,02 $mol.L^{-1}$. *Les concentrations des solutions de soude ajoutées étant de plus en plus hautes en allant vers la droite.*

Dans les expériences réalisées après cette analyse, les solutions de soude injectées sont de concentrations faibles ou l'agitation est augmentée.

8.3.4 Conclusions sur les conditions d'injection de la base

Les expériences réunies dans cette section 8.3, ont mis en évidence que plus que la quantité de précipité d'hydroxyde de magnésium formée, c'est la manière dont celui-ci va se former qui déterminera les performances de récolte. La capture des microalgues semble en effet s'effectuer lors de la précipitation de l'hydroxyde de magnésium. Ceci sera vérifié dans une expérience relatée section 8.4.1, dans laquelle l'injection de lait de magnésie, c'est à dire d'une suspension de particules d'hydroxyde de magnésium, n'induit pas de récolte efficace de *D. salina*.

Cette phase de précipitation doit donc s'effectuer de manière la plus homogène possible, pour qu'un maximum du volume de l'échantillon soit concerné par le piégeage des microalgues dans

le précipité en formation. Par conséquent, il faut adapter les conditions d'ajout de la base dans la suspension pour optimiser son mélange. Pour ce faire, il vient d'être vu que réduire la concentration apparente de la soude est une solution efficace. Il est aussi possible de rendre l'agitation plus efficace.

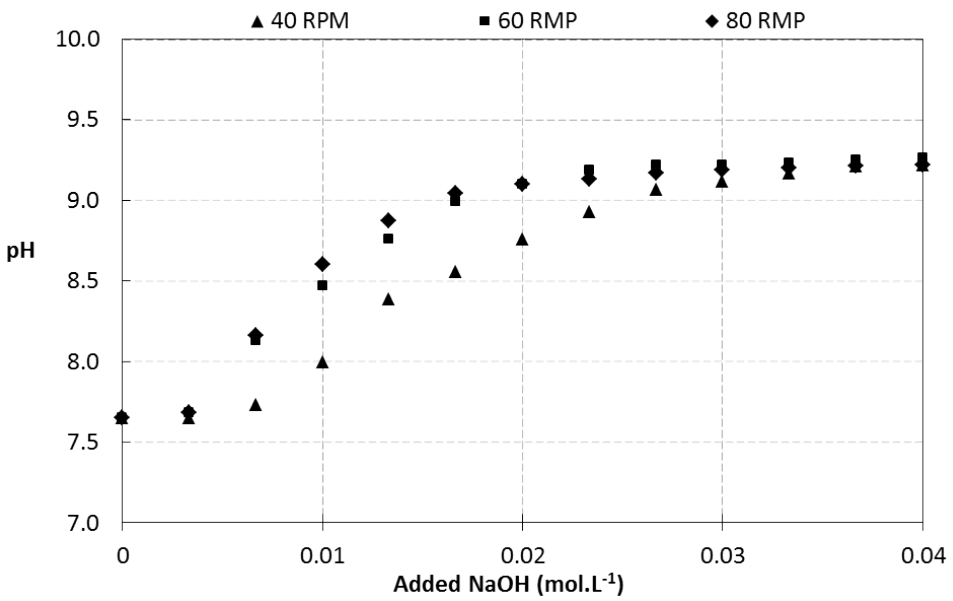


Figure 8.15 – *Suivi de pH lors de l'ajout séquentiel de soude sous différentes vitesses d'agitation.*

Il est intéressant de constater sur la figure 8.15, que lors de l'ajout de soude ou de chaux dans un milieu hypersalin, plus l'agitation est importante, moins l'effet tampon initial sur le pH est constaté. Un temps suffisant est appliqué entre l'injection de base et les relevés, pour que les temps de mélange et celui de réponse de la sonde n'influencent pas les valeurs obtenues.

Que ce soit dans le cas d'une agitation trop faible ou d'une concentration apparente de soude trop élevée, pour une même quantité d'ion hydroxyde ajoutée, les pH inférieurs traduisent qu'une partie de ces ions n'est pas sous forme dissoute. L'explication la plus probable est que ces ions hydroxyde précipitent avec des ions magnésium (ou un autre ion, mais les simulations montrent que le produit de solubilité atteint en premier est celui de la brucite), dans des zones voisines du point d'injection de soude. En effet, étant donné que l'échantillon n'est pas parfaitement agité, de très fortes sur-saturations en brucite apparaissent dans la zone d'injection. La cinétique de précipitation étant une fonction croissante de l'écart à l'équilibre (De Windt *et al.*, 2005), elle s'avère très rapide en comparaison avec la vitesse de mélange, et de la brucite se forme donc dans des zones localisées. La brucite n'aura donc été efficace que sur des zones restreintes, elle ne piège alors que peu de microalgues. Une fois la suspension de nouveau homogénéisée, la brucite précédemment formée se retrouve en très légère sous-saturation dans la suspension globale. Sa cinétique de redissolution est alors beaucoup plus lente que le temps caractéristique de la manipulation. Par ce biais, de la brucite non efficace pour la déstabilisation de la suspension algale est formée alors que dans l'échantillon global, elle est en légère sous-saturation. Du fait de

cette précipitation d'hydroxyde en légère sous-saturation, le pH apparaît tamponné.

Pour de très fortes agitations ou pour de très faibles concentrations apparentes en soude, le volume du flottatest a un comportement qui se rapproche de celui d'un réacteur parfaitement agité. Le produit de solubilité de la brucite est alors atteint simultanément dans l'ensemble de l'échantillon, et pour un pH fonction de la concentration initiale de magnésium dans le milieu. A partir de là, l'hydroxyde de magnésium précipite de manière homogène et plus lente (la sur-saturation étant limitée) dans toute la suspension. L'ensemble de la solution est alors balayée par le précipité dans sa phase de formation et les performances de récolte sont maximisées. C'est vers ce cas de mélange idéal qu'il faut a priori tendre.

La maximisation de l'intensité d'agitation ne peut toutefois pas être un levier sur lequel jouer sans modération. En effet, des observations qualitatives préliminaires à ces études, avaient mis en évidence une différence de structuration des flocs produits par autofloculation assistée, lors de l'application d'agitations trop importantes. Les flocs d'apparence plus granulaire, moins gélifiée, semblaient moins bien captés par les bulles et les performances globales de séparation semblaient s'en ressentir. Ces expériences qualitatives avaient mené aux choix des conditions opératoires appliquées et notamment de l'agitation, fixée à 40 RPM sur la quasi totalité des expériences de cette étude.

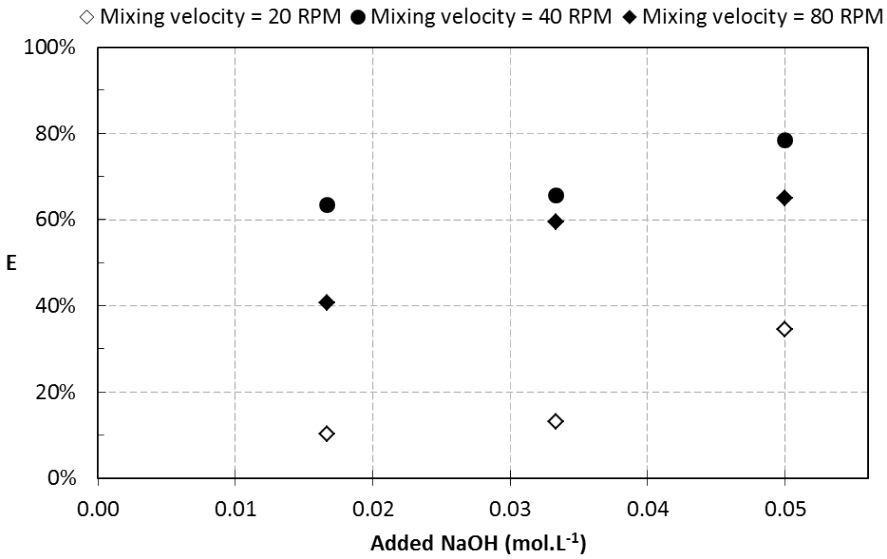


Figure 8.16 – *Influence de la vitesse d'agitation lors de l'injection d'une solution de soude à* $1M$*, sur l'efficacité de récolte d'une souche Gruissan non carencée, cultivée dans un assemblage 3,6/26.*

Peu d'expériences quantitatives ont été menées pour valider ces observations. Sur la figure 8.16, on remarque tout de même que si l'efficacité de récolte est fortement augmentée lorsque l'on passe de 20 à 40 RPM, elle diminue ensuite si l'on applique une agitation à 80 RPM. Une quantification plus précise de l'influence de l'agitation sur la capture par les bulles des flocs

formés, figure dans les perspectives de cette étude.

Pour approfondir la cinétique de précipitation de la brucite, le lecteur peut se référer aux travaux de Pokrovsky & Schott (2004).

8.4 Influence de la base utilisée pour déstabiliser la suspension algale

Dans la section 8.2.1, il a été évalué que le coût en soude pour récolter 1 kg de biomasse dans une culture extérieure est d'environ 0,28 €(selon le prix moyen de la soude en 2013). Une des pistes d'optimisation du procédé, d'un point de vue notamment économique, est d'utiliser d'autres bases pour déstabiliser la suspension. C'est ce qui a été réalisé dans ces expériences.

8.4.1 Détermination des bases et de leur gamme de concentration efficace

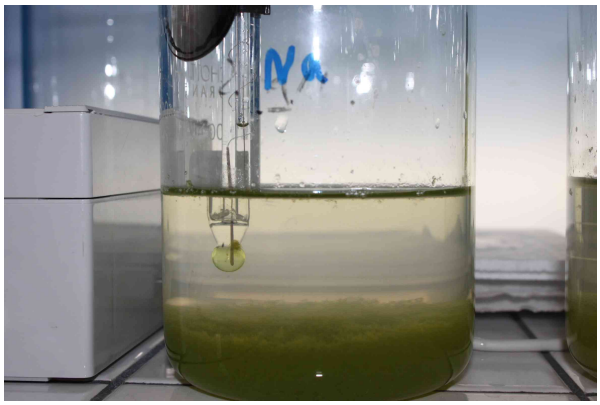
Dans cette expérience, 3 bases sont testées : la soude, la chaux et l'hydroxyde de magnésium. Une solution de soude à 0,5M et des laits de chaux et de magnésie dans les mêmes proportions molaires sont préparés. La chaux éteinte et l'hydroxyde de magnésium étant très peu solubles dans l'eau, il n'est pas possible d'obtenir des solutions de ces composés dans les gammes de concentrations désirées. La part non dissoute des composés dans les laits est dissoute (dans certaines limites, très faibles pour le lait de magnésie) lors de l'ajout du lait dans les suspensions algales.

La suspension microalgale utilisée est une souche LOV cultivée dans des saumures synthétiques à 10%, sans régulation du pH. Au moment des expériences en jartests, cette culture était non carencée ce qui explique son aspect verdâtre. Des échantillons de 300 mL de suspension sont ajoutés dans 6 jartests différents (un duplicat par base). Les solutions et laits sont ajoutés progressivement dans chaque jartest sous agitation à 40 RPM. L'agitation est stoppée 1 min après chaque ajout pendant 5 min pour observer floculation et séparations éventuelles (décantation ou flottation). Il faut noter que les concentrations apparentes des solutions ou laits de bases ajoutés sont élevées au regard de ce qui vient d'être mis en évidence dans la section 8.3.3. Il sera tenu compte de la perte éventuelle d'efficacité dans l'interprétation des résultats de cette manipulation préliminaire.

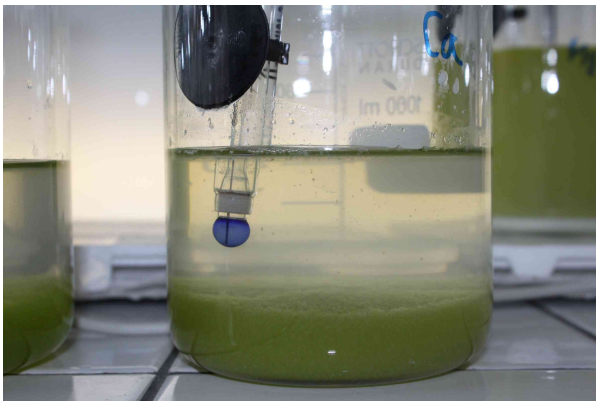
Les premiers jartests sur lesquels une floculation est observée sont ceux dans lesquels de la chaux est ajoutée. Pour la soude, une concentration légèrement supérieure est nécessaire pour

voir apparaître les premiers flocs. Dans les 2 cas, lorsque l'agitation est interrompue, les flocs décantent rapidement (figures 8.17(a) et 8.17(b)). Les flocs produits par ajout de chaux ont une apparence différente de ceux produits par ajout de soude. Il se pourrait que le précipité produit soit différent. Ceci sera vérifié par simulation dans la section 8.4.3.

En ce qui concerne l'ajout d'hydroxyde de magnésium, aucune floculation n'est observée malgré l'ajout de quantités importantes de lait de magnésie (figure 8.17(c)). Ceci confirme l'hypothèse avancée dans les sections 8.3.2 et 8.3.4, sur le fait que le processus de capture des microalgues se déroule durant la phase de précipitation de l'hydroxyde de magnésium. Lorsque celui-ci est apporté directement sous forme solide (a minima pour sa formulation en poudre), les algues ne sont pas captées et aucune décantation n'est observée.



(a) $NaOH$



(b) $Ca(OH)_2$

(c) $Mg(OH)_2$

Figure 8.17 – *Floculation-décantation induite par ajout de diverses bases.*

En ce qui concerne les gammes de concentrations efficaces pour l'autofloculation de *D. salina* dans des saumures synthétiques à 10%, il semblerait qu'elles se situent entre 0.0025 $mol.L^{-1}$ et 0.015 $mol.L^{-1}$ de bases ajoutées.

8.4.2 Autofloculation-flottation induite par ajout de soude et de chaux dans des saumures synthétiques

8.4.2.1 Matériels et méthodes spécifiques de l'étude sur les bases

Pour cette expérience, les mêmes bases que précédemment ont été testées. L'hydroxyde de magnésium sera rapidement abandonné au vu des premiers tests non efficaces. Cette fois, la suspension de *D. salina* souche LOV, cultivée dans des saumures synthétiques à 10%, est carencée en azote. Au moment de l'expérience, elle affiche une couleur orange vive (figure 8.18) et un ratio caroténoïdes sur chlorophylles de 6. Juste avant la récolte, la DO_{800} de la suspension est évaluée à 0,3, soit environ 0,3 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV. La salinité approche 11% du fait d'une légère évaporation durant la culture.

Des échantillons de 500 mL de suspension sont ajoutés dans 3 flottatests différents. Des volumes identiques de chaque solution mère de base sont préalablement complétés par de l'eau déminéralisée pour atteindre 100 mL de solutions basiques, de concentrations inférieures à 0.1 $mol.L^{-1}$ quel que soit le test. Ces solutions de 100 mL sont ajoutées dans chaque flottatest, sous agitation à 40 RPM. En procédant ainsi, on s'affranchit du problème de perte d'efficacité de récolte exposé dans le chapitre 8.3.3.

L'agitation est stoppée 1 min après les ajouts de solutions basiques pour observer la floculation et la décantation éventuelles. 5 min après l'arrêt de l'agitation, 200 mL d'une saumure synthétique à 10% pressurisée à 6 $bars$ sont ajoutés dans chaque flottatest. Les efficacités de récupération et facteurs de concentration sont évalués 10 min après l'ajout de milieu de culture pressurisé.

8.4.2.2 Résultats de l'étude sur les bases

Sur la figure 8.18, il apparaît clairement que seules la soude et la chaux permettent d'obtenir une flottation efficace. La non efficacité de l'hydroxyde de magnésium apporté sous forme solide se confirme sur cette expérience de flottation. On constate par contre que s'il n'emprisonne pas d'algues, l'hydroxyde de magnésium flotte tout de même avec l'ajout de microbulles. Ces observations appuient encore les hypothèses que l'hydroxyde de magnésium est l'agent floculant, que les microalgues sont emprisonnées uniquement durant sa phase de précipitation, mais aussi que c'est lui qui permet l'adhésion des microbulles sur la phase solide.

La figure 8.19 présente les performances d'autofloculation-flottation constatées avec l'ajout de

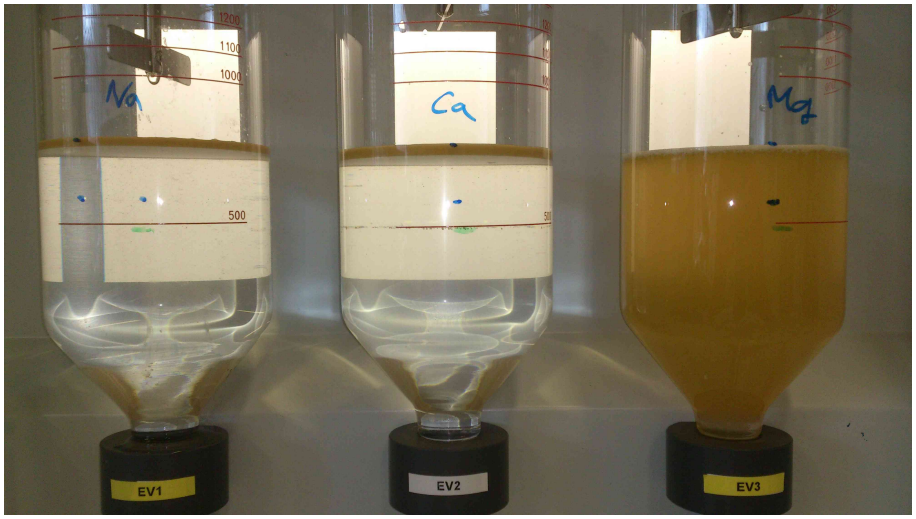


Figure 8.18 – *Floculation-flottation induite par ajout de diverses bases (de gauche à droite : soude, chaux, hydroxyde de magnésium). Concentrations de bases par litre de suspension algale initiale :* 0.01 $mol.L^{-1}$.

soude et de chaux. Les résultats sont présentés en fonction des concentrations en bases ajoutées et en fonction des concentrations en hydroxydes ajoutées par litre de suspension algale initiale.

Sur cette expérience, la chaux présente de meilleures efficacités de récolte que la soude. Des efficacités de récupération supérieures à 80% sont observées dès l'ajout de 0.005 $mol.L^{-1}$ de chaux éteinte dans la suspension initiale. Par contre, pour la soude dont l'efficacité de récolte pour cette même concentration était déjà de 50% dans une eau synthétique Ifremer, aucune séparation n'est observée dans les saumures synthétiques de même salinité.

Ce dernier résultat est surprenant, car la concentration en magnésium supérieure dans la saumure aurait pu laisser penser que la précipitation d'hydroxyde de magnésium serait facilitée et que du coup, l'efficacité de récolte serait augmentée. Il se pourrait ici aussi, que de trop importantes concentrations mais en magnésium cette fois, entraînent des précipitations localisées d'hydroxyde de magnésium et viennent donc amputer les performances de récolte. Ceci sera confirmé par une étude sur l'influence de la salinité du milieu de culture (section 8.6).

L'efficacité de récolte atteint quand même plus de 90% avec la soude mais ceci pour une concentration ajoutée de 0.010 $mol.L^{-1}$. On retrouve à partir de cette concentration les performances obtenues sur les eaux synthétiques Ifremer dans le chapitre 8.2.

Le facteur de concentration lors de l'ajout de 0.005 $mol.L^{-1}$ de chaux éteinte dans la suspension initiale atteint des valeurs supérieures à 15. Pour les séparations efficaces, les facteurs de concentration sont légèrement inférieurs pour la chaux que pour la soude. Ces facteurs de concentration décroissent avec l'ajout de base qu'il s'agisse de soude ou de chaux.

L'ajout de chaux implique la dissociation de 2 fois plus de moles d'hydroxydes que lors de

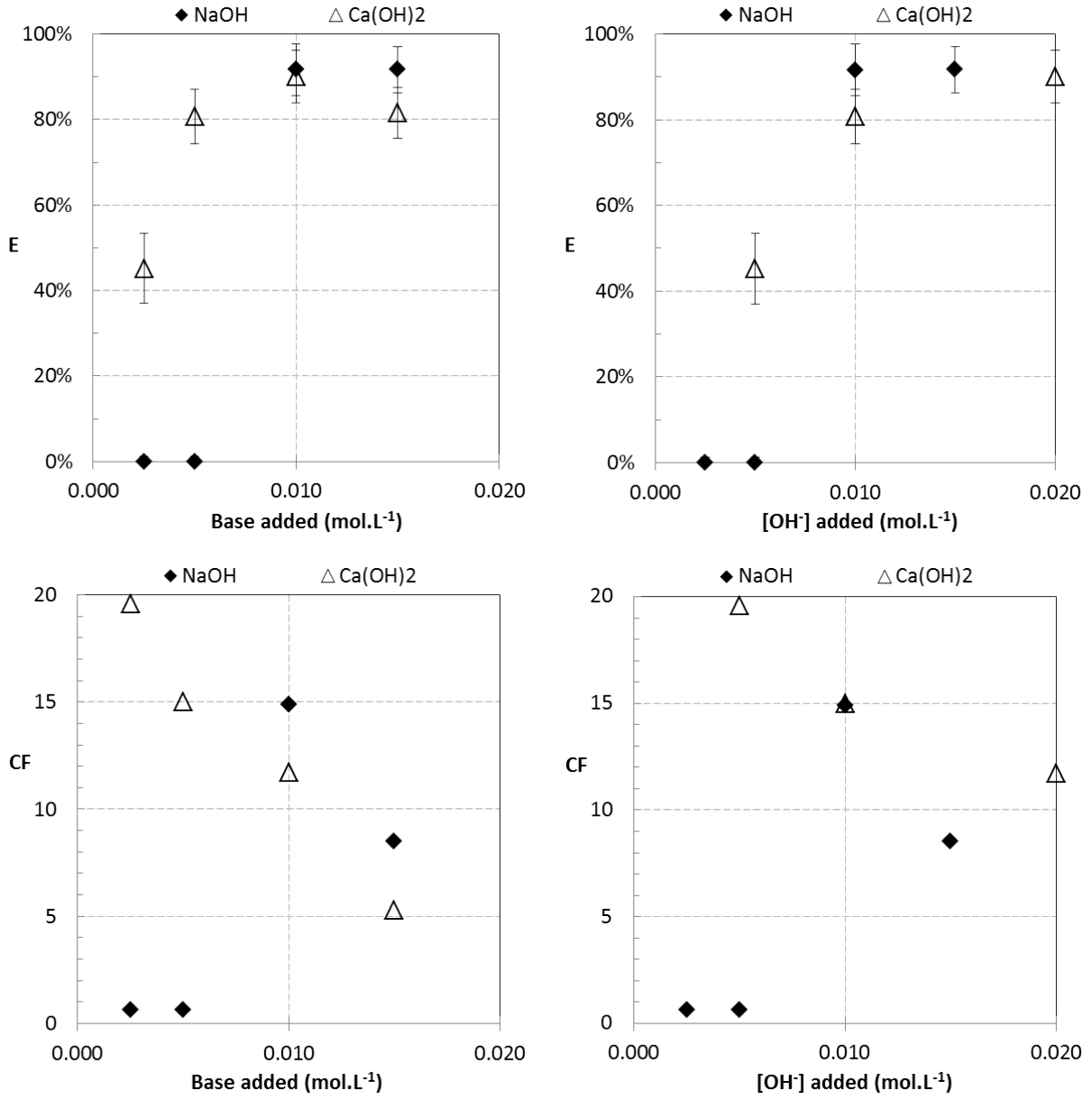


Figure 8.19 – *Performances d'autofloculation-flottation obtenues avec ajout de soude ou de chaux sur une suspension de souche LOV dans des saumures synthétiques* 10%. *Performances exprimées en fonction de la concentration de base ajoutée et en fonction de la concentration d'hydroxydes ajoutés.*

l'injection d'une même concentration de soude. Ceci entraîne une plus grande production de précipité, qui induit une efficacité de récupération plus importante pour la chaux. Dans le cas du facteur de concentration (FC), un encombrement de la phase algale est plus rapidement constaté avec la chaux ce qui conduit à un FC chaux plus faible.

Encore une fois, les flocs produits par ajout de chaux ont une apparence différente de ceux produits par ajout de soude. Il se pourrait que le ou les précipités produits soient différents, ce qui pourrait aussi expliquer cette légère baisse des facteurs de concentration. Ceci sera vérifié par simulation dans la section 8.4.3.

8.4.3 Simulation de l'ajout de chaux et de soude dans une saumure synthétique à 10%

Les concentrations de la saumure synthétique à 10% sont évaluées dans l'échelle des molalités (tableau 8.2) et renseignées dans le programme. La concentration en carbone total correspond à l'évaluation faite dans l'étude précédente sur l'eau synthétique Ifremer.

Concentrations ioniques	en $mmol.kgw^{-1}$
Na^+	1465,79
K^+	29,65
Mg^{2+}	173,92
Ca^{2+}	31,00
Cl^-	1733,05
SO_4^{2-}	86,27
Br^-	2,46
Carbone total	0,21
Température	25 °C
pH	8,00

Tableau 8.2 – *Concentrations en principaux ions et autres caractéristiques d'une saumure synthétique de salinité totale* 10%.

La figure 8.20 regroupe les simulations d'ajout de soude et de chaux dans la saumure synthétique à 10%. On y retrouve les quantités de précipités formés dans chaque cas, ainsi que la simulation de l'évolution du pH.

La quantité de carbone total considérée étant très faible, très peu de dolomite est formée en début d'ajout de base. La figure 8.20 montre que très rapidement un précipité d'hydroxyde de magnésium est formé dans le cas des ajouts de chaux et de soude. Ce précipité est formé 2 fois

plus rapidement pour la chaux que pour la soude, du fait de la présence de 2 ions hydroxydes par molécule de chaux éteinte. Ceci peut expliquer pourquoi à concentration de bases égales, la chaux est plus efficace que la soude.

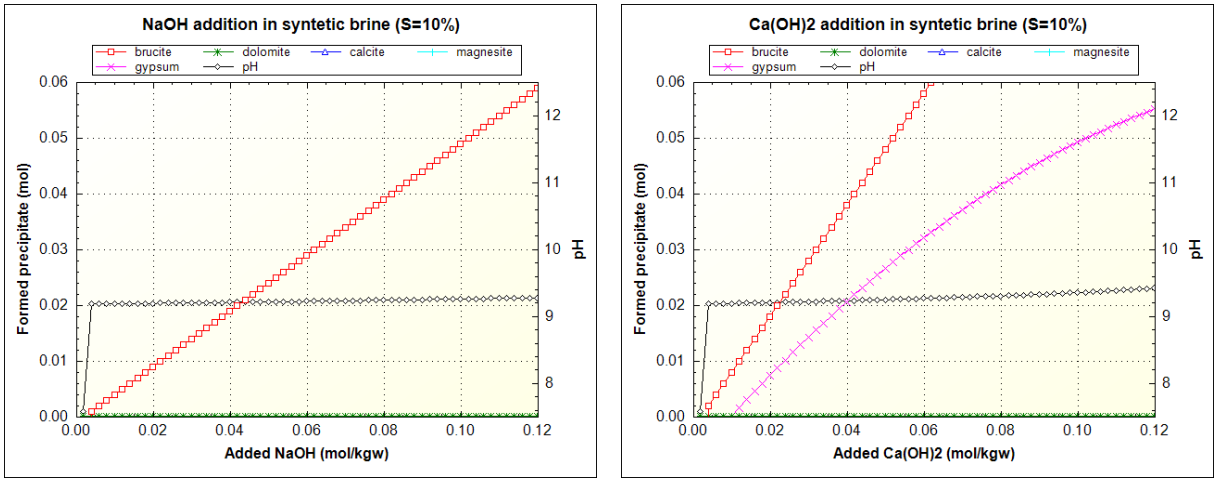


Figure 8.20 – *Simulation de l'ajout de soude et de chaux dans une saumure synthétique à* 10%. *Brucite* (□) *; Gypse* (×) *; Dolomite* (∗) *; pH* (◇).

Ce qu'il est surtout intéressant de constater avec la simulation, c'est la précipitation quasi instantanée lors de l'ajout de chaux d'un autre composé, le gypse. Cette précipitation pourrait expliquer l'apparence différente des flocs produits par ajout de chaux. Elle pourrait aussi expliquer en partie, les facteurs de concentration plus faibles avec la chaux. Étant donné que cette précipitation de gypse n'implique pas de fixation d'hydroxyde, elle ne réduit pas la quantité d'hydroxyde de magnésium produite mais augmente la quantité de solide produite. Cette simulation semble tout à fait en accord avec les expériences.

8.4.4 Conclusions sur les bases utilisées pour déstabiliser les suspensions

L'hydroxyde de magnésium apporté sous forme solide dans des saumures à 10%, s'est avéré inefficace pour déstabiliser une suspension de *D. salina* souche LOV carencée. À l'inverse, les résultats avec la soude et avec la chaux éteinte sont très prometteurs. Dans le cas de la chaux, en plus des précipitations d'hydroxyde de magnésium et de traces de dolomite, la précipitation de gypse a été mise en évidence par la simulation. Ceci explique l'apparence différente des flocs obtenus.

D'un point de vue économique, pour la soude, les chiffres sont identiques à ceux utilisés dans la section 8.2.1 (90% de récupération pour une concentration de soude de 0,01 $mol.L^{-1}$, prix du marché en octobre 2013). Pour récolter 1 kg de biomasse, dans une culture de concentration en

microalgues équivalente à une culture extérieure, le coût de soude est donc d'environ 0,28 €(voir section 8.2.1).

Pour la chaux, avec une concentration de 0,005 $mol.L^{-1}$, il est possible de récupérer 80% des 0,5 $g.L^{-1}$ de matière sèche algale soit 0,4 g_{MS}. Avec la masse molaire de la chaux éteinte, on déduit qu'il faut 0,37 g de chaux pour récolter 0,4 g_{MS}, soit environ 0,93 g de chaux par gramme de matière sèche. Sachant que le prix de la chaux éteinte industrielle tourne autour de 0,09 €/kg en 2013, le coût en floculant pour récolter 1 kg de biomasse dans une culture extérieure serait d'environ 0,08 €, soit 3,5 fois moins qu'avec la soude. La chaux présente donc un intérêt tout particulier pour le passage à l'échelle industrielle du procédé.

8.5 Influence de la concentration en calcium des eaux de culture

Avant de mettre en évidence le mécanisme d'autofloculation-flottation par précipitation d'hydroxyde de magnésium, l'analyse de la littérature et les premières séries de manipulation ont laissé penser que les concentrations en calcium des milieux de culture pouvaient jouer un rôle central sur la récolte.

Après avoir réalisé les premiers tests sur les eaux hypersalées Ifremer et mis en évidence l'importance des équilibres ioniques dans le processus de récolte, il a été décidé de reformuler un milieu de culture plus proche des saumures réelles. Ceci a été fait à partir de mesures Dionex réalisées par nos partenaires du LBE Narbonne. La composition de cette eau baptisée « eau synthétique LBE » est proposée dans le tableau 4.2.

Pour cette expérience, une souche Gruissan est inoculée dans cette eau. Le pH de culture est limité à 8. En fin de culture, la salinité est de 13% du fait d'une évaporation importante dans les premiers jours. Avant récolte, la DO_{800} est de 0,6, soit environ 0,6 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation Ifremer.

Un protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). Les concentrations apparentes des solutions de soude injectées sont inférieures à 0,125 $mol.L^{-1}$.

Les performances de récolte obtenues sur cette eau synthétqiue LBE (carrés sur les figures) sont reportées sur les graphiques 8.21 en comparaison des performances obtenues précédemment sur l'eau synthétique hypersalée Ifremer (losanges). Alors que de meilleurs performances de récolte étaient attendues, étant donnée la concentration plus importante de magnésium dans l'eau LBE, le résultat inverse est mis en évidence. 2 hypothèses peuvent alors être formulées pour expliquer cette perte de performances :

1. Comme mis en évidence dans l'étude de Sukenik & Shelef (1984), un précipité de phosphate de calcium joue un rôle clé dans la récolte. Les concentrations en calcium étant inférieures dans l'eau LBE, ceci peut expliquer les pertes de performance.

2. Les concentrations importantes en sels entraînent des précipitations localisées d'hydroxydes, qui amputent les performances de récolte (cas étudié dans la section 8.6).

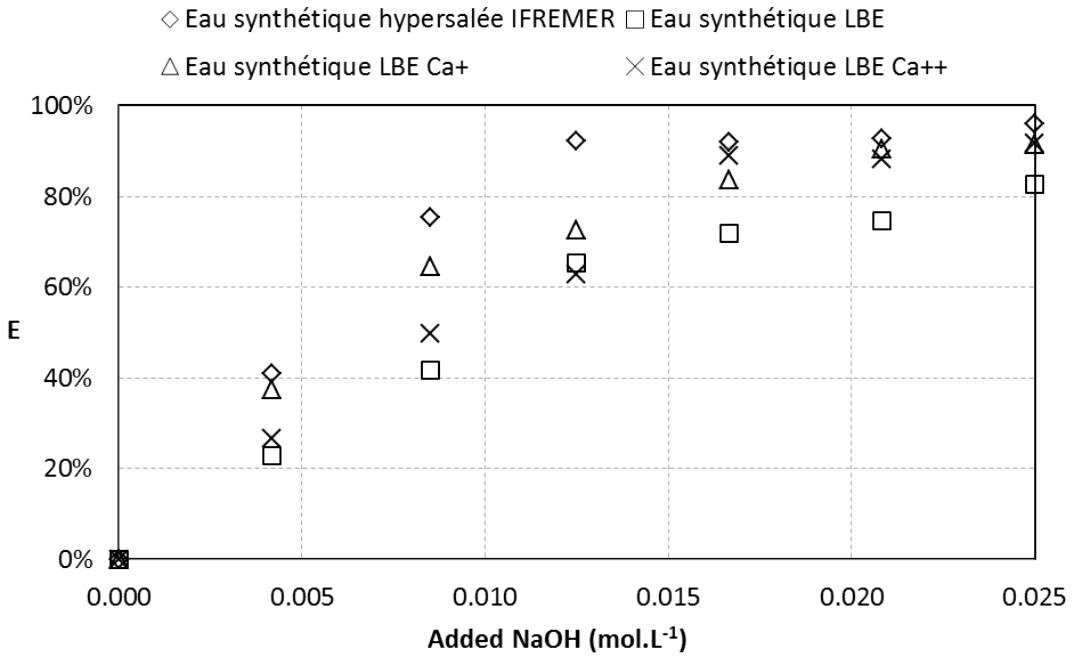
Cette expérience étant l'une des premières réalisées, l'hypothèse 1, plus en phase avec la littérature, fut lors de la première analyse privilégiée. Il fut alors décidé de réaliser 2 nouvelles eaux synthétiques (LBE `Ca+` et LBE `Ca++`) dans lesquelles la concentration en calcium approche et égale celle de l'eau Ifremer (voir compositions dans le tableau 4.2), en espérant retrouver avec ces eaux les performances obtenues avec l'eau Ifremer.

Pour cette nouvelle expérience, la même souche Gruissan est inoculée dans ces eaux. Le pH de culture est limité à 8. En fin de culture, la salinité est de 11,5% dans la culture LBE `Ca+` et de 12,8% dans la culture LBE `Ca++`. La DO_{800} est de 0,36 dans la culture LBE `Ca+` et de 0.42 dans la culture LBE `Ca++`. Le même protocole d'autofloculation-flottation en flottatest qu'au-dessus est appliqué.

En ce qui concerne les évaluations expérimentales du pH après injection de soude (figure 8.22), le plateau pH sur lequel précipite l'hydroxyde de magnésium est atteint pour des valeurs plus faibles que pour l'eau Ifremer. Ce résultat était attendu, il s'explique grâce aux concentrations en magnésium plus importantes, qui permettent d'atteindre le produit de solubilité de son hydroxyde, pour des pH plus faibles.

Les performances de récolte obtenues (triangles pour la culture LBE `Ca+` et croix pour culture LBE `Ca++`) ont aussi été reportées sur les graphiques 8.21. L'eau LBE qui, dans ces conditions de manipulation, arbore les meilleures performances de récolte, est l'eau dont la concentration en calcium est intermédiaire. La suspension LBE `Ca++`, qui affiche la même concentration en calcium que l'eau Ifremer présente des performances de récolte moindres. A priori, la concentration en calcium du milieu de culture ne joue donc pas de rôle primordial dans la récolte. L'hypothèse 1, comme quoi il se formerait un précipité de phosphate de calcium est donc fortement remise en cause par cette expérience.

La suspension LBE `Ca+`, dont les performances de récolte sont légèrement supérieures que pour les autres eaux LBE, affiche par contre une concentration microalgale et surtout une salinité légèrement plus faible au moment de la récolte. L'influence de la salinité du milieu de culture sera étudiée dans la section 8.6 pour voir si l'hypothèse 2 formulée plus haut, peut permettre d'expliquer les résultats obtenus dans cette expérience.



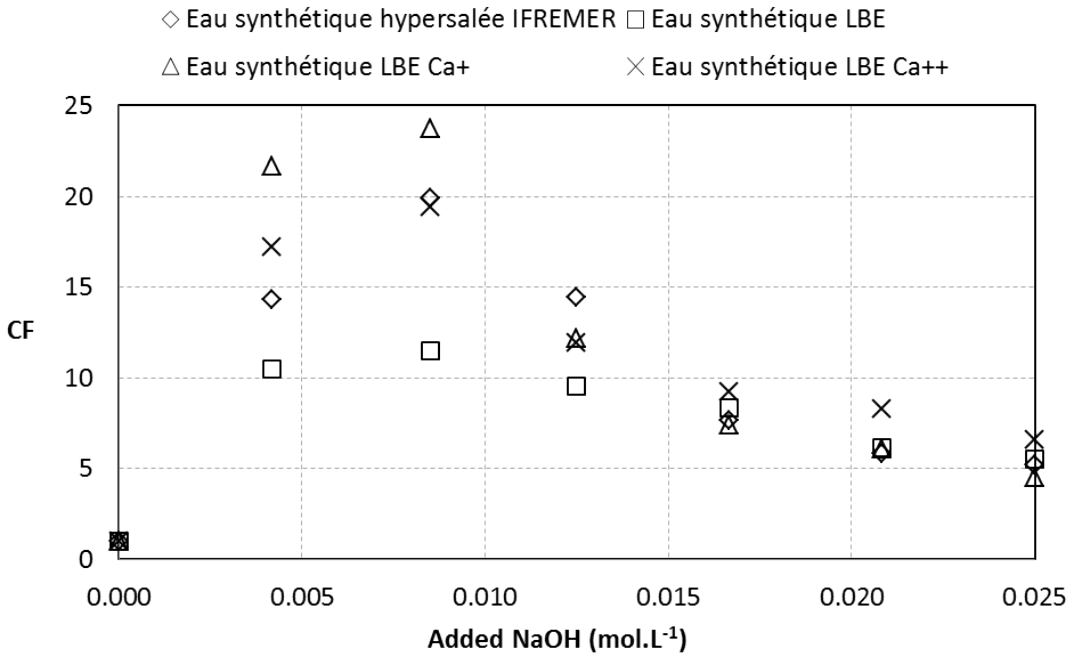


Figure 8.21 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche Gruissan dans des eaux synthétiques LBE.*

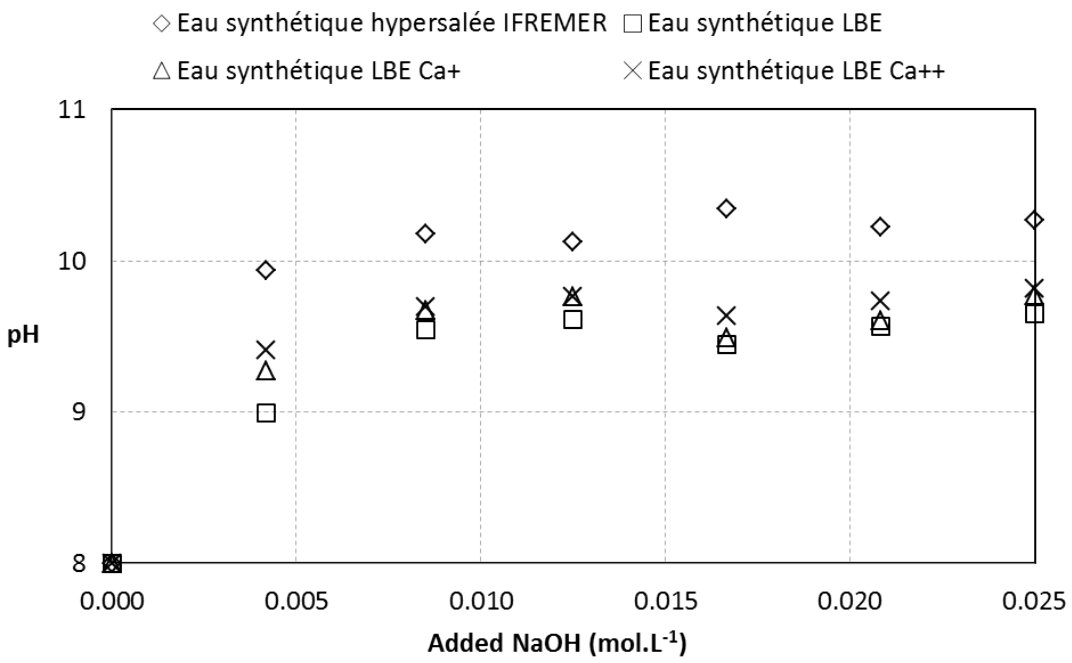


Figure 8.22 – *pH des suspensions de D. salina, souche Gruissan dans des eaux synthétiques LBE et Ifremer, après injection de soude.*

8.6 Influence de la salinité des eaux de culture

2 études distinctes ont été réalisées sur ce point, la première sur des saumures synthétiques représentatives des eaux de salins et la seconde sur des eaux réelles prélevées directement à différents points des salins de Gruissan. Ces études ont été complétées par des simulations.

8.6.1 Étude préliminaire en milieux synthétiques

Entre l'étude précédemment rapportée sur les eaux synthétiques LBE (section 8.5) et cette nouvelle étude, les eaux de salins ont été caractérisées de manière plus précise. Des tests Dionex ont été réalisés directement au LISBP et comparés aux données extraites de tables de composition des saumures d'évaporation (tables confidentielles nouvellement acquises au moment de cette expérience). À partir de là, de nouvelles eaux synthétiques ont alors été proposées et baptisées « saumure synthétique X% », X étant la salinité totale de la saumure préparée.

Une étude sur des suspensions de *D. salina* dans ces eaux est déjà proposée dans la section 6.2.1. Il y est mis en évidence que les hautes salinités ne permettent pas de déstabiliser la souche LOV

cultivée.

Ces suspensions sont récupérées ici, pour étudier l'influence de la salinité des eaux de culture, sur le procédé d'autofloculation-flottation. Pour rappel, 3 cultures de souche LOV, dans des saumures synthétiques à 10, 17,7 et 22,6% de salinités respectives, sont menées dans des PBR 2,5 L, agités par un léger bullage d'air. Ces cultures ne disposent pas de régulation automatique du pH (ajout ponctuel de CO_2 si pH trop important). En fin de culture, les salinités respectives des suspensions étaient de 11%, 20,3% et 23,3%. Les ratios respectifs car/chl des suspensions avant récolte étaient de 5,8, 3,0 et 1,8. Les tests de récolte ont été réalisés lorsque les DO_{800} des suspensions étaient comprises entre 0,3 et 0,5.

Les grandes lignes du protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation sont appliquées (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). Seule modification, la soude est remplacée par un lait de chaux, de concentration totale inférieure à 0,1 $mol.L^{-1}$ quel que soit le test effectué.

Les faibles quantités de suspensions disponibles n'ont permis de réaliser que 2 tests par salinité. Les performances de récolte obtenues sont rapportées sur la figure 8.23. L'efficacité de récolte diminue drastiquement lorsque la salinité du milieu de culture augmente. Pour les facteurs de concentration, il est difficile de dégager une tendance étant donnés l'incertitude sur l'évaluation et le manque de points.

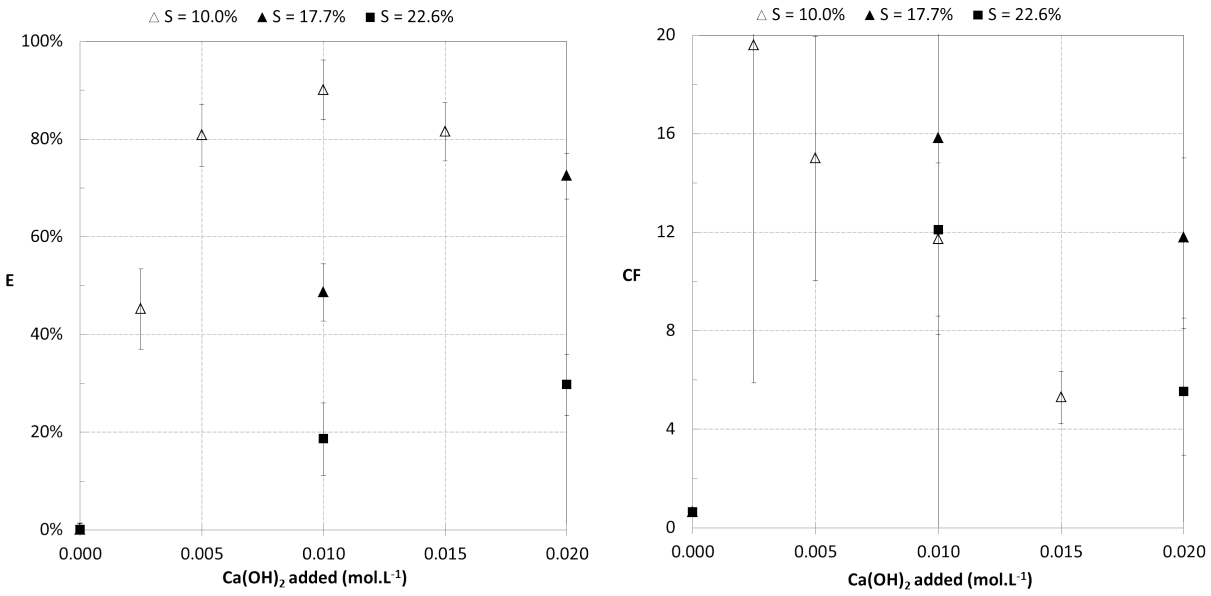


Figure 8.23 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV, dans des saumures synthétiques à différentes salinités.*

Pour compléter cette étude et pouvoir tirer des conclusions plus appuyées sur l'influence de la salinité des eaux de culture, une étude plus complète sur des eaux naturelles a été réalisée.

8.6.2 Étude sur des eaux prélevées dans les salins

Pour cette expérience, des cultures de souche LOV non carencée, dans 3 eaux réelles prélevées dans le circuit des marais de Gruissan et préalablement autoclavées (eau circuit 7,5%, 12% et 15,2%) seront caractérisées. Pour chaque culture, la souche est d'abord acclimatée à son nouvel environnement durant 20 jours. Au bout de cette période, les cultures à caractériser sont initiées à partir des inocula acclimatés. Un protocole de suivi précis est mis en œuvre.

La figure 8.24 propose par exemple le suivi de la concentration microalgale par DO_{800}. On remarque que les cultures, non régulées en pH, atteignent des plateaux au bout de 4 jours. Il est décelé une limitation en carbone inorganique. Des apports réguliers par bullage de CO_2 sont alors réalisés régulièrement à partir du 26/9. Sur cette expérience, les cultures à 7,5 et 12% semblent légèrement plus efficaces que celle à 15,2%. Ceci est en accord avec la littérature sur les salinités optimales de culture de *D. salina* (Munoz *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2008).

Les tests de récolte sont réalisés lorsqu'il est jugé que les cultures ont atteint un nouveau plateau. Un protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). Les quantités de soude souhaitées sont ajoutées aux échantillons, en prenant garde que la concentration de solution de soude ajoutée n'excède pas 0,25 $mol.L^{-1}$, quelle que soit la concentration finale dans l'échantillon.

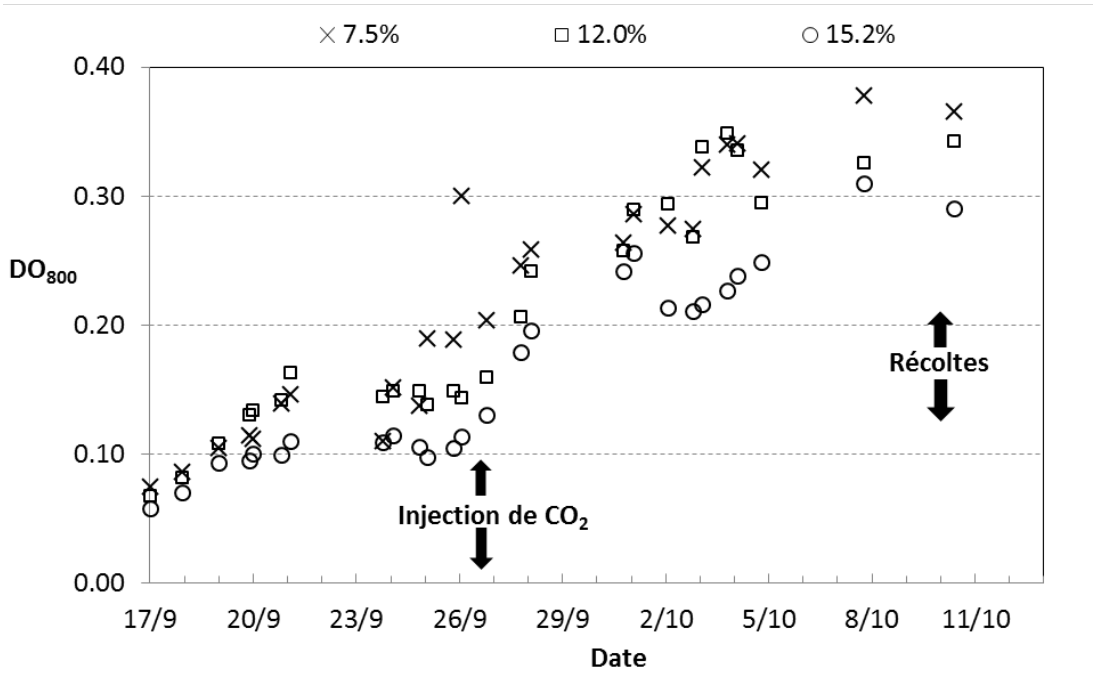


Figure 8.24 – *Suivis des DO_{800} dans des cultures de souche LOV, effectuées dans des eaux réelles des marais de Gruissan, à différentes salinités.*

Sur la figure 8.25, on retrouve avec les eaux de Gruissan réelles de salinité 7,5% les performances entrevues sur l'eau synthétique Ifremer. Ceci est intéressant en ce qui concerne la robustesse du procédé et sa réplicabilité en conditions extérieures de culture. D'un autre point de vue, il est décevant de ne pas obtenir de meilleures performances de récolte alors que les concentrations en magnésium de ces eaux sont bien plus importantes que pour l'eau Ifremer.

En ce qui concerne les différentes salinités, les résultats obtenus sur l'étude en milieux synthétiques sont confirmés sur des milieux réels. La figure 8.25 montre que plus la salinité du milieu de culture est élevée, moins l'efficacité de récolte est bonne. Il n'est pas possible de différencier les résultats obtenus sur les facteurs de concentration.

Pour le pH des échantillons, il se confirme que plus la concentration en magnésium est importante dans les eaux de culture, plus le plateau pH est atteint pour des valeurs basses (figure 8.26). Il a déjà été vu précédemment, et les performances de récolte obtenues ici le confirment, que ceci ne préfigure en rien de meilleures séparations, au contraire.

La figure 8.27 présente des suivis plus précis de l'évolution des pH dans des eaux de différentes salinités prélevées directement dans le circuit des salins. On remarque que l'effet tampon évoqué dans la section 8.3.4, est accentué avec la salinité. En effet, les plateaux pH caractéristiques de la formation normale d'hydroxyde de magnésium, bien que plus bas pour les fortes salinités, sont atteints de manière plus tardive.

Ce comportement ne peut a priori pas s'expliquer par une augmentation de l'alcalinité des eaux. En effet, l'alcalinité des eaux hypersalines n'a pas été caractérisée lors de cette étude mais des travaux de Lazar *et al.* (1983) montrent que l'alcalinité est légèrement supérieure dans une eau à 28%, mais similaire pour les autres salinités considérées. Or, l'effet tampon évolue pour chacune de ces salinités.

Ceci pourrait s'expliquer par l'accentuation pour les eaux fortement salées, du phénomène de sur-saturation évoqué dans la section 8.3.4. Dans ce cas, c'est l'augmentation des concentrations en magnésium pour les eaux de salinités totales supérieures qui favoriserait l'atteinte de zones de sur-saturation en hydroxyde de magnésium. Les conséquences seraient alors identiques, à savoir, précipitations localisées d'hydroxyde de magnésium, mauvais balayage de l'échantillon et donc mauvaise efficacité de récupération pour les fortes salinités si conditions de mélange identiques.

Les simulations obtenues (non présentées) indiquent pour cette étude, que la quantité d'hydroxyde de magnésium formée augmente légèrement avec la salinité. Pour rappel, la modélisation proposée dans cette étude est limitée aux équilibres thermodynamiques, elle ne tient pas compte des cinétiques de formation des précipités. Ceci soutient encore le fait qu'a priori, les performances de récolte ne dépendent pas seulement de la quantité de précipité formé, mais aussi et surtout, de la manière dont celui-ci se forme.

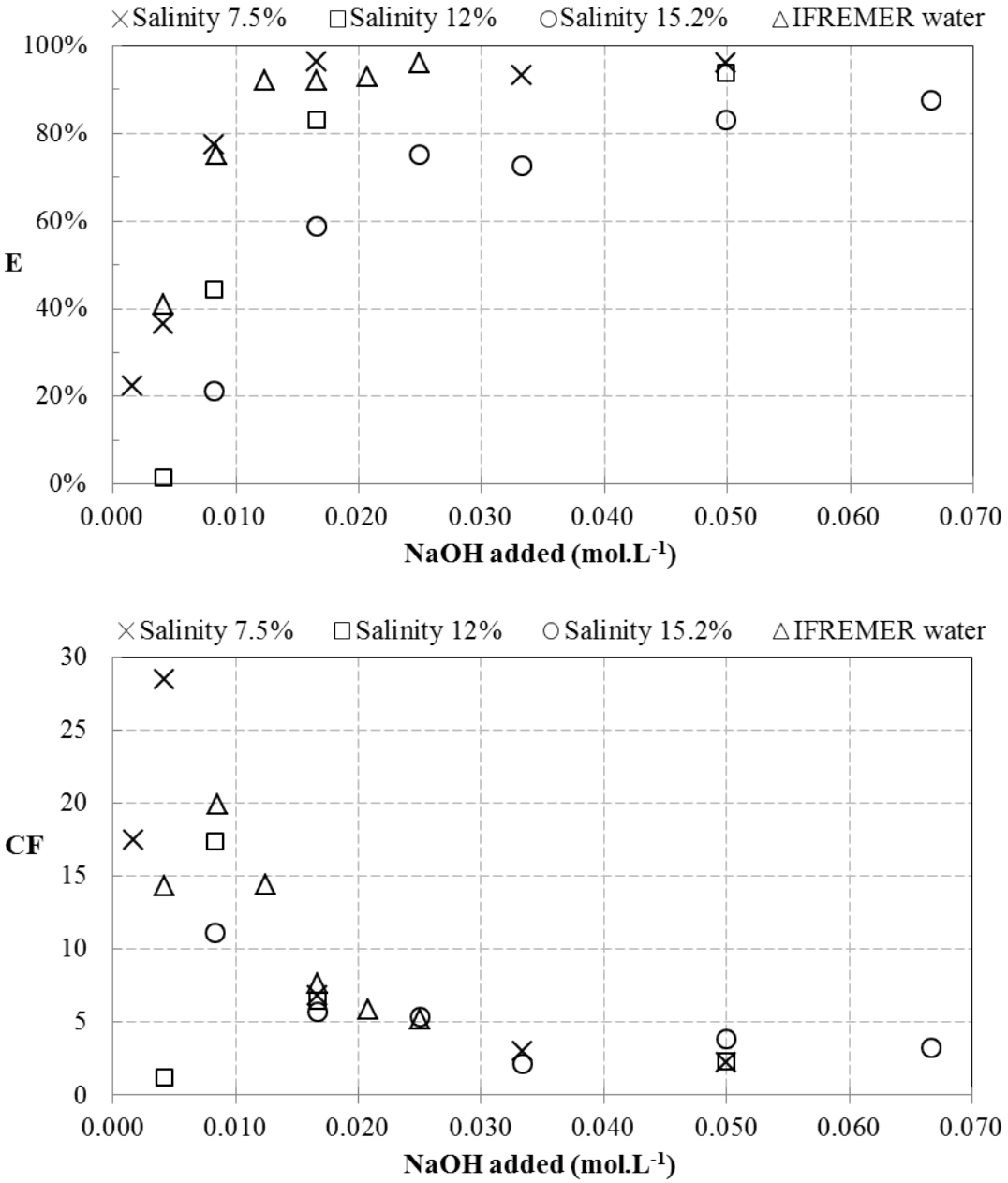


Figure 8.25 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV, dans des eaux naturelles de salins à différentes salinités.*

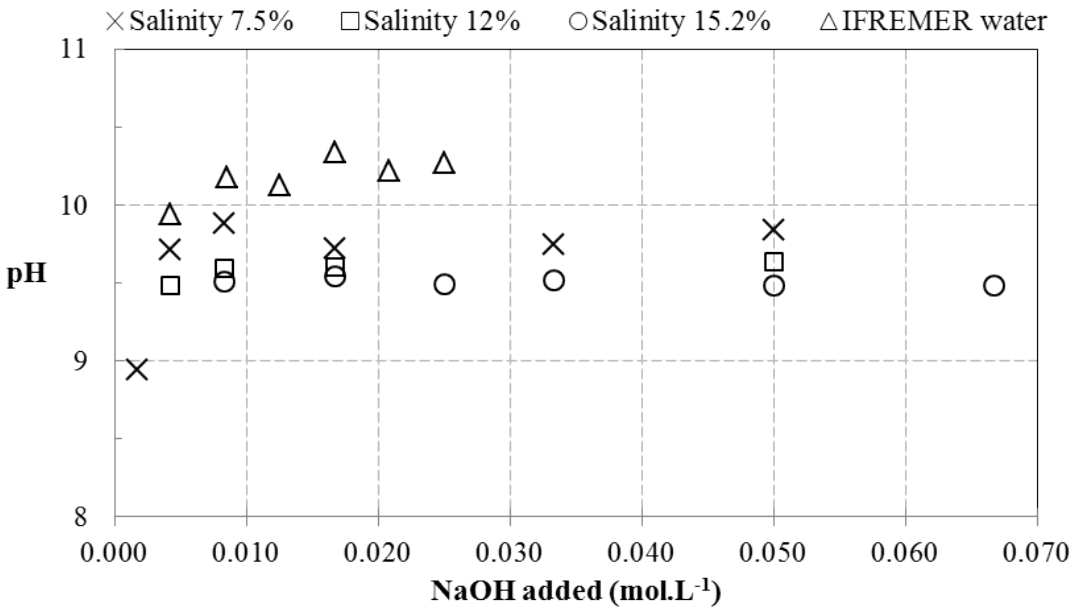


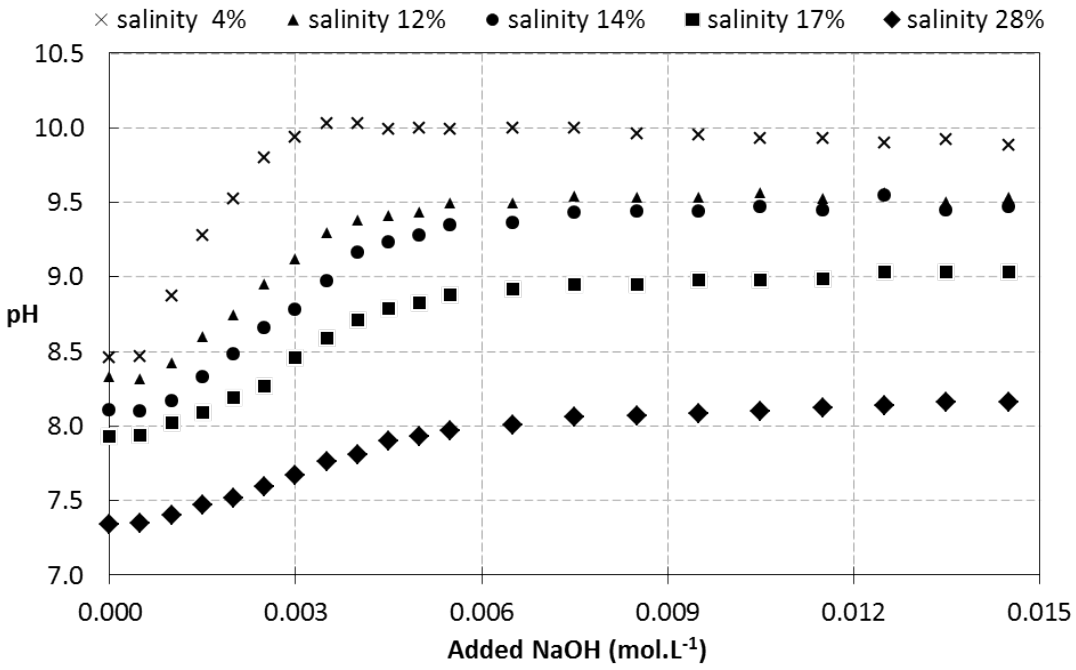
Figure 8.26 – *pH des suspensions de D. salina, souche LOV dans des eaux naturelles des salins à différentes salinités, après injection de soude.*

8.6.3 Conclusions sur l'influence de la salinité des eaux de culture

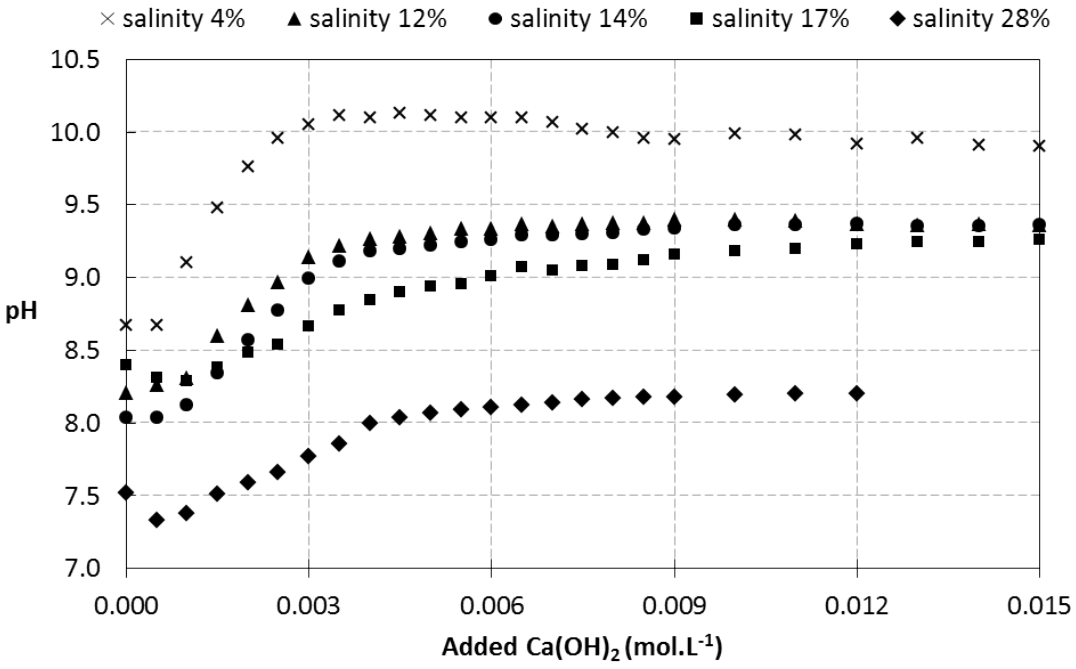
Dans les expériences réalisées ici, plus la salinité des milieux de culture est importante moins les efficacités de récolte sont bonnes. Ce résultat qui va à l'encontre de ce qui avait été anticipé après les premières expériences peut, comme dans le cas des conditions d'injection de bases (voir conclusions section 8.3.4), se justifier par des précipitations d'hydroxyde de magnésium localisées et donc moins efficaces. Dans ce cas, la concentration importante en magnésium qui devait être l'alliée de la récolte, handicaperait cette dernière, en favorisant le phénomène de sur-saturation de la brucite autour du point d'injection de la soude. Ceci est vrai si les mêmes conditions de mélange et d'injection de base sont appliquées.

Pratiquement, pour améliorer les efficacités de récolte, plusieurs solutions pourraient être explorées. La première consiste à réduire la salinité dans les cultures de *D. salina*, pour minimiser la sur-saturation et maximiser les performances de récolte. Cette solution est à considérer en tenant compte de l'évolution des productivités en biomasse et en métabolites d'intérêt, en fonction de la salinité de culture. Une salinité optimale sera alors dégagée.

Une deuxième solution consisterait à utiliser des saumures de salinités totales importantes, mais dans lesquelles la concentration en magnésium est diminuée par rapport à une eau du circuit classique d'évaporation. Dans la section 8.7 suivante, il sera vu qu'il est possible de jouer sur les équilibres ioniques des eaux de culture en préparant des assemblages différents. Malheureusement,



(a) Solution de soude à $1M$



(b) Lait de chaux de concentration équivalente à $1M$

Figure 8.27 – *Suivis de pH durant l'injection de solutions basiques dans des eaux de différentes salinités, prélevées directement dans le circuit des salins de Gruissan.*

il est difficile de diminuer la concentration de magnésium, qui précipite très tard dans le cycle d'évaporation d'une eau de mer. La seule solution envisageable pour réduire la part de magnésium dans les eaux serait plutôt de recycler les eaux traitées par autofloculation-flottation dans de nouvelles cultures. En effet, la crainte de lessivage du magnésium, relevée dans les études en eaux douces (Vandamme *et al.*, 2012), n'est ici plus justifiée étant donnée la concentration initiale de magnésium. La diminution de cette concentration lors de recyclages successifs pourrait plutôt favoriser la récolte des microalgues.

La troisième solution consisterait à ne pas subir la forte concentration en magnésium en adaptant les technologies d'injection de base, ou plus généralement la manière d'augmenter le pH pour induire la précipitation d'hydroxyde de magnésium. En effet, si l'on arrive à se rapprocher des conditions d'équilibre thermodynamique, les fortes salinités pourraient servir les performances de récolte en favorisant une précipitation rapide de l'hydroxyde de magnésium. Les axes de développement pour arriver à ces fins sont ici nombreux : optimisation des conditions de mélange, réduction de la concentration des solutions injectées, utilisation de formulations différentes des solutions de base, utilisation d'une montée naturelle du pH,...

Un compromis entre ces différentes solutions semble être à court terme le meilleur axe de développement du procédé d'autofloculation-flottation.

8.7 Influence de la préparation des eaux de culture

Cette étude a pour but de vérifier si le fait d'utiliser des assemblages d'eaux naturelles, plutôt que d'utiliser des eaux directement issues des circuits, ne vient pas amputer les performances de culture et dans un second temps, celles de récolte. Il a été vu précédemment, que pour simplifier l'obtention de la salinité désirée lors de la culture de *D. salina* à l'échelle industrielle, il est préférable de préparer le milieu de culture par assemblage. Les rapports de concentrations ioniques, notamment celles du calcium et des sulfates, dans ces eaux assemblées peuvent alors légèrement différer de ceux obtenus dans des eaux du circuit d'évaporation classique (tableau 8.3).

Sur cette expérience, des cultures de souche LOV non carencées sont caractérisées. Ces cultures sont menées dans 3 types d'eaux réelles à 12% préparées avec des eaux des marais de Gruissan préalablement autoclavées (eau circuit 12%, assemblage 3,6/16 et assemblage 3,6/26). Le tableau 8.3 rappelle les concentrations en ions principaux des 3 eaux utilisées.

Pour chaque culture, la souche est d'abord acclimatée à son nouvel environnement durant 20 jours. Au bout de cette période, les cultures à caractériser sont initiées à partir des inocula acclimatés. La figure 8.28 montre qu'il n'y a pas de différence significative sur les vitesses de

	Circuit 12%	**Assemblage 3.6/16**	**Assemblage 3.6/26**
Na^+	41.26	41.62	43.53
Cl^-	75.22	76.36	78.59
SO_4^{2-}	9.75	8.89	7.84
Mg^{2+}	5.18	5.16	5.31
Ca^{2+}	1.68	1.35	0.68
K^+	1.46	1.44	1.46
Bore total	0.02	0.02	0.02
Br^-	0.26	0.26	0.26
Sels totaux (g/L)	**134.82**	**135.08**	**137.68**
Salinité réfractomètre	**12.0%**	**12.0%**	**12.0%**

Tableau 8.3 – *Évaluations Dionex des concentrations ioniques (en $g.L^{-1}$), pour les ions principaux dissous dans une eau du circuit des salins à 12% et dans 2 assemblages de même salinité totale.*

croissance initiales dans les différents assemblages. Par contre, le plateau de limitation en carbone inorganique est atteint pour une valeur de DO_{800} plus basse pour l'eau du circuit. Il semblerait que moins de carbone inorganique soit dissous initialement dans l'eau du circuit que dans les assemblages.

Les tests de récolte sont réalisés lorsqu'il est jugé que les cultures atteignent un nouveau plateau. Un protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). Les quantités de soude souhaitées sont ajoutées aux échantillons, en prenant garde que la concentration de solution de soude ajoutée n'excède pas 0,25 $mol.L^{-1}$, quelle que soit la concentration finale dans l'échantillon.

La figure 8.29 qui rassemble les performances de récolte obtenues sur cette étude, montre que l'origine des eaux ne semble pas avoir d'effet significatif. Ces résultats plaident de nouveau pour la non influence de la concentration en calcium sur les performances de récolte déjà remarquées dans la section 8.5.

Ces résultats sont de premier intérêt pour l'industrialisation de la chaîne de production microalgale. Il est a priori possible de préparer des eaux de culture de différentes manières, sans que cette préparation n'handicape le procédé de récolte. Cette robustesse entrevue du procédé de récolte par autofloculation-flottation laisse augurer plus de flexibilité dans la chaîne de production de microalgues.

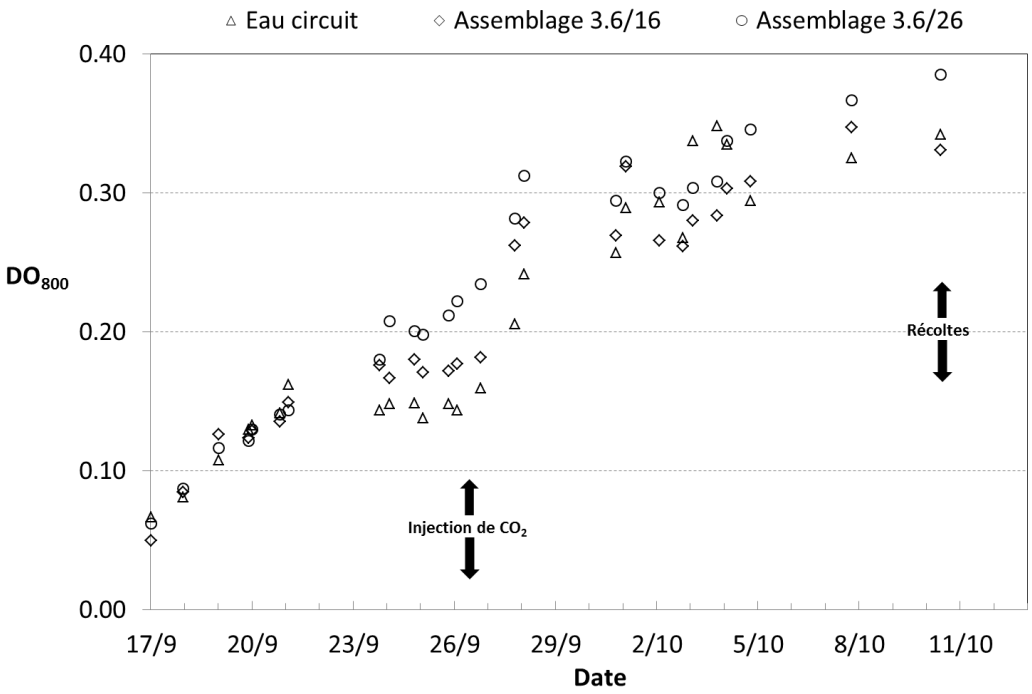


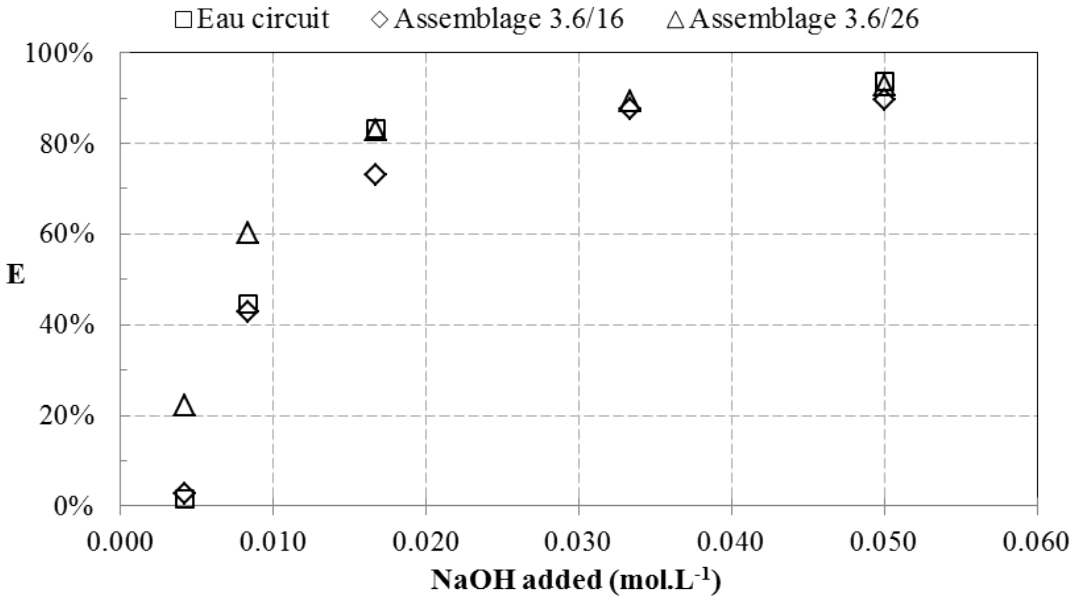
Figure 8.28 – *Suivis des DO_{800} dans des cultures de souche LOV, effectuées dans des eaux réelles des marais de Gruissan à* 12%*, issues de divers assemblages.*

8.8 Influence de la souche de *D. salina* récoltée

Toujours dans l'optique de s'assurer de la robustesse du procédé de récolte par autofloculation-flottation, son caractère souche-dépendant est testé. Dans le chapitre 5, il a été vu que les résultats obtenus sur certaines souches de la même espèce *D. salina*, pouvaient différer fortement.

2 cultures de souche Gruissan et LOV sont menées dans des conditions identiques. Une eau circuit 12% est inoculée avec des souches acclimatées pendant 20 jours aux conditions de l'expérience. Les cultures sont non régulées, aucune carence n'est appliquée mais une limitation en carbone inorganique est décelée et corrigée durant la culture. La figure 8.30 montre que la souche Gruissan se développe plus rapidement dans ces conditions que la souche LOV. Elle atteint en fin de culture des DO_{800} d'environ 0,5 (soit environ 0,5 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation Ifremer), contre 0,3 pour la souche LOV (soit environ 0,3 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV).

Les performances de récolte regroupées sur la figure 8.31 ne peuvent pas être différenciées selon l'origine de la souche. Les concentrations microalgales différentes pourraient biaiser le résultat, mais dans cette étude, ce critère n'a jamais été considéré comme influant sur les performances de récolte. Le mécanisme de capture par balayage, mis en évidence dans les eaux hypersalines, n'affiche pas la dépendance à la concentration microalgale constatée pour le mécanisme de



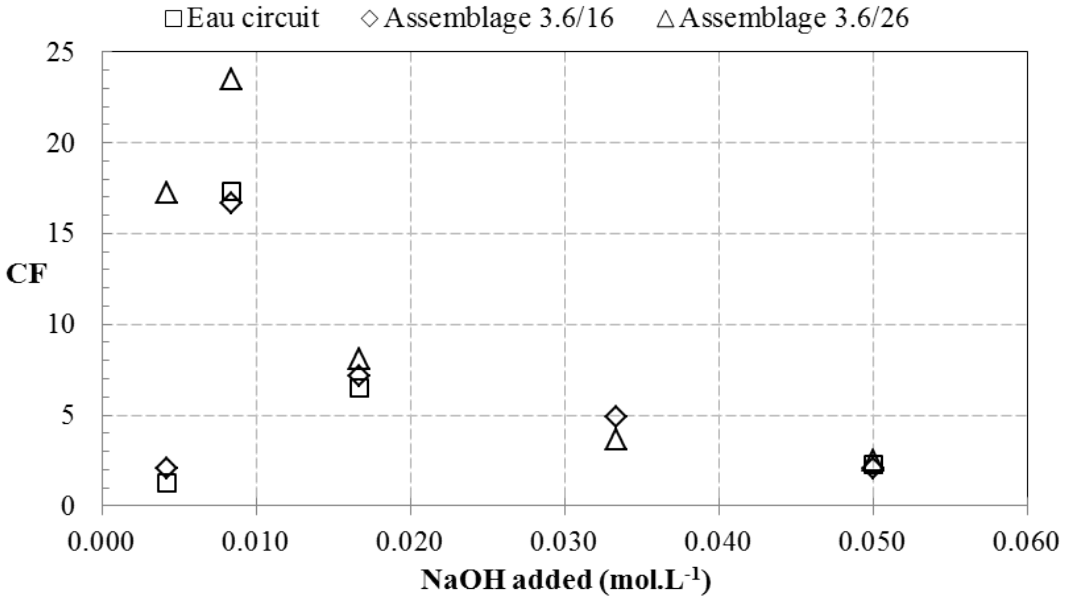


Figure 8.29 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV, dans différents assemblages à* 12% *d'eaux naturelles de salins.*

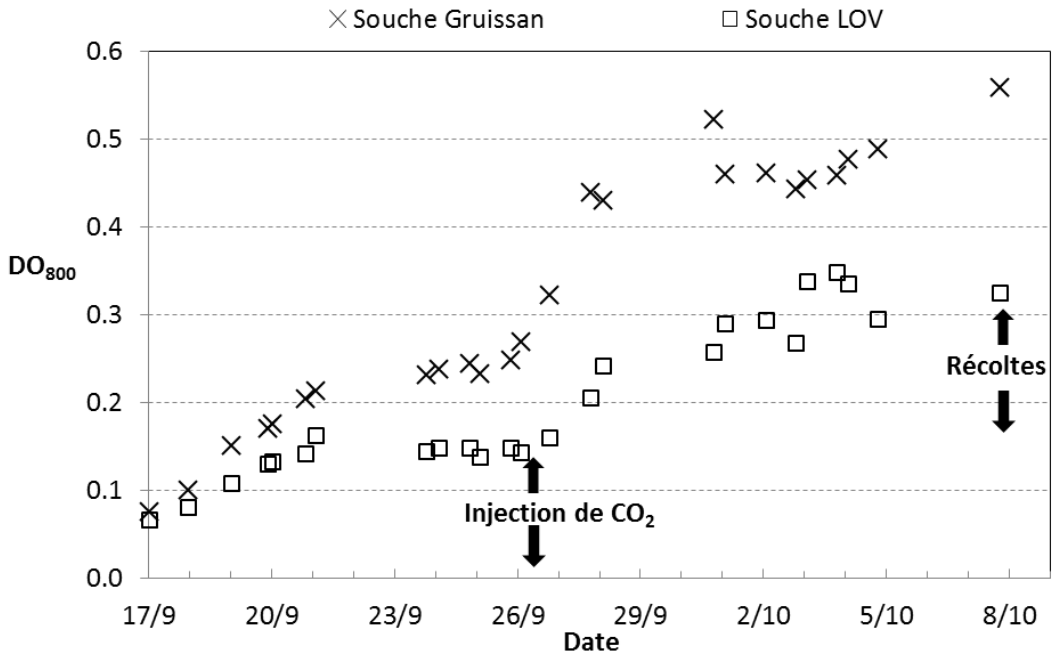


Figure 8.30 – *Suivis des DO_{800} dans des cultures de souche LOV et Gruissan, effectuées dans des eaux circuits* 12% *des marais de Gruissan.*

neutralisation de charge observé en eau douce (Schlesinger *et al.*, 2012).

Cette robustesse à la souche (a minima aux 2 souches testées) est un nouveau point positif pour l'industrialisation du procédé de récolte.

8.9 Influence de l'état de carence en azote des microalgues sur leur récolte

L'objectif étant de récolter des microalgues chargées en métabolites d'intérêt, une phase de maturation de la culture sera appliquée avant récolte des microalgues. Cette phase de maturation devrait consister principalement à carencer la culture en azote. Il est donc nécessaire de s'assurer que le procédé de récolte reste efficace sur des microalgues ainsi carencées. Des résultats positifs de récolte de *D. salina* carencée ont déjà été présentés dans la section 8.4.2 de ce manuscrit. Avant cette expérience qui visait la caractérisation des performances de récolte obtenues avec différentes bases, une étude avait été réalisée sur la possibilité de récolter *D. salina* carencée par autofloculation-flottation. C'est cette dernière étude qui est présentée ici.

Pour les besoins de l'expérience, quatre cultures non régulées en pH sont menées dans des eaux

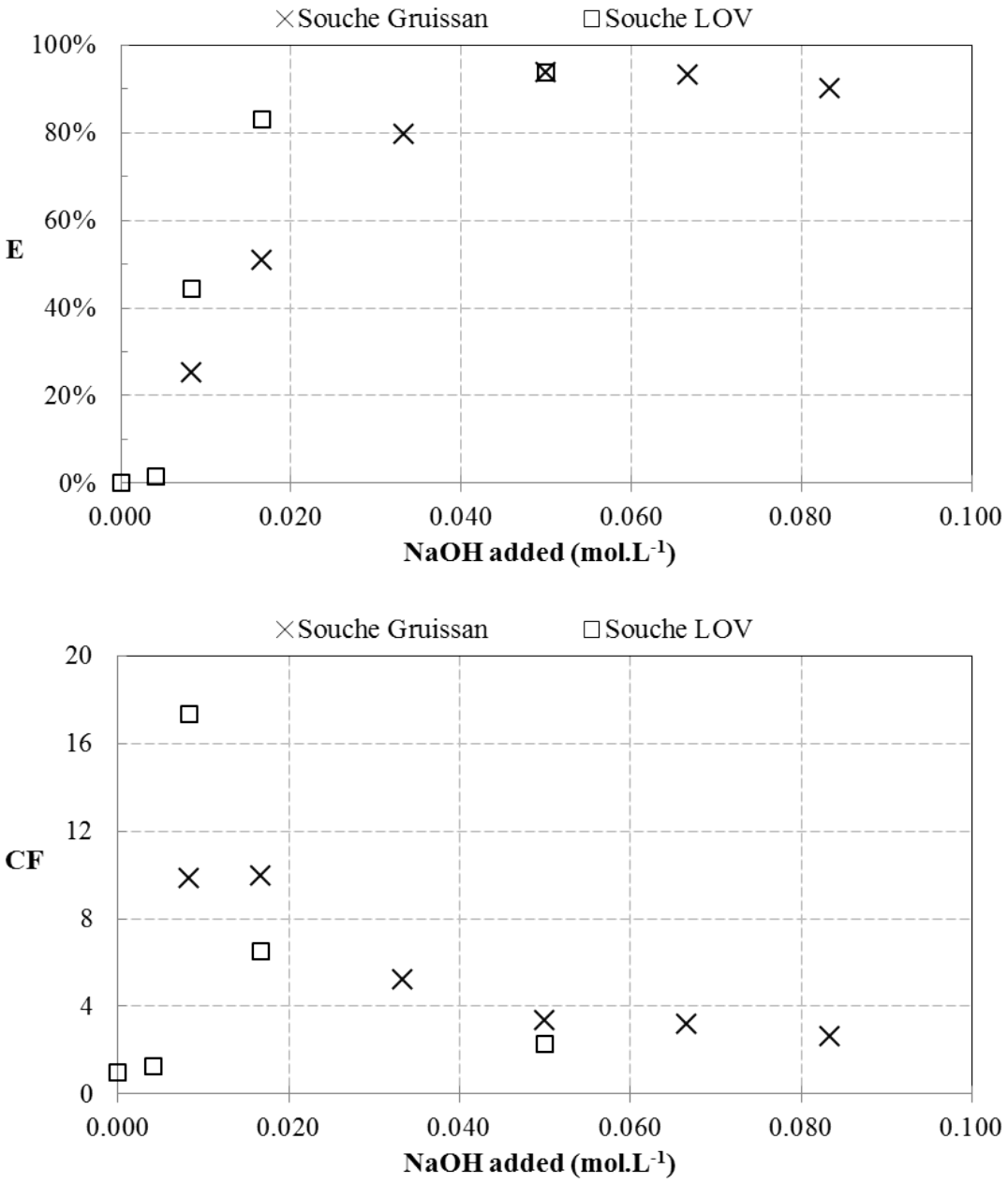


Figure 8.31 – *Efficacité de récupération (E) et facteur de concentration (CF) obtenus par autofloculation-flottation d'une suspension de souche LOV et d'une suspension de souche Gruissan, dans des eaux naturelles de salins à* 12%.

synthétiques des salins à 10% de salinité totale. 2 de ces cultures sont inoculées avec une souche Gruissan et les 2 autres avec une souche LOV, préalablement acclimatées aux conditions de culture rencontrées sur l'expérience. Pour chaque souche, une des cultures est alimentée en milieu de Conway complet (culture baptisée « nom de la souche N »), et l'autre en milieu de Conway dans lequel la concentration en azote a été réduite par 4 (culture baptisée « nom de la souche N/4 »).

Un suivi complet de ces cultures a été réalisé. La salinité totale atteinte en fin de culture est de 11% pour toutes les cultures. Les DO_{800} avant récolte et les ratios caroténoïdes/chlorophylles sont reportés dans le tableau 8.4. Un protocole classique de caractérisation de l'autofloculation-flottation est appliqué (voir chapitre 5.4.1 et annexe H). Une seule concentration finale de soude est testée, 0,0167 $mol.L^{-1}$, et 2 réplicats par culture sont réalisés (les performances présentées sont la moyenne des résultats obtenus sur les réplicats). La soude est injectée via une solution de concentration 0,100 $mol.L^{-1}$.

Culture	DO_{800}	Ratio Car/chl	Efficacité de récupération	Facteur de concentration
Gruissan N	0,39	0,99	93%	9,04
Gruissan N/4	0,25	3,4	82%	10,65
LOV N	0,36	1,6	96%	6,82
LOV N/4	0,33	8,3	94%	6,11

Tableau 8.4 – *Résultats de l'expérience sur l'influence de l'état de carence en azote des microalgues sur leur récolte. Concentration de soude injectée par volume de suspension :* 0,0167 $mol.L^{-1}$.

Les performances de récolte rapportées dans le tableau 8.4, sont semblables quels que soient la souche et son état. Il semblerait que le procédé de récolte par autofloculation-flottation ne soit pas perturbé outre mesure par l'état de carence des souches ou par l'origine des souches. Les expériences rapportées dans les sections 8.4.2 et 8.8 ont déjà validé ces 2 constats.

8.10 Conclusions sur le procédé de récolte de *D. salina* par autofloculation-flottation

En plus de confirmer l'intérêt d'un procédé d'autofloculation-flottation pour la récolte de *D. salina*, les études réalisées ont permis de comprendre plus précisément les mécanismes de séparation et de dégager de nombreux axes d'optimisation.

Lors de l'ajout d'une solution basique dans une culture de *D. salina*, de l'hydroxyde de magnésium précipite (lors d'un ajout de chaux, du gypse apparaît également) et entraîne une floculation

par balayage des microalgues. Les microbulles formées par DAF viennent s'enchevêtrer dans le précipité gélatineux (voir figure 8.32) et l'attelage bulles/précipités/microalgues flotte.

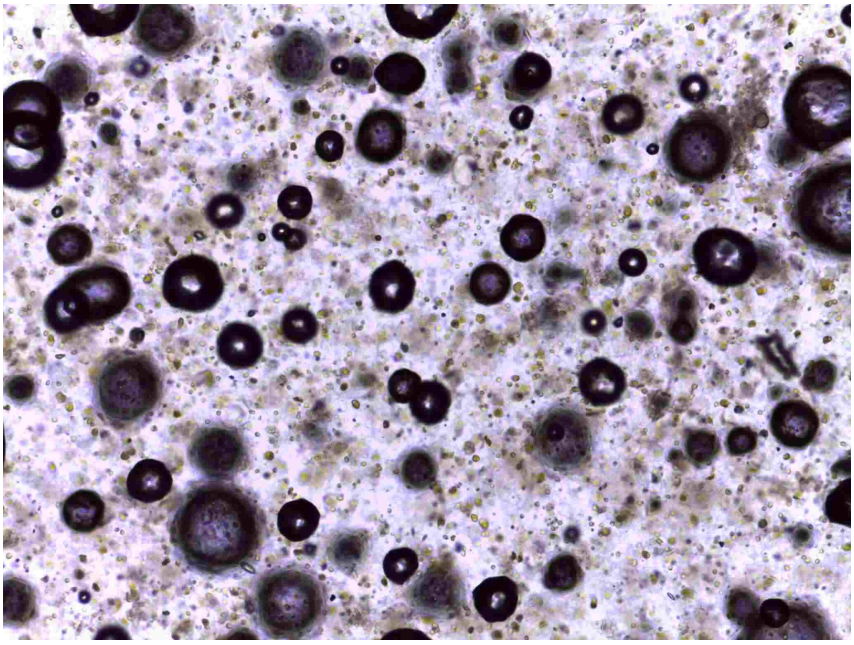


Figure 8.32 – *Boues de flottation post autofloculation observées au microscope.*

La capture des microalgues n'est efficace que pendant la phase de précipitation. Une fois le précipité formé, celui-ci peut être transporté dans l'ensemble de la suspension, il ne captera plus les microalgues. En conséquence, pour maximiser la capture des microalgues et par là même les performances de récolte, la précipitation doit être la plus homogène possible dans la suspension.

Ce n'est pas le cas lorsque la solution basique injectée est trop concentrée, que les concentrations en magnésium du milieu sont trop importantes et/ou que l'agitation du milieu durant l'injection est trop faible. En effet, ces 3 conditions entraînent des sur-saturations locales et par conséquent des précipitations d'hydroxyde de magnésium dans des zones proches de l'injection. Les quantités de microalgues concernées par ces précipitations locales étant moins importantes, l'efficacité de capture est fortement diminuée.

À partir de cette compréhension des mécanismes de séparation et de la mise en évidence de la non influence sur les performances de récolte, des concentrations en calcium du milieu, de la souche et de l'état de carence de la culture, le passage à l'échelle industrielle du procédé peut être abordé de manière plus efficace. La concentration des solutions basiques, l'agitation au lieu d'injection et la quantité de base injectée étant des paramètres clés du procédé, c'est sur eux que se concentreront dans un premier temps les études sur le pilote semi-industriel dans le chapitre 9 suivant. Pour arriver plus rapidement à des résultats satisfaisants malgré des temps d'expérience bien plus importants qu'à l'échelle du flottatest, les gammes dans lesquelles ces paramètres devront être utilisés seront inspirées des études précédemment citées.

Chapitre 9

Mise en place d'un procédé semi-industriel de récolte de *D. salina* par autofloculation-flottation

L'objectif de ce chapitre est de présenter les résultats de la mise en œuvre à une échelle semi-industrielle du procédé d'autofloculation-flottation caractérisé à une plus petite échelle dans les deux chapitres précédents.

S'agissant d'un des objectifs du projet Salinalgue, la construction du pilote de flottation a débuté dès l'entame de la thèse. Ce pilote caractérisé dans la section 9.1 a ensuite été intégré dans une plateforme de récolte plus complexe (§ 9.2), développée avec le soutien technique de José Moreau. Cette plateforme a permis la réalisation des premiers tests de récolte semi-industrielle de *D. salina* par le procédé d'autofloculation-flottation (§ 9.3).

Sommaire

9.1 Pilote de flottation 249
9.1.1 Conception du pilote de flottation 249
9.1.2 Caractérisation du pilote de flottation 254
9.2 Plateforme de récolte sur le site de démonstration semi-industriel 265
9.2.1 Réglage du débit d'alimentation du flottateur et du temps de passage dans le réservoir de stockage 266
9.2.2 Fonctionnement classique de la plateforme 266
9.2.3 Mise en régime de la plateforme de récolte 267
9.3 Récolte semi-industrielle de *Dunaliella salina* 268
9.3.1 Influence de la quantité de soude ajoutée 269
9.3.2 Influence du lieu d'injection de la soude 270
9.3.3 Influence de la concentration de la solution de soude ajoutée 273
9.4 Conclusions et perspectives sur la récolte semi-industrielle 276

9.1 Pilote de flottation

Lors de cette étude, un flottateur de type cylindro-conique, inspiré d'un de ses modèles de flottateurs industriels, a été fabriqué par l'entreprise régionale Sérinol (§ 9.1.1). S'en est suivi une longue phase de prise en main et de caractérisation de son fonctionnement en eaux hypersalées, retranscrite en partie dans ce manuscrit (9.1.2). Cette caractérisation a mené à quelques modifications du pilote dues aux particularités des eaux traitées. Durant cette phase, une méthode de caractérisation de la taille des bulles en flottation à air dissous a notamment été développée (§ 9.1.2.3 et annexe K).

9.1.1 Conception du pilote de flottation

9.1.1.1 Définition du cahier des charges et choix du constructeur

Considérant les délais de fabrication de pilote de taille semi-industrielle, il était nécessaire de définir rapidement le cahier des charges de l'appareil pour lancer la consultation de fabricants potentiels. Cette définition s'est faite en tout début de projet, avant la phase d'étude en laboratoire du procédé. Les partenaires orientés « culture » dans le projet Salinalgue ayant commencé leurs travaux à la même période qu'au LISBP, peu d'informations sur les suspensions algales à traiter étaient disponibles pour préciser le cahier des charges.

Il a donc été choisi de s'inspirer d'un modèle de flottateur industriel et de proposer des modifications ciblées au constructeur, pour permettre de gagner en flexibilité et en possibilité de caractérisation sur l'appareil. En procédant ainsi, l'objectif était de disposer le plus rapidement possible d'un appareil fonctionnel sur le site de Gruissan. Dans un premier temps, 10 constructeurs de flottateurs ont été contactés pour évaluer leur capacité de fabrication d'un pilote de flottation à air dissous répondant à un nombre limité de caractéristiques :

- Capacité de traitement : $0 - 1\ m^3/h$.
- Fonctionnement continu.
- Matériaux résistant aux fortes salinités.
- Charge organique admissible : environ $1\ g/L$.
- Possibilité de modifier le modèle usine pour l'orienter vers des problématiques de recherche.

5 des constructeurs ont proposé un devis initial en accord avec ce cahier des charges simplifié. Après analyse des offres et discussions sur les éventuelles modifications à apporter sur chacun des flottateurs, c'est l'offre de l'entreprise Sérinol (Bram - Aude) qui a été retenue. En plus de présenter le meilleur rapport qualité/prix, ce constructeur présente l'avantage d'être situé entre le laboratoire LISBP et le site de démonstration de Gruissan.

9.1.1.2 Technologie du flottateur industriel

Le pilote de flottation conçu pour cette étude s'inspire du flottateur $CY1$ proposé par Sérinol (photo 9.1 et première planche de l'annexe J). La technologie cylindro-conique permet d'abaisser le coût et l'emprise surfacique du flottateur par rapport au modèle parallélépipédique du même constructeur.

Figure 9.1 – *Photo du flottateur $CY1$ de Sérinol avant modifications.*

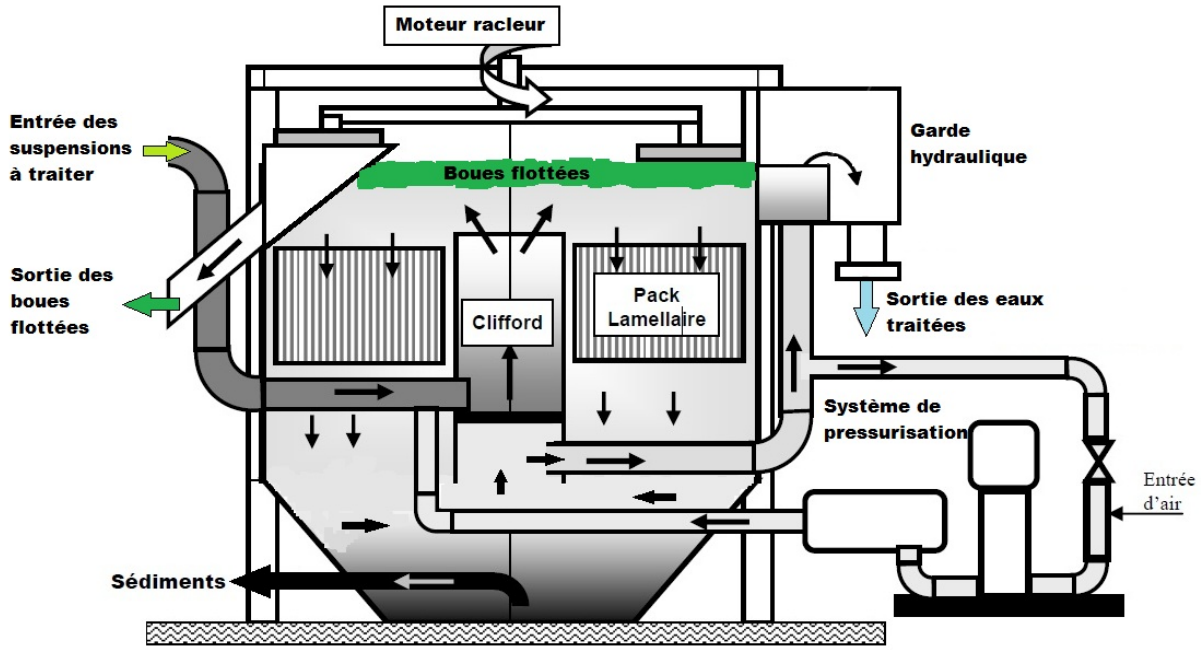


Figure 9.2 – *Schéma général du flottateur* $CY1$.

De nombreuses modifications sont apportées au modèle d'usine mais le schéma de fonctionnement général reste identique (figure 9.2).

Le flottateur est composé d'une unité de pressurisation permettant la production de bulles de 20 à 50 μm selon le constructeur. Cette unité comprend une pompe monocellulaire « roue ouverte » en acier inoxydable $316L$. La technologie « roue ouverte » permet de transférer des liquides contenant des particules solides en suspension comme les microalgues. Cette pompe élève la pression de l'eau dans un ballon de pressurisation à 6 bars. Le ballon est dimensionné de manière à atteindre la saturation en air des eaux pressurisées, pour le débit nominal du flottateur. L'air est pompé par l'intermédiaire d'un venturi placé en bypass de la pompe. En sortie de système de pressurisation (qui correspond à l'entrée de la suspension à traiter), une vanne pointeau assure la détente de l'eau et la formation des microbulles dans la suspension.

Sur le $CY1$, ce système de pressurisation est intégré sur la structure de la cuve de séparation. Cette cuve de séparation est divisée en 3 zones :

- Une zone à forte agitation délimitée par un Clifford, dans laquelle l'eau pressurisée est mélangée à l'eau brute pour favoriser les contacts bulles/particules à flotter dans un écoulement ascendant.
- Une zone à écoulement laminaire dans la partie annulaire, où un pack lamellaire permet d'homogénéiser les vitesses de l'écoulement descendant.
- Une zone « morte » supérieure, dans laquelle les flottants s'accumulent, et où le passage

des racleurs ne perturbe pas la zone inférieure.

L'appareil est dimensionné pour que la vitesse descendante du courant dans la zone annulaire soit de l'ordre de 4 m/h. En partie basse de la cuve, l'eau épurée est récupérée par un tube collecteur placé sous le Clifford. Les sédiments tombent au fond du cône et sont évacués par l'ouverture de la vanne de fond. En partie haute de la cuve, un système de raclage permet de retirer de la cuve les boues flottées.

9.1.1.3 Modifications initiales apportées au modèle $CY1$ d'usine

Afin de permettre une utilisation de l'appareil à des fins de recherche, de nombreuses modifications ont été effectuées sur le modèle d'usine. Les plans du pilote de flottation utilisé sont visibles en deuxième partie de l'annexe J, une photo de l'installation est proposée en figure 9.3.

Figure 9.3 – *Photo du flottateur $CY1$ de Sérinol après modifications.*

L'acier $304L$ utilisé pour la construction est remplacé par de l'acier $316L$ permettant une meilleure résistance à la corrosion redoutée dans les eaux hypersalines. 2 zones de visualisation

sont ajoutées sur la cuve. Pour permettre d'améliorer cette visualisation, le pack lamellaire et le Clifford sont réalisés en plastique transparent et un spot d'éclairage étanche est ajouté dans la cuve.

La cuve de séparation a été voulue indépendante du système de pressurisation pour pouvoir permettre son utilisation avec d'autres systèmes de génération de bulles. Le tableau électrique est déporté sur l'unité indépendante de pressurisation pour pouvoir permettre son utilisation sur d'autres cuves de séparation. Plusieurs vannes sont ajoutées pour faciliter l'isolement de certaines zones de l'installation.

La cuve dispose si besoin d'un socle de surélévation dimensionné pour permettre un fonctionnement gravitaire de l'ensemble de la plateforme de récolte. Il sera en effet vu plus loin que la suspension est initialement pompée dans un réservoir en hauteur qui permet d'alimenter de manière gravitaire le flottateur. En sur-élevant la cuve, les eaux traitées peuvent être recyclées vers les bassins ou évacuées sans pompage supplémentaire. Les boues peuvent aussi éventuellement être déversées de manière gravitaire vers une unité de centrifugation.

Afin de pouvoir travailler sur la structure des boues, le système de raclage a été revu. Le nombre de racleurs est doublé et les patins de raclage sont amovibles pour pouvoir tester plusieurs matériaux. Un motoréducteur permet aussi le contrôle de la vitesse de rotation des bras de raclage et une temporisation du raclage, pour laisser les boues plus ou moins s'égoutter. La rampe d'évacuation des boues peut aussi être recouverte de matériaux favorisant l'égouttage des boues. La profondeur de raclage est réglable. Il en est de même pour la garde hydraulique (au niveau de l'évacuation des eaux traitées), dont le réglage permet le contrôle du niveau d'eau dans la cuve.

Une deuxième entrée dans le système de pressurisation est ajoutée. Elle permet de pressuriser si besoin des eaux non recyclées, pour éviter par exemple le passage de microalgues dans la pompe. Une double entrée de gaz est aussi prévue pour laisser la possibilité de pressuriser les eaux en présence d'un gaz différent de l'air. Une rampe de prise électrique étanche $IP55$ est ajoutée pour permettre l'ajout de matériel de suivi.

Enfin, la métrologie du système a été revue. 3 débitmètres électromagnétiques $Optiflux - 4100$ reliés à des convertisseurs de mesures $IFC - 100$ sont intégrés à l'unité de pressurisation pour permettre la caractérisation de l'ensemble des débits. Le choix de cette technologie électromagnétique s'est fait en concertation avec Krohne. Elle offre une résistance et une robustesse aux très hautes salinités et charges organiques rencontrées dans le cadre de la récolte de *D. salina*. Les débits massiques de boues récoltées sont caractérisés par une balance plateforme Sartorius™ Midrics 2 de précision 10 g. L'afficheur de la balance est déporté dans la zone de contrôle de l'unité de flottation, avec les autres afficheurs de débit.

9.1.2 Caractérisation du pilote de flottation

Cette section présente les caractéristiques mesurées et vérifiées sur le pilote de flottation, telles les mesures de débit, de taille de bulles et les résultats de tests de fonctionnement en eaux hypersalées.

9.1.2.1 Vérification des débitmètres

Le pilote de flottation est équipé de 3 débitmètres électromagnétiques $Optiflux - 4100$ reliés à des convertisseurs de mesures $IFC - 100$. Pour valider les mesures obtenues en eaux hypersalées, ces débitmètres ont été caractérisés précisément avant utilisation et contrôlés régulièrement tout au long du projet. Pour accélérer la procédure, la mesure du premier débitmètre est vérifiée par empotage et les autres sont vérifiées grâce à l'installation du premier débitmètre en série.

La figure 9.4 est un extrait des résultats obtenus sur un assemblage 3,6/26 à 12%, classiquement utilisé comme milieu de culture sur Gruissan. Les débits évalués par le débitmètre d'entrée de la suspension algale sont légèrement inférieurs à ceux évalués par empotage, mais une relation linéaire satisfaisante est obtenue entre les 2 mesures. Les différences relatives entre empotages et mesures directes par le débitmètre sont inférieures à 5%, soit de l'ordre de grandeur de l'erreur relative de la mesure réalisée par empotage. Il est donc choisi d'utiliser les mesures du débitmètre électromagnétique d'entrée des suspensions algales, sans correction, pour caractériser les débits durant chaque expérience.

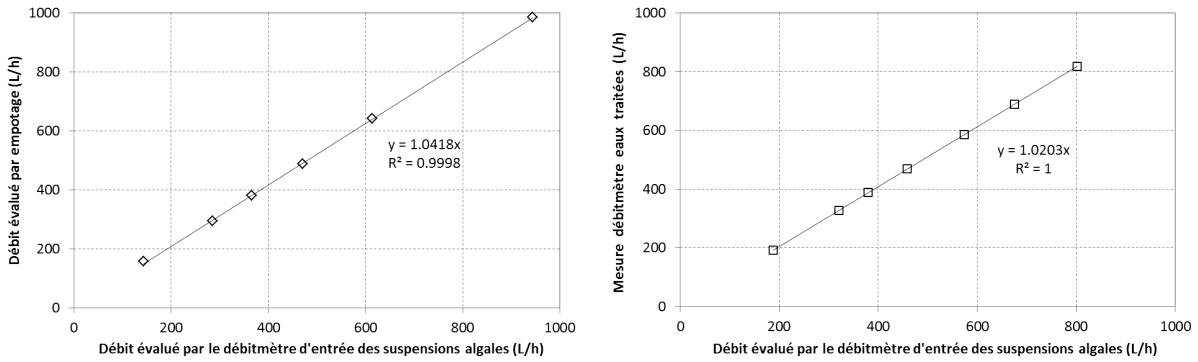


Figure 9.4 – *Vérification des mesures fournies par les débitmètres électromagnétiques*

Le débitmètre de sortie des eaux traitées (9.4) et celui de sortie des eaux pressurisées (non montré sur la figure) renvoient des mesures en accord avec celles obtenues par le premier débitmètre

validé. Ils seront donc aussi utilisés sans correction. Cette procédure de vérification a été reprise régulièrement pour prévenir une éventuelle dérive des mesures avec le temps. Les débitmètres électromagnétiques semblent avoir une très bonne résistance aux eaux hypersalées (a minima lorsqu'une procédure de rinçage est appliquée pour chaque arrêt de l'installation). En effet, aucune dérive n'a été observée 18 mois après la mise en service (temps de fonctionnement effectif environ 4 mois).

9.1.2.2 Caractérisation de la fuite permanente

Pour des raisons de sécurité (absence de soupape sur le ballon de pressurisation), une fuite permanente est ajoutée sur le ballon de pressurisation. Dans le cas de la pressurisation d'eaux recyclées (pompées en sortie de la cuve de flottation), la fuite est reliée au réservoir des eaux traitées. Si de l'eau « propre » est pressurisée, pour éviter des consommations trop importantes, la fuite est reliée au bac des « eaux propres » à pressuriser.

Le constructeur évalue la fuite permanente entre 0,15 et 0,20 m^3/h pour un ballon sous 4 $bars$ et entre 0,20 et 0,25 m^3/h pour un ballon sous 6 $bars$. Une vérification effectuée par empotage donne des débits de fuites moyennés sur 5 mesures de 0,17 m^3/h pour un ballon sous 4 $bars$ et de 0,26 m^3/h pour un ballon sous 6 $bars$. Ces débits sont non négligeables car de l'ordre de grandeur des débits d'eaux pressurisées injectées dans la suspension.

La quantité d'air aspirée se partage donc entre cette fuite permanente et les eaux injectées dans la suspension. Tout l'air dissous n'est donc pas efficace dans cette technologie.

9.1.2.3 Taille des bulles produites et vitesses d'ascension

Le principe de la méthode développée durant cette étude et les résultats obtenus sur le pilote $CY1$ ont été présentés oralement lors de la 6e conférence internationale IWA sur la flottation dans le secteur du traitement des eaux (Flotation 2012, New-York, octobre 2012). À l'issue de cette conférence, l'entreprise belge DeWatergroep a contracté avec le LISBP pour mettre en œuvre cette méthode sur leur technologie de flottateur.

La présente section est un extrait de l'étude présentée à la conférence « flotation 2012 ». Les lecteurs anglophones sont invités à consulter cette étude dans l'annexe K. Les lecteurs francophones peuvent aussi se référer à cette annexe K pour obtenir plus d'informations, notamment sur les propriétés des eaux hypersalées.

Dans la littérature, plusieurs méthodes, intrusives ou non, ont été développées pour évaluer la distribution de taille des bulles générées par DAF. Des méthodes d'analyse d'images sont utilisées mais nécessitent la mise en place de protocoles compliqués (De Rijk *et al.*, 1994; Rykaart & Haarhoff, 1995; Rodrigues & Rubio, 2003). Une méthode utilisant un compteur de particules est aussi proposée (Han *et al.*, 2002). (Couto *et al.*, 2009) développent eux une méthode basée sur la diffraction de la lumière laser.

Dans cette étude, une autre méthode d'évaluation de la taille des bulles basée sur la diffraction de la lumière laser dans un appareil Malvern Spraytech™ (Figure 9.5) est développée.

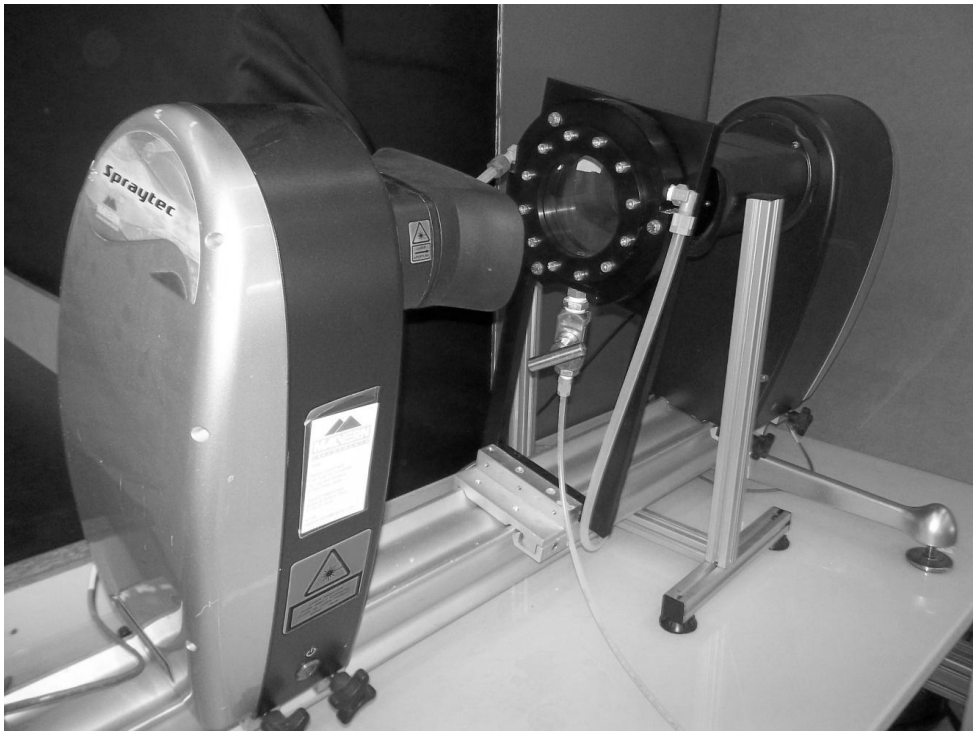


Figure 9.5 – *Malvern Spraytech™ couplé avec la cellule de visualisation conçue dans cette étude, pour mesurer la distribution de taille des bulles produites par DAF*

Cette méthode est utilisée pour évaluer la distribution de taille des bulles produites par le pilote $CY1$ pour des eaux de diverses salinités pressurisées à 6 *bars* (voir propriétés dans l'annexe K). Ces eaux sont dépressurisées dans une cellule conçue pour l'application de cette méthode et intégrée sur le Spraytech™ (figure 9.6). Pour minimiser la croissance des bulles par coalescence le long d'une conduite, la vanne de dépressurisation du pilote est montée à l'entrée de la cellule de mesure. Une réserve tampon d'eau à salinité souhaitée permet de limiter les variations de température pendant les manipulations ($23.5 \pm 2°C$).

4 exemples de distribution de taille des bulles pour différentes salinités sont proposés sur la figure 9.7. Il apparaît que plus la salinité est importante, plus la distribution de taille des bulles

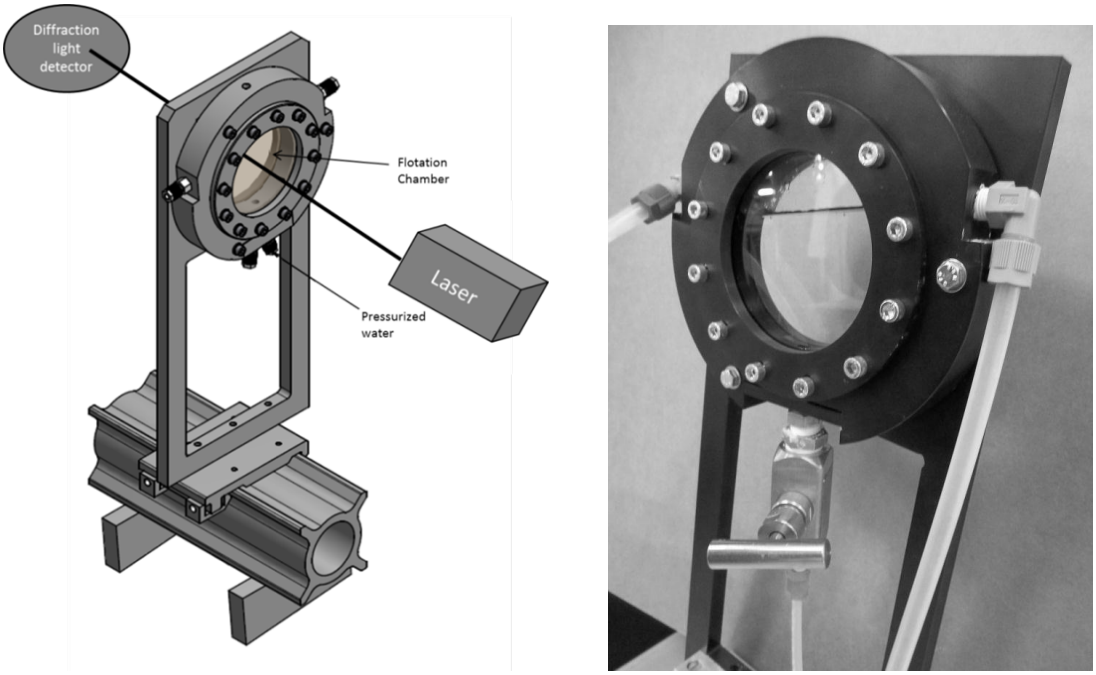


Figure 9.6 – *Cellule de mesure et vanne de dépressurisation*

se décale vers les faibles diamètres.

Les diamètres moyens présentés dans la figure 9.8 sont les diamètres de Sauter. Avec n_i le nombre de bulles dans la gamme de diamètre caractéristique d_i, ce diamètre de Sauter est évalué par :

$$D_S = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \tag{9.1}$$

La distribution de taille de bulles dans une eau douce et le diamètre moyen évalués avec cette nouvelle méthode sont de l'ordre de ce qui est trouvé dans la littérature avec d'autres méthodes (Edzwald, 1995).

Les caractérisations en eaux salées indiquent que l'augmentation de la salinité induit une réduction de la taille des bulles produites par DAF. Le diamètre moyen des bulles obtenues dans des eaux similaires aux eaux de culture de *D. salina* est d'environ 40 μm.

Cette réduction de la taille des bulles en eaux hypersalées a des conséquences sur le dimensionnement des flottateurs. La réduction de la vitesse d'ascension des bulles produites pourrait en effet engendrer certains problèmes hydrodynamiques. Les plus petites bulles pourraient par exemple être emportées dans la zone d'écoulement descendant, limitant ainsi le débit maximal que peut traiter cet appareil par rapport à celui accessible en eau douce.

Dans la gamme de taille considérée, les bulles sont des sphères rigides qui obéissent à la loi de Stokes corrigée par Oseen (Oseen, 1910; Clift *et al.*, 1978). Cette loi est utilisée ici pour évaluer

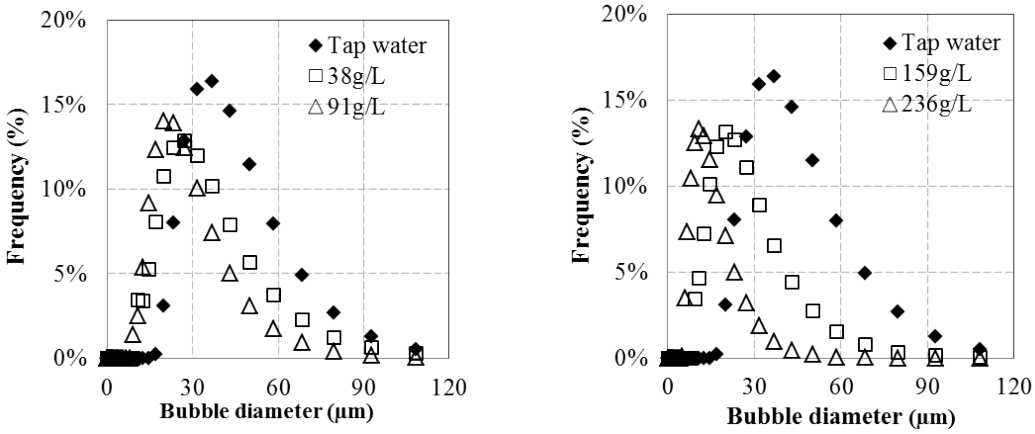


Figure 9.7 – *Distribution (en nombre) de la taille des bulles produites par DAF dans des eaux de différentes salinités (en g.L^{-1})*

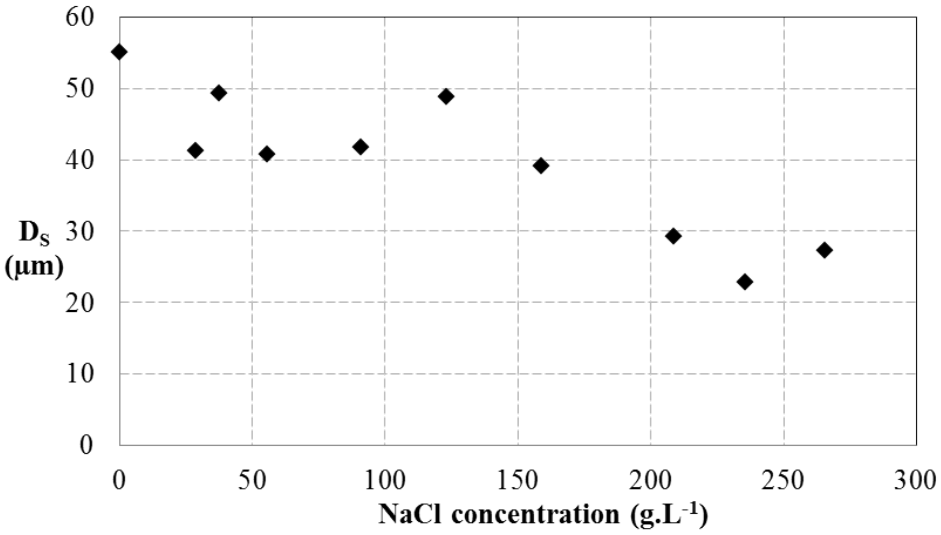


Figure 9.8 – *Diamètre moyen de Sauter des bulles produites par DAF dans des eaux de différentes salinités*

la vitesse terminale des bulles, en considérant les diamètres de bulles et les masses volumiques des eaux caractérisées lors de l'expérience. Une expérience parallèle a montré que la viscosité des eaux ne varie pas de manière significative sur la gamme de salinités caractérisées, la viscosité d'une eau pure est donc utilisée pour les calculs. Les calculs sont effectués en considérant des interfaces de bulles propres ou totalement contaminées (figure 9.9). La vitesse réelle des bulles se situera entre ces 2 extrêmes, selon son degré de contamination.

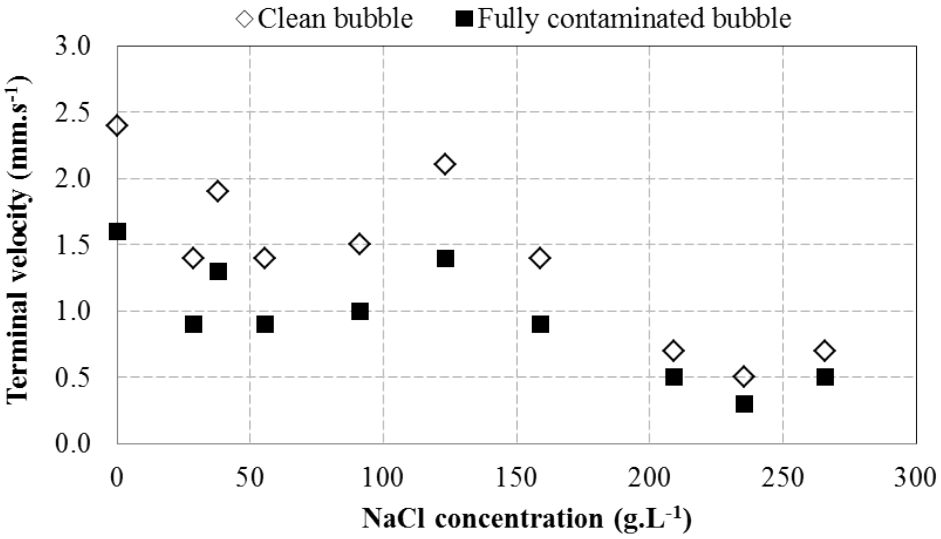


Figure 9.9 – *Vitesse terminale des bulles de diamètre moyen dans des eaux de différentes salinités et pour une température de* $23.5°C$

Les vitesses moyennes d'ascension de bulles produites par DAF dans les eaux hypersalées utilisées pour la culture de *D. salina* sont comprises entre 1 et 1,5 mm/s, soit entre 3,6 et 5,4 m/h. Le flottateur $CY1$ étant dimensionné pour obtenir en conditions de fonctionnement nominal, des vitesses descendantes de 4 m/h dans la partie annulaire, des problèmes de fonctionnement du pilote en eaux hypersalées pourraient être constatés (aspiration de bulles vers l'évacuation des eaux traitées).

9.1.2.4 Problèmes de fonctionnement du pilote et modifications apportées

Les modifications apportées sur le flottateur d'usine, ainsi que l'utilisation du pilote dans des eaux hypersalées ont engendré de nombreux problèmes lors de la mise en fonctionnement de ce dernier. Les principaux sont présentés ici avec les solutions apportées.

Lors de tests sur des eaux hypersalées sans algues, il a été constaté que les bulles n'atteignaient pas la surface. Les bulles sortaient en effet en bas de Clifford par des trous prévus pour l'évacuation

de la matière sédimentée dans le Clifford. Elles se retrouvaient alors dans la zone annulaire dans laquelle la vitesse d'écoulement descendant atteint 4 m/h. Les bulles produites en eaux hypsersalées étant de très faible diamètre (§ 9.1.2.3), leur vitesse d'ascension est faible (§ 9.9), entre 3,6 m/h et 5,4 m/h en moyenne. Une grande partie de ces bulles est donc emportée dans les eaux normalement traitées ou reste en partie basse de la cuve. Pour remédier à ceci et conserver tout de même les trous d'évacuation des matières décantées une étude sur la procédure de mise en marche du pilote a été réalisée. Cette étude n'ayant pas dégagé de conditions simples et robustes de mise en marche, dans lesquelles la stratification des bulles en zone inférieure n'apparaissait pas de manière reproductible, il a finalement été décidé d'occulter les évacuations de matière sédimentée dans le Clifford. Ceci a permis de retrouver un fonctionnement normal du pilote malgré les faibles vitesses ascensionnelles des bulles produites en eaux hypersalées. Il faut noter que pour des dédits supérieurs au débits nominaux (1 m^3/h et 20% de taux de recyclage, soit 200 L/h d'eau pressurisée), l'écoulement descendant entraînent les plus petites bulles produites vers la sortie des eaux traitées (voir § 9.1.2.5).

Ce pilote n'était pas non plus prévu pour fonctionner hors débit nominal. Les quantités de suspension disponibles étant finalement plus faibles que prévu, il a été nécessaire de réduire le débit de traitement du pilote. Le problème est qu'en abaissant le débit d'alimentation en suspension, il est aussi nécessaire de réduire le débit d'eau pressurisée injecté, pour maintenir un taux de recyclage convenable. Or sur le pilote initial, la pompe fonctionnant à fréquence constante, cette réduction du débit d'eau pressurisée s'accompagne nécessairement d'une augmentation de la pression de saturation. Pour permettre de dissocier pression de saturation et débit d'injection des eaux pressurisées, un bypass de taille variable a été monté sur la pompe. En jouant sur l'ouverture de ce bypass et de la vanne de dépressurisation il est par exemple possible de sélectionner différents taux de recyclage pour une même pression de saturation.

Toutes les modifications du pilote ont été proposées au constructeur et validées par le service technique de l'entreprise.

9.1.2.5 Tests après modifications du pilote pour validation du fonctionnement en eaux hypersalées

Une fois les modifications proposées ci-dessus intégrées sur le pilote, une phase de tests sur une grande partie des paramètres opératoires ajustables a été réalisée. Cette phase réalisée dans un assemblage 3,6/26 de salinité 12% avait pour objectif de valider la bonne formation des bulles et le bon fonctionnement hydrodynamique du pilote, avant de passer sur des suspensions microalgales dans lesquelles il est difficile de distinguer les bulles.

9.1.2.5.1 Influence du débit d'alimentation en suspension à traiter (Qs)

Pour tester l'influence du débit d'alimentation en suspension à traiter (Qs) sur le bon fonctionnement du pilote, le débit d'air aspiré (Qa), le débit d'eaux pressurisées ajoutées (Qp) et la pression appliquée sur ces eaux (P) sont fixés. Le tableau 9.1 montre que dans la limite du fonctionnement nominal du flottateur original (Qs = 1 m^3/h et 20% de taux de recyclage, soit Qp = 200 L/h), le fonctionnement du pilote est tout à fait satisfaisant. La légère fuite en bas de Clifford est la conséquence d'un défaut d'usinage sur l'entrée de la suspension dans le Clifford. La part de cette fuite sur le débit total qui circule dans le Clifford est négligeable.

L'entraînement des bulles vers la sortie des eaux traitées pour des débits supérieurs aux débits nominaux ne permet cependant pas d'utiliser ce pilote dans des eaux hypersalées, pour des débits d'alimentation supérieurs à 1 m^3/h.

9.1.2.5.2 Influence du débit d'air aspiré (Qa)

Pour tester l'influence du débit d'air aspiré, Qp, P et Qs sont fixés. Le tableau 9.2 montre qu'en l'absence d'aspiration d'air, aucune bulle n'est produite dans le système DAF. Ceci signifie que l'unité de pressurisation est bien étanche et que le gaz injecté dans la suspension proviendra du captage prévu à cet effet (important si l'on choisit de pressuriser un autre gaz que l'air). Les faibles densités de bulles constatées aux faibles débits d'air aspiré traduisent qu'une partie de l'air est perdue par la fuite permanente. Le débit d'air relevé sur le rotamètre prévu à cet effet ne caractérise pas la quantité totale d'air injecté dans la suspension, il surévalue la valeur réelle étant donné qu'une partie de l'air s'échappe par la fuite permanente.

La densité de bulles augmente avec le débit d'air aspiré. Ceci signifie que pour les faibles Qa, l'eau pressurisée n'est pas saturée à cause d'une limitation en air disponible dans l'unité.

9.1.2.5.3 Influence du débit d'eaux pressurisées ajoutées (Qp)

Pour tester l'influence du débit d'eaux pressurisées ajoutées (Qp), Qa, P et Qs sont fixés. Le tableau 9.3 rapporte une augmentation de la densité de bulles avec l'augmentation du débit d'eaux pressurisées, ce qui est tout à fait cohérent.

P (bar)	**Qp (L/h)**	**Qa (L/min)**	**Qs (L/h)**	**Hauteur du plafond de bulles (cm)**	**Observations**
5,5	200	1	**0**	5	Les bulles remontent dans le clifford et se répartissent à la surface assez lentement. Densité de bulles importante.
5,5	200	1	**200**	5	Remontée assez lente. Formation d'un plafond de bulles plus concentré au centre que sur la périphérie de l'airlift.
5,5	200	1	**400**	8	Remontée plus rapide. Meilleure répartition du plafond de bulles sur la section de la cuve. Plafond net et dense.
5,5	200	1	**700**	8	Remontée rapide. Bonne répartition du plafond de bulles sur la section de la cuve. Légère fuite de bulles par le bas du clifford.
5,5	200	1	**848**	12	Remontée rapide. Bonne répartition du plafond de bulles sur la section de la cuve. Légère fuite de bulles par le bas du clifford.
5,5	200	1	**1000**	14	Remontée très rapide. Bonne répartition du plafond de bulles sur la section de la cuve. Fuite de bulles par le bas du clifford.
5,5	200	1	**1100**	Bulles emportées	Une partie des bulles arrivées en haut du clifford est emportée dans la zone d'écoulement descendant et aspirée dans les eaux traitées.

Tableau 9.1 – *Influence du débit d'alimentation en suspension à traiter (Qs) sur le bon fonctionnement du pilote.*

P (bar)	Qp (L/h)	Qa (L/min)	Qs (L/h)	Hauteur du plafond de bulles (cm)	Observations
5,5	197	**0**	407	0	Pas de bulles.
5,5	197	**0,2**	407	0	Très peu de bulles remontent dans le Clifford.
5,5	197	**0,4**	407	8	Faible densité de bulles qui forment un plafond diffus.
5,5	197	**0,6**	407	10	Densité moyenne de bulles, plafond plus net.
5,5	197	**0,8**	407	10	Forte densité de bulles, plafond net et dense.
5,5	197	**1**	407	8	Forte densité de bulles, plafond net et dense.

Tableau 9.2 – *Influence du débit d'air aspiré (Qa) sur le bon fonctionnement du pilote.*

P (bar)	Qp (L/h)	Qa (L/min)	Qs (L/h)	Hauteur du plafond de bulles (cm)	Observations
5,5	**100**	1	400	9	Densité moyenne de bulles, plafond diffus.
5,5	**200**	1	400	8	Forte densité de bulles, plafond net et dense.
5,5	**300**	1	400	9	Forte densité de bulles, plafond net et dense.

Tableau 9.3 – *Influence du débit d'eaux pressurisées ajoutées (Qp) sur le bon fonctionnement du pilote*

9.1.2.5.4 Influence de la pression de pressurisation des eaux (P)

Pour tester l'influence de la pression de pressurisation des eaux (P), Qp, Qa et Qs sont fixés. Le tableau 9.4 rapporte une augmentation de la densité de bulles avec l'augmentation de la pression de pressurisation des eaux. Ceci est cohérent car plus la pression est importante, plus la quantité d'air dissous dans l'eau est grande. Un plus gros volume total de bulles sera donc produit lors de la dépressurisation.

Pour la gamme testée, l'augmentation de la pression de saturation ne semble pas permettre de produire des bulles de diamètre trop faible et qui seraient alors emportées dans les eaux traitées

P (bar)	**Qp (L/h)**	**Qa (L/min)**	**Qs (L/h)**	**Hauteur du plafond de bulles (cm)**	**Observations**
3,5	200	1	400	8	Bonne densité de bulles, plafond net et dense.
4,5	200	1	400	6,5	Bonne densité de bulles, plafond net et dense.
5,5	200	1	400	8	Forte densité de bulles, plafond net et dense.
6,0	200	1	400	6,5	Forte densité de bulles, plafond net et dense.

Tableau 9.4 – *Influence de la pression de pressurisation des eaux (P) sur le bon fonctionnement du pilote*

9.1.2.5.5 Conclusions sur les conditions opératoires imposées sur le pilote

Les tests en eaux hypersalées sur ce pilote devront se limiter à des débits de suspension de 1 m^3/h. Comme il n'est pas simple d'évaluer le débit de la fuite permanente, une quantité d'air minimale de 1 L/min sera aspirée quelles que soient les conditions de pressurisation. Le constructeur conseille « d'ouvrir la vanne d'injection d'air jusqu'à voir apparaître des grosses bulles dans la fuite permanente », qui traduisent selon lui la saturation de l'eau pressurisée (à nuancer selon les cinétiques de dissolution de l'air dans les eaux hypersalées). La quantité de bulles injectées peut être modifiée en jouant sur le taux de recyclage (Qp/Qs). Il est aussi possible de modifier la pression de saturation, pour modifier la quantité de bulles injectées. Ceci entraînera aussi une

modification de la taille des bulles produites par le pilote.

9.2 Plateforme de récolte sur le site de démonstration semi-industriel

Sur le site de démonstration de Gruissan, le pilote de flottation s'intègre dans une plateforme de récolte, mise en place sous une serre, entre les 4 raceways de culture (cf annexe F). La surface et la hauteur disponibles sous cette serre sont limitées et nécessitent donc une implantation concentrée (figure 9.10).

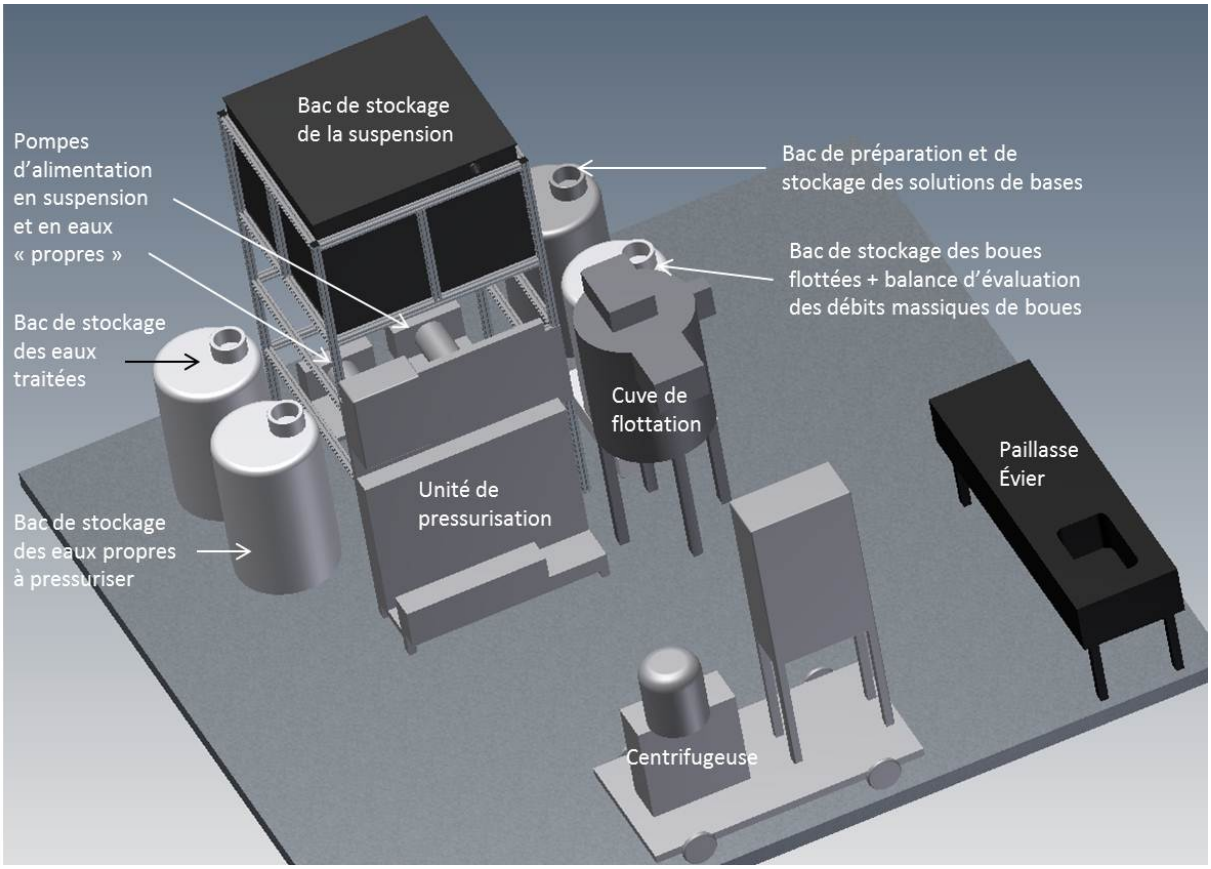


Figure 9.10 – *Plan d'implantation simplifié de la plateforme de récolte mise en place sur le site de Gruissan durant cette étude (réalisation : José Moreau).*

Un diagramme de tuyauterie et d'instrumentation (PID : « Pipe and Instrumentation Diagram ») est proposé en annexe L pour faciliter la compréhension du fonctionnement de cette plateforme. Ce diagramme est complété dans l'annexe L par une présentation détaillée des éléments de la plateforme de récolte et une validation de leur fonctionnement.

Une présentation rapide du fonctionnement général de la plateforme est proposée dans la suite.

9.2.1 Réglage du débit d'alimentation du flottateur et du temps de passage dans le réservoir de stockage

Une fois l'installation positionnée de manière définitive, le débit d'alimentation du flottateur est fonction uniquement de la hauteur d'eau dans le réservoir de stockage $R103$ et de l'ouverture de la vanne d'alimentation $V1$ en sortie de ce bac. La hauteur d'eau dans $R103$ est imposée par le positionnement des capteurs de niveaux qui asservissent la pompe d'alimentation $P203$ (si le débit d'alimentation du flottateur reste inférieur au débit imposé par $P203$: 800 L/h). Les capteurs de niveaux ont été montés sur des axes glissières permettant de jouer sur leurs positions relatives et absolues.

Pour maintenir un débit constant durant une manipulation, il suffit de diminuer la hauteur relative entre les capteurs pour que $P203$ se déclenche plus fréquemment. La surface apparente de $R103$ a été dimensionnée pour éviter un fonctionnement trop saccadé. Selon le débit d'alimentation du flottateur souhaité, il est aussi possible de jouer sur la hauteur absolue des capteurs pour contrôler les temps de passage de la suspension algale dans l'obscurité de $R103$.

En pratique, pour régler le débit d'alimentation du flottateur, il s'agit donc dans un premier temps de régler le positionnement des capteurs et dans un second temps de jouer sur l'ouverture de $V1$. Ainsi, il est possible de contrôler à la fois le débit d'alimentation et le temps de passage de la suspension algale dans $R103$, pour permettre si nécessaire différents prétraitements de la suspension.

9.2.2 Fonctionnement classique de la plateforme

Cette section présente le fonctionnement le plus classique de la plateforme. Les essais présentés dans la suite de ce manuscrit sont réalisés dans cette configuration. La description proposée s'appuie sur le diagramme de tuyauterie et d'instrumentation (PID) de la plateforme (annexe L).

Les suspensions microalgales sont transférées des raceways vers $R103$ par la pompe péristaltique $P203$. Les capteurs de niveaux sont abaissés au maximum pour réduire le temps de passage des suspensions dans $R103$. La distance relative entre les capteurs est faible pour maintenir un débit d'alimentation constant durant les expériences, pour une ouverture donnée de la vanne

d'alimentation $V1$.

La suspension est mise en contact avec la solution basique et les eaux pressurisées avant l'injection dans le Clifford (voir § L.4.3 pour le lieu d'injection de la solution basique). Les bulles apparaissent après dépressurisation des eaux au passage de la vanne pointeau $V2$.

La suspension chargée de précipités et de bulles remonte dans le Clifford de la cuve de flottation. Les attelages bulles/précipités/microalgues viennent former une mousse à la surface de la cuve. Cette mousse est raclée et évacuée jusqu'à la vanne $V14$. Ces mousses que l'on baptise aussi boues flottées sont pesées automatiquement. Une fois le réservoir de boues rempli, les boues sont conditionnées manuellement.

Dans la cuve de flottation, les eaux traitées redescendent dans la zone annulaire et sont évacuées sous le Clifford. Une partie de ces eaux est alors recyclée vers l'unité de pressurisation sous l'effet de l'aspiration par $P2$. $V5$, $V6$, $V10$, $V11$ et $V8$, sont totalement ouvertes lors du fonctionnement de l'unité. La vanne du débitmètre d'air permet de contrôler la quantité d'air injectée au niveau du Venturi.

Le réservoir $R104$ permet d'obtenir un temps de passage suffisant dans l'unité de pressurisation pour permettre la saturation des eaux en air. Pour régler le débit d'eaux pressurisées injecté et la pression de pressurisation, il faut jouer simultanément sur les ouvertures des vannes $V9$ et $V2$. La fuite permanente de $R104$ est reliée à la sortie des eaux traitées au niveau de $E3$ (sur le PID, pour plus de clarté elle est directement reliée au réservoir $R102$).

Les eaux traitées non recyclées vers l'unité de pressurisation sont déversées dans $R102$. De là, elles sont renvoyées vers les raceways ou vers l'égout.

Le débitmètre d'alimentation est placé en charge avant l'injection des eaux pressurisées et de la solution basique. Celui des eaux pressurisées est positionné juste avant la vanne de dépressurisation pour ne pas être perturbé par un écoulement diphasique. Le débitmètre des eaux traitées est placé en charge et prend en compte les eaux évacuées par la garde hydraulique et les eaux issues de la fuite permanente.

Des prises d'échantillons sont possibles à différents endroits de l'unité. Ces prises sont matérialisées sur le PID par des étiquettes « E ». Des échantillons peuvent aussi être prélevés dans chacun des réservoirs et dans la cuve de flottation.

9.2.3 Mise en régime de la plateforme de récolte

Pour évaluer le temps de mise en place du régime permanent, les conditions extrêmes de fonctionnement en termes de débit ont été testées. Une culture effectuée dans un assemblage

3,6/26 a été utilisée en alimentation et de la soude à 0,2 mol/L a été injectée. La DO_{800} initiale de la suspension était de 0,23.

La première expérience est réalisée à faibles débits. Le débit d'alimentation Qs est fixé à 300 L/h. Un taux de recyclage de 30% est imposé, soit un débit d'eaux pressurisées Qp de 100 L/h. Un débit de soude de 35 L/h est aussi ajouté. Le débit liquide total circulant dans le flottateur est donc de 435 L/h. Le débit d'air aspiré Qa est fixé à 1 L/min et la pression de pressurisation P est réglée à 5 $bars$.

Les pH et débits sont suivis en différents lieux de l'unité et notamment sur la sortie des eaux traitées. Des prélèvements de solutions traitées sont effectués toutes les 5 min et caractérisés par DO_{800}. Au bout d'une heure, les paramètres relevés semblent constants. Cependant, le volume du flottateur étant de 200 L, une marge est appliquée pour être sûr de caractériser le régime permanent. Un temps de 90 min, correspondant à 3 fois le temps de passage dans le flottateur, est imposé après modification d'un paramètre opératoire pour considérer l'installation en régime permanent.

La seconde expérience est réalisée en conditions de fonctionnement nominal du pilote de flottation. Le débit d'alimentation Qs est fixé à 1000 L/h. Un taux de recyclage de 20% est imposé, soit un débit d'eaux pressurisées Qp de 200 L/h. Un débit de soude de 100 L/h est aussi ajouté. Le débit liquide total circulant dans le flottateur est donc de 1300 L/h. Le débit d'air aspiré Qa est fixé à 1 L/min et la pression de pressurisation P est réglée à 5 $bars$.

Dans ces conditions, le temps de passage dans le flottateur est de 10 min. Au bout de 30 min, les paramètres relevés semblent constants. Lorsqu'un tel fonctionnement est appliqué, un temps de mise en régime permanent de 30 min est suffisant.

9.3 Récolte semi-industrielle de *Dunaliella salina*

Les expériences présentées dans cette section ont été réalisées durant la saison estivale 2013. L'objectif principal était de tester à l'échelle semi-industrielle le procédé étudié en laboratoire. Les résultats obtenus se sont avérés satisfaisants.

L'efficacité de récupération du procédé continu est évaluée avec l'expression utilisée pour les tests batch en flottatest (équation 5.3), les volumes étant remplacés par les débits. En ce qui concerne les facteurs de concentration, ils sont par contre évalués en comparant les taux de matière sèche dans la suspension initiale et dans les boues flottées.

9.3.1 Influence de la quantité de soude ajoutée

Pour cette expérience, une culture de souche LOV non carencée, menée en raceway dans un assemblage 3,6/26 est utilisée. Cette culture a été inoculée le 29/08. Les premières récoltes sont effectuées le 05/09, la DO_{800} est alors de 0,27, soit environ 0,2 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV. Une des récoltes est effectuée le 12/09 (concentration en soude ajoutée : 0,022 mol/L). La culture est alors dans sa phase de déclin, la DO_{800} affiche une valeur de 0,23. La corrélation LOV n'est pas suffisamment précise pour différencier le taux initial de matière sèche.

La solution de soude injectée a une concentration de 0,2 mol/L. Elle est injectée à différents débits dans la conduite d'alimentation en suspension, 50 cm au-dessus de l'injection des eaux pressurisées (point I sur la figure 9.12). Le débit d'alimentation Qs est fixé à 300 L/h. Un taux de recyclage de 30% est choisi, soit un débit d'eaux pressurisées Qp de 100 L/h. Ces faibles débits par rapport aux caractéristiques du pilote sont justifiés par la faible disponibilité de suspensions microalgales à traiter. Le débit d'air aspiré Qa est fixé à 1 L/min. La pression de pressurisation P est réglée à 5 $bars$.

Une fois le régime permanent atteint (90 min après la dernière modification d'un paramètre opératoire d'après la section 9.2.3), des prélèvements et leurs caractérisations sont effectués toutes les 15 min pendant une heure. Ceci permet de vérifier la bonne mise en place du régime permanent quelles que soient les conditions opératoires. Les débits et densités optiques utilisés pour l'évaluation des performances de récolte sont des moyennes obtenues sur l'heure de suivi en régime permanent.

Les efficacités de récolte en fonction de la quantité de soude ajoutée dans la suspension sont présentées dans la figure 9.11. Elles sont évaluées en utilisant de manière indépendante DO_{800}, DO_{680} et les débits mesurés par les débitmètres électromagnétiques. Pour la DO_{800}, une évaluation de l'efficacité de récolte à partir des débits d'eaux traitées obtenus par bilan sur le flottateur (légèrement différents des débits moyens évalués par le débitmètre) est aussi proposée. Les 3 méthodes pour remonter à l'efficacité donnent des résultats similaires.

Les efficacités de récolte obtenues en régime continu à l'échelle semi-industrielle sont comparées à des tests batch réalisés en flottatest sur une suspension de caractéristiques similaires. La quantité de soude nécessaire pour obtenir une séparation efficace en flottateur est plus importante. Les efficacités atteignent des valeurs comprises entre 60 et 70%.

Les pistes d'optimisation de la séparation mises en évidence lors des études en laboratoire, notamment concernant les conditions d'injection de la soude, restant à explorer, cette première expérience caractérisable à l'échelle semi-industrielle est tout de même très encourageante. Plus de 50% de microalgues sont récupérés en ajoutant une quantité modérée de soude dans la suspension (0,02 mol/L). De plus, une évaluation de la matière sèche indique que les boues

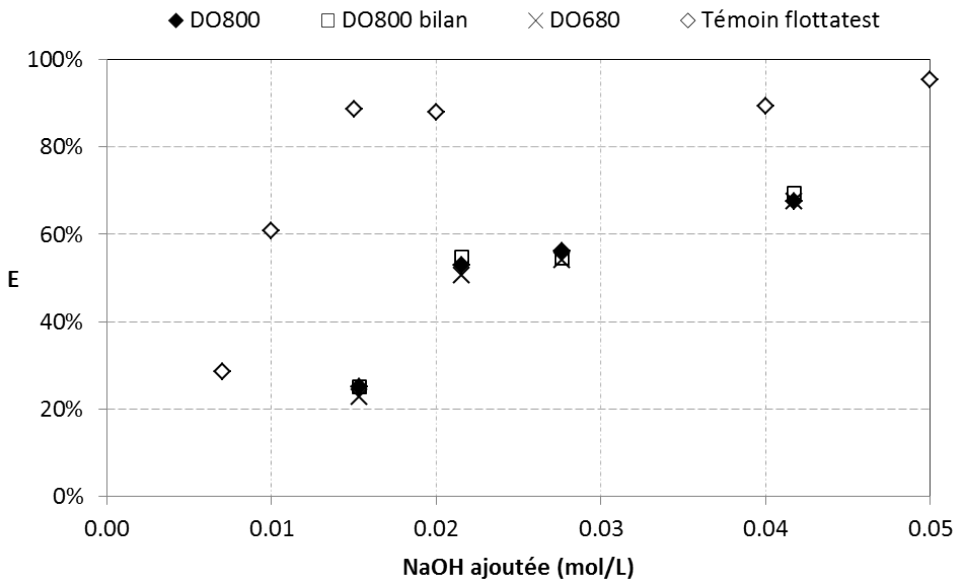


Figure 9.11 – *Efficacité de récolte obtenue par autofloculation-flottation semi-industrielle en fonction de la quantité de soude ajoutée. Concentration de la solution de soude injectée :* 0,2 mol/L.

obtenues contiennent 3 à 4% de matière sèche. Selon la concentration initiale des suspensions évaluée à environ 0,2 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$, des facteurs de concentration de 150 à 200 sont obtenus dans les conditions considérées.

9.3.2 Influence du lieu d'injection de la soude

Lors des études laboratoire, il a été mis en évidence que l'agitation imposée lors de l'injection de soude pourrait induire des différences de performances de séparation. Il est difficile de comparer les conditions d'agitation dans un flottatest et dans l'alimentation du flottateur semi-industriel. Ce qui est sûr, c'est que cette agitation peut varier selon le point d'injection de la soude choisi.

Pour permettre de caractériser l'influence du lieu d'injection de la soude sur les performances de récolte, une expérience est entamée sur la même culture que celle utilisée sur la section 9.3.1 (souche LOV, raceway inoculé le 29/08, assemblage 3,6/26 à 12%). Cette culture n'ayant pas survécu sur la durée de l'expérience, une autre culture dans les mêmes conditions mais dans un autre raceway est utilisée pour une partie des essais. Les DO_{800} varient pour cette expérience entre 0,24 et 0,37, soit entre 0,2 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ et 0,3 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV.

Le système d'injection présenté dans la section L.4.3 est utilisé pour permettre d'injecter une solution de soude de concentration 0,2 mol/L à différents endroits (voir figure 9.12). Une même

quantité de soude par volume de suspension, 0,02 mol/L, est injectée quel que soit le lieu d'injection. Le débit d'alimentation Qs est fixé à 300 L/h. Un taux de recyclage de 30% est choisi, soit un débit d'eaux pressurisées Qp de 100 L/h. Le débit d'air aspiré Qa est fixé à 1 L/min et la pression de pressurisation P est réglée à 5 $bars$.

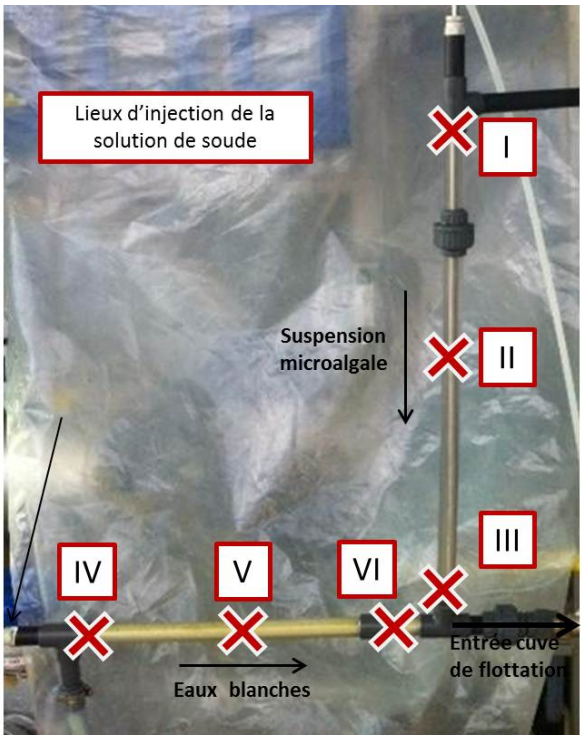


Figure 9.12 – *Localisation des points d'injection de soude testés.*

Les débits et densités optiques utilisés pour l'évaluation des performances de récolte sont des moyennes obtenues sur une heure de suivi en régime permanent (un échantillonage toutes les 15 min). Les efficacités de récupération obtenues en fonction du lieu d'injection de soude sont rapportées sur la figure 9.13. Le point d'injection III est dupliqué pour vérifier la reproductibilité des résultats. On peut aussi considérer que le point d'injection VI présente des similarités avec le point III étant donnée la faible distance qui les sépare.

Les efficacités de récolte obtenues sur les 2 tests au point III et sur celui au point VI sont similaires, l'expérience semble reproductible. Il faudrait bien sûr multiplier le nombre de mesures pour vérifier cette dernière assertion, mais le temps de manipulation étant long et la matière algale disponible en quantité limitée, ceci n'a pas été effectué.

Les meilleures performances de récolte sont obtenues en plaçant l'injection de soude aux points III et VI, qui correspondent au confluent de l'alimentation en suspension et de celle en soude. Les sections de tuyauterie étant constantes, c'est le lieu pour lequel l'agitation est maximale. En effet, c'est ici que le débit est le plus important, le fluide est déjà triphasique (milieu de culture + bulles + microalgues) et un coude est rencontré sur la conduite d'alimentation en suspension.

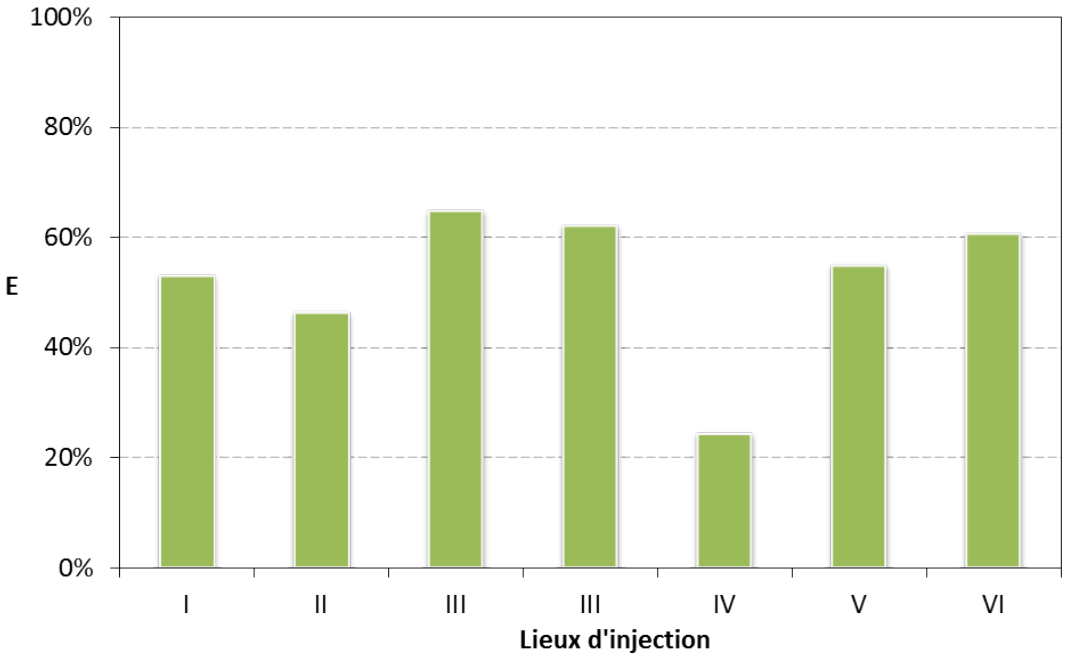


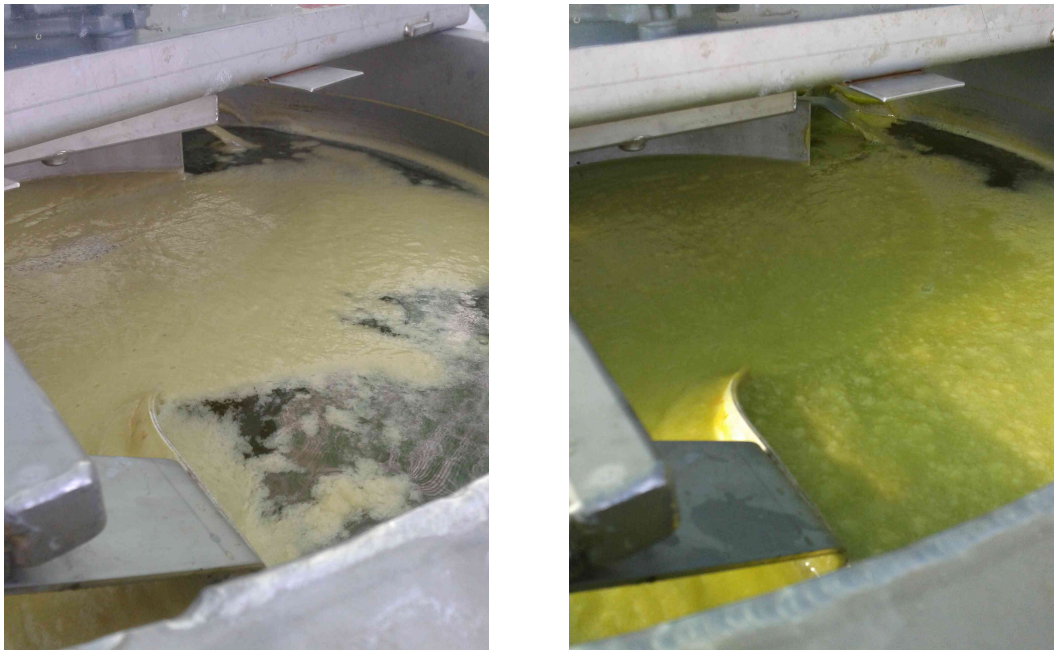
Figure 9.13 – *Efficacité de récolte obtenue par autofloculation-flottation semi-industrielle en fonction du lieu d'injection de la soude. La quantité de soude ajoutée par volume de suspension est fixée à* 0,022 *mol/L.*

L'agitation semble donc bien favorable à la séparation.

Si l'on injecte la soude sur la conduite d'alimentation en suspension, les performances de récolte sont légèrement supérieures si cette injection se fait en sortie de coude (point I), où des phénomènes de recirculation interviennent. Ces performances n'atteignent pas cependant celles constatées aux points III et VI.

Sur la conduite d'alimentation en eaux pressurisées, plus l'injection s'éloigne de la zone de confluence avec l'alimentation en suspension, moins l'efficacité de récolte est bonne. Cette efficacité est déjà bien diminuée au point IV. Ceci peut s'expliquer par la moindre présence de microalgues dans cette conduite. En effet, les débits de suspension sont plus faibles et ces suspensions pressurisées sont moins concentrées car déjà passées par la zone de séparation. Plus la quantité de précipité formé dans une zone à faible densité algale est importante, moins les performances de récolte seront bonnes. Ceci confirme ce qui a été envisagé après les études à l'échelle du flottatest, sur la nécessité de former le précipité en présence des microalgues.

Sur la figure 9.14, on remarque qu'une importante quantité de précipité est formée lors de l'injection de soude au point IV, mais l'apparence blanchâtre de ce dernier indique qu'il n'a pas capté les microlagues de manière efficace. En comparaison, la mousse formée lors d'une injection de soude au point VI semble chargée de microalgues.



(a) Point d'injection IV (b) Point d'injection III

Figure 9.14 – *Différentes mousses de flottation obtenues selon le lieu d'injection de la soude.*

9.3.3 Influence de la concentration de la solution de soude ajoutée

Bien que la concentration des solutions de soude ait été diminuée pour les premières expériences retranscrites (0,2 mol/L), il est possible vu ce qui a été constaté dans la section 8.3.3 que les performances de récolte puissent être augmentées en diminuant encore cette concentration. Ceci a été vérifié lors d'une nouvelle expérience.

Pour caractériser l'influence de la concentration de soude à l'échelle du pilote, la culture de souche LOV non carencée, menée dans un assemblage 3,6/26 à 12% est de nouveau utilisée. Sur cette expérience la culture est en phase stationnaire de croissance. La DO_{800} avant récolte est comprise entre de 0,42 et 0,47, soit légèrement plus de 0,3 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$ selon la corrélation LOV.

3 solutions de soude de concentrations différentes sont préparées. En tenant compte des résultats obtenus dans la section 9.3.2, ces solutions sont injectées au point III, à des débits différents permettant d'obtenir pour chaque essai, une même quantité de soude ajoutée par volume de suspension : 0,022 mol/L. Comme pour les autres expériences, les efficacités sont moyennées sur une heure de fonctionnement en régime permanent. Le débit d'alimentation Qs est fixé à 300 L/h. Un taux de recyclage de 30% est choisi, soit un débit d'eaux pressurisées Qp de 100 L/h. Le débit d'air aspiré Qa est fixé à 1 L/min et la pression de pressurisation P est réglée à 5 $bars$.

La figure 9.15 montre que les efficacités obtenues sur le flottateur sont similaires à celles qui

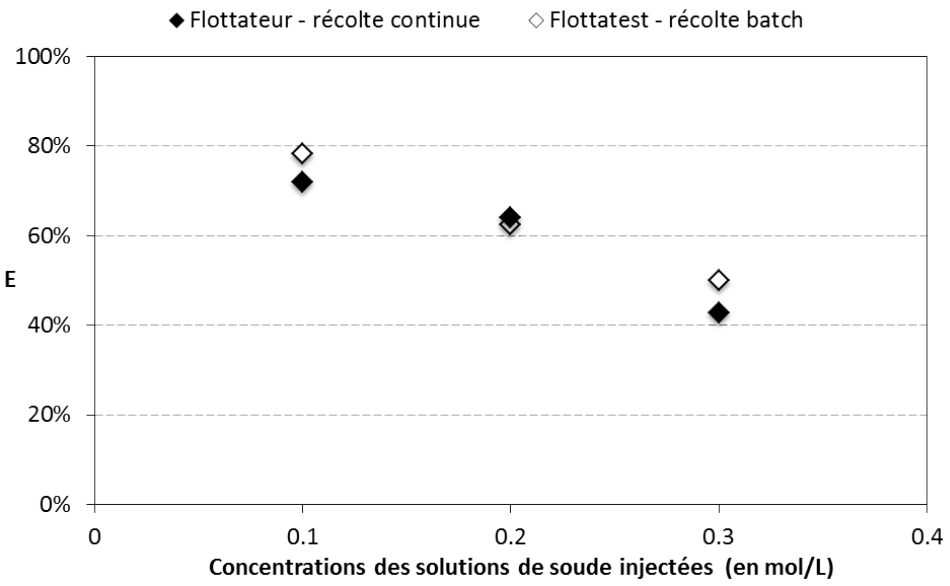


Figure 9.15 – *Efficacité de récolte obtenue par autofloculation-flottation semi-industrielle en fonction de la concentration des solutions de soude ajoutée. La quantité de soude ajoutée par volume de suspension est fixée à* 0,022 mol/L. *Résultats comparés à ceux obtenus en flottattest en fonctionnement batch.*

avaient été obtenues en flottatest dans l'expérience retranscrite section 8.3.3. Des efficacités de récolte supérieures à 72% sont constatées en flottateur semi-industriel lorsque la concentration de solution de soude est abaissée à 0,1 mol/L. Ces efficacités chutent dans les mêmes proportions que pour les tests à petite échelle, lorsque la solution de soude est concentrée.

Les pH caractérisés en sortie des eaux traitées dans le flottateur sont tout à fait en accord avec ceux qui avaient été constatés en flottatest. En effet, plus la solution de soude injectée est concentrée, moins le pH atteint est important pour une même quantité de base ajoutée (pH = 9,75 pour une solution à 0,1 mol/L ; pH = 9,72 pour une solution à 0,2 mol/L ; pH = 9,42 pour une solution à 0,3 mol/L).

La figure 9.16 traduit bien l'efficacité de récupération obtenue sur une suspension faiblement concentrée initialement. On remarque aussi sur l'échantillon de boues (à droite), qu'une fois raclées, ces boues peuvent encore se concentrer si on les laisse reposer. En laissant se concentrer ainsi les boues dans le bac de récupération et en ne récupérant que le surnageant (voir figure 9.17), on obtient des taux de matière sèche de l'ordre de 7%, soit un facteur de concentration d'environ 230 sur le procédé d'autofloculation-flottation

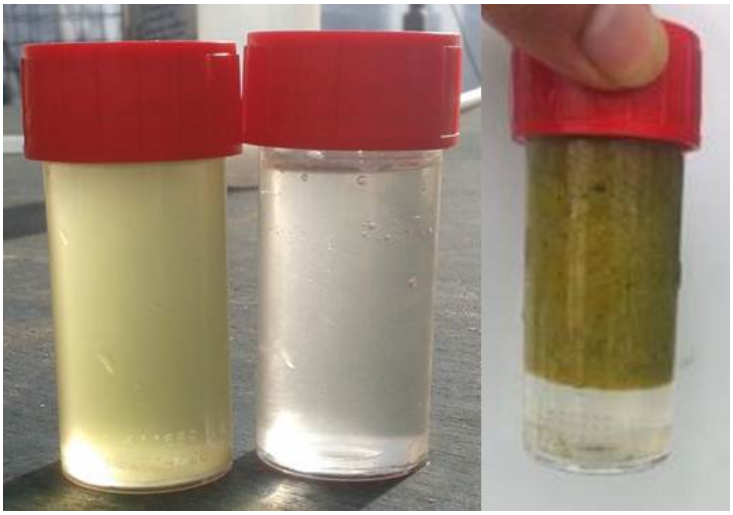


Figure 9.16 – *Échantillons de suspension initiale (à gauche), de suspension traitée (au centre) et de boues flottées (à droite) obtenus lors de l'injection d'une solution de soude à* 0,1 *mol/L (quantité totale ajoutée par volume de suspension :* 0,022 *mol/L).*

Figure 9.17 – *Échantillon de boues obtenues après sur-concentration dans le bac de récupération des boues flottées.*

9.4 Conclusions et perspectives sur la récolte semi-industrielle

Les travaux réalisés en laboratoire ont permis de définir précisément le procédé de récolte de *D. salina* par autofloculation-flottation. La mise en place d'une plateforme de récolte continue opérationnelle en eaux hypersalées, permet maintenant de tester ce procédé à une échelle que l'on qualifiera de « semi-industrielle »(débit de suspension traitée : 1 m^3/h).

Les premières expériences ont d'ores et déjà montré que le procédé d'autofloculation-flottation pouvait être performant à cette nouvelle échelle. En effet, pour un simple passage, des efficacités de récupération supérieures à 70% et des facteurs de concentration de 230 ont été observés en ajoutant seulement 0,022 mol de soude par litre de suspension. Les efficacités de récupération sont équivalentes à celles obtenues sur la même suspension lors de tests « batch » sur des échantillons de 500 mL. Elles approchent les meilleures performances obtenues en laboratoire sur d'autres suspensions. Les facteurs de concentration obtenus sont même bien supérieurs en fonctionnement continu que pour l'ensemble des expériences « batch » réalisées en laboratoire.

La faisabilité prouvée, reste maintenant à optimiser le procédé de récolte à l'échelle du pilote. Pour ce faire, plusieurs axes ont été dégagés et certains testés. Il a par exemple été vu que dans les conditions d'agitation testées, réduire la concentration de la solution de soude au moins jusqu'à 0,1 mol/L permettait d'améliorer les performances de récolte. Injecter cette soude dans une zone fortement agitée semble aussi propice à la récolte. D'un point de vue économique, l'utilisation de chaux éteinte (non testée à l'échelle du pilote) en remplacement de la soude semble être à court terme un axe d'optimisation évident.

De nombreuses améliorations technologiques sur le procédé d'autofloculation-flottation, notamment sur la technique d'injection de soude, peuvent être imaginées à partir de l'analyse proposée des mécanismes de séparation. Plusieurs de ces améliorations sont actuellement étudiées au LISBP.

Conclusions et perspectives

La finalité des travaux présentés dans ce mémoire était de développer un procédé de récolte semi-industriel de *D. salina*. À l'issue de ces 3 années de recherche, ce but a été atteint et le projet Salinalgue dispose aujourd'hui d'une plateforme innovante et performante de récolte de microlagues par autofloculation-flottation.

Pour en arriver là, un large panel de procédés a d'abord été considéré. Suite à une vaste analyse bibliographique, il s'est avéré que peu de ces procédés pouvaient s'accorder avec les caractéristiques de l'algue et de son milieu. En considérant en plus, les objectifs du projet Salinalgue en termes de concentration (20% de matière sèche en fin d'étape de récolte), de valorisation (produits à faible valeur ajoutée non contaminés), de non utilisation de manipulations génétiques, de production en milieu extérieur et de conservation de l'intégrité des microlagues, la liste s'est réduite à quelques procédés : la centrifugation, l'adsorption et la flottation ou la sédimentation couplées à une étape d'épaississement.

Le développement de plateformes analytique et de culture au LISBP a permis de caractériser les performances de ces procédés sur la récolte de *D. salina*. Les quelques tests effectués sur l'adsorption n'ont pas permis de mettre en évidence des conditions favorables à la séparation des souches considérées. Si la centrifugation s'est avérée efficace et respectueuse de l'intégrité des cellules dans les conditions évaluées, elle n'est envisagée à l'échelle industrielle que comme procédé d'épaississement post sédimentation ou flottation. Pour ces derniers, il est apparu nécessaire de les coupler à une étape de déstabilisation pour obtenir des séparations efficaces.

Après les tests de plusieurs techniques de déstabilisation, la floculation induite par augmentation du pH s'est avérée la plus prometteuse. Son couplage avec une étape de flottation est la principale méthode de récolte considérée dans ce mémoire. Il a été mis en évidence que lors de l'ajout de solutions basiques, une précipitation d'hydroxyde de magnésium entraîne une capture par balayage des microalgues. Les flocs alors formés ont plutôt tendance à décanter, mais si des microbulles sont ajoutées dans le milieu, elles s'enchevêtrent dans le précipité formé et font flotter le tout.

L'étude approfondie de cette récolte par autofloculation-flottation a permis de préciser ce mécanisme, en montrant que les microalgues étaient capturées uniquement durant la phase de

précipitation de l'hydroxyde de magnésium. Les performances de récolte de *D. salina* sont donc principalement fonction des méthodes mises en œuvre pour forcer la précipitation. Quelles que soient ces méthodes, elles doivent conduire à une précipitation d'hydroxyde de magnésium la plus homogène possible, pour optimiser la capture des microalgues.

En considérant ceci, le transfert à l'échelle semi-industrielle du procédé d'autofloculation-flottation induit par ajout de soude s'est rapidement montré efficace. Les premiers tests effectués à cette échelle remplissent déjà les objectifs initiaux du projet Salinalgue. En effet, la récolte par autofloculation-flottation permet d'obtenir une matière algale non contaminée par des sels d'aluminium ou de fer qui viendraient limiter les valorisations de la biomasse. Cette dernière est intègre pour sa fraction récoltée et sa fraction non récoltée peut même servir d'inoculum à une nouvelle culture. Il n'est pas nécessaire de modifier génétiquement les microalgues pour faciliter leur séparation et le procédé semble même robuste à l'origine de la souche et à l'état de carence de la culture.

Pour des ajouts modérés de soude (0,022 $mol.L^{-1}$), d'excellentes performances de récolte sont obtenues sur des cultures initialement très diluées (0,2 à 0,3 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$). Une efficacité de récupération supérieure à 70% est atteinte et des efficacités supérieures à 90% sont même envisageables étant donnée l'adéquation avec les tests laboratoire mise en évidence dans les dernières expériences. Des facteurs de concentration de 230 sont atteints pour porter les taux de matière sèche à une valeur proche du maximum envisageable par flottation, à savoir, 7% de matière sèche dans la pâte algale flottée.

De nombreuses pistes d'optimisation sont d'ores et déjà à l'étude au LISBP pour atteindre, a minima, les performances mises en évidence à l'échelle du laboratoire. À court terme, en remplaçant la soude par de la chaux éteinte et en optimisant l'injection de cette dernière avec des méthodes déjà éprouvées, il semble probable de pouvoir atteindre des coûts en additif chimique de 0,08 €/kg de matière sèche algale récoltée (prix du marché en 2013 ; culture à 0,5 $g_{MS}.L^{-1}_{suspension}$). Plusieurs innovations technologiques autour de l'injection de soude pourraient même réduire encore ces coûts. Une réflexion globale sur l'ensemble de la filière de production de microalgues et une utilisation maximale de phénomènes naturels, comme par exemple l'augmentation du pH par assimilation photosynthétique du carbone inorganique, des nitrates et des phosphates sont envisagées pour optimiser encore la récolte.

Pour diminuer les autres coûts opératoires liés à la flottation (non quantifiés sur cette étude), une réduction de la pression de pressurisation des eaux semble envisageable (analyse de résultats en cours). L'ajout d'une étape de décantation avant la flottation est aussi sérieusement envisagé. Des tests (non présentés dans le mémoire) ont d'ailleurs montré qu'il était possible de sur-concentrer des boues d'autofloculation-décantation, par flottation à air dissous.

Mais la meilleure réponse viendra peut être de la sélection d'une souche auto-floculante (figure 9.18), comme cette nouvelle souche de *D. salina* isolée dans le cadre du projet Salinalgue et

capable de flotter naturellement...

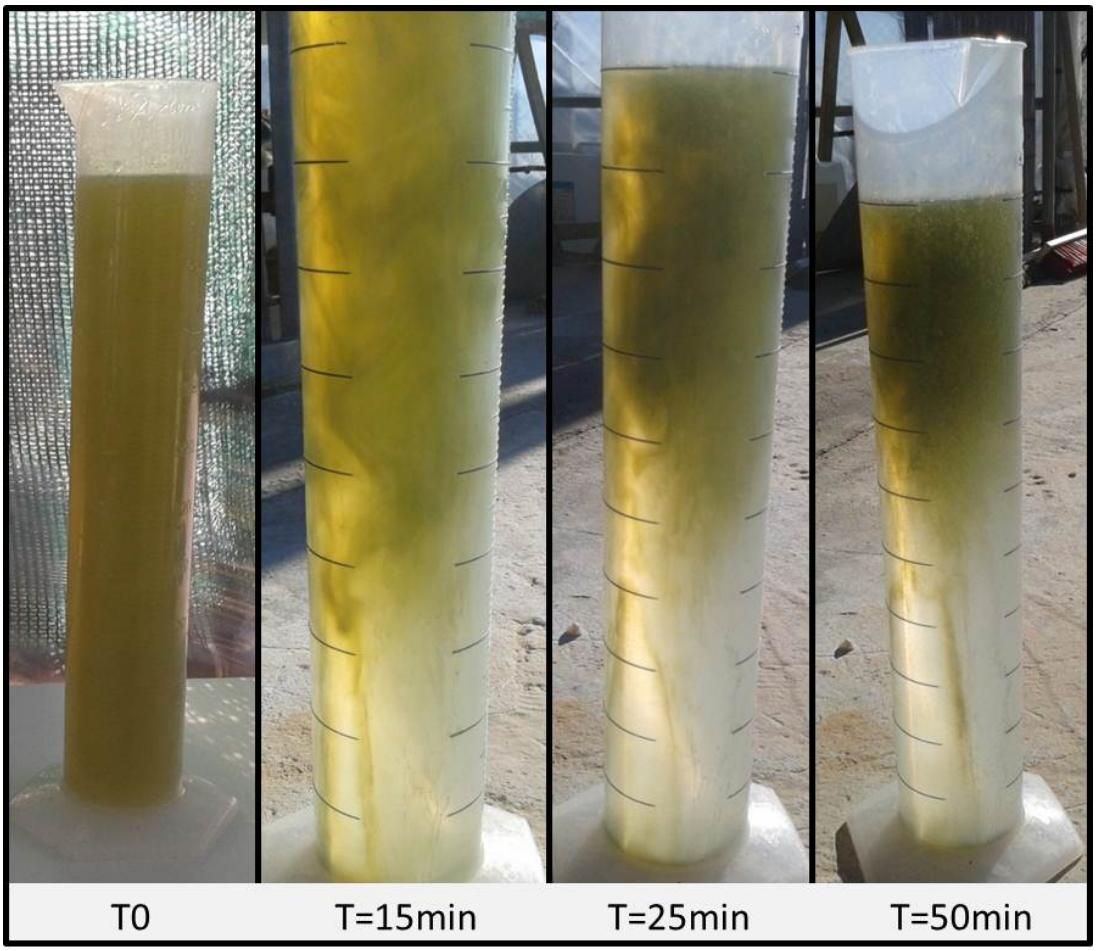


Figure 9.18 – *Flottation naturelle (sans additif) d'un souche auto-floculante récemment isolée dans le cadre du projet Salinalgue.*

Annexe A

Protocole de comptage de microalgues sur cellule de Malassez

Ce protocole est celui utilisé au LISBP. Il est en accord avec les protocoles proposés par les autres laboratoires partenaires du projet Salinalgue.

Protocole de comptage de microalgues sur cellule Malassez

Pour application au LISBP par Alexandre Besson

Matériels

- 1 cellule de Malassez quadrillage double
- 1 lamelle pour cellule de Malassez
- Micropipette ou autre système de prélèvement + tips
- Une solution de Lugol (voir paragraphe préparation du Lugol)
- Un tube + bouchon
- 1 microscope optique
- 1 système d'acquisition photographique si traitement automatique des images
- 1 compteur à main si traitement manuel

Préparation Lugol

Pour fixer les microalgues lors du comptage, une solution de Lugol est ajoutée à chaque échantillon. Cette solution se prépare simplement en mélangeant dans les proportions suivantes :

- 1 L d'eau distillée
- 50 g d'iode
- 100 g d'iodure de potassium

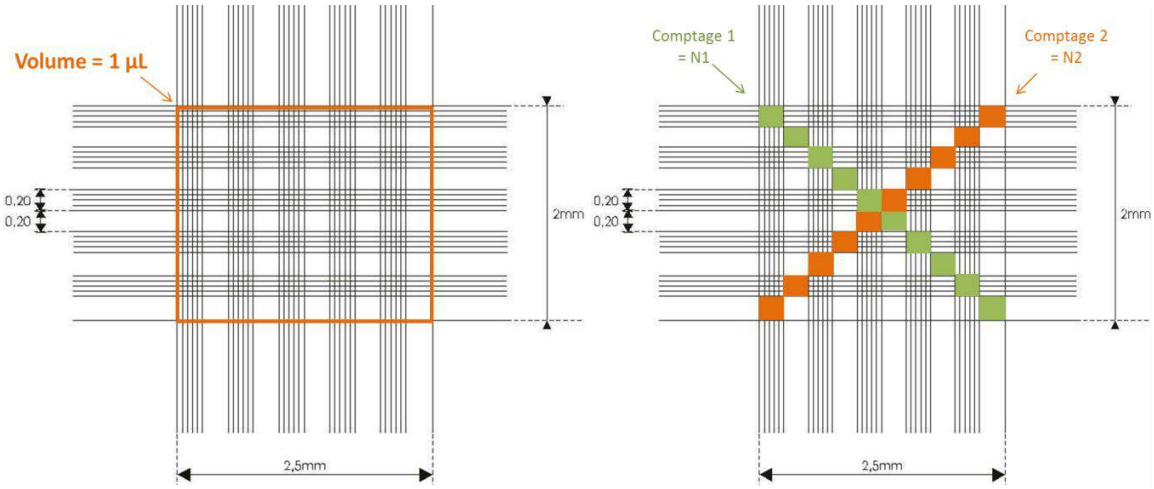
Le Lugol est conservé à température ambiante à l'abri de la lumière.

Préparation de la cellule de Malassez

1. Agiter la suspension microalgale et prélever à la micropipette un échantillon E1 de 100 µL.
2. Prélever 100 µL d'une solution de Lugol et le mélanger avec E1 dans le tube pour fixer et colorer les algues (N.B. : Après fixation il est possible de conserver l'échantillon pendant 2-3 jours sans craindre de dégradation). Attention, la fixation entraîne la sédimentation des microalgues. Penser à agiter le flacon avant tout prélèvement.
3. Après agitation du flacon, prélever à l'aide de la micropipette environ 30 µL de la suspension fixée et déposer cette goutte sur la cellule de Malassez. Répéter cette action sur le deuxième quadrillage servant de réplica pour le même échantillon.
4. « Lâcher » la lamelle sur les gouttes en prenant garde à ce que le liquide soit équitablement réparti (un dépôt trop lent de la lamelle peut entraîner une accumulation des algues dans certaines zones ; une observation rapide de l'ensemble de la lamelle est conseillée pour vérification de l'homogénéité).
5. Laisser sédimenter les algues pour qu'elles se retrouvent toutes dans le plan focal du quadrillage.
6. Positionner la cellule de Malassez sous le microscope pour procéder au comptage

Comptage et estimation de la concentration algale

Chaque quadrillage des cellules de Malassez contient 100 « gros rectangles » de 200*250 µm, pour un volume total balayé de 1 µL.



On compte le nombre de microalgues contenues dans la première diagonale de 10 carrés (=N1).
On fait de même avec le 2ème diagonale de 10 carrés (=N2).

Pour obtenir la concentration cellulaire (C_c) de microalgues, en cellules par millilitre, on applique le calcul suivant :

$$C_c = \frac{(N1 + N2)}{2} \times 2 \times 10 \times 1000$$

On prend la moyenne de 2 comptages N1 et N2. On multiplie par 2 pour tenir compte de la dilution au Lugol, par 10 pour considérer 100 carrés (soit 1 µL), et par 1000 pour passer en millilitre. On a donc finalement :

$$\boldsymbol{C = (N1 + N2) \times 10000}$$

Vérifier l'adéquation des réplicas et si validation, prendre la moyenne des comptages.

Il est conseillé d'effectuer en parallèle une DO_{800} et une DO_{680} sur chaque échantillon pour s'assurer de la cohérence des résultats.

Annexe B

Programme Matlab permettant d'évaluer la concentration d'un échantillon en microalgues/mL

Ce programme nécessite la possession d'une licence *Matlab* et de la *toolbox image processing* sur l'ordinateur utilisé. L'interface n'a pas été soignée étant donné le peu d'utilisateurs concernés et la faible durée d'utilisation de ce programme, avant remplacement par la macro ImageJ.

```
% Programme permettant d'évaluer la concentration d'un échantillon
% en algues/mL
% L'opérateur fournit le nombre d'images qu'il souhaite du même échantillon
% (conseil : au moins 5 images). Ces images sont prises dans les zones
% non quadrillées d'une cellule de Malassez à grossissement donné. Le
% protocole de préparation de la cellule est identique à un comptage
% classique (dilution par 2 avec lugol, attente décantation,...)
close all
clear all

c=5;  %numérotation de la première image à traiter (pas de 0)
n=15; %numérotation de la dernière image à traiter

hauteur=1280; %hauteur des images en pixel
largeur=960; %largeur des images en pixel

volume=0.01 ; %Volume "de la prise de vue" en mL. Estimé en fonction d'un
% étalonnage sur le quadrillage de Malassez à grossissement identique. Il
% est vérifié que ce paramètre est constant à grossissement identique et
% mêmes références de cellules Malassez.

for i=c:n % traitement séquencé des images de l'échantillon à caractériser
    if i<=9;  % concaténation pour le nom de fichier
      image=strcat('Lugol-10x000',num2str(i),'.bmp');
    end
    if i>9;
      image=strcat('Lugol-10x00',num2str(i),'.bmp');
    end
    if i>99;
      image=strcat('Lugol-10x0',num2str(i),'.bmp');
    end
    if i>999;
      image=strcat('Lugol-10x',num2str(i),'.bmp');
    end
    % toutes les lignes "pour vérification" sont supprimées dans le
    % programme final pour accélérer le calcul
    I1=imread(image,'bmp');   % lecture de l'image
    subplot(2,2,1), imshow(I1) % affichage de l'image pour vérification
    I2=im2double(I1); % passage en double précision
    I2=rgb2gray(I2); % passage en niveau de gris
    subplot(2,2,2), imshow(I2)  % pour vérification
    level = graythresh(I2); % seuillage et binarisation
    d=i-c+1;  % pour vérification
    Seuil(d,1)=level; %enregistrement du seuil pour vérification
    I3=edge(I2); %recherche des contours des algues
    subplot(2,2,3), imshow(I3)% pour vérification
    I4 = imfill(I3,'holes'); % remplissage des "trous"
    I4 = bwareaopen(I4, 70); % suppression des objets trop petits
    subplot(2,2,4), imshow(I4)% pour vérification
    cc = bwconncomp(I4, 8); % évaluation du nombre d'algues sur l'image
    nombre_algues(d,1)=cc.NumObjects; %archivage nombre d'algues par image
end

moy_nombre_algues=mean(nombre_algues);
concentration=2*moy_nombre_algues/volume % tient compte de la dilution
```

Annexe C

Protocole d'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles

Ce protocole a été utilisé suite aux conseils d'Hubert Bonnefond (LOV). Il est utilisé au LISBP uniquement pour déterminer le ratio caroténoïdes/chlorophylles et n'a pas pour objectif la détermination des concentrations de chacun des pigments. En conséquence, il n'est pas nécessaire de respecter parfaitement les volumes proposés dans ce protocole. Il est même préférable de les adapter aux concentrations microalgales de chacun des échantillons.

Protocole d'évaluation du ratio caroténoïdes/chlorophylles

Pour application au LISBP par Alexandre Besson (source : Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology, 148, 350-382.)

Matériels et produits

- Spectrophotomètre
- Montage pour filtration sous vide (avec si possible utilisation de la pompe à vide manuelle plutôt que de la trompe consommatrice d'eau potable !)
- Filtre en fibre de verre Whatman GF6
- Acétone qualité laboratoire
- Papier aluminium
- Tubes pour centrifugeuse de 15mL résistants à l'acétone
- Centrifugeuse
- Cuves pour spectrophotomètre résistantes à l'acétone

Protocole

Attention : il est recommandé de travailler dans l'obscurité pour éviter la dégradation des pigments.

1) Allumer le spectrophotomètre pour permettre le chauffage des lampes.

2) Recouvrir les tubes de papier aluminium pour éviter toute pénétration de lumière.

3) Filtrer 10 mL de la suspension microalgale à caractériser sur le montage de filtration sous vide.

4) Récupérer le filtre, le mettre dans un tube pour centrifugeuse et ajouter 6 mL d'acétone.

5) Agiter doucement le tube et le mettre au réfrigérateur pendant une heure (agiter le tube dans le réfrigérateur toutes les 20 minutes).

6) Centrifuger le tube pendant 5 min à 2000 rpm.

7) Faire le blanc du spectrophotomètre avec la solution d'acétone pur.

8) Récupérer le surnageant de la centrifugation et le mettre dans une cuve de spectrophotomètre.

9) Mesurer les densités optiques du surnageant aux longueurs d'ondes suivantes : 470 nm ; 644,8 nm ; 661,6 nm ; 700 nm. La valeur à 700 nm traduit l'efficacité de la centrifugation et doit être proche de 0.

10) Calculer la concentration en chlorophylle a en µg/mL d'acétone :

$$[Chla] = 11{,}24.A_{661{,}6} - 2{,}04.A_{644{,}8}$$

11) Calculer la concentration en chlorophylle b en µg/ml d'acétone :

$$[Chlb] = 20{,}13.A_{644{,}8} - 4{,}19.A_{661{,}6}$$

12) Calculer la concentration en chlorophylles a et b en µg/ml d'acétone :

$$[Chl] = [Chla] + [Chlb] = 7{,}05.A_{661{,}6} + 18{,}09.A_{644{,}8}$$

13) Calculer la concentration en caroténoïdes et xanthophylles en µg/ml d'acétone :

$$[Car] = \frac{1000.A_{470} - 1{,}90.C_a - 63{,}14.C_b}{214}$$

14) Calculer finalement le ratio caroténoïdes/chlorophylles : $R = \frac{[Car]}{[Chl]}$

Sécurité

Attention à la manipulation de l'Acétone :

R: 11, 36, 66, 67 : Facilement inflammable, irritant pour les yeux et par inhalation.
S : 2, 9, 16, 26, 46 : Tenir hors de portée des enfants, garder dans un endroit ventilé à l'écart des flammes et/ou étincelles. Si contact avec les yeux, rincer et consulter un médecin. Si ingestion, consulter un médecin.

Annexe D

Protocole d'évaluation du caractère hydrophobe d'une culture micoalgale

Ce protocole utilisé dans d'autres études sur les microalgues (Garg *et al.*, 2012), a été testé et invalidé pour *D. salina* au LISBP.

PROTOCOLE TEST DE L'HYDROPHOBIE

1. MATÉRIELS

- Spectrophotomètre
- Cuve pour spectrophotomètre
- Outil de prélèvement
- N-hexane
- Mélangeur vortex

2. PROCÉDURE

Ce test s'appuie sur le ratio de distribution des cellules entre l'eau et une phase organique (Rosenberg et al. 1980).

1) Mesurer la densité optique à 800 nm de la solution algale étudiée.
2) Prélever 4 ml de solution algale et y ajouter 1 ml de n-hexane.
3) Placer le tube à essai dans un mélangeur vortex pendant 1 minute.
4) Laisser reposer pendant 5 minutes le temps de voir se former les deux phases.
5) Prélever un peu de la phase aqueuse et mesurer la densité optique de celle-ci à 800 nm.
6) Le pourcentage d'adhésion à l'hydrocarbure peut alors être calculé :

$$H = \left(\frac{A_0 - A_W}{A_0}\right) \times 100\%$$

Avec A_o l'absorbance de la solution algale avant extraction et A_w l'absorbance de la phase aqueuse prélevée après repos.

Annexe E

Composition et préparation du milieu de Conway

Lors de cette étude, un milieu nutritif de Conway a été utilisé pour chaque culture. Seules les solutions principales et vitaminiques sont ajoutées. La solution silicatée est réservée aux diatomées.

MILIEU DE CONWAY

SOLUTION PRINCIPALE :

Composition pour 10 litres :

Nitrate de sodium ($NaNO_3$)	1000 g
Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	200 g
Acide Ethylènediamine tetraacetique de sodium (Na_2EDTA)	450 g
Acide borique (H_3BO_3)	336 g
Chlorure de manganèse ($MnCl_2$)	3,6 g
Chlorure ferrique ($FeCl_3$)	13 g
Solution métallique	10 ml
Qsp 10 litres d'eau déminéralisée	

SOLUTION METALLIQUE :

Composition pour 1 litre :

Chlorure de zinc ($ZnCl_2$)	21 g
Chlorure de cobalt hexahydraté ($CoCl_2$, $6H_20$)	20 g
Sulfate de cuivre pentahydraté ($CuSO_4$, $5H_2O$)	20 g
Ammonium heptamolybdate tetrahydraté ($6(NH_4)Mo_70_{24}$, $4H_20$)	9 g
Qsp 1litre d'eau déminéralisée	

SOLUTION VITAMINIQUE :

Composition pour 1 litre :

2 g de Thiamine (Vitamine B1)

0,1 g de cyanocobalamine (Vitamine B12)

Qsp 1 llitre d'eau déminéralisée stérilisée

Solution à conserver au refrigérateur

SOLUTION SILICATEE (pour les diatomées) :

Composition pour 1 litre :

40 g de métasilicate de sodium (Na_2SiO_3, $5H_20$)

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée

UTILISATION :

Ce milieu est utilisé pour la culture des micro-algues en eau de mer naturelle.

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution principale

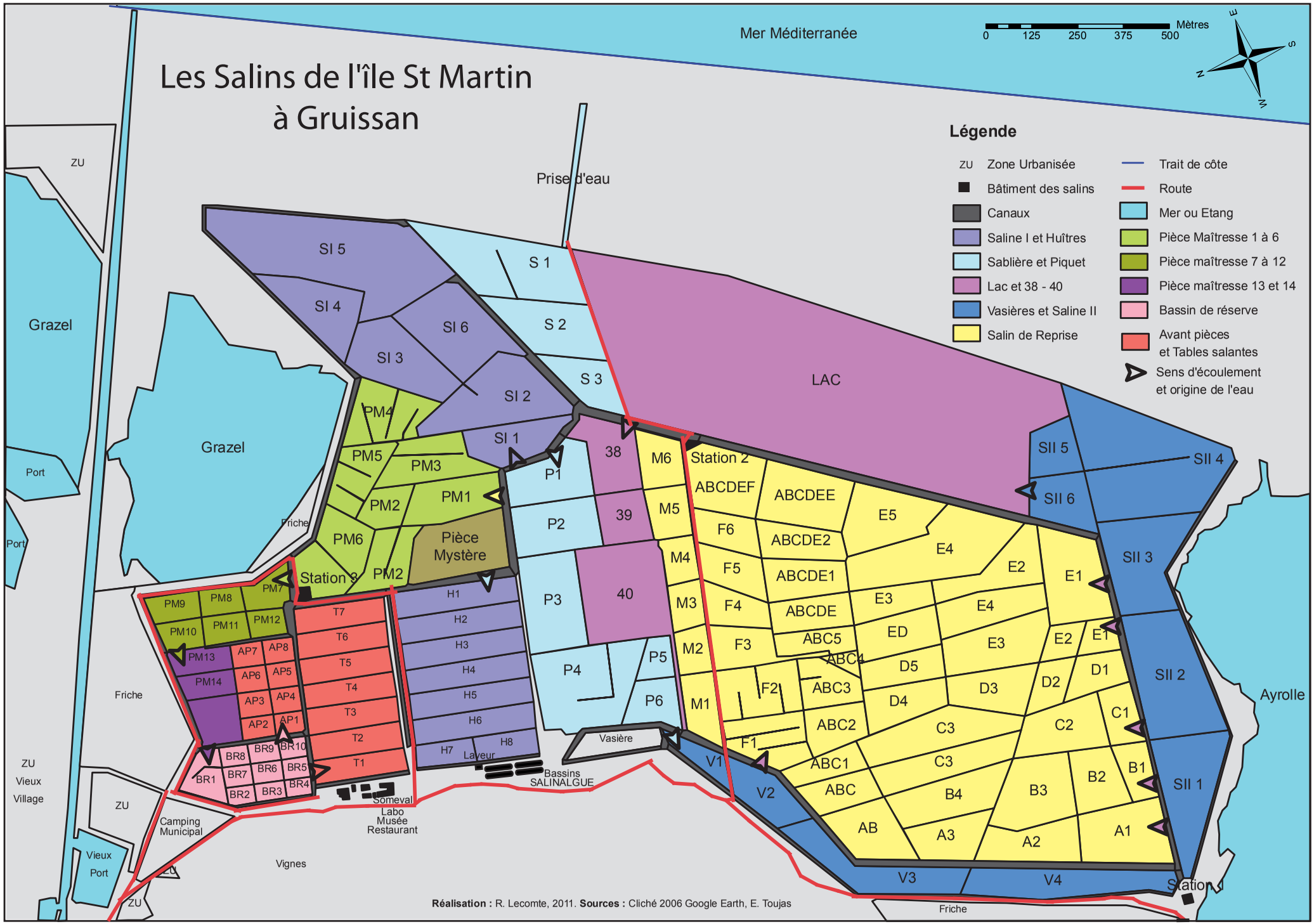
0,1 ml de solution vitaminique

2,5 ml de solution silicatée pour les diatomées

Annexe F

Site de démonstration semi-industriel Salinalgue

L'emplacement des bassins Salinalgue sur le site des salins de Gruissan est indiqué sur le premier plan. Un zoom sur cette zone est proposé par la suite. Ces plans ont été réalisés par IDEE Aquaculture.

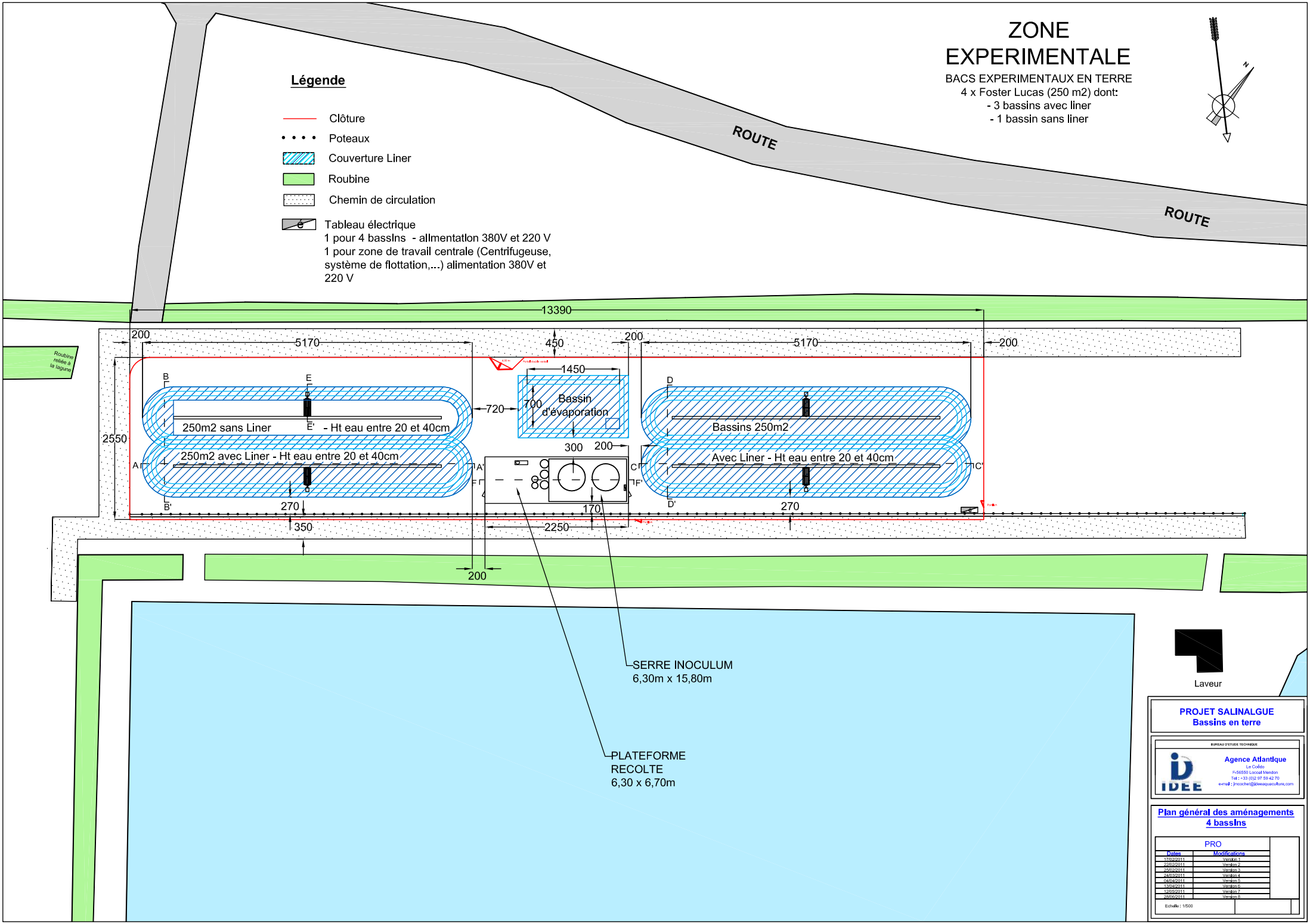

Les Salins de l'île St Martin
à Gruissan
Mer Méditerranée
0 125 250 375 500 Mètres
Légende
ZU Zone Urbanisée
Bâtiment des salins
Canaux
Saline I et Huîtres
Sablière et Piquet
Lac et 38 - 40
Vasières et Saline II
Salin de Reprise
Trait de côte
Route
Mer ou Etang
Pièce Maîtresse 1 à 6
Pièce maîtresse 7 à 12
Pièce maîtresse 13 et 14
Bassin de réserve
Avant pièces
et Tables salantes
Sens d'écoulement
et origine de l'eau
Prise d'eau
LAC
Grazel
Port
Friche
Pièce Mystère
Station 1
Station 2
Station 3
Laveur
Vasière
Bassins SALINALGUE
Someval
Labo
Musée
Restaurant
Camping Municipal
Vignes
Vieux Port
ZU Vieux Village
Ayrolle
Réalisation : R. Lecomte, 2011. Sources : Cliché 2006 Google Earth, E. Toujas

ZONE EXPERIMENTALE

BACS EXPERIMENTAUX EN TERRE
4 x Foster Lucas (250 m2) dont:
- 3 bassins avec liner
- 1 bassin sans liner

Légende

- Clôture
- Poteaux
- Couverture Liner
- Roubine
- Chemin de circulation
- Tableau électrique
  1 pour 4 bassins - alimentation 380V et 220 V
  1 pour zone de travail centrale (Centrifugeuse, système de flottation,...) alimentation 380V et 220 V



PROJET SALINALGUE
Bassins en terre

BUREAU D'ETUDE TECHNIQUE

Agence Atlantique
Le Coëdo
F-56550 Locoal Mendon
Tel : +33 (0)2 97 59 42 70
e-mail : jmocchet@ideeaquaculture.com

Plan général des aménagements
4 bassins

PRO

Dates	Modifications
17/02/2011	Version 1
22/02/2011	Version 2
23/02/2011	Version 3
24/03/2011	Version 4
04/04/2011	Version 5
13/04/2011	Version 6
12/05/2011	Version 7
26/06/2011	Version 8

Echelle : 1/500

Annexe G

Integrity conservation of *D. salina* membrane during centrifugation

Ce poster a été présenté lors de la conférence internationale Alg'n'Chem 2012 (Montpellier, France). Une étude plus complète de la centrifugation est proposée dans ce manuscrit (chapitre 5.2).

Integrity conservation of *Dunaliella salina* membrane during centrifugation

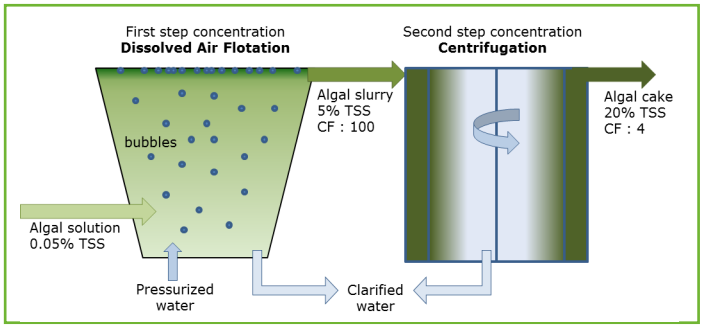
Alexandre Besson, Han Zhang, Pascal Guiraud
Université de Toulouse; INSA,UPS,INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France
INRA, UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France
CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

Context

Microalgae can grow on non-arable land, in non-potable water, with high rate of biomass productivity. Their CO_2 fixation capacity gives them sustainable interest.

Salinalgue project aims production of *Dunaliella salina* in open ponds reactors and biorefining of the algal cake. Biofuels and high value products (β-Carotene, Omega 3,…) are possible valorizations of this hypersaline microalga.

Harvesting steps represent a large part of the global microalgae production cost and require improvements to reach the break-even point of microalgae biofuel. In Salinalgue project, among other solutions, a process combining flotation and centrifugation is examined.



Scientific challenge

Dunaliella salina is a unicellular mobile microalgae which stay in suspension in corrosive brine. Low cell densities can be achieved in open ponds increasing harvesting difficulties. *Dunaliella salina* lacks a rigid polysaccharides cell wall and its elastic plasma membrane is sensitive to shear force. Conventional harvesting methods can cause cell lysis and loss of interesting metabolites.

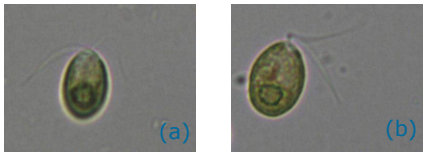
Use a low cost harvesting method, that respects cells integrity, is one of the purposes of Salinalgue project. This work concerns centrifugation and aims to maximize separation while maintaining cells viability during this process.

Membrane integrity conservation during centrifugation is essential to improve shelf-life of algal cake

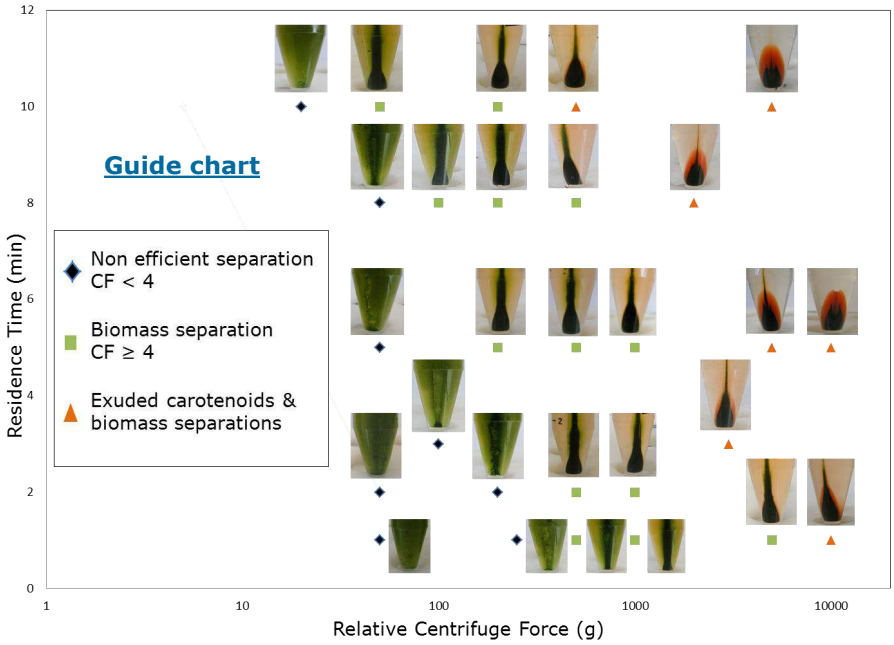
Materials & Methods

This study was achieved in a batch Sigma 6-15 centrifuge with rotor 12170. **Relative centrifuge force** (RCF) and **residence time** (T) were studied. Quadruplicates of each point were realized with 2 cultures of *Dunaliella salina* isolated from Gruissan (Fr) ponds.

Cultures and supernatant concentrations (C_i & C_s) were determined by microscopic examination using haemocytometer (Malassez) and by absorption at 680nm and 800nm. Cells integrity was evaluated by microscopic observation.



Dunaliella salina before (a) and after (b) centrifugation (RCF=10000 & T=10min)



Results

Concentration factor (CF) was used to evaluate harvest efficiency :

$$CF = \frac{C_c}{C_i} = \frac{C_i V_i - C_s V_s}{C_i (V_i - V_s)}$$

C_i & V_i : concentration & volume of initial solution
C_s & V_s : concentration & volume of supernatant
C_c & V_c : concentration & volume of concentrate

Limit of acceptable efficiency was defined as CF≥4. Increase RCF or T maximize biomass separation. For high accelerations a "third orange phase" appears. The **guide chart** is proposed to lead the choice of centrifugation conditions.

The membrane lysis, noticed during continuous centrifugation of *Dunaliella salina*, was not confirmed here. For high RCF, flagella damage were observed but a quick regeneration allows microalgae to recover mobility. Additional tests for RCF=16000g were realized with same results: conservation of membrane integrity and cell viability.

The "third orange phase" could be carotenoids exuded before or during centrifugation.

Conclusion and perspectives

The discharge system of continuous centrifuges could be the principal damage factor of *Dunaliella salina* cells, more than acceleration and residence time in centrifuge.

A progressive centrifuge process could enable at low RCF to recycle *Dunaliella salina* cells in culture ponds, and at higher RCF to separate exuded carotenoids from the supernatant.

Studies to evaluate the presence of free carotenoids in culture medium before centrifugation are necessary to better understand the behavior of cells during centrifugation.

Acknowledgements

This research is supported by FUI (France). Salinalgue collaborators and laboratory technical support are thanked for their help.

Annexe H

Protocole de caractérisation de la flottation dans le flottatest Orchidis

Ce protocole est celui utilisé par l'ensemble des opérateurs impliqués dans cette étude. Selon l'étude, certains paramètres ont tout de même été légèrement modifiés (volumes de solution algale prélevés différents, moins de paramètres référencés dans le tableau de résultats,...), mais le canevas reste identique.

Lors de la caractérisation de flottation non assistée, les étapes 5 à 9 sont retirées et l'agitation dans le flottatest est interrompue avant injection de l'eau pressurisée.

Protocole Flottatest Orchidis

Pour application au LISBP par Alexandre Besson

Chaque paramètre souligné est à renseigner dans le tableau de résultats.

1. Démarrer le spectrophotomètre pour permettre le chauffage des lampes (30 min avant la première mesure). Vérifier que la longueur d'onde est réglée sur 800 nm.

2. Mettre sous pression, dans le flottatest, 3L de milieu de culture à la salinité de la suspension algale traitée. Le manomètre du flottatest doit indiquer 6 bars, si ce n'est pas le cas, il faut régler le détendeur. La mise sous pression doit se faire au moins 15 min avant la première injection d'eau pressurisée dans les échantillons.

3. Prélever 600 mL de suspension algale, et les verser dans un des flottatests, noter l'heure et le PBR dans lequel est réalisé le prélèvement. Répéter l'opération si nécessaire pour les 3 flottatests. Mettre en rotation les agitateurs (40 RPM) et allumer la lumière du flottatest.

4. Prélever en plus dans le PBR un peu de culture afin de déterminer :
   - La température du PBR
   - La DO_{800} initiale (avant récolte)
   - La salinité de culture

5. Étalonner les sondes pH avec les solutions tampons (User 7.01 et user 10.01). Pour ce faire, se référer au protocole proposé. Prendre ensuite la mesure du pH initial des différentes suspensions algales.

6. Préparer les solutions de base à ajouter aux suspensions algales : prélever la quantité de NaOH nécessaire et compléter avec de l'eau permutée jusqu'à 100 ml pour normaliser en volume l'ensemble des essais.

7. Injecter les solutions de bases ainsi préparées dans leur flottatest respectif et noter l'heure d'injection. Attendre la floculation et noter les observations. Procéder au relevé du pH de chaque suspension algale.

8. Arrêter la rotation des agitateurs 2min après l'injection. Noter les observations sur la décantation.

9. 5 min après l'arrêt de l'agitation noter si possible le volume de la phase décantée.

10. Injecter 200 ml d'eau pressurisée simultanément dans les 3 flottatests et noter les observations sur la flottation.

11. 10 minutes après l'injection de l'eau pressurisée, évaluer la hauteur de la phase algale dans les bacs grâce au papier millimétré.

12. Soutirer un échantillon représentatif de la phase traitée, en prenant garde à évacuer le bouchon initial, afin de mesurer la DO_{800} finale.

13. Récupérer la phase flottée pour évaluation éventuelle d'une surconcentration par flottation ou centrifugation et pour caractériser si nécessaire le taux de matière sèche.

14. Entre 2 manipulations, procéder au lavage des flottatests. En fin de journée pour éviter la dégradation du matériel procéder à la vidange du bac de pressurisation. Le remplir d'eau permutée, le remettre sur pression et évacuer l'eau par les électrovannes. Répéter cette séquence une nouvelle fois avec de l'eau permutée.

Annexe I

Modélisation de la précipitation en milieu hypersalin - bases théoriques

Cette annexe vient compléter la section 8.1 de ce manuscrit. Elle rassemble les bases théoriques nécessaires à la compréhension du modèle utilisé. La première partie recense les grandeurs thermodynamiques et les relations fondamentales d'équilibre entre minéraux et solution, nécessaires à l'étude de solutions aqueuses d'électrolytes. Dans la seconde partie, les principales théories menant aux calculs des coefficients d'activité sont exposées. Le propos est rapidement centré sur la théorie de Pitzer et les équations de son modèle d'interaction ionique spécifique sont détaillées.

1. Fondements thermodynamiques des équilibres entre minéraux et solutions

1.1 Relation de Gibbs-Duhem

Les systèmes considérés dans la suite évoluent à température et pression constantes, il est donc judicieux d'introduire la fonction d'état d'enthalpie libre. Pour un système à composition chimique variable, si l'on maintient température et pression constantes, l'addition de dn_i moles du constituant i implique la variation d'enthalpie libre totale du système (G) :

$$dG = \overline{G_i} dn_i \qquad (1)$$

$\overline{G_i}$ est l'enthalpie libre molaire partielle du constituant i et par définition le potentiel chimique du constituant i :

$$\overline{G_i} = (\frac{\delta G}{\delta n_i})_{T,P,n_{j\neq i}} = \mu_i \qquad (2)$$

Le potentiel chimique traduit l'effet global sur l'espèce chimique des interactions microscopiques avec son environnement. Plus le potentiel chimique d'une espèce dans une phase sera important, plus cette espèce aura tendance à quitter cette phase pour une autre phase où son potentiel chimique sera plus faible ou plus cette espèce aura tendance à disparaître par réaction chimique.

La différentielle totale de la fonction d'état G est exacte. À T et P constantes, elle s'écrit donc pour plusieurs compositions variables :

$$dG = \sum_i \mu_i \, dn_i \qquad (3)$$

G étant une fonction d'état extensive on obtient l'identité d'Euler :

$$G = \sum_i \mu_i \, n_i \qquad (4)$$

Et par conséquent :

$$dG = \sum_i d(\mu_i \, n_i) = \sum_i d\mu_i \, n_i + \sum_i \mu_i \, dn_i = \sum_i \mu_i \, dn_i \qquad (5)$$

S'en suit donc la relation de Gibbs-Duhem :

$$\sum_i d\mu_i \, n_i = 0 \qquad (6)$$

Cette relation exprime une condition restrictive, nécessairement vérifiée par les variations des potentiels chimiques des divers constituants d'un mélange à T et P constantes. Elle est utile en particulier pour les mélanges binaires (à T et P constantes, n1dμ1 + n2dμ2 = 0 ; si on peut connaître μ1, par diverses méthodes, on peut par intégration calculer μ2).

1.2 Solutions aqueuses idéales

Une solution est dite idéale si le potentiel chimique de chacun de ses constituants est de la forme :

$$\mu_i = \mu_i^{\circ} + RT\ ln(x_i) \qquad (7)$$

Avec, μ_i° le potentiel standard du constituant i pour une fraction molaire $x_i = 1$ (dépendant de l'échelle des concentrations choisie) ; R la constante des gaz parfaits (R=1,98716 cal.mol^{-1}.K^{-1}) ; T la température absolue (en K).

D'après l'identité d'Euler :

$$G = \sum_i \mu_i\, n_i = \sum_i \mu_i^{\circ}\, n_i + RT \sum_i n_i ln x_i \qquad (8)$$

Le premier terme représente l'enthalpie libre totale des constituants non mélangés et le second l'enthalpie libre de mélange idéal.

1.3 Solutions aqueuses non idéales

Dans une solution aqueuse réelle, les effets chimiques (association, dissociation et solvatation) et physiques (influence de la variation des volumes molaires et des forces d'interaction) fonctions de la concentration des composés en solution induisent des écarts par rapport à l'idéalité. Il est tout de même possible d'écrire des équations analogues aux solutions idéales en remplaçant les concentrations par des activités :

$$\mu_i = \mu_i^{\circ} + RT\ ln a_i \qquad (9)$$

a_i est l'activité du constituant i. Il s'agit de la concentration fictive pour laquelle la solution aurait les mêmes propriétés thermodynamiques que la solution idéale dans les mêmes conditions de température, pression et compositions.

La relation entre la concentration et l'activité est exprimée par le coefficient d'activité. Sous Phreeqc (logiciel libre utilisé dans cette étude), la molalité est choisie comme échelle de concentration. Soit le coefficient d'activité molal qui décrit l'écart qui existe entre le potentiel chimique de l'espèce dans la solution réelle et celui dans une solution idéale :

$$\gamma_i = \frac{a_i}{m_i} \qquad (10)$$

Soit un électrolyte $A_{\nu_-}B_{\nu_+}$ qui se dissocie en ν_- anions et ν_+ cations. Son potentiel chimique est alors défini par la somme des potentiels chimiques des anions et cations qui le constituent :

$$\mu = \nu_-\mu_- + \nu_+\mu_+ \quad (11)$$

Dans une solution idéale et dans l'échelle des molalités, on a vu que les potentiels chimiques des ions s'exprimaient sous la forme :

$$\mu_+ = \mu_+^\circ + RT\ ln(m_+) \quad (12)$$

$$\mu_- = \mu_-^\circ + RT\ ln(m_-) \quad (13)$$

Avec μ° le potentiel chimique standard de l'électrolyte on arrive à :

$$\mu = \mu^\circ + RT\ \ln(m_-^{\nu_-}.m_+^{\nu_+}) \quad (14)$$

Soit pour une solution non idéale :

$$\mu = \mu^\circ + RT\ \ln\left(a_-^{\nu_-}a_+^{\nu_+}\right) = \mu^\circ + RT\ \ln((\gamma_-m_-)^{\nu_-}(\gamma_+m_+)^{\nu_+}) \quad (15)$$

L'activité a et le coefficient d'activité γ de l'électrolyte sont alors définis par :

$$a = a_-^{\nu_-}.a_+^{\nu_+} \quad (16)$$

$$\gamma = \gamma_-^{\nu_-}.\gamma_+^{\nu_+} \quad (17)$$

On définit également l'activité ionique moyenne $a_\pm$ et le coefficient d'activité moyen des ions :

$$a_\pm = (a_-^{\nu_-}.a_+^{\nu_+})^{1/\nu} \quad (18)$$

$$\gamma_\pm = (\gamma_-^{\nu_-}.\gamma_+^{\nu_+})^{1/\nu} \quad (19)$$

Avec :

$$\nu = \nu_+ + \nu_- \quad (20)$$

Le potentiel chimique d'un solvant s'exprime lui :

$$\mu_S = \mu_S^\circ + RT\ lna_S \quad (21)$$

μ_S° est le potentiel chimique standard du solvant

L'activité a_S d'un solvant de masse molaire M_S peut être exprimée en fonction d'un coefficient osmotique molal φ :

$$\varphi = -\frac{1000.\,lna_s}{M_S.\sum_i m_i} = -\frac{n_S}{\sum_i n_i} lna_S \qquad (22)$$

n_S est le nombre de moles de solvant et les sommes sont relatives aux solutés.

1.4 Enthalpies libres de mélange

Dans l'échelle des molalités, l'enthalpie libre d'une phase aqueuse contenant i solutés dans un solvant S a pour expression :

$$G = \sum_i \mu_i\, n_i + \mu_S n_S \qquad (23)$$

$$G = \sum_i \mu_i^{\circ}\, n_i + RT\left(\sum_i n_i lnm_i + \sum_i n_i ln\gamma_i\right) + \mu_S^{\circ} n_S + RTn_S lna_S \qquad (24)$$

Or :

$$n_S lna_S = -\varphi \sum_i n_i \qquad (25)$$

On obtient donc :

$$G = \sum_i \mu_i^{\circ}\, n_i + \mu_S^{\circ} n_S + RT\left(\sum_i n_i ln(m_i) + \sum_i n_i ln\gamma_i - \varphi \sum_i n_i\right) \qquad (26)$$

Dans un mélange idéal ($\gamma_i = 1$ pour tout i et $\varphi = 1$) on a donc :

$$G_{ideal} = \sum_i \mu_i^{\circ}\, n_i + \mu_S^{\circ} n_S + RT\left(\sum_i n_i ln(m_i) - \sum_i n_i\right) \qquad (27)$$

On définit ici une enthalpie libre d'excès de mélange :

$$G_{excès} = G - G_{ideal} \qquad (28)$$

$$G_{excès} = RT \sum_i n_i ln\gamma_i + RT(1-\varphi) \sum_i n_i \qquad (29)$$

À partir de cette expression, de la définition du potentiel chimique et en appliquant la relation de Gibbs-Duhem, on montre que $G_{excès}$ est liée au coefficient d'activité et au coefficient osmotique par les équations suivantes :

$$\frac{\partial G_{excès}}{\partial n_i} = RTln\gamma_i \tag{30}$$

$$\frac{\partial G_{excès}}{\partial n_S} = RT\frac{\sum n_i}{n_S}(1-\varphi) \tag{31}$$

1.5 Réactions chimiques et équilibres

Soit le système dans lequel se produit une réaction du type :

$$\nu_A A + \nu_B B + \cdots \leftrightarrows \nu_C C + \nu_D D + \cdots \tag{32}$$

Avec ν_i les coefficients stœchiométriques de la réaction. Si dn_i est la variation du nombre de moles de i, on a :

$$d\xi = \frac{dn_i}{\nu_i} \tag{33}$$

ξ est le degré d'avancement de la réaction, il est négatif pour les réactifs et positif pour les produits. La variation d'enthalpie libre de la réaction peut donc s'écrire :

$$dG = \sum_i \mu_i\, dn_i = \sum_i \mu_i\, \nu_i d\xi \tag{34}$$

La variation d'enthalpie libre de la réaction (ΔG_R) s'exprime donc :

$$\Delta G_R = \frac{dG}{d\xi} = \sum_i \mu_i\, \nu_i \tag{35}$$

$$\Delta G_R = \sum_i \nu_i \mu_i^{\circ} + RTln\prod_i a_i^{\nu_i} = \Delta G_R^{\circ} + RTlnQ \tag{36}$$

Avec ΔG_R° l'enthalpie libre standard de la réaction et Q le produit d'activité ionique relatif à cette réaction. À pression et température fixées, l'enthalpie libre d'une réaction tend à diminuer jusqu'à atteindre son minimum à l'équilibre. On aura donc à l'équilibre :

$$\Delta G_R = \frac{dG}{d\xi} = 0 \tag{37}$$

À l'équilibre, le produit d'activité ionique définit alors une constante d'équilibre telle que :

$$\Delta G_R^{\circ} = -RTlnK \tag{38}$$

On a donc la relation générale suivante :

$$\Delta G_R = RTln\frac{Q}{K} \quad (39)$$

Dans le cas des réactions de précipitation (ou dissolution), au centre de cette étude, la constante d'équilibre est appelée produit de solubilité et le rapport Q/K mesure l'état de saturation de la solution vis-à-vis du minéral.

Si Q<K ($\Delta G_R < 0$) la solution est sous saturée, si Q=K ($\Delta G_R = 0$) la solution et le minéral sont en équilibre et si Q>K ($\Delta G_R > 0$) la solution est sursaturée vis-à-vis du minéral considéré.

2. *Coefficients d'activité dans les solutions aqueuses d'électrolytes*

La théorie de Debye-Hückel tient compte uniquement des interactions ioniques électrostatiques. Dans des solutions diluées, l'écart à l'idéalité est dû essentiellement à ces dernières, c'est pourquoi la théorie de Debye-Hückel donne des résultats satisfaisants. Plus l'on concentre les solutions plus l'impact des interactions ioniques à courte distance se fait sentir et plus les comportements des solutions s'éloignent de celui décrit par la théorie de Debye-Hückel. Pour évaluer cette déviation, deux types de modèles sont proposés, l'association ionique et l'interaction ionique spécifique.

2.1 Théorie de Debye-Hückel

Cette théorie est basée sur l'hypothèse que chaque ion est entouré d'un nuage sphérique composé d'ions de charge opposée. Comme avancé ci-dessus, le calcul des coefficients d'activité des espèces aqueuses prend en compte uniquement les interactions électrostatiques, à grande distance, entre les ions en solution. Les interactions de Van der Waals sont par exemple négligées.

L'expression la plus souvent proposée pour le calcul des coefficients d'activité (échelle des molalités), à partir de la théorie de Debye-Hückel, s'écrit comme suit :

$$\ln \gamma_d = -\frac{A\, z_d^2 \sqrt{I}}{1 + B\, \mathring{a}_d \sqrt{I}} \qquad (40)$$

Avec : z_d : Charge de l'ion d

A, B : Constantes fonction de la température

$\mathring{a}_d$: «Distance minimale d'approche » des autres ions autour de d, paramètre d'ajustement relié au rayon ionique de d en solution

I : Force ionique totale de la solution qui s'exprime dans l'échelle des molalités m_i sous la forme :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i\, z_i^2 \qquad (41)$$

Cette formule de Debye-Hückel donne une bonne évaluation des coefficients d'activité pour des forces ioniques inférieures à 0,01 (Whitfield 1979).

Plusieurs extensions de la théorie de Debye-Hückel, par ajout de termes linéaires ou polynomiaux en I à l'expression du coefficient d'activité, permettent d'élargir le domaine de validité de cette théorie. Le formule suivante, issue d'un modèle de Debye-Hückel étendu, donne par exemple une bonne évaluation des coefficients d'activité de systèmes binaires pour des forces ioniques allant jusqu'à 1 (Robinson & Stokes 1970) :

$$\ln \gamma_r = -\frac{A\ \sqrt{I}}{1 + B\ a_r\ \sqrt{I}} + \dot{B}_r \qquad (42)$$

A et B étant les constantes de Debye-Hückel, a_r et $\dot{B}_r$ des paramètres spécifiques à l'ion r.

Ces expressions étendues qui ne présentent pas vraiment de fondement théorique ne sont pas satisfaisantes pour décrire des systèmes aussi complexes et concentrés que des eaux de salins. D'autres modèles sont proposés dans cette optique.

2.2 Modèle d'association ionique

Le modèle d'association ionique se limite aux solutions dont la force ionique ne dépasse pas celle de l'eau de mer (I = 0,7). Son extension aux solutions concentrées est limitée entre autres par la non prise en compte des interactions ioniques entre ions de même signe et de la formation de triplets d'ions.

Ce modèle ne peut satisfaire à une étude portant sur les eaux hypersalines dans lesquelles *Dunaliella salina* est cultivée. L'utilisation de bases de données issues de modèles d'association ionique (comme WATEQ, EQUIL, SOLMNEQ, ...) est donc proscrite pour des solutions de forces ioniques supérieures à 0,7.

2.3 Modèle d'interaction ionique spécifique (SIT)

La théorie d'interaction ionique spécifique (SIT theory) est utilisée pour estimer des coefficients d'activité dans des solutions électrolytiques fortement concentrées. Elle a été proposée par Brönsted (Brönsted 1922) et développée par Guggenheim (Guggenheim 1935; Guggenheim & Turgeon 1955). Cette théorie, applicable dans un premier temps aux solutions diluées, a ensuite été étendue par d'autres auteurs pour permettre de prendre en compte des solutions de forces ioniques plus importantes (Scatchard 1936; Pitzer 1973).

La théorie des modèles d'interaction ionique spécifique est fondée sur une expansion de viriel du coefficient d'activité ou de l'enthalpie libre d'excès de mélange. Par ce biais, la SIT tient compte des différences spécifiques entre les électrolytes de même charge présents en solution. Les formules issues de cette théorie contiennent des paramètres $\beta_{R,X}$ appelés « coefficients d'interaction » pour chaque combinaison de cation R et d'anion X. La SIT permet de déduire les propriétés thermodynamiques d'électrolytes mixtes à partir de celles d'électrolytes simples. En effet, la valeur de chaque coefficient d'interaction $\beta_{R,X}$ est déterminée expérimentalement sur une solution contenant uniquement des ions R et X et réutilisée lorsque ces mêmes ions se trouvent en solution plus complexes. Les valeurs de ces coefficients sont d'ailleurs documentées pour certaines températures.

Pour cette théorie le coefficient d'activité de l'ion peut s'exprimer comme suit (échelle des molalités) :

$$\ln \gamma_s = -\frac{0{,}51\, z_s^2 \sqrt{I}}{1 + 1{,}5\sqrt{I}} + \sum_k \beta_{s,k} m_k \qquad (43)$$

Avec : z_s : Charge de l'ion s
I : Force ionique totale de la solution
$\beta_{s,k}$: coefficients d'interaction entre l'ion s et l'ion k en solution
m_k : molalités de l'ion k en solution

Le premier terme découle de la théorie de Debye-Hückel et le second montre que les contributions de chaque interaction sont dépendantes des concentrations de chaque ion.

Initialement, le modèle d'interaction spécifique proposé par Bronsted-Guggenheim ne considérait qu'un terme supplémentaire à celui de Debye-Hückel. Les coefficients de ces seconds termes étant constants et déterminés expérimentalement pour chaque paire d'ions de charge opposée.

Pour élargir le domaine de validité de cette théorie, Scatchard a proposé de faire varier ces coefficients avec la force ionique (Scatchard 1936) ce qui fut réalisé par McMillan-Mayer et Friedman pour des solutions de plusieurs électrolytes (McMillan Jr & Mayer 1945; Friedman 1962). Ce modèle fut testé pour de l'eau de mer et montra des résultats satisfaisants jusqu'à des forces ioniques de 4 mol.L^{-1} (Whitfield 1973; Whitfield 1975).

Dans le même temps, Scatchard et Pitzer ont proposé des théories semi-empiriques, incluant des termes supplémentaires nécessaires pour traiter de plus fortes concentrations en électrolytes (Scatchard 1968; Scatchard et al. 1970; Pitzer 1973). Pour des forces ioniques importantes, ces derniers auteurs ont montré qu'il était aussi nécessaire de tenir compte des interactions entre ions de même charge. Pitzer a rajouté pour ceci dans son modèle un autre coefficient dont l'importance ne devient significative qu'à force ionique importante. Scatchard a rajouté encore un terme supplémentaire mais des études suivantes ont montré que le modèle de Pitzer suffisait à décrire correctement des solutions complexes très concentrées (Harvie & Weare 1980). Le modèle de Pitzer est détaillé ci-dessous.

2.4 Équations de Pitzer

Le modèle d'interaction ionique spécifique basé sur les équations de Pitzer est utilisé notamment pour décrire le comportement des ions dissous dans des eaux naturelles (lacs, rivière, mer). Il permet en effet de décrire les propriétés thermodynamiques des solutions hypersalines sur une large gamme de force ionique.

Le modèle SIT de Pitzer est basé sur l'expression de viriel donnée au terme d'enthalpie libre d'excès de mélange d'une solution. Pour une solution contenant n_w kg d'eau et des molalités m_i, m_j, m_k en solutés i, j, k, on a l'équation suivante :

$$\frac{G_{excès}}{n_w RT} = f(I) + \sum_i \sum_j \lambda_{ij}(I) m_i m_j + \sum_i \sum_j \sum_k \mu_{ijk} m_i m_j m_k \qquad (44)$$

On retrouve une fonction f(I), fonction uniquement de la force ionique, de type Debye-Hückel qui traduit l'effet des forces électrostatiques. Les interactions à courte distance sont prises en compte par les deux autres termes du viriel. Les coefficients λ_{ij} sont fonction de la force ionique et permettent la prise en compte des interactions binaires. Les coefficients μ_{ijk} sont eux indépendants de la force ionique, ils tiennent compte des interactions ternaires et sont nuls si i, j et k sont tous des cations ou tous des anions.

En dérivant l'équation précédente par rapport au nombre de moles de chaque composé on obtient les expressions des coefficients d'activité et osmotique :

$$\begin{aligned} ln\gamma_i = \frac{\delta G_{excès}}{RT\delta n_i} = \frac{z_i^2}{2} f' + 2\sum_j \lambda_{ij} m_j + \frac{z_i^2}{2} \sum_j \sum_k \lambda'_{jk} m_j m_k \\ + 3\sum_j \sum_k \mu_{ijk} m_j m_k \end{aligned} \qquad (45)$$

$$\begin{aligned} \varphi - 1 &= -\frac{\delta G_{excès}/\delta n_W}{RT \sum_i m_i} \\ &= \frac{(If' - f) + \sum_i \sum_j (\lambda_{ij} + I\lambda'_{ij}) m_i m_j + 2\sum_i \sum_j \sum_k \mu_{ijk} m_i m_j m_k}{\sum_i m_i} \end{aligned} \qquad (46)$$

Avec : $f' = \frac{df}{dI}$ et $\lambda'_{jk} = \frac{d\lambda_{jk}}{dI}$

Les coefficients λ et μ sont symétriques mais ne sont pas mesurables directement. Il est possible de déterminer expérimentalement des combinaisons de sommes de ces paramètres. On introduit ici les paramètres B et φ qui représentent des combinaisons mesurables du coefficient λ et des coefficients C et ψ pour μ. En utilisant ces paramètres, qui seront définis plus bas, il est alors possible de réécrire les relations donnant le coefficient osmotique de l'eau et les coefficients d'activité des cations (γ_M) et d'un anion (γ_X) :

$$\begin{aligned} ln\gamma_M = z_M^2 . F + \sum_a m_a (2B_{Ma} + ZC_{Ma}) \\ + \sum_c m_c \left(2\varphi_{Mc} + \sum_a m_a \psi_{Mca} \right) \\ + \sum_{a<a'} \sum m_a m_a{}' \psi_{aa'M} + |z_M| \sum_c \sum_a m_c m_a C_{ca} \end{aligned} \qquad (47)$$

$$ln\gamma_X = z_X^2 F + \sum_c m_c(2B_{cX} + ZC_{cX}) + \sum_a m_a\left(2\varphi_{Xa} + \sum_c m_c\psi_{Xac}\right) + \sum_{c<c'}\sum m_c m_c{}'\psi_{cc'X} + |z_X|\sum_c\sum_a m_c m_a C_{ca} \quad (48)$$

$$\varphi - 1 = \frac{2}{\sum_i m_i}\left\{-\frac{A^\varphi I\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} + \sum_c\sum_a m_c m_a\left(B_{ca}^\varphi + ZC_{ca}\right) + \sum_{c<c'}\sum m_c m_{c'}\left(\varphi_{cc'}^\varphi + \sum_a m_a\psi_{cc'a}\right) + \sum_{a<a'}\sum m_a m_{a'}\left(\varphi_{aa'}^\varphi + \sum_c m_c\psi_{aa'c}\right)\right\} \quad (49)$$

Dans ces équations, m_c est la molalité du cation c de charge z_M. Les symboles M, c, c' réfèrent aux cations et X, a, a' aux anions. La sommation d'indice c, désigne la somme tenant compte de tous les cations du système. La double sommation $c < c'$ désigne la somme sur toutes les paires distinctes de cations différents.

La fonction F ci-dessus introduite est définie par :

$$F = -A^\varphi\left[\frac{\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} + \frac{2}{b}ln\left(1+b\sqrt{I}\right)\right] + \sum_c\sum_a m_c m_a B'_{ca} + \sum_{c<c'}\sum m_c m_{c'}\varphi'_{cc'} + \sum_{a<a'}\sum m_a m_{a'}\varphi'_{aa'} \quad (50)$$

La base de données disponible sous Phreeqc pour le modèle de Pitzer n'est valable que pour une température de 25°C. À cette température : $A^\varphi = 0.392$ et b=1,2 pour tous les électrolytes.

Les paramètres B peuvent être exprimés en fonction de la force ionique et des paramètres β spécifiques de chaque sel et déterminés à partir des électrolytes purs :

$$B_{MX} = \beta_{MX}^{(0)} + \beta_{MX}^{(1)}g\left(\alpha_1\sqrt{I}\right) + \beta_{MX}^{(2)}g\left(\alpha_2\sqrt{I}\right) \quad (51)$$

$$B'_{MX} = \beta_{MX}^{(1)}g'\frac{\left(\alpha_1\sqrt{I}\right)}{I} + \beta_{MX}^{(2)}g'\frac{\left(\alpha_2\sqrt{I}\right)}{I} \quad (52)$$

$$B_{MX}^\varphi = \beta_{MX}^{(0)} + \beta_{MX}^{(1)}\exp\left(-\alpha_1\sqrt{I}\right) + \beta_{MX}^{(2)}exp(-\alpha_2\sqrt{I}) \quad (53)$$

Les fonctions g et g' étant données par :

$$g(x) = \frac{2[1-(1+x)\exp(-x)]}{x^2} \quad (54)$$

$$g'(x) = \frac{-2[1-(1+x+0.5x^2)\exp(-x)]}{x^2} \quad (55)$$

Avec x=$\alpha\sqrt{I}$.

Les valeurs de α dépendent de la nature de l'électrolyte. Pour les électrolytes de types 1-1 et 1-2, Pitzer a évalué de manière empirique, $\alpha_1 = 2$ et $\alpha_2 = 0$. Pour des électrolytes de valence supérieure, $\alpha_1 = 1{,}4$ et $\alpha_2 = 12{,}0$ (Pitzer & Mayorga 1973; Pitzer & Mayorga 1974).

Il faut noter que si l'on ne tient compte que des paramètres de Debye-Hückel et des coefficients B, le modèle de Pitzer se ramène à un modèle SIT avec des coefficients de second viriel fonctions de la force ionique. Il a été vu plus haut que cette forme était satisfaisante jusqu'à des forces ioniques de 4M.

Pour élargir le modèle, il faut tenir compte également des coefficients de troisième viriel C, caractéristiques comme B des électrolytes simples, ainsi que des coefficients φ et ψ caractéristiques des électrolytes mixtes. Les coefficients C sont considérés indépendants de la force ionique. Les paramètres C_{MX} sont reliés aux paramètres tabulés C_{MX}^{φ} (Pitzer & Mayorga 1973) par :

$$C_{MX} = \frac{C_{MX}^{\varphi}}{2}\sqrt{|z_M z_X|} \quad (56)$$

Certains termes contenant les coefficients C sont dépendants de la concentration, on introduit alors la fonction Z :

$$Z = \sum_i m_i |z_i| \quad (57)$$

Les coefficients φ et ψ sont des paramètres de mélange déduits des données relatives aux systèmes binaires. Le premier est relatif aux interactions entre 2 ions de même signe et le second tient compte des interactions entre une paire d'anions ou de cations et un autre ion de signe opposé. Les coefficients φ sont donnés par :

$$\varphi_{ij} = \theta_{ij} + {}^{E}\theta_{ij}(I) \quad (58)$$

$$\varphi'_{ij} = {}^{E}\theta'_{ij}(I) \quad (59)$$

$$\varphi_{ij}^{\varphi} = \theta_{ij} + {}^{E}\theta_{ij}(I) + I\,{}^{E}\theta'_{ij}(I) \quad (60)$$

Les paramètres θ_{ij} sont des paramètres d'ajustement pour chaque paire d'anions ou de cations.

Les termes ${}^{E}\theta_{ij}(I)$ et ${}^{E}\theta'_{ij}(I)$ représentent les effets électrostatiques sur les mélanges asymétriques et sont dépendants des charges des ions et de la force ionique. Ces deux termes sont nuls lorsque les ions i et j sont de même charge ($z_i = z_j$). Sinon, ils sont évalués grâce aux équations suivantes (Pitzer 1975) :

$$^{E}\theta_{ij}(I) = \frac{z_i z_j}{4I}\left(J_0(x_{ij}) - 0{,}5J_0(x_{ii}) - 0{,}5J_0(x_{jj})\right) \quad (61)$$

$$^{E}\theta'_{ij}(I) = \frac{z_i z_j}{8I^2}\left(x_{ij}J_1(x_{ij}) - x_{ii}0{,}5J_1(x_{ii}) - x_{jj}0{,}5J_1(x_{jj})\right) - \frac{^{E}\theta_{ij}(I)}{I} \quad (62)$$

Avec :

$$x_{ij} = 6z_i z_j A^{\varphi}\sqrt{I} \quad (63)$$

J_0 et J_1 sont des fonctions complexes de la force ionique qui nécessitent une résolution numérique. Pitzer en propose les approximations suivantes (Pitzer 1975) :

$$J_0(x) = x[4 + c_1 x^{-c_2}\exp(-c_3 x^{c_4}]^{-1} \quad (64)$$

$$J_1(x) = \frac{dJ_0(x)}{dx} \quad (65)$$

Avec $c_1 = 4{,}581$; $c_2 = 0{,}7237$; $c_3 = 0{,}012$; $c_4 = 0{,}528$

L'intégration de ces paramètres traduisant des effets électrostatiques sur les mélanges asymétriques améliore l'efficacité du modèle de Pitzer sur des systèmes proches des eaux de salins (Harvie & Weare 1980).

Les paramètres ψ_{ijk} sont tabulés. Ils sont utilisés quand i et j sont des anions différents et que k est un cation ou quand i et j sont des cations différents et que k est un anion. Ils ne dépendent pas des concentrations.

Le modèle d'interaction ionique spécifique basé sur les équations de Pitzer sera retenu dans la suite de l'étude. Il sera mis en œuvre sous Phreeqc.

Références bibliographiques spécifiques

Bronsted, J.N., 1922. Studies on solubility. IV. the principle of the specific interaction of ions. *Journal of the American Chemical Society*, 44(5), p.877‑898.

Friedman, H.L., 1962. *Ionic Solution Theory: based on Cluster expansion methods*, Interscience Publishers.

Guggenheim, E.A., 1935. L. The specific thermodynamic properties of aqueous solutions of strong electrolytes. *Philosophical Magazine Series 7*, 19(127), p.588‑643.

Guggenheim, E.A. & Turgeon, J.C., 1955. Specific interaction of ions. *Transactions of the Faraday Society*, 51(0), p.747‑761.

Harvie, C.E. & Weare, J.H., 1980. The prediction of mineral solubilities in natural waters: the Na-K-Mg-Ca-Cl-SO4-H2O system from zero to high concentration at 25° C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44(7), p.981‑997.

McMillan Jr, W.G. & Mayer, J.E., 1945. The statistical thermodynamics of multicomponent systems. *The Journal of Chemical Physics*, 13, p.276.

Pitzer, K.S., 1973. Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(2), p.268‑277.

Pitzer, K.S., 1975. Thermodynamics of electrolytes. V. Effects of higher-order electrostatic terms. *Journal of Solution Chemistry*, 4(3), p.249–265.

Pitzer, K.S. & Mayorga, G., 1973. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(19), p.2300–2308.

Pitzer, K.S. & Mayorga, G., 1974. Thermodynamics of electrolytes. III. Activity and osmotic coefficients for 2–2 electrolytes. *Journal of Solution Chemistry*, 3(7), p.539–546.

Robinson, R.R.A. & Stokes, R.R.H., 1970. *Electrolyte Solutions*, Courier Dover Publications.

Scatchard, G., 1936. Concentrated Solutions of Strong Electrolytes. *Chemical Reviews*, 19(3), p.309‑327.

Scatchard, G., 1968. Excess free energy and related properties of solutions containing electrolytes. *Journal of the American Chemical Society*, 90(12), p.3124–3127.

Scatchard, G., Rush, R.M. & Johnson Jr, J.S., 1970. Osmotic and activity coefficients for binary mixtures of sodium chloride, sodium sulfate, magnesium sulfate, and magnesium chloride in water at 25. deg.. III. Treatment with the ions as components. *The Journal of Physical Chemistry*, 74(21), p.3786–3796.

Whitfield, M., 1973. A chemical model for the major electrolyte component of seawater based on the Brønsted-Guggenheim hypothesis. *Marine Chemistry*, 1(4), p.251–266.

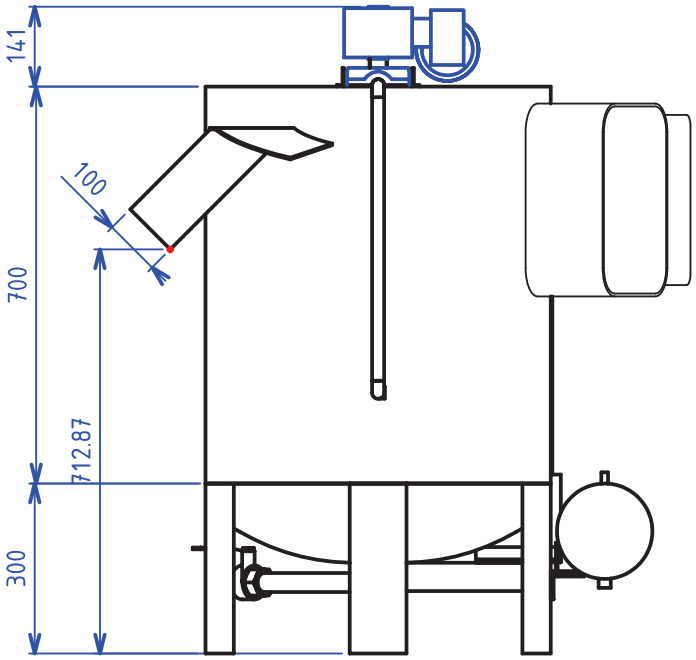
Whitfield, M., 1979. Activity coefficients in natural waters. *Activity coefficients in electrolyte solutions*, 2, p.153–299.

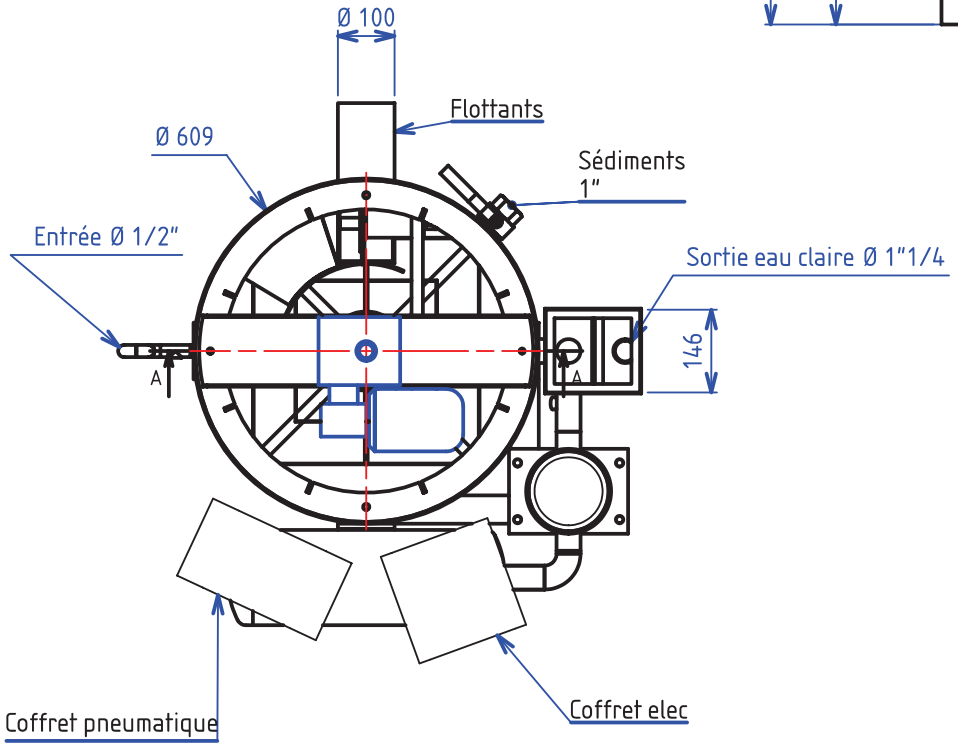
Whitfield, M., 1975. An improved specific interaction model for seawater at 25 C and 1 atmosphere total pressure. *Marine chemistry*, 3(3), p.197–213.

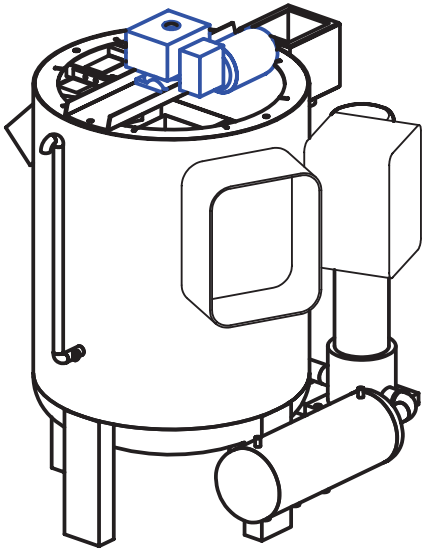
Annexe J

Plan du flottateur CY1 avant et après modifications

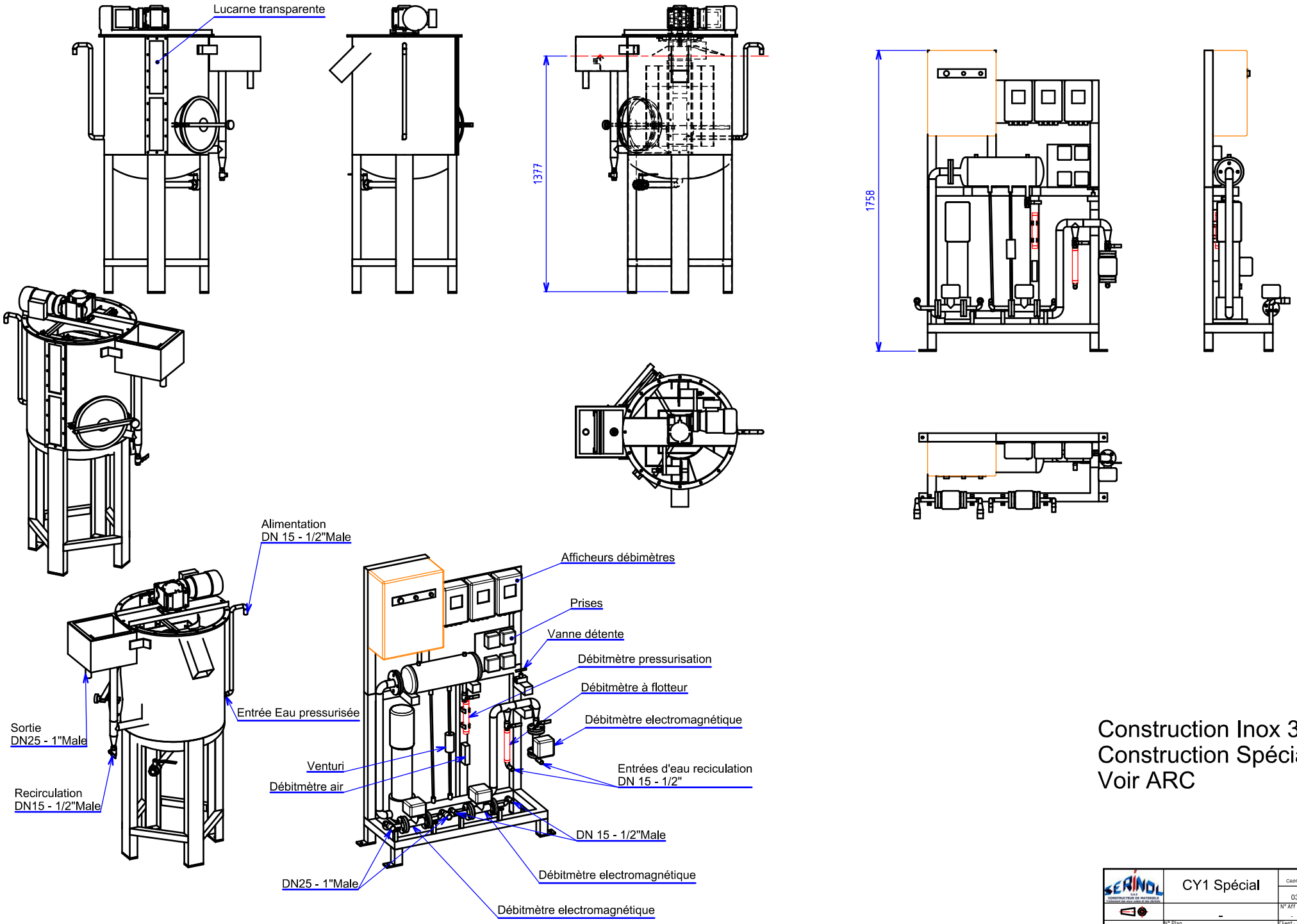
Les plans de la première page représentent le flottateur $CY1$ produit industriellement par l'entreprise Sérinol. Sur la seconde page, on trouve les plans du pilote de flottation développé en collaboration avec Sérinol, pour les besoins de cette étude.


141
100
700
712.87
300


Ø 100
Flottants
Ø 609
Sédiments
1"
Entrée Ø 1/2"
Sortie eau claire Ø 1"1/4
146
A
A
Coffret pneumatique
Coffret elec



Pilote CY 1



Construction Inox 316L
Construction Spéciale
Voir ARC

SERINOL SAS CONSTRUCTEUR DE MATERIELS	CY1 Spécial	AUTEUR Cédric DUMONTIER	
		DATE 03/08/2011	
	-	N° Aff -	ECHELLE 1:10
A1	N° Plan 12688-01	Client INSA	00

Annexe K

Characterization of bubbles produced by dissolved air flotation in saline water

Durant cette étude, une méthode de caractérisation de la taille des bulles produites par DAF a été développée. Le principe de la méthode et les résultats obtenus sur le pilote $CY1$ ont été présentés oralement lors de la 6e conférence internationale IWA sur la flottation dans le secteur du traitement des eaux (New-York, octobre 2012). Cette annexe est le résumé de l'étude présentée lors de cette conférence. Certaines figures ont été déplacées dans le corps du manuscrit.

In Dissolved Air Flotation (DAF) process, particles capture efficiency is a function of bubble size among other parameters. Reducing the bubble size increases the capture efficiency and, as a consequence, decreases capital and operating costs. The size of bubbles, in steady state, has been measured in the past for pure water to 10 – 100 µm with an average bubble diameter at 40 µm (Edzwald, 1995). This size slightly depends upon the pressure applied to dissolve the air into the liquid. It decreases when increasing the pressure, but in a limited range. Indeed, above 500 kPa increasing the pressure has a small effect on bubble size (Heinanen *et al.*, 1992; De Rijk *et al.*, 1994). Injection flow rate of pressurized water influences also the bubble size distribution.

For several DAF applications, like treatment of industrial waters and harvesting of seawater or hypersaline microalgae, the knowledge of the bubble size distribution in saline waters is essential to predict the capture efficiency of particles in suspension. In this study a new method to evaluate the size distribution of bubbles is proposed. This method is based on in-situ light scattering with a Malvern Spraytech™ apparatus.

This study is part of a research project which aims to harvest *Dunaliella salina*, a hypersaline alga, by DAF. The scientific literature is mainly concerned with waters whose salinities are limited to those found in the sea. No data are available for water with salinity higher than seawater, in which this alga grows. As the knowledge of physical properties of water is essential to understand the phenomenon of bubble formation, it is therefore necessary to extend the evaluation of water physical properties to wider ranges of salinity. The results begin with these measurements.

K.1 Properties of hypersaline waters

K.1.1 Saline water solutions

In this study, NaCl is dissolved in tap water to prepare a range of saline water solutions with concentrations from 0 to 265 $g.L^{-1}$. For this preliminary study of concentrated seawater (like waters in the saltmarshes where grow the algae *Dunaliella salina*), no other salt has been dissolved. A heated bath is used to maintain the temperature of solutions to the desired values during the experiments.

K.1.2 Refractive indices

To apply light scattering sizing technique, it is necessary to evaluated the refractive index (n) which depends upon NaCl concentration, temperature, pressure and wavelength (Copin-Montegut, 2002). Refractive index can be evaluated optically in various ways. In this study, Abbe refractometer is used to determine the relationship between n and NaCl concentration (in $g.L^{-1}$) at 23.5 °C, atmospheric pressure and for solar spectrum (figure K.1).

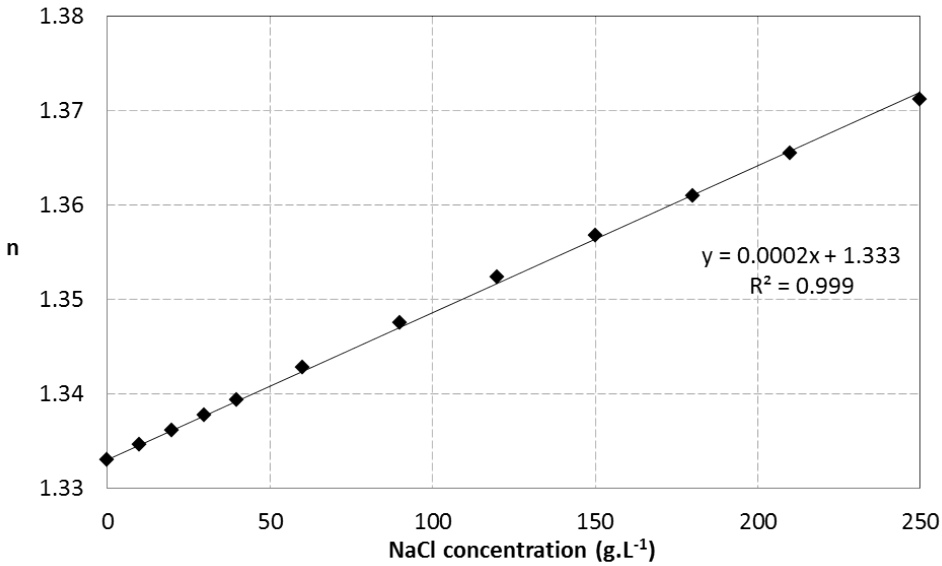


Figure K.1 – *Refractive indices at* $23.5°C$ *as a function of NaCl concentration in water*

The refractive index (n) has been found to increases linearly with C_{NaCl} as :

$$n = 0.0002 \cdot C_{NaCl} + 1.333 \tag{K.1}$$

From pure to seawater, a relationship between the refractive index and the total salinity is given by Seaver-Millard equations (Millard & Seaver, 1990). Results obtained here for a wider salinity range are in agreement with values obtained with Seaver-Millard algorithm for concentrations of NaCl from 0 to 40 $g.L^{-1}$.

K.1.3 Density

The density (ρ) of saline water depends upon temperature, pressure and salinity. For seawater, the density can be evaluated with the International thermodynamic equation of seawater. However, no data are available for hypersaline waters.

In this study, a pycnometer is used to determine the relationship between density of waters (in $kg.L^{-1}$) and their NaCl concentration (C_{NaCl} in $kg.L^{-1}$). Linear relations are given at 20°C (Figure K.2), 25°C and 30°C for a large range of NaCl concentrations from 0 to 250 $g.L^{-1}$:

$$At\ 20°C : \rho = 0{,}0007 \cdot C_{NaCl} + 0.9986 \tag{K.2}$$

$$At\ 25°C : \rho = 0{,}0006 \cdot C_{NaCl} + 0.9977 \tag{K.3}$$

$$At\ 30°C : \rho = 0{,}0006 \cdot C_{NaCl} + 0.9957 \tag{K.4}$$

The density decreases slightly with increasing temperature. These results are in agreement with values obtained with the International thermodynamic equation of seawater for concentrations of NaCl from 0 to 40 $g.L^{-1}$.

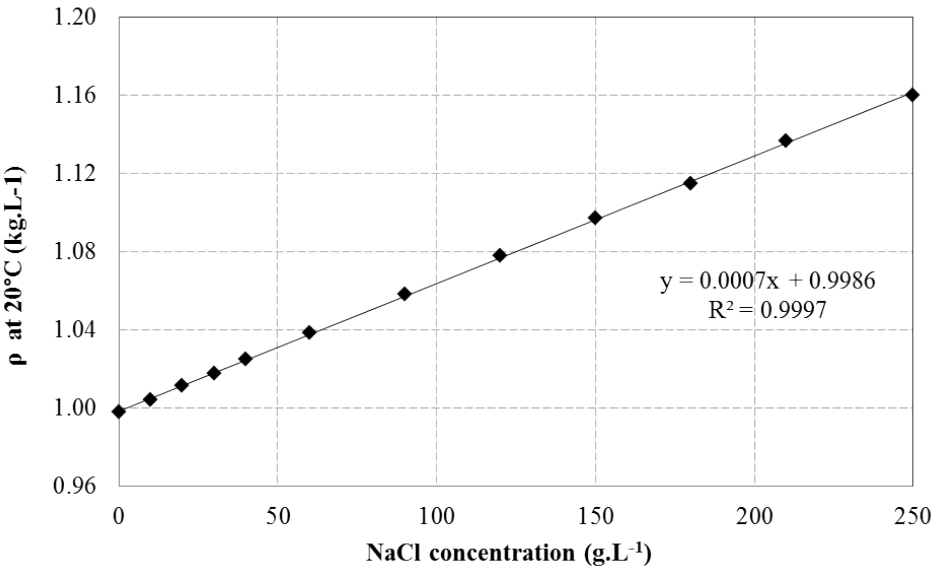


Figure K.2 – *Density at* 20°*C as a function of NaCl concentration in water*

K.1.4 Surface tension

The surface tension (σ) of pure water at 23.5°C is 72.3 $mN.m^{-1}$ (Copin-Montegut, 2002). σ decreases with increasing temperature and increases with the dissolution of electrolytic compounds (Fleming & Revelle, 1939; Houdart, 1973). However, the surface tension of seawater is mostly sensitive to the presence of organic matter.

The surface tension of tap water used to dissolve NaCl is 74.1 $mN.m^{-1}$ at 23.5°C. σ at 23.5°C increases with NaCl concentration to reach 82.4 $mN.m^{-1}$ at NaCl concentration of 265 $g.L^{-1}$.

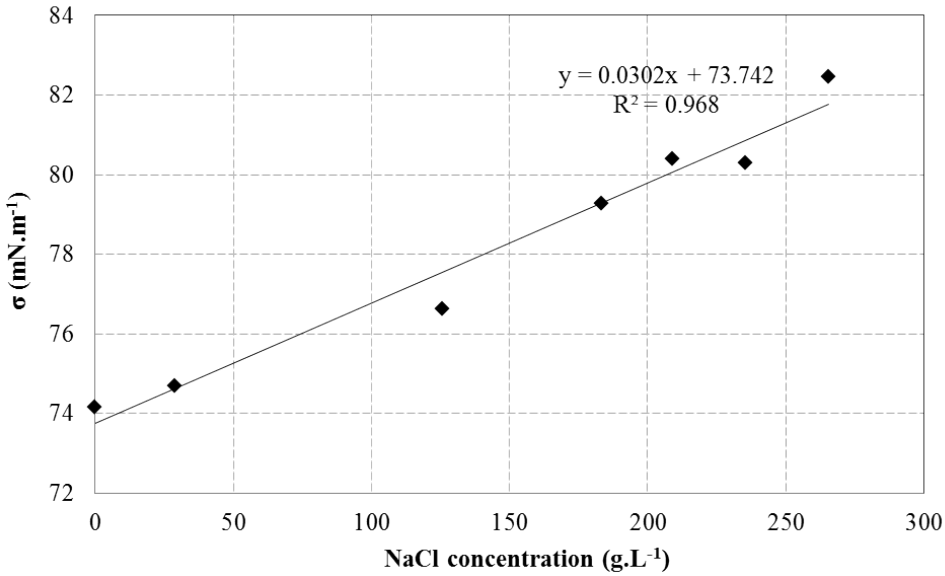


Figure K.3 – *Surface tension at* 23.5°C *as a function of NaCl concentration in water*

The result shown in figure K.3 is in agreement with the literature for seawater and has been fitted by a linear law (equation (K.5)).

$$At\ 23.5°C : \sigma = 0{,}0302 \cdot C_{NaCl} + 73{,}742 \tag{K.5}$$

K.2 Bubbles size distribution in saline waters

K.2.1 Bubble formation

DAF consists to produce small air bubbles (100 µm or less) by injection of pressurized water into a flotation tank containing the suspension to be treated. Needle valves are used to depressurize water. Bubble formation involves two steps, spontaneous nucleation and bubble growth (Edzwald, 1995). Assuming air dissolved in pure water is an ideal gas, the critical diameter of the nucleus (d_n) for homogeneous nucleation, with pressure difference across the needle valve (ΔP), is :

$$d_n = \frac{4 \cdot \sigma}{\Delta P} \tag{K.6}$$

In homogeneous nucleation, smaller nuclei are formed at higher pressure difference across the needle valve and for low surface tension. After formation, the nuclei grow to become bubbles.

K.2.2 Determination of bubble size distribution

Several methods, intrusive or not, have been developed to evaluate bubble size distribution in DAF bubble generation. Image analysis methods are widely used but require complicated set-up (De Rijk *et al.*, 1994; Rykaart & Haarhoff, 1995; Rodrigues & Rubio, 2003). A method using on-line particle counters is also developed to measure bubble size (Han *et al.*, 2002). An indirect method consists to measure the rising velocity of the bubbles and calculate bubbles diameters with Stokes' Law. However this method is not applicable for DAF multiple bubbles formations.

In this study, a light scattering sizing technique based on Malvern Spraytech™ (Figure 9.5) is used to in-situ measure the size distribution of the bubbles created by a DAF system at various concentration of NaCl in water. The bubble cloud created by DAF approaches the structure of a spray that is why this apparatus can be used.

To produce small bubbles, pressure drops of 400 to 600 kPa are recommended. In this study, saline waters are pressurized with air at $\Delta P = 600\ kPa$ by an industrial flotation apparatus (Serinol $CY1-250$ liters). Waters are depressurized through a needle valve in a home-designed measurement cell mounted on the light axis of the light scattering apparatus. To minimize additional bubble growth by coalescence, the needle valve is located just upstream of the measurement cell (figure 9.6). A buffer tank allows maintaining a constant temperature during the experiments ($23.5 \pm 2°C$).

Hand refractometer with temperature compensation is used to evaluate the salinity of solutions pressurized in the flotation apparatus. The relationship between the salinity expressed as mass of NaCl per mass of solution given by refractometer (S) and the concentration of NaCl in solution is given in figure K.4.

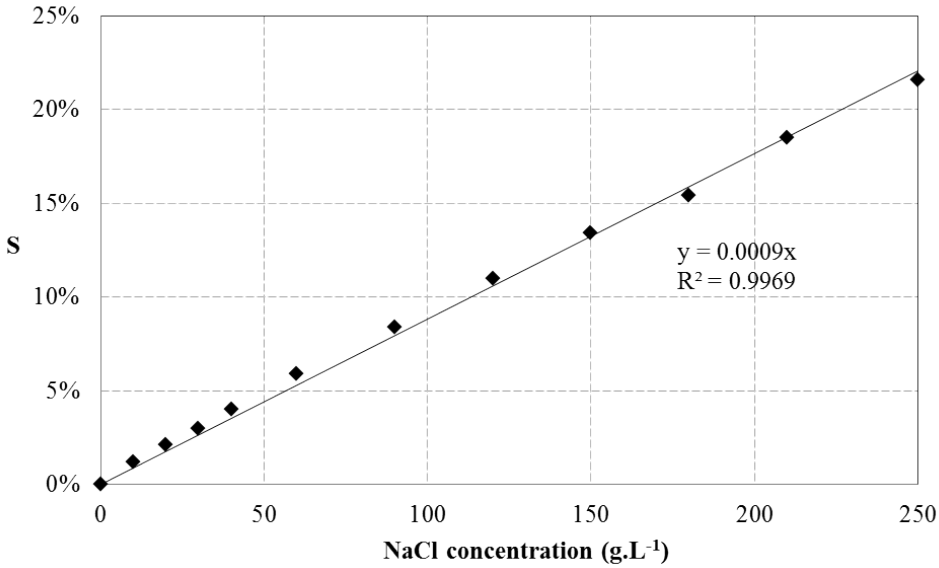


Figure K.4 – *Salinity ($kg_{NaCl}.kg^{-1}_{Solution}$) as a function of NaCl concentration ($g.L^{-1}$) in saline water*

Four examples of bubble size distributions in different NaCl concentrations are presented in figure 9.7. The mean bubble diameter presented in figure 9.8 is the Sauter Diameter D_S, with n_i being the number of bubbles in the range of diameter d_i :

$$D_S = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \tag{K.7}$$

The bubble size distributions and the mean diameters are closed to the results found in literature for pure water (Edzwald, 1995). Results show that salinity causes a global reduction in the size of bubbles produced by DAF. The DAF apparatus used (Serinol CY1) produces bubbles smaller than 120 µm in all the waters under consideration. Most of bubbles produced in these saline waters have a diameter smaller than 60 µm.

The mean bubble diameter seems to decrease with the NaCl concentration while the surface tension of the solution increases, showing a reverse trend that the one predicted by equation (K.6). The terminal velocities of bubbles that can be observed in the measurement cell as well as in the industrial flotation apparatus seem to decrease with increasing of NaCl concentrations, which supports the result obtained with this light scattering sizing technique. This result could be explained by a heterogeneous instead of homogeneous nucleation mechanism in these saline

waters that are far from being free of small solid impurities.

K.3 Bubbles velocities in saline waters

The design of a flotation apparatus treating hypersaline waters should take into account the decrease of terminal velocity with increasing of the NaCl concentrations. Within the range of sizes measured here, these bubbles are rigid spheres that obey to Stokes' law with Oseen correction (Oseen, 1910; Clift *et al.*, 1978). This law is used to calculate the terminal velocity of bubbles considering the diameters obtained by the light scattering sizing technique, and the density previously presented. Experiments have shown that the viscosity of water does not vary significantly with the concentration of NaCl in this range of concetrattion, so the viscosity of pure water is used. Velocities for clean bubbles and for bubbles fully covered by impurities are shown on figure 9.9.

Figure 9.9 clearly shows that the terminal velocity of the bubbles can be divided by 3 to 5 while the salinity increases. A similar effect could be observed on the maximum flow rate treated by the industrial flotation apparatus.

K.4 Conclusion

Light scattering sizing technique with Malvern Spraytech™ performed in a measurement cell just downstream the depressurization needle valve is efficient and gives a quick access to the size distribution of bubbles produced by a Dissolved Air Flotation system. This method showed that the size of the bubbles decreases with increasing NaCl concentration. This result is not supported by the classical homogeneous nucleation mechanism and suggests the presence of a heterogeneous nucleation due to tiny particles in suspension.

The decrease of the bubble size with the salinity could be interesting for harvesting the microalgae. Indeed, for microparticles (as microalgae), as small the bubble size as efficient the flotation capture process (Sarrot *et al.*, 2005, 2007; Legendre *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011, 2012). However, the bubble size has also a negative effect on the flotation capacity because the bubble terminal velocity decreases with the bubble diameter. To design flotation apparatus working in hypersaline waters, care should be taken to the resulting effect on the overall efficiency.

Annexe L

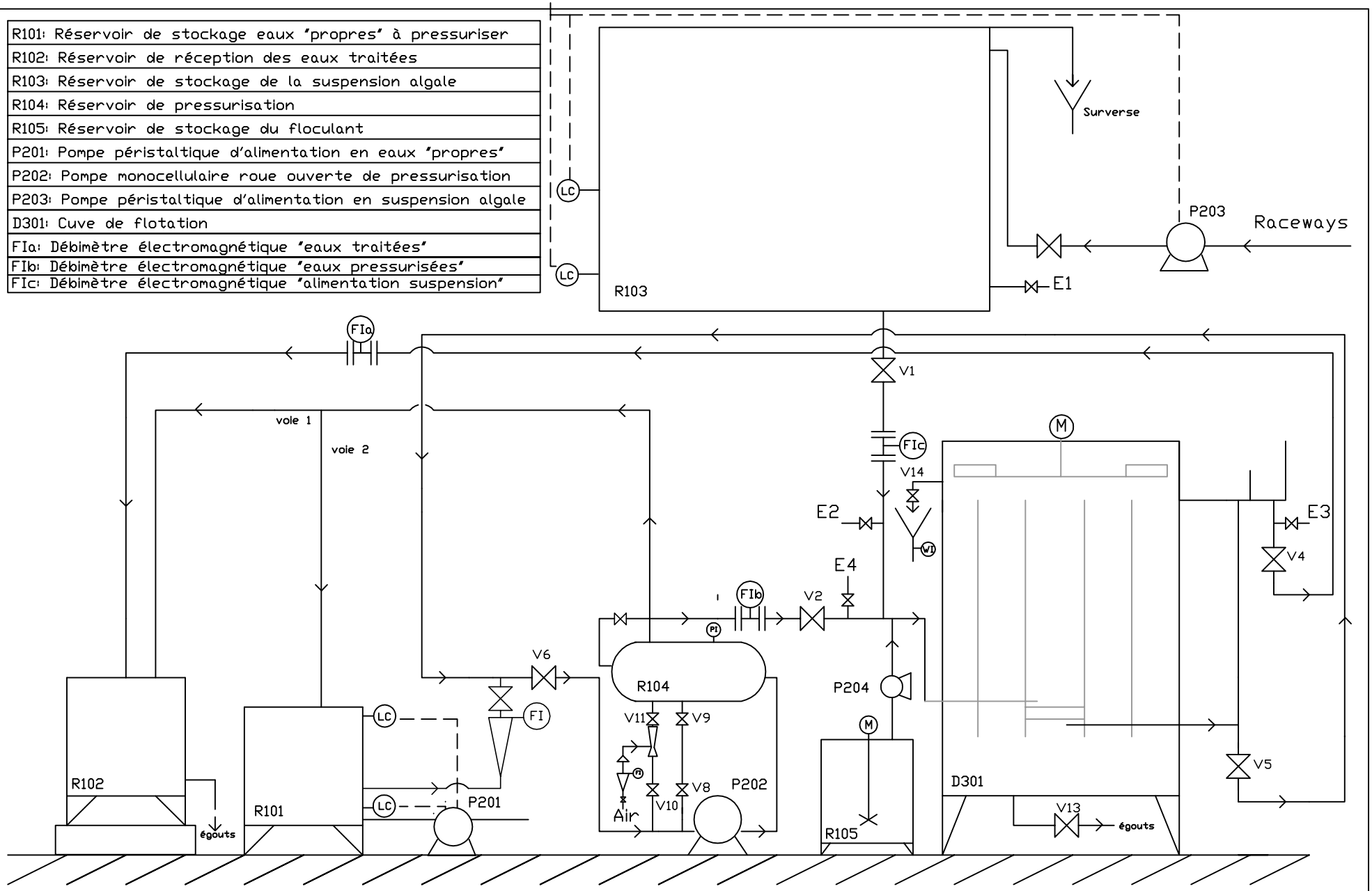
Diagramme PID et description des éléments de la plateforme de récolte

Le diagramme de tuyauterie et d'instrumentation (PID) est valable pour deux types de fonctionnement. Pour le fonctionnement classique de l'eau recyclée est pressurisée. Ce fonctionnement est détaillé dans le manuscrit (§ 9.2.2).

Dans le cas d'un fonctionnement dit « eaux propres », de l'eau sans algue, pompée par $P201$ et stockée dans $R101$ est pressurisée. La vanne $V5$ est alors fermée et la fuite permanente est connectée sur le bac $R101$ pour réduire la consommation d'eaux propres (voie 2).

Les éléments de la plateforme ainsi que leur utilisation sont détaillés à la suite du diagramme.

R101: Réservoir de stockage eaux 'propres' à pressuriser
R102: Réservoir de réception des eaux traitées
R103: Réservoir de stockage de la suspension algale
R104: Réservoir de pressurisation
R105: Réservoir de stockage du floculant
P201: Pompe péristaltique d'alimentation en eaux 'propres'
P202: Pompe monocellulaire roue ouverte de pressurisation
P203: Pompe péristaltique d'alimentation en suspension algale
D301: Cuve de flotation
FIa: Débimètre électromagnétique 'eaux traitées'
FIb: Débimètre électromagnétique 'eaux pressurisées'
FIc: Débimètre électromagnétique 'alimentation suspension'



PROJET SALINALGUE		FERROUKHI
RECOLTE DE DUNALIELLA SALINA PAR AUTOFLOCULATION-FLOTTATION - PILOTE SEMI-INDUSTRIEL (GRUISSAN)		BESSON
	08/07/2013	N°1

L.1 Bassin « d'évaporation »

Un bassin dit « d'évaporation » a été construit en début de projet sur le site de Gruissan (cf annexe F). C'est le seul élément hors-serre potentiellement considéré comme partie prenante de la plateforme de récolte. L'idée sous-tendant la construction de ce bassin était de pouvoir tester à l'échelle industrielle, un procédé de concentration par évaporation de l'eau jusqu'à atteinte de salinités rendant les microalgues hydrophobes. En effet, pour augmenter la productivité de biomasse, les microalgues sont cultivées dans le projet Salinalgue à des salinités plus faibles que celles rendant *D. salina* hydrophobe selon Curtain & Snook (1985).

Ce bassin a été dimensionné pour permettre chaque jour, le prélèvement d'un volume représentatif de la productivité de biomasse sur une culture continue dans un raceway. Il donne la possibilité de laisser une partie de l'eau prélevée s'évaporer pour atteindre la salinité désirée avant récolte. L'évaporation doit aussi permettre de pré-concentrer les microalgues et de favoriser l'accumulation de métabolites d'intérêt. La non régulation du pH de la suspension prélevée permet aussi un accroissement photosynthétique de ce pH, favorable à la récolte.

Malheureusement, il a été vu dans les chapitres précédents, mais après la construction du bassin, que les souches du projet ne présentent semble-t-il pas de caractère hydrophobe, même à très fortes salinités. Ceci fait perdre une partie de son utilité au bassin d'évaporation. Cette éventualité avait été anticipée lors de la conception du bassin, c'est pourquoi d'autres fonctions avaient été envisagées.

Ce bassin d'évaporation est par exemple muni d'un puits dans lequel vient s'insérer une cuve montée sur flotteur, développée lors de cette étude. Ce dispositif permet la déverse sélective des eaux superficielles du bassin d'évaporation dans la cuve. Le pompage vers la plateforme s'effectuant dans cette cuve, ce sont ces eaux superficielles qui sont pompées vers le système de récolte. L'idée est encore une fois de préconcentrer la suspension algale en utilisant cette fois la propriété de phototaxie positive de *D. salina*. Les cultures avant récolte étant déjà concentrées, les algues ont tendance à s'accumuler à la surface pour capter plus facilement la lumière (Schlipalius, 1991). Un gradient de concentration s'installe alors dans un bassin non agité. En prélevant seulement la partie supérieure des eaux, on profite d'un facteur de concentration « gratuit » avant la récolte.

Le bassin d'évaporation est aussi utilisé actuellement comme bassin de stockage du milieu de culture.

L.2 Pompe d'alimentation en suspension (P203)

Divers échanges avec d'autres chercheurs et aquaculteurs ont permis de définir qu'afin de ne pas

détériorer les cellules de *D. salina*, il est conseillé d'utiliser des pompes péristaltiques ou des pompes vortex pour le transfert des suspensions. Considérant le caractère extrêmement corrosif des suspensions traitées, la technologie péristaltique a été privilégiée, car elle permet d'éviter la mise en contact du corps de pompe avec la suspension.

Sur la plateforme, les suspensions sont donc transférées des raceways ou du bassin d'évaporation vers le réservoir de stockage de la suspension d'alimentation (voir § L) par l'intermédiaire d'une ou deux pompes péristaltiques industrielles de la série $AB1$ (pompes AB, France). La deuxième pompe est ajoutée en parallèle, seulement pour des besoins de débits d'alimentation en suspension supérieurs à 800 L/h.

Les pompes sont munies d'un variateur de fréquence étanche permettant de jouer sur la vitesse de rotation de leur tête. La figure L.1 présente l'évaluation du débit imposé par une pompe péristaltique d'alimentation en fonction de la fréquence réglée au régulateur. Durant cette évaluation une eau de salinité 12% a été transportée sur une longueur de 28 m et sur une hauteur de 2,8 m entre un raceway et le haut du réservoir de stockage de la suspension.

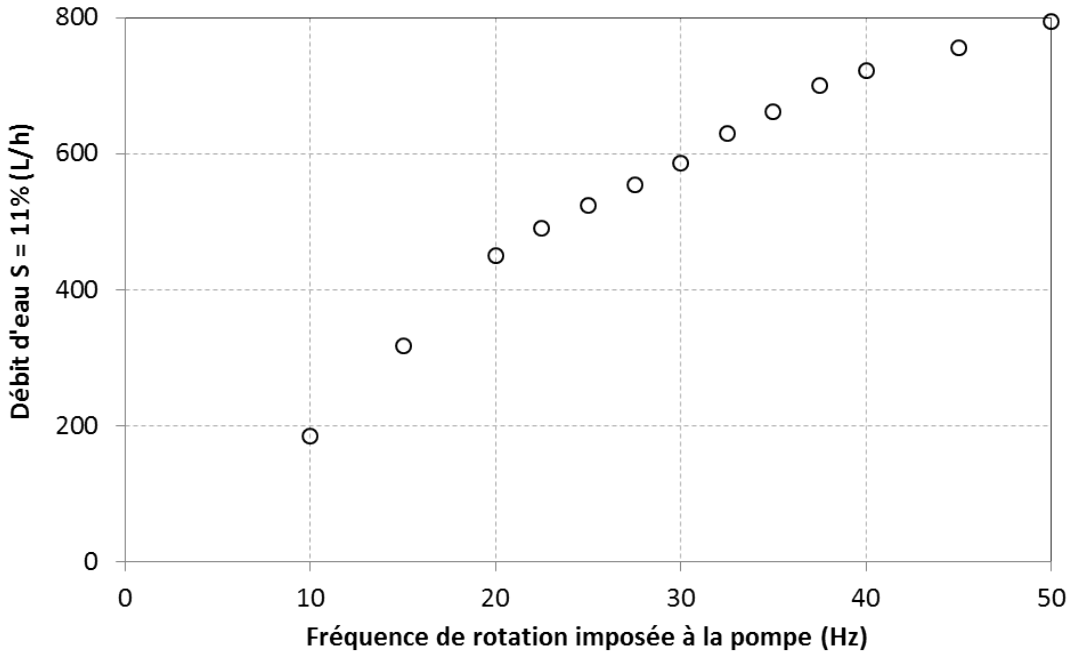


Figure L.1 – *Évaluation du débit imposé par la pompe péristaltique d'alimentation, en fonction de la fréquence réglée au régulateur, pour une eau de salinité* 11%.

Une autre manipulation a mis en évidence qu'à fréquence donnée, le débit imposé par la pompe péristaltique d'alimentation diminue légèrement avec le temps de pompage (figure L.2). Pour cette raison et parce que les pompes péristaltiques induisent un pompage saccadé, il a été décidé de ne pas baser l'alimentation en suspension microalgale dans le flottateur sur le réglage de la fréquence imposée aux pompes.

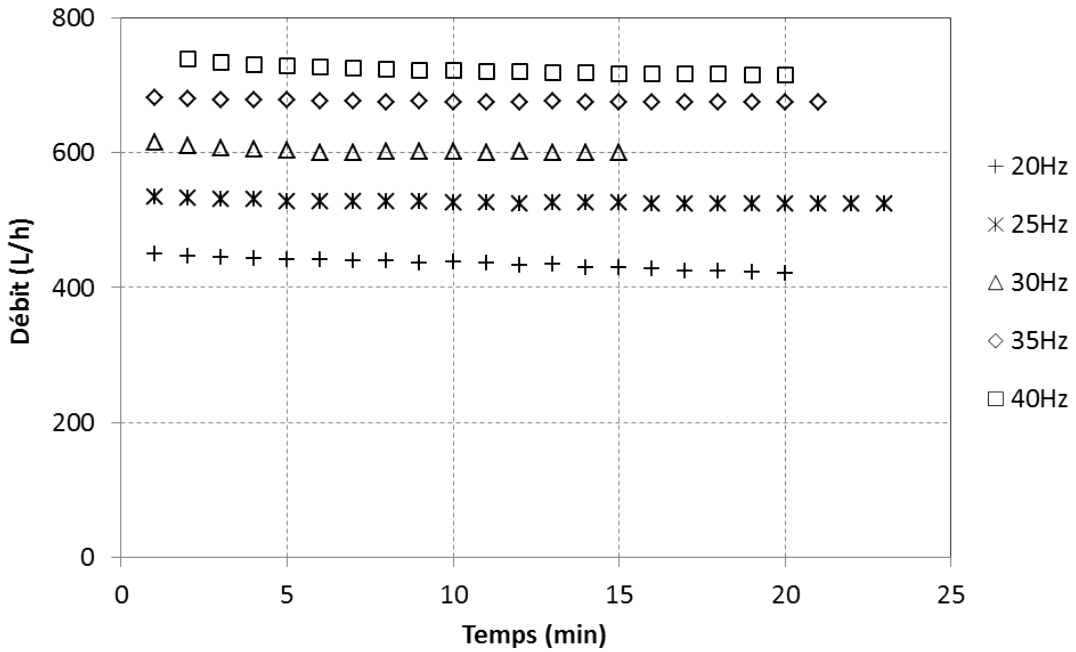


Figure L.2 – *Débit imposé par la pompe péristaltique d'alimentation en suspension, en fonction du temps de pompage.*

Un réservoir tampon de stockage a été ajouté sous la serre. Des capteurs de niveaux bas et haut ont été ajoutés dans ce bac. Ils permettent l'asservissement des pompes. Ces dernières sont finalement réglées à une fréquence maximale de fonctionnement de 50 Hz. Elles se déclenchent lors de l'atteinte du niveau bas dans le réservoir d'alimentation et s'arrêtent lors de l'atteinte du niveau haut. Cette configuration autorise le fonctionnement de l'installation jusqu'à des débits d'alimentation de 800 L/h.

L.3 Réservoir de stockage de la suspension d'alimentation (R103)

Ce réservoir de stockage de la suspension d'alimentation a été dimensionné pour pouvoir contenir jusqu'à 1 m^3 de suspension (soit 1 h de fonctionnement du pilote en régime nominal). Il repose sur un socle de profilés en aluminium qui porte la hauteur en bas de cuve à 180 cm. La fabrication de la cuve en polyéthylène a été confiée à l'entreprise *Mégias Plastiques*. La surface apparente de la cuve a été volontairement maximisée pour permettre son intégration dans la serre de hauteur limitée et réduire la vitesse de variation de la hauteur de suspension dans le bac, pour faciliter le contrôle du débit dans le flottateur (voir § 9.2.1).

Les suspensions issues soit du bassin d'évaporation, soit directement des raceways, sont pompées

vers ce réservoir qui a plusieurs utilités.

Il permet notamment de tamponner l'alimentation saccadée des pompes péristaltiques et permet d'éviter la surchauffe de ces dernières lors de fonctionnements prolongés. Il offre aussi la possibilité d'appliquer des prétraitements à la suspension algale avant son passage dans le flottateur et facilite la prise de prélèvements.

Il joue aussi un rôle de « château d'eau » et permet un fonctionnement gravitaire tout au long de la phase de récolte. La suspension est en effet relevée une seule fois par une pompe péristaltique. Elle s'écoule ensuite par gravité dans le flottateur qui a été surélevé lors de sa conception. Cette surélévation laisse la possibilité de transférer les boues algales par gravité vers la centrifugeuse. Elle permet aussi, toujours de manière gravitaire, de rejeter les eaux traitées vers les bassins de traitement, ou de les recycler vers les raceways (recyclage non testé lors du projet). Ceci a permis de réduire les investissements en systèmes de pompage.

L.4 Système d'injection de bases

Les expériences laboratoires ont montré qu'il était nécessaire de déstabiliser la suspension algale, pour pouvoir appliquer une séparation par flottation. Pour ce faire, l'autofloculation par injection d'une solution basique dans la suspension microalgale s'est avérée efficace. Le transfert de cette méthode à l'échelle industrielle a nécessité la mise en place d'une ligne spécifique sur la plateforme de récolte.

L.4.1 Réservoir de préparation et de stockage des solutions de bases (R105)

Les solutions de soude ou de chaux sont préparées dans un réservoir fermé de contenance 100 L. La solution est homogénéisée par un agitateur à pales inclinées. Toute solution préparée est consommée dans les 12 h pour éviter la dégradation des solutions par le transfert de CO_2 atmosphérique. Le prélèvement de solution basique se fait en bas de cuve.

L.4.2 Pompes d'injection de base (P204)

Les solutions basiques sont pompées dans le réservoir de stockage de base et injectées dans la suspension algale par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique à vitesse de rotation variable. Le lieu d'injection de la solution basique peut être modifié facilement (voir § L.4.3).

Pour évaluer le débit de base ajouté à la suspension en entrée de flottateur, un étalonnage précis

de la pompe d'injection est réalisé toutes les 50 h d'utilisation et à chaque changement de tuyaux masterflex™. Ces étalonnages sont réalisés par empotage dans les conditions de hauteurs et de charges rencontrées en fonctionnement normal. La figure L.3 présente 2 étalonnages effectués à 50 h d'intervalle sur la même pompe.

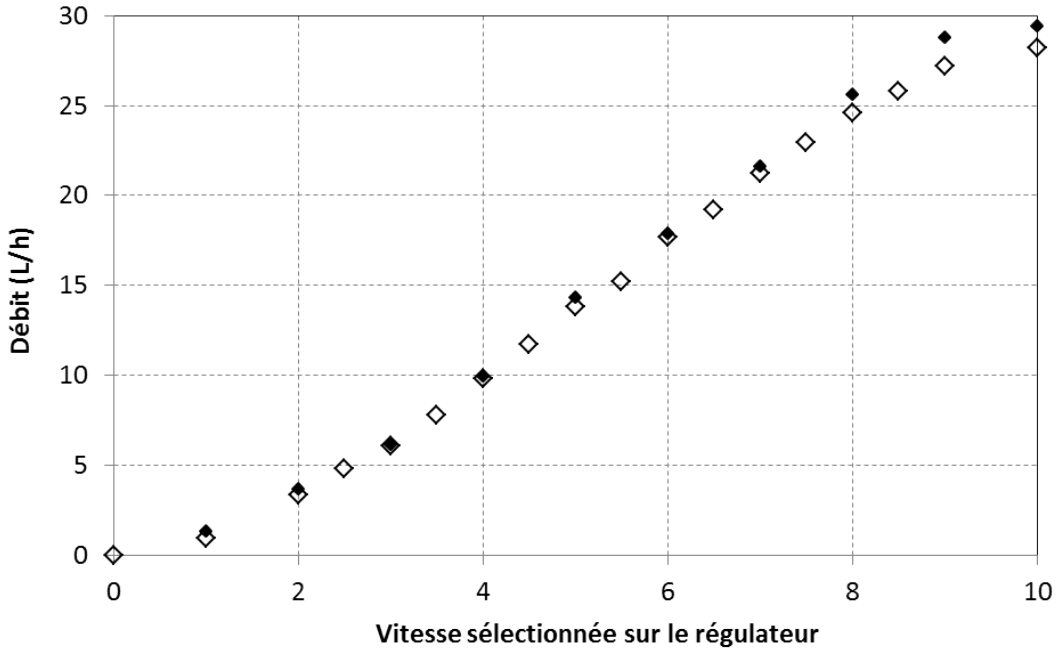


Figure L.3 – *Évaluation du débit imposé par la première pompe péristaltique d'injection de base, en fonction de la vitesse réglée sur le régulateur.* (◆) *: étalonnage initial ;* (◇) *: étalonnage réalisé* 50 h *d'utilisation plus tard.*

La première pompe utilisée ayant cessé de fonctionner, une nouvelle pompe péristaltique a été utilisée en cours de projet. Étant donnée la réduction des concentrations des solutions de bases injectées durant le projet, la capacité de la seconde pompe a été légèrement augmentée. Le même type d'étalonnage a été effectué.

L.4.3 Lieu d'injection des solutions de bases

Les études laboratoires ayant mis en évidence l'importance des conditions d'injection de soude, ce paramètre a été étudié à l'échelle semi-industrielle. L'influence du lieu d'injection de la solution basique a par exemple été étudiée.

Pour cela, un système d'injection mobile, fabriqué durant cette étude, a été mis en place sur le pilote (photo L.4). Ce système permet de visualiser la zone d'injection pour vérifier le

bon déroulement de cette dernière. Un système de presse-étoupe couplé à une canne rigide permet de positionner le point d'injection à différents endroits, sur la conduite d'alimentation en suspension algale ou sur celle d'alimentation en eaux blanches (injection en aval de la vanne de dépressurisation).

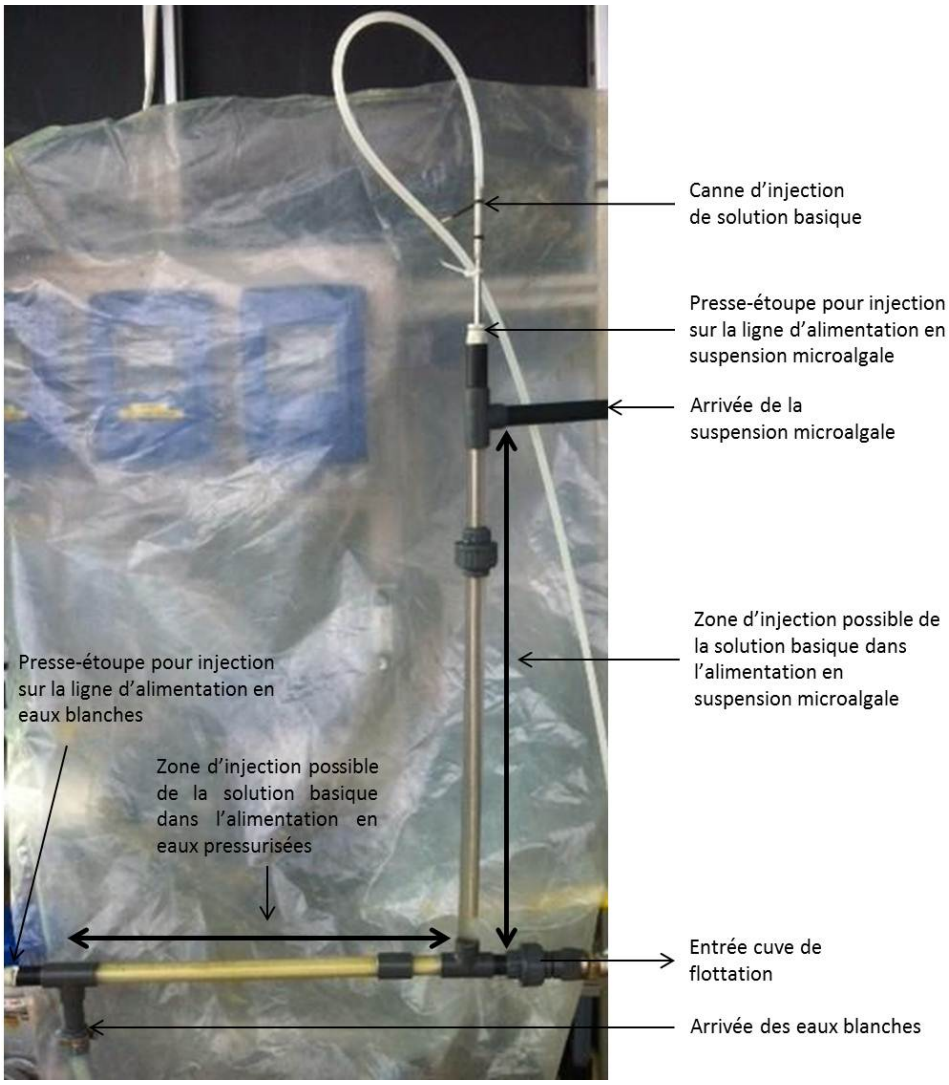


Figure L.4 – *Système d'injection mobile des solutions basiques en amont de la cuve de flottation.*

Il est aussi possible de positionner l'injection de soude directement à l'entrée du clifford dans le flottateur ou bien en amont dans le bas de stockage de la suspension algale.

L.5 Conditionnement des boues algales

Après séparation dans la cuve de flottation, les boues algales sont évacuées du flottateur par raclage. Elles sont dirigées vers un réservoir positionné sur une balance plate-forme Sartorius™ Midrics 2 de précision 10 g, pour évaluation des débits massiques de boues récoltées. L'afficheur de la balance est déporté dans la zone de contrôle de l'unité. La balance a été contrôlée et certifiée en début de projet.

Les boues récoltées sont ensuite soit acheminées vers la centrifugeuse soit directement conditionnées et congelées dans des poches thermosoudées, pour transfert vers les partenaires bioraffinerie du projet Salinalgue.

L.6 Réservoir de stockage des eaux traitées (R102)

Un réservoir de 150 L est ajouté sur la plateforme pour permettre le stockage des eaux traitées. Il facilite notamment la prise d'échantillons d'eau traitée et peut permettre, selon l'agencement de la deuxième pompe péristaltique, de multiplier les passages de la suspension dans le flottateur. Il laisse aussi la possibilité de travailler sur les eaux traitées avant recyclage vers les raceways ou évacuation à l'égout.

L.7 Réservoir de stockage des eaux « propres » à pressuriser (R101)

Le réservoir baptisé « réservoir de stockage des eaux propres à pressuriser » permet le stockage d'eaux sans microalgues destinées à la pressurisation. L'idée est de pouvoir permettre des expériences durant lesquelles les eaux pressurisées ne sont pas des eaux recyclées potentiellement chargées en microalgues. Aucune de ces expériences n'est présentée dans ce manuscrit.

L.8 Deuxième pompe péristaltique (P201)

Il a été vu que la deuxième pompe péristaltique industrielle de la série $AB1$ (pompes AB, France) peut être utilisée sur la plateforme pour différentes tâches. Elle peut être utilisée en complément de la première pour permettre un fonctionnement de l'unité pour des débits d'alimentation supérieurs à 800 L/h. Elle peut aussi servir à fournir l'installation en eaux propres à pressuriser. Dans une autre configuration, elle peut permettre de multiplier le nombre de passages de la suspension dans le flottateur.

Bibliographie

Aasen, A. J., Eimhjellen, K. E., & Liaaen-Jensen, S. 1969. An extreme source of beta-carotene. *Acta Chemica Scandinavica*, **23**(7), 2544.

Amaro, Helena M., Guedes, A., & Malcata, F. Xavier. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, **88**(10), 3402–3410.

Aminot, Alain, & Kerouel, Roger. 2004. *Hydrologie des ecosystemes marins : parametres et analyses*. Editions Quae.

Arbelaez, Javier, Koopman, Ben, & Lincoln, E. P. 1983. Effects of Dissolved Oxygen and Mixing on Algal Autoflotation. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **55**(8), 1075–1079.

Arora, H., DeWolfe, J. R, Lee, R. G, & Grubb, T. P. 1995. Evaluation of dissolved air flotation process for water clarification and sludge thickening. *Water Science and Technology*, **31**(3-4), 137–147.

Avron, Mordhay, & Ben-Amotz, Ami. 1978 (Sept.). *Production Of Glycerol From Algae. Brevet US4115949*.

Ayoub, George M., & Koopman, Ben. 1986. Algal Separation by the Lime-Seawater Process. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **58**(9), 924–931.

Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., & Zamir, A. 2002. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga Dunaliella salina. *Plant physiology*, **129**(3), 1320.

Azarian, G. H, Mesdaghinia, A. R, Vaezi, F., Nabizadeh, R., & Nematollahi, D. 2007. Algae removal by electro-coagulation process, application for treatment of the effluent from an industrial wastewater treatment plant. *Iranian Journal of Public Health*, **36**(4), 57–64.

Babel, Sandhya, & Takizawa, Satoshi. 2011. Chemical pretreatment for reduction of membrane fouling caused by algae. *Desalination*, **274**(1-3), 171–176.

Bare, W. F. R, Jones, N. B, & Middlebrooks, E. J. 1975. Algal removal using dissolved air flotation. *Journal Water Pollution Control Federation*, **47**(1), 153–169.

Baseggio, Gino. 1974. The composition of sea water and its concentrates. *Pages 351–358 of : Proceedings of the Fourth Symposium on Salt, 8-12 April 1973.*

Beach, Evan S, Eckelman, Matthew J, Cui, Zheng, Brentner, Laura, & Zimmerman, Julie B. 2012. Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae Neochloris oleoabundans. *Bioresource technology*, **121**(Oct.), 445–449. PMID : 22853967.

Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, **25**(2), 207–210.

Ben-Amotz, A., & Avron, M. 1981. Glycerol and Beta-carotene metabolism in the halotolerant alga Dunaliella : a model system for biosolar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences*, **6**, 297–299.

Ben-Amotz, A., & Avron, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga Dunaliella. *Trends in Biotechnology*, **8**(5), 121–126.

Ben-Amotz, A., Sussman, I., & Avron, M. 1982. Glycerol production by dunaliella. *Experientia*, **38**(1), 49–52.

Ben-Amotz, A., Shaish, A., & Avron, M. 1989. Mode of Action of the Massively Accumulated {beta}-Carotene of Dunaliella bardawil in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation. *Plant Physiology*, **91**(3), 1040.

Ben-Amotz, Ami. 1995. New mode of Dunaliella biotechnology : two-phase growth for Îš-carotene production. *Journal of Applied Phycology*, **7**(1), 65–68.

Benemann, J. R. 1997. CO2 mitigation with microalgae systems. *Energy conversion and management*, **38**, S475–S479.

Benemann, J. R., Koopman, B. L., Weissman, J. C., Eisenberg, D. M., & Goebel, R. P. 1980. Development of microalgae harvesting and high rate pond technology. *Algal Biomass*, 457–499.

Berry, W.W., Tegen, M.G., & Sutterlin, W.R. 2011 (July). *Method for harvesting microalgae suspended in an aqueous solution using a hydrophobic chemical.* US Patent 20110165662.

Besson, Alexandre, & Guiraud, Pascal. 2013. High–pH–induced flocculation-flotation of the hypersaline microalga Dunaliella salina. *Bioresource Technology*, **147**(Nov.), 464—470.

Betzer, N., Argaman, Y., & Kott, Y. 1980. Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation. *Water Research*, **14**(8), 1003–1009.

Bilanovic, D., Shelef, G., & Sukenik, A. 1988. Flocculation of microalgae with cationic polymers - effects of medium salinity. *Biomass*, **17**(1), 65–76.

Bloch, Moshe R, Sasson, Joel, Ginzburg, Margaret E, Gloldman, Zvi, Ginzburg, Ben Z., Garti, Nissim, & Porath, Asher. 1982. *Oil product from algae.* Brevet US4341038.

Borodyanski, Genady [il], & Konstantinov, Irina [il]. 2002 (June). *Microalgae separator apparatus and method.* Brevet US2002079270 (A1).

Borowitzka, L. J. 1991. Development of Western biotechnology algal beta-carotene plant. *Bioresource Technology*, **38**(2-3), 251–252.

Borowitzka, L. J., & Borowitzka, M. A. 1989. Beta-carotene (provitamin A) production with algae. *Pages 15—26 of : Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors.* Springer Netherlands.

Borowitzka, L. J, Borowitzka, M. A, & Moulton, T. P. 1984. The mass-culture of Dunaliella-salina for fine chemicals - from laboratory to pilot-plant. *Hydrobiologia*, **116**(SEP), 115–121.

Borowitzka, L.J., & Brown, A. D. 1974. Salt relations of marine and halophilic species of unicellular green-alga, Dunaliella - role of glycerol as a compatible solute. *Archives of Microbiology*, **96**(1), 37–52.

Borowitzka, M. A. 1992. Algal growth media and sources of algal cultures. *Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Great Britain*, 456–465.

Borowitzka, M. A. 1994. Large-scale algal culture systems : the next generation. *Australas Biotechnol*, **4**(4), 212–5.

Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture : Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, **9**(5), 393–401.

Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae : ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, **70**(1-3), 313–321.

Borowitzka, Michael A. 1990. The mass culture of Dunaliella salina. *Proceedings of Regional Seafarming Development and Demonstration Project - Bangkok.*

Borowitzka, Michael A. 2013. Energy from Microalgae : A Short History. *Pages 1–15 of :* Borowitzka, Michael A., & Moheimani, Navid R. (eds), *Algae for Biofuels and Energy.* Developments in Applied Phycology, no. 5. Springer Netherlands.

Bosma, R., Van Spronsen, W. A, Tramper, J., & Wijffels, R. H. 2003. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. *Journal of Applied Phycology*, **15**(2-3), 143–153.

Brennan, L., & Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**(2), 557–577.

Brown, Malcolm R., Dunstan, Graeme A., Norwood, Suzanne. J., & Miller, Kelly A. 1996. Effects of Harvest Stage and Light on the Biochemical Composition of the Diatom Thalassiosira Pseudonana1. *Journal of Phycology*, **32**(1), 64–73.

Bux, Faizal. 2013. *Biotechnological Applications of Microalgae : Biodiesel and Value Added Products*. Taylor & Francis Group.

Cadoret, Jean-Paul, & Bernard, Olivier. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues - promesses et defis. *Journal de la Societe de Biologie*, **202**(3), 201–211.

Castrillo, M., Lucas-Salas, L.M., Rodriguez-Gil, C., & Martinez, D. 2013. 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**(0), 324–329.

Chen, Chun-Yen, Yeh, Kuei-Ling, Aisyah, Rifka, Lee, Duu-Jong, & Chang, Jo-Shu. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production : a critical review. *Bioresour Technol*, **102**(1), 71–81.

Chen, Fangjian, Liu, Zhiyong, Li, Demao, Liu, Chenfeng, Zheng, Ping, & Chen, Shulin. 2012. Using ammonia for algae harvesting and as nutrient in subsequent cultures. *Bioresource technology*, **121**(Oct.), 298–303.

Chen, G. H. 2004. Electrochemical technologies in wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*, **38**(1), 11–41.

Chen, J. J, Yeh, H. H, & Tseng, I. C. 2009. Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal - Pilot and bench scale tests. *Chemosphere*, **74**(6), 840–846.

Chen, Y. M, Liu, J. C, & Ju, Y. H. 1998. Flotation removal of algae from water. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **12**(1), 49–55.

Cheng, Kuan-Chen, & Ogden, Kimberly L. 2011. Algal Biofuels : The Research. *Chemical Engineering Progress*, **107**(3), 42–47.

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. 2010. Dispersed ozone flotation of Chlorella vulgaris. *Bioresource Technology*, **101**(23), 9092–9096.

Cheng, Ya-Ling, Juang, Yu-Chuan, Liao, Guan-Yu, Tsai, Pei-Wen, Ho, Shih-Hsin, Yeh, Kuei-Ling, Chen, Chun-Yen, Chang, Jo-Shu, Liu, Jhy-Chern, Chen, Wen-Ming, & Lee, Duu-Jong. 2011a. Harvesting of Scenedesmus obliquus FSP-3 using dispersed ozone flotation. *Bioresour Technol*, **102**(1), 82–7.

Cheng, Yu-Shen, Zheng, Yi, Labavitch, John M., & VanderGheynst, Jean S. 2011b. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of Chlorella. *Process Biochemistry*, **46**(10), 1927–1933. WOS :000295913700006.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3), 294–306.

Chisti, Yusuf, & Yan, Jinyue. 2011. Energy from algae : Current status and future trends : Algal biofuels - A status report. *Applied Energy*, **88**(10), 3277–3279.

Chojnacka, K. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbonmetabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, **3(1)**(Mar.), 21–34.

Christenson, Logan, & Sims, Ronald. 2011 (Aug.). *Rotating Bioreactor and Spool Harvester Apparatus for Biomass Production.* Brevet US20110217764 (A1).

Clift, R., Grace, J. R., & Weber, M. E. 1978. *Bubbles, drops, and particles.* Vol. 3. Academic press New York.

Cojan, Isabelle, & Renard, Maurice. 2006. *Sedimentologie - cours.* Paris : Dunod.

Copin-Montegut, Gerard. 1996. Equilibre acides-bases dans la solution eau de mer. *In : Physique et chimie marines.*

Copin-Montegut, Gerard. 2002. *Proprietes physiques de l'eau de mer.* Ed. Techniques Ingenieur.

Couto, H. J. B., Nunes, D. G., Neumann, R., & Fran\cca, S. C. A. 2009. Micro-bubble size distribution measurements by laser diffraction technique. *Minerals Engineering*, **22**(4), 330–335.

Coward, Thea, Lee, Jonathan G.M., & Caldwell, Gary S. 2013. Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass. *Algal Research*, **2**(2), 135–144.

Curtain, Cyril. 2000. The growth of Australia's algal beta-carotene industry. *Australasian Biotechnology*, **10**(3), 19–23.

Curtain, Cyril C, & Snook, Harvey. 1985 (Nov.). *Method For Harvesting Algae.* Brevet US4554390 (A).

Danquah, M. K, Ang, L., Uduman, N., Moheimani, N., & Fordea, G. M. 2009. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production : exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**(7), 1078–1083.

Das, Keshav C., Chinnasamy, Senthil, Shelton, James, Wilde, Susan B., Haynie, Rebecca S., & Herrin, James A. 2011 (Feb.). *Algal lipid harvest using mollusks for biofuels production.*

De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., & Vincenzini, M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation : a review. *Journal of Applied Phycology*, **13**(4), 293–299.

De Rijk, Sander E., Jaap H.J.M. aivan der, Graaf, & den Blanken, Jan G. 1994. Bubble size in flotation thickening. *Water Research*, **28**(2), 465–473.

De Windt, Laurent, Van der Lee, Jan, & Schmitt, Jean-Michel. 2005. *Modelisation en geochimie des eaux*. Ed. Techniques de l'Ingenieur.

Del Campo, J. A, Garcia-Gonzalez, M., & Guerrero, M. G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production : current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**(6), 1163–1174.

Demirbas, A. 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, **51**(12), 2738–2749.

Dibenedetto, Angela. 2011. The potential of aquatic biomass for CO2-enhanced fixation and energy production. *Greenhouse Gases : Science and Technology*, **1**(1), 58–71.

Dickson, Andrew G., & Goyet, Catherine. 1994. *Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water*. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory.

Divakaran, R., & Pillai, V. N. S. 2002. Flocculation of algae using chitosan. *Journal of Applied Phycology*, **14**(5), 419–422.

Dodd, Joseph. 1976 (Apr.). *Algae Harvester*. Brevet US3951805 (A).

DOE, U.S. 2010 (May). *National Algal Biofuels Technology Roadmap*. Tech. rept. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program.

Dong, Longying, Drury, Kenneth K, & Fadeev, Andrei. 2010. *Methods for harvesting microalgae using ceramic membrane filters*.

Dowbiggin, W. B, & Singer, P. C. 1989. Effects of natural organic matter and calcium on ozone-induced particle destabilization. *Journal American Water Works Association*, **81**(6), 77–85.

Downing, J. B, Bracco, E., Green, F. B, Ku, A. Y, Lundquist, T. J, Zubieta, I. X, & Oswald, W. J. 2002. Low cost reclamation using the Advanced Integrated Wastewater Pond Systems (R) Technology and reverse osmosis. *Water Science and Technology*, **45**(1), 117–125.

Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A. A, & Teixeira, J. A. 2010. Third generation biofuels from microalgae.

Dziubek, Am, & Kowal, Al. 1989. High-pH Coagulation Adsorption - a New Technology for Water-Treatment and Reuse. *Water Science and Technology*, **21**(6-7), 511–517.

Edwards, M., & Benjamin, M. M. 1992. Effect of preozonation on coagulant-NOM interactions. *Journal-American Water Works Association*, **84**(8), 63–72.

Edzwald, J. K. 1993. Algae, bubbles, coagulants, and dissolved air flotation. *Water Science and Technology*, **27**(10), 67–81.

Edzwald, J. K. 1995. Principles and applications of dissolved air flotation. *Water Science and Technology*, **31**(3-4), 1–23.

Edzwald, J. K., & Paralkar, A. 1992. Algae, coagulation, and ozonation. *Page 263 of : Chemical Water and Wastewater Treatment II : Proceedings of the 5th Gothenburg Symposium 1992, September 28-30, 1992, Nice, France.* Springer.

Edzwald, J. K., & Wingler, B. J. 1990. Chemical and physical aspects of dissolved air flotation for the removal of algae. *Aqua*, **39**(1), 24–35.

Elmaleh, S., Coma, J., Grasmick, A., & Bourgade, L. 1991. Magnesium induced algal flocculation in a fluidized bed. *Water Science & Technology*, **23**(7-9), 1695–1702.

Ferguson, C., Logsdon, G. S, & Curley, D. 1995. Comparison of dissolved air flotation and direct-filtration. *Water Science and Technology*, **31**(3-4), 113–124.

Feris, L. A, & Rubio, J. 1999. Dissolved air flotation (DAF) performance at low saturation pressures. *Filtration & Separation*, **36**(9), 61–65.

Fernandes, H. L., Veloso, V., Gouveia, L., Empis, J. M., & Novais, J. M. 1997. Mild method of pre-concentration of Dunaliella salina from culture medium. *Biotechnology techniques*, **11**(8), 557–559.

Fleming, R. H., & Revelle, R. 1939. Physical processes in the ocean. *Recent Marine Sediments, Amer. Assoc. Petrol. Geol*, 48–141.

Folkman, Yair, & Wachs, Alberto M. 1973. Removal of algae from stabilization pond effluents by lime treatment. *Water Research*, **7**(3), 419–435.

Fournier, Real. 2008. *Concentrated aqeous suspensions of microalgae.*

Frappart, M., Jaffrin, M. Y, Ding, L. H, & Espina, V. 2008. Effect of vibration frequency and membrane shear rate on nanofiltration of diluted milk, using a vibratory dynamic filtration system. *Separation and Purification Technology*, **62**(1), 212–221.

Frappart, Matthieu, Masse, Anthony, Jaffrin, Michel Y., Pruvost, Jeremy, & Jaouen, Pascal. 2011. Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation. *Desalination*, **265**(1-3), 279–283.

Gao, Baoyu, Zhu, Xiaobiao, Xu, Chunhua, Yue, Qinyan, Li, Weiwei, & Wei, Jincheng. 2008. Influence of extracellular polymeric substances on microbial activity and cell hydrophobicity in biofilms. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **83**(3), 227–232.

Gao, S. S, Du, M. A, Tian, J. Y, Yang, J. Y, Yang, J. X, Ma, F., & Nan, J. 2010. Effects of chloride ions on electro-coagulation-flotation process with aluminum electrodes for algae removal. *Journal of Hazardous Materials*, **182**(1-3), 827–834.

Garcia-Gonzalez, M., Moreno, J., Canavate, J. P, Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F. J, & Guerrero, M. G. 2003. Conditions for open-air outdoor culture of Dunaliella salina in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, **15**(2-3), 177–184.

Garg, Sourabh, Li, Yan, Wang, Liguang, & Schenk, Peer M. 2012. Flotation of marine microalgae : Effect of algal hydrophobicity. *Bioresource Technology*, **121**(0), 471–474.

Ghernaout, B., Ghernaout, D., & Saiba, A. 2010. Algae and cyanotoxins removal by coagulation/flocculation : A review. *Desalination and Water Treatment*, **20**(1-3), 133–143.

Ginzburg, M. 1987. Dunaliella - a green-alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, **14**, 93–183.

Giordano, M. 2001. Interactions between C and N metabolism in Dunaliella salina cells cultured at elevated CO2 and high N concentrations. *Journal of Plant Physiology*, **158**(5), 577–581.

Giordano, M., & Bowes, G. 1997. Gas exchange and C allocation in Dunaliella salina cells in response to the N source and CO2 concentration used for growth. *Plant Physiology*, **115**(3), 1049–1056.

Golueke, C. G., & Oswald, W. J. 1965. Harvesting and processing sewage-grown planktonic algae. *Journal - Water Pollution Control Federation*, 471–498.

Gonzalez, M. A., Gomez, P. I., & Polle, J. E. W. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus Dunaliella. *In the book : The Alga Dunaliella - Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology*, 15–44.

Gouveia, L., & Oliveira, A. C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**(2), 269–274.

Griffiths, Melinda J., Garcin, Clive, van Hille, Robert P., & Harrison, Susan T.L. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, **85**(2), 119–123.

Gueddari, Moncef. 1984. *Geochimie et thermodynamique des evaporites continentales : etude du lac Natron (Tanzanie) et du Chott El Jerid (Tunisie).* ThÃÍse, Universite Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg.

Gueddari, Moncef, Monnin, Christophe, Perret, Dominique, Fritz, Bertrand, & Tardy, Yves. 1983. Geochemistry of brines of the chott El Jerid in southern Tunesia - Application of Pitzer's equations. *Chemical Geology*, **39**(1-2), 165–178.

Guelcher, Scott Arthur, & Kanel, Jeffrey Scott. 1998a (July). *Method for deep bed filtration of microalgae.* Brevet WO9828404 (A1).

Guelcher, Scott Arthur, & Kanel, Jeffrey Scott. 1998b (July). *Method for dewatering microalgae with a bubble column.* Brevet WO9828081 (A1).

Guelcher, Scott Arthur, & Kanel, Jeffrey Scott. 1998c (July). *Methods for dewatering microalgae with a Jameson flotation cell.* Brevet WO9828083 (A1).

Hadi, M. R, Shariati, M., & Afsharzadeh, S. 2008. Microalgal Biotechnology : Carotenoid and Glycerol Production by the Green Algae Dunaliella Isolated from the Gave-Khooni Salt Marsh, Iran. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**(5), 540–544.

Han, M. Y., Park, Y. H., & Yu, T. J. 2002. Development of a new method of measuring bubble size. *Pages 77–83 of : 2nd World Water Congress : Drinking Water Treatment*, vol. 2. London : I W a Publishing. WOS :000176510900010.

Hanotu, James, Bandulasena, H.C. Hemaka, & Zimmerman, William B. 2012. Microflotation performance for algal separation. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**(7), 1663–1673.

Harun, R., Singh, M., Forde, G. M, & Danquah, M. K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**(3), 1037–1047.

Harvie, Charles E., & Weare, John H. 1980. The prediction of mineral solubilities in natural waters : the Na-K-Mg-Ca-Cl-SO4-H2O system from zero to high concentration at 25degree Celcius. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **44**(7), 981–997.

Harvie, Charles E, MÃŸller, Nancy, & Weare, John H. 1984. The prediction of mineral solubilities in natural waters : The Na-K-Mg-Ca-H-Cl-SO4-OH-HCO3-CO3-CO2-H2O system to high ionic strengths at 25ÂřC. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **48**(4), 723–751.

Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T., & Foulkes, L. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. *Aquaculture Research*, **31**(8-9), 637–659.

Heinanen, J., Jokela, P., & Peltokangas, J. 1992. Experimental studies on the kinetics of flotation. *Chemical Water and Wastewater Treatment II*, 247–262.

Hejazi, M A, Holwerda, E, & Wijffels, R H. 2004. Milking microalga Dunaliella salina for beta-carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **85**(5), 475–481. PMID : 14760687.

Henderson, R., Parsons, S. A, & Jefferson, B. 2008. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae. *Water Research*, **42**(8-9), 1827–1845.

Henderson, R. K, Parsons, S. A, & Jefferson, B. 2009. The Potential for Using Bubble Modification Chemicals in Dissolved Air Flotation for Algae Removal. *Separation Science and Technology*, **44**(9), 1923–1940.

Hogg, R. 2000. Flocculation and dewatering. *International Journal of Mineral Processing*, **58**(1-4), 223–236.

Horiuchi, J. I, Ohba, I., Tada, K., Kobayashi, M., Kanno, T., & Kishimoto, M. 2003. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga Dunaliella tertiolecta with pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **95**(4), 412–415.

Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. 2009. Dunaliella biotechnology : methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, **107**(1), 14–35.

Hosseini Tafreshi, Ali, & Shariati, Mansour. 2006. Pilot culture of three strains of Dunaliella salina for beta-carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **22**(9), 1003–1006.

Houdart, M. 1973. Contribution a l'etude de quelques proprietes physiques de la surface des oceans : tension superficielle, evaporation. *Th. Univ. Paris VI*, 68.

Huang, G. H, Chen, F., Wei, D., Zhang, X. W, & Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, **87**(1), 38–46.

Huang, Z., Legendre, D., & Guiraud, P. 2011. A new experimental method for determining particle capture efficiency in flotation. *Chemical Engineering Science*, **66**(5), 982–997.

Huang, Z., Legendre, D., & Guiraud, P. 2012. Effect of interface contamination on particle-bubble collision. *Chemical Engineering Science*, **68**(1), 1–18.

Huesemann, Michael H., & Benemann, John R. 2009. Biofuels from Microalgae : Review of Products, Processes and Potential, with Special Focus on Dunaliella Sp. *Pages 445—474 of : The alga Dunaliella.*

Hung, M. T, & Liu, J. C. 2006. Microfiltration for separation of green algae from water. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **51**(2), 157–164.

Jin, E. S, & Melis, A. 2003. Microalgal biotechnology : Carotenoid production by the green algae Dunaliella salina. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **8**(6), 331–337.

Johnson, M. B, & Wen, Z. Y. 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**(3), 525–534.

Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A, Embirucu, M., & Ghirardi, M. L. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource technology*, **101**(4), 1406–1413.

Kanel, Jeffrey Scott, & Guelcher, Scott Arthur. 1998 (July). *Method for cross flow microfiltration of microalgae in the absence of flocculating agents.* Brevet WO9828403 (A1).

Kashyap, S., Sundararajan, A., & Ju, L. K. 1998. Flotation characteristics of cyanobacterium Anabaena flos-aquae for gas vesicle production. *Biotechnology and Bioengineering*, **60**(5), 636–641.

Katz, A., Waridel, P., Shevchenko, A., & Pick, U. 2007. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga Dunaliella salina as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**(9), 1459–1472.

Kim, Dong-Geol, La, Hyun-Joon, Ahn, Chi-Yong, Park, Yong-Ha, & Oh, Hee-Mock. 2011. Harvest of Scenedesmus sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. *Bioresource technology*, **102**(3), 3163–3168.

Kim, S. G, Choi, A., Ahn, C. Y, Park, C. S, Park, Y. H, & Oh, H. M. 2005. Harvesting of Spirulina platensis by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in Applied Microbiology*, **40**(3), 190–194.

Kleinegris, Dorinde M. M., van Es, Marjon A., Janssen, Marcel, Brandenburg, Willem A., & Wijffels, Rene H. 2011a. Phase toxicity of dodecane on the microalga Dunaliella salina. *Journal of Applied Phycology*, **23**(6), 949–958.

Kleinegris, Dorinde M M, Janssen, Marcel, Brandenburg, Willem A, & Wijffels, Rene H. 2011b. Two-phase systems : potential for in situ extraction of microalgal products. *Biotechnology advances*, **29**(5), 502–507. PMID : 21689738.

Knuckey, R. M, Brown, M. R, Robert, R., & Frampton, D. M. F. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, **35**(3), 300–313.

Koopman, B., & Lincoln, E. P. 1983. Autoflotation harvesting of algae from high-rate pond effluents. *Agricultural Wastes*, **5**(4), 231–246.

Lamers, Packo P., van de Laak, Carlien C.W., Kaasenbrood, Petrouchka S., Lorier, Jeroen, Janssen, Marcel, De Vos, Ric C.H., Bino, Raoul J., & Wijffels, RenÃĽ H. 2010. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed Dunaliella salina. *Biotechnology and Bioengineering*, **106**(4), 638âĂŞ648.

Lavoie, A., & Delanoue, J. 1987. Harvesting of scenedesmus-obliquus in wastewaters - autoflocculation or bioflocculation. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**(7), 852–859.

Lavoie, A., Delanoue, J., & Serodes, J. B. 1984. Harvesting of microalgae from wastewaters - comparative-study of different flocculation agents. *Canadian Journal of Civil Engineering*, **11**(2), 266–272.

Lazar, B., Starinsky, A., Katz, A., Sass, E., & Ben-Yaakov, S. 1983. The Carbonate System in Hypersaline Solutions : Alkalinity and CaCO3 Solubility of Evaporated Seawater. *Limnology and Oceanography*, **28**(5), 978–986.

Lee, A. K, Lewis, D. M, & Ashman, P. J. 2009. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, **21**(5), 559–567.

Lee, A. K, Lewis, D. M, & Ashman, P. J. 2010. Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. *Chemical Engineering Research & Design*, **88**(8A), 988–996.

Lee, S. J, Kim, S. B, Kim, J. E, Kwon, G. S, Yoon, B. D, & Oh, H. M. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga Botryococcus braunii. *Letters in Applied Microbiology*, **27**(1), 14–18.

Lee, Y. K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods : Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, **13**(4), 307–315.

Leentvaar, J., & Rebhun, M. 1982. Effect of magnesium and calcium precipitation on coagulation-flocculation with lime. *Water Research*, **16**(5), 655–662.

Legendre, D., Sarrot, V., & Guiraud, P. 2009. On the particle inertia-free collision with a partially contaminated spherical bubble. *International Journal of Multiphase Flow*, **35**(2), 163–170.

Levin, G. V, Gibor, A., Clendenning, J. R, & Bogar, F. D. 1962. Harvesting of algae by froth flotation. *Applied Microbiology*, **10**(2), 169–175.

Li, Z.H., Kuba, T., & Kusuda, T. 2006. The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**(5), 670–674.

Liang, H., Nan, J., He, W. J, & Li, G. 2009. Algae removal by ultrasonic irradiation-coagulation. *Desalination*, **239**(1-3), 191–197.

Lichtenthaler, Hartmut K. 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids : Pigments of photosynthetic biomembranes. *Pages 350–382 of :* Lester Packer, Roland Douce (ed), *Methods in Enzymology*. Plant Cell Membranes, vol. Volume 148. Academic Press.

Liska, A. J, Shevchenko, A., Pick, U., & Katz, A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in Dunaliella as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiology*, **136**(1), 2806–2817.

Liu, Jian-guo, & Bourne, W.F. 1999. Dynamic studies on flagellar regeneration in Dunaliella salina. *Chinese journal oceanol. limnol*, **17**(3), 200–206.

Liu, Jiexia, Zhu, Yi, Tao, Yujun, Zhang, Yuanming, Li, Aifen, Li, Tao, Sang, Ming, & Zhang, Chengwu. 2013. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnology for biofuels*, **6**(1), 98.

Liu, Shan-pei, Wang, Qi-shan, He, Wen-jie, Han, Hong-da, Fan, Xue-hong, & Geng, Tian-jia. 2007. Comparison of dissolved air flotation and sedimentation in treatment of typical north china source water. *The chinese journal of process engineering*, **7**(2).

Loeblich, L. A. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light-intensity and salinity in the halophile Dunaliella-salina (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **62**(3), 493–508.

Malcata, F. Xavier. 2011. Microalgae and biofuels : A promising partnership ? *Trends in Biotechnology*, **29**(11), 542–549.

Markham, L., Porter, M., & Schofield, T. 1997. Algae and Zooplankton Removal by Dissolved Air Flotation at Severn Trent Ltd. Surface Water Treatment Works. *Pages 112–119 of : Proceedings CIWEM Dissolved Air Flotation International Conference, April.*

Markou, Giorgos, Chatzipavlidis, Iordanis, & Georgakakis, Dimitris. 2012. Carbohydrates Production and Bio-flocculation Characteristics in Cultures of Arthrospira (Spirulina) platensis : Improvements Through Phosphorus Limitation Process. *Bioenergy Research*, **5**(4), 915–925.

Martin del Campo, Julia S., & Patino, Rodrigo. 2013. Harvesting microalgae cultures with superabsorbent polymers : Desulfurization of Chlamydomonas reinhardtii for hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, **110**(12), 3227âĂŞ3234.

Massyuk, N. P. 1965. Effect of Na, Mg, Cl and SO4 ions on growth, reproduction and carotene production in Dunaliella salina Teod. *Ukr Bot*, **22**, 3âĂŞ11.

Mata, T. M, Martins, A. A, & Caetano, N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(1), 217–232.

McLachlan, J. 1960. The culture of Dunaliella tertiolecta Butcher-a euryhaline organism. *Canadian Journal of Microbiology*, **6**(3), 367–379.

Meier, R. L. 1955. *Biological cycles in the transformation of solar energy into useful fuels.* Madison University Wisconsin Press.

Melis, A. 2009. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis : Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, **177**(4), 272–280.

Melis, A., Neidhardt, J., & Benemann, J. R. 1998. Dunaliella salina (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, **10**(6), 515–525.

Metting, F. B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **17**(5-6), 477–489.

Millard, R.C., & Seaver, G. 1990. An index of refraction algorithm for seawater over temperature, pressure, salinity, density, and wavelength. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, **37**(12), 1909–1926.

Mishra, A., & Jha, B. 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae Dunaliella salina under salt stress. *Bioresource Technology*, **100**(13), 3382–3386.

Mishra, A., Mandoli, A., & Jha, B. 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of Dunaliella salina isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**(10), 1093–1101.

Mishra, A., Kumari, K., & Jha, B. 2010. Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae Dunaliella salina. *Carbohydrate Polymers*.

Moheimani, N. R, & Borowitzka, M. A. 2006. The long-term culture of the coccolithophore Pleurochrysis carterae (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology*, **18**(6), 703–712.

Molina Grima, E., Belarbi, E. H, Acien Fernandez, F. G, Robles Medina, A., & Chisti, Yusuf. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites : process options and economics. *Biotechnol Adv*, **20**(7-8), 491–515.

Mollah, M. Y. A, Morkovsky, P., Gomes, J. A. G, Kesmez, M., Parga, J., & Cocke, D. L. 2004. Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*, **114**(1-3), 199–210.

Morineau-Thomas, O., Jaouen, P., & Legentilhomme, P. 2002. 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**(1), 35–42.

Moulton, T. P, Borowitzka, L. J, & Vincent, D. J. 1987. the mass-culture of Dunaliella-salina for beta-carotene - from pilot-plant to production plant. *Hydrobiologia*, **151**, 99–105.

Munoz, J., Mudge, S. M, & Sandoval, A. 2004. Effects of ionic strength on the production of short chain volatile hydrocarbons by Dunaliella salina (Teodoresco). *Chemosphere*, **54**(8), 1267–1271.

Negoro, Masaaki, Shioji, Norio, Ikuta, Yoshiaki, Makita, Takenori, & Uchiumi, Makoto. 1992. Growth characteristics of microalgae in high-concentration co2 gas, effects of culture medium trace components, and impurities thereon. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **34-35**(1), 681–692.

Oh, H. M, Lee, S. J, Park, M. H, Kim, H. S, Kim, H. C, Yoon, J. H, Kwon, G. S, & Yoon, B. D. 2001. Harvesting of Chlorella vulgaris using a bioflocculant from Paenibacillus sp AM49. *Biotechnology Letters*, **23**(15), 1229–1234.

Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**(2), 334–348.

Oren, Aharon. 2005. A hundred years of Dunaliella research : 1905-2005. *Saline Systems*, **1**, 2.

Oseen, C. W. 1910. Stokes' Formula and a Related Theorem in Hydrodynamics. *Arkiv. Mat. Astron. Fysik*, **6**, 20.

Oswald, W. J. 1991. Introduction to advanced integrated waste-water ponding systems. *Water Science and Technology*, **24**(5), 1–7.

Pahl, Stephen L., Lee, Andrew K., Kalaitzidis, Theo, Ashman, Peter J., Sathe, Suraj, & Lewis, David M. 2013. Harvesting, Thickening and Dewatering Microalgae Biomass. *Pages 165–185 of :* Borowitzka, Michael A., & Moheimani, Navid R. (eds), *Algae for Biofuels and Energy.* Developments in Applied Phycology, no. 5. Springer Netherlands.

Park, Don-Hee, Ruy, Hwa-Won, Lee, Ki-Young, Kang, Choon-Hyoung, Kim, Tae-Ho, & Lee, Hyeon-Yong. 1998. The Production of Hydrocarbons from Photoautotrophic Growth of Dunaliella salina 1650. *Pages 739–746 of :* Finkelstein, Mark, & Davison, Brian H. (eds), *Biotechnology for Fuels and Chemicals.* Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press.

Parkhurst, David L., & Appelo, C.A.J. 2013. Description of input and examples for PHREEQC Version 3 - A computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. *U.S. Geological Survey Techniques and Methods*, **6**(A43), 497.

Parkhurst, David L., Thorstenson, Donald C., & Plummer, L. Niel. 1980. PHREEQE- A Computer Program for Geochemical Calculations. *NTIS, SPRINGFIELD, VA, 1980, 218.*

Petrusevski, B., Bolier, G., Vanbreemen, A. N, & Alaerts, G. J. 1995. Tangential flow filtration - a method to concentrate fresh-water algae. *Water Research*, **29**(5), 1419–1424.

Petrusevski, B., vanBreemen, A. N, & Alaerts, G. 1996. Effect of permanganate pre-treatment and coagulation with dual coagulants on algae removal in direct filtration. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, **45**(6), 316–326.

Phoochinda, W., & White, D. A. 2003. Removal of algae using froth flotation. *Environmental Technology*, **24**(1), 87–96.

Pieterse, A. J. H., & Cloot, A. 1997. Algal cells and coagulation, flocculation and sedimentation processes. *Water Science and Technology*, **36**(4), 111–118.

Pittman, Jon K., Dean, Andrew P., & Osundeko, Olumayowa. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, **102**(1), 17–25.

Pitzer, Kenneth S. 1973. Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. *The Journal of Physical Chemistry*, **77**(2), 268–277.

Pitzer, Kenneth S. 1975. Thermodynamics of electrolytes. V. Effects of higher-order electrostatic terms. *Journal of Solution Chemistry*, **4**(3), 249–265.

Pitzer, Kenneth S., & Kim, Janice J. 1974. Thermodynamics of electrolytes. IV. Activity and osmotic coefficients for mixed electrolytes. *Journal of the American Chemical Society*, **96**(18), 5701–5707.

Pitzer, Kenneth S., & Mayorga, Guillermo. 1973. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *The Journal of Physical Chemistry*, **77**(19), 2300–2308.

Pitzer, Kenneth S., & Mayorga, Guillermo. 1974. Thermodynamics of electrolytes. III. Activity and osmotic coefficients for 2-2 electrolytes. *Journal of Solution Chemistry*, **3**(7), 539–546.

Plummer, L. Niel, Parkhurst, D. L., Fleming, G. W., & Dunkle, S. A. 1988. *A computer program incorporating Pitzer's equations for calculation of geochemical reactions in brines*. Department of the Interior, US Geological Survey.

Poelman, E., DePauw, N., & Jeurissen, B. 1997. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Resources Conservation and Recycling*, **19**(1), 1–10.

Pokrovsky, Oleg S., & Schott, Jacques. 2004. Experimental study of brucite dissolution and precipitation in aqueous solutions : surface speciation and chemical affinity control. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**(1), 31–45.

Polle, J. E. W., Tran, D., & Ben-Amotz, A. 2009. History, distribution, and habitats of algae of the genus Dunaliella Teodoresco (Chlorophyceae). *The Alga Dunaliella : Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology*, 1âĂŞ14.

Post, F. J, Borowitzka, L. J, Borowitzka, M. A, Mackay, B., & Moulton, T. 1983. The protozoa of a western australian hypersaline lagoon. *Hydrobiologia*, **105**(SEP), 95–113.

Pragya, Namita, Pandey, Krishan K., & Sahoo, P.K. 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **24**(Aug.), 159–171.

Pulz, O., & Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**(6), 635–648.

Rabbani, Said, Beyer, Peter, Lintig, Johannes v, Hugueney, Philippe, & Kleinig, Hans. 1998. Induced Îš-Carotene Synthesis Driven by Triacylglycerol Deposition in the Unicellular Alga Dunaliella bardawil. *Plant Physiology*, **116**(4), 1239–1248. PMID : 9536040.

Radaelli, Guido, Fleischer, Daniel, Vick, Bertrand, Caspari, Matthew, Weissman, Joseph, & Rice, David. 2009. *Methods for concentrating microalgae.* Brevet US20090162919.

Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. 2007. Exploitation of Dunaliella for beta-carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**(3), 517–523.

Rao, S. D. V. 2009. Cultivation, growth media, division rates and applications of Dunaliella species. *India : Science Pubublishers.*

Rashid, Naim, Rehman, Saif Ur, & Han, Jong-In. 2013a. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochemistry*, **48**(7), 1107–1110.

Rashid, Naim, Rehman, Muhammad Saif Ur, & Han, Jong-In. 2013b. Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga Chlorella vulgaris. *Chemical Engineering Journal*, **226**(June), 238–242.

Rene, Francois, Lemarie, Gilles, Champagne, Jean-Yves, & Morel, Robert. 2008. *Procede et installation de traitement d'un effluent aqueux, en vue d'en extraire au moins un compose gazeux dissous ; application a l'aquaculture en milieu aqueux recircule.* Brevet FR2914296.

Riano, B., Molinuevo, B., & Garcia-Gonzalez, M.C. 2012. Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology. *Ecological Engineering*, **38**(1), 110–113.

Rodrigues, R.T., & Rubio, J. 2003. New basis for measuring the size distribution of bubbles. *Minerals Engineering*, **16**(8), 757–765.

Rosenberg, J. N, Oyler, G. A, Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J. 2008. A green light for engineered algae : redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**(5), 430–436.

Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, **9**(1), 29–33.

Rossi, N., Petit, I., Jaouen, P., Legentilhomme, P., & Derouiniot, M. 2005. Harvesting of cyanobacterium Arthrospira platensis using inorganic filtration membranes. *Separation science and technology*, **40**(15), 3033–3050.

Rossignol, N., Vandanjon, L., Jaouen, P., & Quemeneur, F. 1999. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium : compared performances of cross-flow microfiltration and ultra-filtration. *Aquacultural Engineering*, **20**(3), 191–208.

Ruane, Michael. 1976. *Recovery of algae from brine suspensions.* Brevet AU486999.

Rubio, J., Souza, M. L, & Smith, R. W. 2002. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. *Minerals Engineering*, **15**(3), 139–155.

Rykaart, E.M., & Haarhoff, J. 1995. Behaviour of air injection nozzles in dissolved air flotation. *Water Science and Technology*, **31**(3-4), 25–35.

Saidam, M. Y., & Butler, D. 1996. Algae Removal by Horizontal Flow Rock Filters. *Advances in Slow Sand and Alternative Biological Filtration. John Wiley & Sons Ltda, Inglaterra*, 327–340.

Salim, S., Bosma, R., Vermue, M. H., & Wijffels, R. H. 2011. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of applied phycology*, **23**(5), 849–855.

Salim, S., Vermue, M. H., & Wijffels, R. H. 2012. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. *Bioresource technology*, **118**(Aug.), 49–55.

Salim, S., Gilissen, L., Rinzema, A., Vermue, M.H., & Wijffels, R.H. 2013. Modeling microalgal flocculation and sedimentation. *Bioresource Technology*, **144**(Sept.), 602–607.

Sarrot, V., Guiraud, P., & Legendre, D. 2005. Determination of the collision frequency between bubbles and particles in flotation. *Chemical Engineering Science*, **60**(22), 6107–6117.

Sarrot, V., Huang, Z., Legendre, D., & Guiraud, P. 2007. Experimental determination of particles capture efficiency in flotation. *Chemical Engineering Science*, **62**(24), 7359–7369.

Schlesinger, Ami, Eisenstadt, Doron, Einbinder, Shai, & Gressel, Jonathan. 2011 (July). *Method and system for efficient harvesting of microalgae and cyanobacteria.*

Schlesinger, Ami, Eisenstadt, Doron, Bar-Gil, Amicam, Carmely, Hilla, Einbinder, Shai, & Gressel, Jonathan. 2012. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories ; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances*, **30**(5), 1023–1030.

Schlipalius, L. 1991. The extensive commercial cultivation of Dunaliella-salina. *Bioresource Technology*, **38**(2-3), 241–243.

Semerjian, L, & Ayoub, GM. 2003. High-pH magnesium coagulation-flocculation in wastewater treatment. *Advances in Environmental Research*, **7**(2), 389–403.

Sheehan, J. 1998. *A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program : Biodiesel from algae.* Vol. 328. National Renewable Energy Laboratory.

Shelef, G., Soeder, C.J., Balaban, M., (Israel), Mo çŹŐ tsah ha-le çŢŁ mit le-me éĹĆéĹĕ ar ule-fitua éĹĆ, & Umweltforschung, Gesellschaft f éŚĕ r Strahlen- und. 1980. *Algae biomass : production and use.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Shelef, G., Sukenik, A., & Green, M. 1984. *Microalgae harvesting and processing : a literature review.* Tech. rept. Technion Research and Development Foundation Ltd., Haifa (Israel).

Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*, **27**(4), 409–416.

Sim, T. S, Goh, A., & Becker, E. W. 1988. Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae. *Biomass*, **16**(1), 51–62.

Sing, Sophie Fon, Isdepsky, Andreas, Borowitzka, Michael A., & Moheimani, Navid Reza. 2013. Production of biofuels from microalgae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **18**(1), 47–72.

Sirin, Sema, Trobajo, Rosa, Ibanez, Carles, & Salvado, Joan. 2012. Harvesting the microalgae Phaeodactylum tricornutum with polyaluminium chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *Journal of Applied Phycology*, **24**(5), 1067–1080.

Spilling, Kristian, Seppala, Jukka, & Tamminen, Timo. 2011. Inducing autoflocculation in the diatom Phaeodactylum tricornutum through CO2 regulation. *Journal of Applied Phycology*, **23**(6), 959–966.

Stander, G. J., & Van Vuuren, L. R. J. 1969. The reclamation of potable water from wastewater. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **41**(3), 355–367.

Stephens, Evan, Ross, Ian L, Mussgnug, Jan H, Wagner, Liam D, Borowitzka, Michael A, Posten, Clemens, Kruse, Olaf, & Hankamer, Ben. 2010. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Sci*, **15**(10), 554–64.

Sukenik, A., & Shelef, G. 1984. Algal autofloculation - verification and proposed mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**(2), 142–147.

Sukenik, A., Bilanovic, D., & Shelef, G. 1988. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. *Biomass*, **15**(3), 187–199.

Suresh Kumar, Anita, Mody, Kalpana, & Jha, Bhavanath. 2007. Bacterial exopolysaccharides âĂŞ a perception. *Journal of Basic Microbiology*, **47**(2), 103–117.

Tadros, Mahasin G. 1985. *Screening and characterizing oleaginous microalgal species from the southeastern United States.* Subcontract Report SERI/STR-231-2657. Aquatic Species Program.

Takagi, M., Karseno, & Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**(3), 223–226.

Teixeira, M. R, & Rosa, M. J. 2006. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of Microcystis aeruginosa Part 1 : The key operating conditions. *Separation and Purification Technology*, **52**(1), 84–94.

Tenney, M. W, Echelber, Wf, Schuessl, Rg, & Pavoni, J. L. 1969. Algal flocculation with synthetic organic polyelectrolytes. *Applied Microbiology*, **18**(6), 965–971.

Terry, K. L, & Raymond, L. P. 1985. System-design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, **7**(10), 474–487.

Tornabene, T.G., Holzer, G., & Peterson, S.L. 1980. Lipid profile of the halophilic alga, Dunaliella salina. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **96**(3), 1349–1356.

Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K, Forde, G. M, & Hoadley, A. 2010. Dewatering of microalgal cultures : A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, **2**(1).

Uduman, Nyomi, Bourniquel, Vivien, Danquah, Michael K., & Hoadley, Andrew F.A. 2011. A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, **174**(1), 249–257.

Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *Journal of Applied Phycology*, **22**(4), 525–530.

Vandamme, D., Pontes, S. C. V., Goiris, K., Foubert, I., Pinoy, L. J. J., & Muylaert, K. 2011. Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. *Biotechnology and bioengineering*, **108**(10), 2320–2329.

Vandamme, Dries, Foubert, Imogen, Fraeye, Ilse, Meesschaert, Boudewijn, & Muylaert, Koenraad. 2012. Flocculation of Chlorella vulgaris induced by high pH : Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, **105**(0), 114–119.

Vandamme, Dries, Foubert, Imogen, & Muylaert, Koenraad. 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, **31**(4), 233–239.

Vandanjon, L., Rossignol, N., Jaouen, P., Robert, J. M., & Quemeneur, F. 1999. Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **63**(1), 1–9.

Viecelli, J. A. 1984. Analysis of a relationship between the vertical distribution of inorganic carbon and biological productivity in the oceans. *Journal of Geophysical Research : Oceans*, **89**(C5), 8194–8196.

Vorst, P., Baard, R. L, Mur, L. R, Korthals, H. J, & van den Ende, H. 1994. Effect of growth arrest on carotene accumulation and photosynthesis in Dunaliella. *Microbiology*, **140**(6), 1411.

Wang, Zhaowei, Hou, Jing, Bowden, Dustin, & Belovich, Joanne M. 2013. Evaluation of an Inclined Gravity Settler for Microalgae Harvesting. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, In press.

Wayne, R., Kadota, A., Watanabe, M., & Furuya, M. 1991. Photomovement in Dunaliella salina : fluence rate-response curves and action spectra. *Planta*, **184**(4), 515–524.

Wiley, P. E, Brenneman, K. J, & Jacobson, A. E. 2009. Improved Algal Harvesting Using Suspended Air Flotation. *Water Environment Research*, **81**(7), 702–708.

Wiley, Patrick E, Campbell, J. Elliott, & McKuin, Brandi. 2011. Production of Biodiesel and Biogas from Algae : A Review of Process Train Options. *Water Environment Research*, **83**(Apr.), 326–338.

Wu, Zechen, Zhu, Yi, Huang, Weiya, Zhang, Chengwu, Li, Tao, Zhang, Yuanming, & Li, Aifen. 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource technology*, **110**(Jan.), 496–502.

Xu, Han, Miao, Xiaoling, & Wu, Qingyu. 2006. High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, **126**(4), 499–507.

Xu, Yanan, Purton, Saul, & Baganz, Frank. 2013. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga Chlorella sorokiniana. *Bioresource Technology*, **129**(Feb.), 296–301.

Yahi, H., Elmaleh, S., & Coma, J. 1994. Algal flocculation-sedimentation by pH increase in a continuous reactor. *Water Science and Technology*, **30**(8), 259–267.

Zhang, G. M, Zhang, P. Y, & Fan, M. H. 2009. Ultrasound-enhanced coagulation for Microcystis aeruginosa removal. *Ultrasonics Sonochemistry*, **16**(3), 334–338.

Zhang, Jianguo, & Hu, Bo. 2012. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresource Technology*, **114**(June), 529–535.

Zhang, Tianxi, & Crowell, Richard. 2011 (Oct.). *Compositions and methods for continuous harvesting of suspension growth cultures*. Brevet US20110263002.

Zhang, X. Z, Hu, Q., Sommerfeld, M., Puruhito, E., & Chen, Y. S. 2010. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresource Technology*, **101**(14), 5297–5304.

Zhang, Xuezhi, Amendola, Pasquale, Hewson, John C., Sommerfeld, Milton, & Hu, Qiang. 2012. Influence of growth phase on harvesting of Chlorella zofingiensis by dissolved air flotation. *Bioresource Technology*, **116**(0), 477–484.

Zhu, C. J., & Lee, Y. K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, **9**(2), 189–194.

Zimmerman, William B., Zandi, Mohammad, Hemaka Bandulasena, H.C., Tesar, Vaclav, James Gilmour, D., & Ying, Kezhen. 2011. Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae Dunaliella salina. *Applied Energy*, **88**(10), 3357–3369.