



**HAL**  
open science

# Etude et optimisation de bioaccumulation de $Mg^{2+}$ dans les microalgues “ *Chlorella vulgaris* ”

Hela Ben Amor

► **To cite this version:**

Hela Ben Amor. Etude et optimisation de bioaccumulation de  $Mg^{2+}$  dans les microalgues “ *Chlorella vulgaris* ”. Autre. Université Paris Saclay (COMUE); Université de Sfax (Tunisie), 2015. Français. NNT : 2015SACLC004 . tel-01281323

**HAL Id: tel-01281323**

**<https://theses.hal.science/tel-01281323v1>**

Submitted on 16 Mar 2016

**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.

NNT :2015SACL004



CentraleSupélec

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
ET DE  
L'UNIVERSITE DE SFAX

PREPAREE A L'ECOLE CENTRALESUPELEC PARIS

ÉCOLE DOCTORALE N° 579

Sciences Mécaniques et Energétiques, Matériaux et Géosciences

Spécialité de doctorat : Génie des procédés

Par

**Mme Hela Ben Amor Ben Ayed**

Etude et optimisation de la bioaccumulation de magnésium dans les microalgues  
« *Chlorella vulgaris* »

**Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 26 Octobre 2015 :**

**Composition du jury:**

M. P. Perré	Directeur de laboratoire, Université Paris Saclay	Président
M. J. Pruvost	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M. S. Maalej	Professeur, Université de Sfax	Examinateur
Mme. D. Pareau	Professeur émérite, Université Paris-Saclay	Examinatrice
M. M. Stambouli	Professeur, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
M. H. Ayadi	Professeur, Université de Sfax	Co-directeur de thèse
M. B. Taidi	Professeur, Université Paris –Saclay	Co-directeur de thèse
M. R. Reynaud	Directeur de recherche et développement, Soliance	Invité

**Titre :** Etude et optimisation de la bioaccumulation de magnésium dans les microalgues « *Chlorella vulgaris* »

**Mots clés :** *Chlorella vulgaris*, bioréacteur, magnésium ( $Mg^{2+}$ ), bioaccumulation,  $Mg^{2+}$  adsorbé,  $Mg^{2+}$  absorbé

**Résumé :** Des cultures de *Chlorella vulgaris* ont été réalisées en triplicata sur de longues périodes (15-30 jours) en autotrophie et en mixotrophie afin d'étudier l'effet de  $Mg^{2+}$  sur les microalgues et déterminer sa concentration dans la biomasse au cours de la croissance. Différentes concentrations ont été testées (de 8.9 à 465  $mg\ L^{-1}$ ). Ceci a montré que le  $Mg^{2+}$  n'est pas toxique pour les algues à des concentrations élevées provoquant habituellement l'inhibition de la croissance dans le cas d'autres ions divalents (métaux lourds). Des bilans matière ont été établis et vérifiés avec une précision satisfaisante (écart moyen de 90%). La quantité de  $Mg^{2+}$  bioaccumulée augmente avec la concentration initiale de  $Mg^{2+}$  du milieu de culture. Une saturation en  $Mg^{2+}$  intracellulaire a été observée à partir d'environ 45  $mg$  de  $Mg^{2+}\ L^{-1}$ . Typiquement, la répartition entre le  $Mg^{2+}$

extracellulaire et intracellulaire est de 18% contre 51% dans le bioréacteur (5L) pour une concentration initiale de 16  $mg\ L^{-1}$ . En mixotrophie (addition de 10  $g\ L^{-1}$  de glucose), une production de biomasse significativement plus importante et plus rapide que celle en autotrophie a été observée. En revanche, la quantité de  $Mg^{2+}$  accumulée dans les cellules est plus importante en autotrophie qu'en mixotrophie. Des mesures de chlorophylle *a*, de nitrate et de glucose ont été également réalisées. Afin de comprendre la cinétique relativement complexe de bioaccumulation du  $Mg^{2+}$ , un modèle cinétique original a été élaboré couplant transfert (externe, membrane, interne) et réactions (ad/absorption) en milieu hétérogène. Le modèle a été validé expérimentalement. Il permet de rendre compte au mieux de l'ensemble des résultats obtenus.

**Title :** Bioaccumulation of  $Mg^{2+}$  by microalgae under different culture condition

**Keywords :** *Chlorella vulgaris*, bioreactor, magnesium ( $Mg^{2+}$ ), uptake, adsorbed  $Mg^{2+}$ , absorbed  $Mg^{2+}$

**Abstract** *Chlorella vulgaris* cultures were grown in triplicate over 15-30 days under autotrophic or mixotrophic conditions in order to study  $Mg^{2+}$  uptake and accumulation into the biomass. The concentrations of  $Mg^{2+}$  tested were 8.9 to 465  $mg\ L^{-1}$ . The results showed that  $Mg^{2+}$  is not toxic to *C. vulgaris* even at 465  $mg\ L^{-1}$  which is not the case for other divalent ions (especially heavy metals). The mass balances for  $Mg^{2+}$  accumulation were determined for the cultures and were confirmed to an average of 90%. Beyond 46.1  $mg$  of  $Mg^{2+}\ L^{-1}$  in the culture medium, the cells became saturated at 4  $mg$  of  $Mg^{2+}$  absorbed per g of dry biomass.

In the bioreactor (5L), at an initial  $Mg^{2+}$  concentration of 16  $mg\ L^{-1}$ , the cells accumulated 69% of the initial concentration, in which 18% was adsorbed and 51% absorbed. The chlorophyll *a*, nitrate and glucose concentrations were measured during the experiments. Under mixotrophic conditions (glucose 10  $g\ L^{-1}$ ), a greater and faster biomass production was obtained than under autotrophic conditions. The  $Mg^{2+}$  bioaccumulation was higher in the autotrophic rather than the mixotrophic phase. In order to understand the kinetics of  $Mg^{2+}$  uptake, an original kinetic model was developed coupling the transfer and reaction phenomena in heterogeneous media. This model was confirmed experimentally.



## *Remerciements*

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, professeur Moncef Stambouli. Sa haute compétence, ses qualités humaines et ses conseils judicieux ont été pour moi une source inestimable de réconfort et d'encouragement pour l'accomplissement de ce travail. Je le remercie pour avoir dirigé mes recherches et pour les longues journées passées à m'expliquer les rudiments de la modélisation et l'interprétation pertinente des résultats. Qu'il soit assuré pour tout cela de ma profonde reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie sincèrement le professeur Behnam TAIDI pour avoir accepté de co-diriger ma thèse. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour les conseils enrichissants aux plans théorique et pratique dans le domaine de la biologie et pour la correction de mon anglais. Sa disponibilité et son soutien m'ont été d'un grand apport dans l'accomplissement de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement le professeur Habib Ayadi mon co-directeur de thèse. Il m'a permis de réaliser ce travail de recherche. Je le remercie pour toutes ses qualités humaines, son appui, son soutien et ses conseils précieux ainsi que pour son aide scientifique.

Je souhaite remercier particulièrement le professeur Dominique Pareau pour sa précieuse contribution à ce travail de recherche. J'ai eu le privilège de bénéficier tant de sa rigueur que de sa richesse scientifique et de sa grande expérience dans le domaine de modélisation et génie des bioprocédés pour mener à terme cette thèse. Je la remercie pour son appui, son soutien et sa persévérance.

J'exprime également toute ma gratitude au Professeur Jérémy Pruvost et au professeur Abdelhafidh Dhouib qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier professeur Patrick Perré directeur du laboratoire de génie des procédés et matériaux à Centralesupélec Paris, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour sa participation au jury de cette thèse.

Je remercie également professeur Sami Maalej directeur de l'école doctorale à la faculté des sciences de Sfax pour sa participation au jury de cette thèse.

Je souhaite remercier vivement Monsieur Romain Reynaud, directeur R&D de la société Soliance, pour sa contribution scientifique, ses qualités humaines et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Madame Filipa Lopes pour sa contribution intéressante lors de la première année de cette thèse, pour ses qualités humaines et sa richesse scientifique dans le monde des microalgues.

Un grand merci à Cyril Breton pour son apport pertinent à la bonne réalisation de ces travaux de recherche et toujours dans la bonne humeur ! Merci à Thierry pour son aide technique aux nombreux problèmes rencontrés lors des expérimentations.

Je remercie également Vincent Butin pour la bonne humeur, la disponibilité et l'aide si précieuse que tu m'as procuré durant toutes les analyses réalisées sur le spectre d'absorption atomique et sur la chromatographie ionique.

Ces années n'auraient pas été les mêmes si elles n'avaient pas été partagées avec d'autres thésards et chercheurs. Merci à Jordan, Pierre, Cédric, Marine, Nadine, Clément et Rayen. Un grand merci à Vanessa pour ton amitié, ton soutien et pour les bons moments qu'on a passé ensemble. C'était vraiment un plaisir de partager le bureau avec toi.

J'adresse ma profonde gratitude envers les différents membres de l'équipe du laboratoire du Génie des Procédés et Matériaux de CentraleSupélec Paris.

Mes meilleures pensées s'adressent à mes parents à qui je dois ma réussite. Les mots sont peu de choses pour exprimer ma reconnaissance. Je leur dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection. Je n'en serais sûrement pas arrivée là sans mon mari qui m'a soutenue et accepté mon choix de me tourner vers un parcours scientifique. Merci pour ton aide et tes sacrifices que tu as consentis pour m'assurer un environnement favorable afin de poursuivre mes travaux de recherche.

Un grand merci pour ma petite princesse Eya, sa joie de vivre, son sourire et son amour étaient un grand réconfort pour moi pendant les moments difficiles vécus durant ces années de thèse.

Tous mes remerciements s'adressent à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Bibliographie.....	5
1 Généralités sur les microalgues.....	6
2 Application des microalgues.....	7
3 Présentation du modèle d'étude .....	14
3.1 Chlorella vulgaris .....	14
3.2 La photosynthèse .....	17
a. Organites et molécules de la photosynthèse .....	17
b. Mécanisme de la photosynthèse.....	18
4 La culture des microalgues .....	21
4.1 Les modes de culture .....	21
4.2 Les réacteurs de culture de microalgues.....	24
5 L'impact des paramètres de culture sur la croissance des microalgues.....	29
5.1 L'énergie lumineuse .....	29
5.2 Le dioxyde de carbone.....	31
5.3 Les nutriments .....	31
5.4 L'agitation .....	33
5.5 La température.....	34
5.6 Le pH.....	35
5.7 Conclusion.....	36
6 Modes de culture.....	37
7 La bioaccumulation des oligoéléments dans les microalgues.....	37
7.1 Les processus de bioaccumulation des métaux dans les microalgues.....	38
7.1.1 Adsorption à la surface cellulaire.....	38
7.1.2 Transport à travers la membrane plasmique .....	39
a. Mécanismes généraux.....	39
b. Cas des éléments anioniques.....	40
c. Cas d'éléments cationiques.....	40
7.1.3. Exemples de quelques métaux .....	42
7.1.4. Cas du magnésium .....	45
7.2 Les facteurs affectant la bioaccumulation .....	46
7.2.1 Impact de la température .....	47
7.2.2 Impact du pH.....	47

---

7.2.3	Impact de la concentration en métal.....	48
7.2.4	Impact de la spéciation chimique.....	49
7.2.5	Impact de la concentration en biomasse.....	50
7.2.6	Impact de la viabilité des cellules algales.....	50
8	Conclusion.....	51
Chapitre II : Matériel et méthodes.....		52
1	Culture de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	53
1.1	Inoculum.....	53
1.2	Milieu de culture.....	53
1.3	Les réacteurs de culture de <i>C. vulgaris</i> .....	53
1.3.1	L'incubateur.....	53
1.3.2	Le micro pilote.....	54
1.3.3	Le photobioréacteur.....	55
2	Méthodes d'analyse.....	57
2.1	Concentration cellulaire.....	57
2.2	Concentration en Chlorophylle a dans les cellules.....	58
2.3	Taille des cellules.....	58
2.4	Concentrations en ion nitrate et en glucose.....	59
2.5	Concentrations en magnésium dans la solution et dans la biomasse.....	59
Chapitre III : Bioaccumulation du magnésium par <i>C. vulgaris</i> .....		61
1	Cultures autotrophes en réacteurs de faibles volumes (100-300mL).....	62
1.1	Etude préliminaire :.....	62
1.2	Effet du magnésium sur la croissance de <i>C.vulgaris</i> (Article scientifique).....	67
1.3	Modélisation de la cinétique de bioaccumulation du magnésium par les microalgues :.....	84
1.3.1	Généralités.....	84
1.3.2	Modèles publiés :.....	89
1.3.3	Présentation du modèle.....	91
1.3.4	Validation expérimentale du modèle.....	101
1.4	Conclusion.....	106
2	Cultures autotrophes de <i>C. vulgaris</i> dans le photobioréacteur de 5 L à une concentration donnée de magnésium.....	108
2.1	Bioaccumulation de Mg <sup>2+</sup> par <i>C. vulgaris</i> en autotrophie dans le photo- bioréacteur (Article scientifique).....	108



2.2	Conclusion .....	124
3	Cultures mixotrophes en batch de <i>C. vulgaris</i> dans le photobioréacteur à une concentration donnée en magnésium .....	125
3.1	Croissance et bioaccumulation de $Mg^{2+}$ par <i>C. vulgaris</i> en conditions de culture en mixotrophie (Article scientifique) .....	126
4	Comparaison de la croissance de <i>C. vulgaris</i> et de la fixation du magnésium dans les deux modes de culture (autotrophie et mixotrophie).....	143
	Conclusions et Perspectives .....	149
	Références bibliographiques .....	156
	Annexes .....	183

## Introduction générale

Les protistes eucaryotes représentent une part importante de la biomasse aquatique. Aujourd'hui 127 000 espèces d'algues ont été identifiées, majoritairement des microalgues. De nombreuses espèces restent encore non identifiées ou non étudiées. D'autre part, les microalgues ont colonisé aussi bien les milieux marins, que d'eaux douces ou terrestres, ce qui en fait des organismes adaptés à un grand nombre de conditions environnementales. Ils peuvent s'adapter à tous les climats, des plus froids au plus chauds. Cette grande diversité des espèces de microalgues ouvre les portes sur de nombreuses possibilités d'utilisation.

Cependant malgré cette large diversité, seulement une dizaine d'espèces de microalgues, ont été cultivées à l'échelle industrielle dont trois espèces sont prédominantes : *Arthrospira* (*Spirulina*), *Chlorella* et *Dunaliella*.

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques présentent de diverses caractéristiques biochimiques intéressantes pour un grand spectre d'applications dans différents domaines à savoir : l'alimentation humaine et animale, la production d'énergie (biocarburants) et la production de molécules à hautes valeurs ajoutées pour des fins industrielles, notamment les domaines pharmaceutique et cosmétique.

Une grande importance a été accordée dès les années 1940 aux Etats Unis, en Allemagne et au Japon, pour la culture des microalgues dans le but de produire des protéines. Tel est le cas du laboratoire NREL aux Etats Unis qui a réalisé une large étude dans les années 80 pour identifier les espèces de microalgues les plus prometteuses pour la production de lipides (Rengel, 2010).

L'utilisation de microalgues suscite un intérêt croissant. Grâce à leur pouvoir métabolique, certaines microalgues se présentent comme porte-étendard de la mise au point de bioprocédés. Plusieurs applications ont été développées comme par exemple : la production de biodiesel, le captage de CO<sub>2</sub> résultant des émissions polluantes, le traitement des eaux usées par la bioaccumulation des métaux lourds, ...etc.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont été réalisées (Negoro et al, 1991) sur la capacité des microalgues à produire des molécules de hautes valeurs ajoutées via la photosynthèse, ainsi que leur pouvoir de bioaccumulation et leur affinité vis-à-vis de certains métaux lourds.

La microalgue choisie en tant que microorganisme modèle est *Chlorella vulgaris*. Il existe en effet un grand nombre de données disponibles et de travaux publiés concernant cette

espèce ; par ailleurs le laboratoire LGPM de CentraleSupélec a une expertise importante dans sa culture et ses applications.

Cette microalgue attire l'attention des industriels grâce à sa richesse en éléments nutritifs comme les polysaccharides et les acides gras polyinsaturés qui sont essentiels pour la nutrition humaine et animale. Elle possède plusieurs pigments dont les plus importants : la chlorophylle *a* et *d* et des phycobiliprotéines. Plusieurs études se sont focalisées sur le rôle potentiel des systèmes biologiques dans la phytoremédiation, plus particulièrement celle réalisée par *C. vulgaris*. Cette microalgue est une bonne candidate pour le traitement des eaux polluées grâce à son pouvoir d'absorption des métaux lourds ; la bioaccumulation/biosorption des métaux peut donc être une piste de recherche intéressante pour des fins industrielles.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans ce domaine de recherche ; l'objectif est d'étudier en premier lieu la croissance des microalgues vertes « *Chlorella vulgaris* » en autotrophie et en mixotrophie et dans un deuxième temps, étudier la bioaccumulation du magnésium par ce microorganisme à des fins cosmétiques.

- Le premier mode de culture est l'autotrophie qui consiste à cultiver les cellules algales en présence de lumière et de CO<sub>2</sub> (apport d'air enrichi en CO<sub>2</sub> à la culture) ; le phénomène prépondérant est la photosynthèse.
- Le deuxième mode de culture est la mixotrophie qui allie photosynthèse (apport de lumière et CO<sub>2</sub>) et hétérotrophie (apport de glucose).

Les microalgues sont cultivées dans le milieu de culture choisi enrichi en magnésium à différentes concentrations, afin d'étudier l'effet de celui-ci sur les cellules et leur aptitude à la bioaccumulation.

Généralement, les algues accumulent les métaux par l'intermédiaire de deux mécanismes :

- L'adsorption du métal sur la surface biologique externe de la cellule : c'est un phénomène extracellulaire
- L'absorption au niveau intracellulaire qui permet un transfert du métal du milieu extracellulaire à l'intérieur de la cellule.

L'étude de la bioaccumulation du magnésium (en fait de l'ion  $Mg^{2+}$ ) se fera aux niveaux extracellulaires et intracellulaires.

Le magnésium est un élément important dans les mécanismes physiologiques cellulaires, notamment la croissance (Gorain et al, 2013) ; c'est un cofacteur de différentes enzymes responsables des activités cellulaires.

De plus, il est essentiel pour la synthèse de la chlorophylle et par conséquent il est indispensable pour la photosynthèse (Sarma et al, 2014). Il intervient également dans la bioaccumulation des lipides dans les microalgues, notamment dans *Chlorella vulgaris* (Gorain et al, 2013).

### **Organisation de la thèse**

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse s'orientent vers une des applications de la biotechnologie microalgale, à savoir la bioaccumulation du magnésium dans des systèmes de culture contrôlés sous différentes conditions. Ce manuscrit comprend cinq chapitres, conclusions et perspectives du travail et des annexes, dont le détail est donné ci-dessous:

*Chapitre I : Microalgues : applications, systèmes de production de biomasse et bioaccumulation des métaux*

Ce premier chapitre est une étude bibliographique consacrée à une présentation générale des microalgues ainsi que de leurs possibilités d'exploitation : production de biomasse à but alimentaire, production de molécules à haute valeur ajoutée et applications environnementales. Une description des systèmes de production de microalgues est également présentée. Par ailleurs, la bioaccumulation des métaux est présentée de façon générale, puis l'absorption du magnésium est particulièrement détaillée.

*Chapitre II : Matériel et méthodes*

Les différents outils utilisés dans ce travail (méthodes analytiques et bioessais) et protocoles expérimentaux seront présentés dans le deuxième chapitre.

*Chapitre III : Bioaccumulation du cation magnésium par C. vulgaris en fonction d'un certain nombre de paramètres*

Ce chapitre décrit le travail global de la thèse. Il a été structuré selon le type de réacteur et le mode de culture. Il contient deux grandes parties.

La première partie consiste à étudier dans des petits réacteurs (100 à 300 mL), l'effet de  $Mg^{2+}$  sur la croissance de *C. vulgaris* et sa bioaccumulation par les cellules, dans une large gamme de concentrations. Un modèle mathématique décrivant la bioaccumulation de ce métal par *C. vulgaris* a été développé et ses paramètres identifiés.

La deuxième partie, la plus importante, présente les expériences réalisées dans le photobioréacteur de 5L sous deux modes de cultures en batch l'autotrophie et la mixotrophie.

Dans le cadre de l'étude en autotrophie, la croissance des cellules et la cinétique d'épuisement du milieu de culture en ion magnésium ont été examinées. Des bilans matière sur le magnésium avec distinction des formes adsorbé et absorbé ont été établis à différents stades de la culture. Les résultats expérimentaux confirment la validité du modèle proposé dans la première partie.

En ce qui concerne la mixotrophie, les concentrations en glucose et nitrate ont été suivies dans le milieu de culture, en plus des concentrations en biomasse et en ions magnésium. On observe différentes phases de culture qui seront étudiées en détail.

Les modes autotrophie et mixotrophie sont ensuite comparés, notamment en terme de rentabilité pour une application industrielle.

### ***Conclusions et perspectives***

Cette partie permet de tirer un bilan global des différents travaux réalisés durant cette thèse. Des perspectives sont proposées pour la continuité du sujet abordé.

### ***Annexes***

Ce mémoire inclut des annexes décrivant le matériel et méthodes, en complément du chapitre II.

## **Chapitre I : Bibliographie**

# 1 Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des microorganismes aquatiques unicellulaires eucaryotes de forme ellipsoïde ou ronde, elles se trouvent dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eaux douces. Elles sont souvent connues sous la dénomination de « phytoplancton » (Sumi, 2009). Les microalgues utilisent l'énergie solaire et l'eau pour la production de biomasse et d'oxygène, par le biais de la photosynthèse. En effet, ces microorganismes sont à l'origine de l'équilibre de la composition atmosphérique dont la fixation de dioxyde de carbone et le rejet d'oxygène et contribuent ainsi à la continuité de la vie animale et végétale.

Les algues sont classées selon leur taille (micro et macroalgues), selon leurs pigments, les caractéristiques de leurs parois et leurs compositions.

Les macroalgues sont généralement visibles à l'œil nu, elles sont souvent connues par « seaweeds » (Guiry, 2008). Elles sont cultivées pour produire des composants d'intérêt destinés à des applications industrielles. L'existence de ces organismes est nécessaire aux écosystèmes en termes de fonction, productivité et composition (Dawes et Mathiesen, 2008 ; Littler et Littler, 2000 ; Taylor, 1957; Taylor, 1960). Les macroalgues peuvent être subdivisées en trois groupes selon leur pigmentation : verte, marron, et rouge. Actuellement, les macroalgues sont utilisées dans des procédés de transformation pour produire de l'énergie : combustion, pyrolyse et digestion anaérobie (biogaz) (Ross et al, 2008).

Les microalgues sont considérées comme des algues unicellulaires, qui ont une taille de l'ordre du micromètre. Elles se développent principalement en suspension dans des solutions aqueuses (Wen et Johnson, 2009). Elles sont aptes à coloniser tous types de milieux, notamment eaux salées, douces, saumâtres et même dans des eaux usées grâce à leurs capacités d'adaptation et de survie. Elles peuvent également se développer sur des surfaces rigides, telles que les troncs d'arbre, les structures immergées ou les murs (Becerra Celis, 2009).

A l'échelle microscopique, elles peuvent se présenter séparées ou en colonies. Selon leur type et les conditions environnementales, les microalgues peuvent produire des quantités importantes de lipides, de sucres et de protéines grâce à la photosynthèse.

Les microalgues présentent différentes formes : souvent sphériques (*porphyridium*), de gouttelette (*Chlamydomonas*), de filament (*Spirulina*), de spirale (*Arthrospira*), et même d'étoile (*Staurastrum*) (figure 1, Sumi 2009).

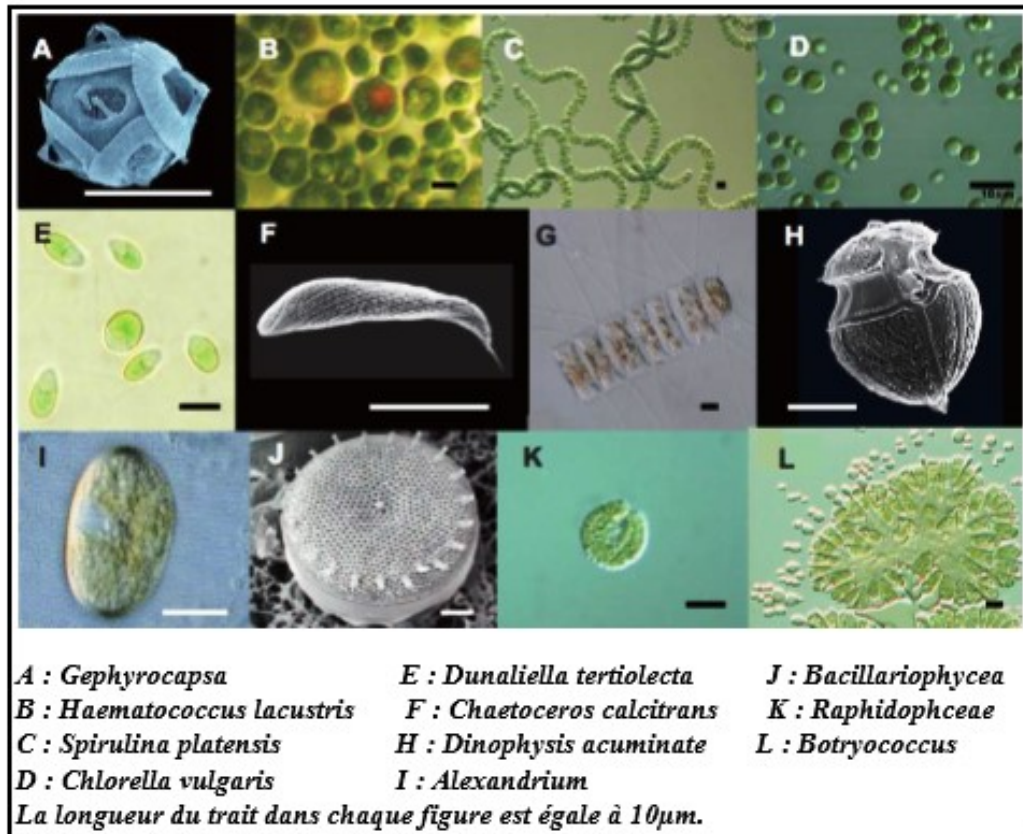


Figure 1. Les différentes formes des microalgues

## 2 Application des microalgues

Les microalgues planctoniques ont non seulement une grande importance dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, mais aussi un grand potentiel pour la production de composés intéressants pour l'alimentation humaine, l'aquaculture (figure 2, Rösch et Posten, 2012), et pour la production de molécules à haute valeur ajoutée dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (Spolaore et al, 2006; Brennan et Owende, 2010).



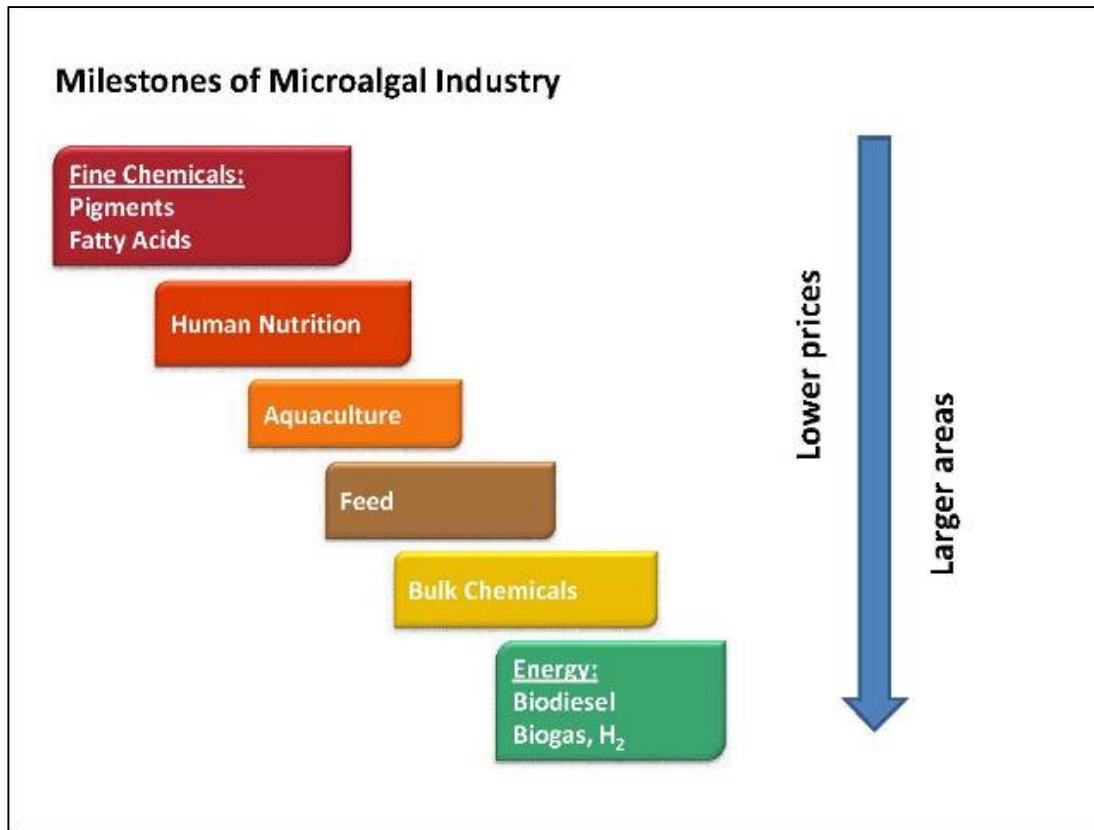


Figure 2. Les vastes domaines d'application des microalgues (Rösch et Posten, 2012)

### a) Domaine alimentaire

Grâce à leur bonne valeur nutritionnelle, ces microorganismes sont utilisés dans l'alimentation animale et humaine et dans l'aquaculture (Pulz et al, 2004). La biomasse peut être manufacturée sous diverses formes telles que tablettes, poudre, capsules, pastilles....*Chlorella vulgaris* et *Daniella Salina* sont les espèces les plus répandues en alimentation humaine et animale.

Les microalgues se composent de nombreux pigments tels que la chlorophylle, les caroténoïdes qui sont souvent employés en tant que colorants naturels dans l'industrie alimentaire limitant ainsi l'utilisation des colorants artificiels (Gordon et Bouernfeind, 1982). Dans ce contexte, On cite l'exemple de la microalgue *Dunaliella* qui synthétise le pigment  $\beta$ -carotène utilisé comme colorant en industrie alimentaire. D'autres caroténoïdes, notamment l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine, sont utilisés

comme des antioxydants en aquaculture et en alimentation animale et humaine (Lorenz et Cysewski, 2000).

Les microalgues produisent des polysaccharides, qui sont largement exploités en tant que agents gélifiants ou épaississants dans l'industrie agroalimentaire (De la Noüe et al, 1988).

### **b) Domaine cosmétique**

Plusieurs espèces de microalgues, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorella* sont de plus en plus exploitées dans le domaine cosmétique (Stolz et Obermayer, 2005). D'autres espèces algales, sont utilisées dans la fabrication des produits de soin capillaire, du visage et de la peau grâce à leur activité antioxydante (Pulz et al, 2004). En outre, la souche *Arthrospira* produit des protéines qui permettent la réparation des signes de vieillissement de la peau alors que des extraits de la microalgue *Chlorella vulgaris* permettent de stimuler la production du collagène. Ce dernier a une propriété anti-âge (Spolaore et al, 2006) qui se révèle intéressante dans la fabrication des émulsions et des crèmes antirides (Gouveia et al, 2008). Par ailleurs, les pigments extraits des microalgues sont également recherchés dans le domaine cosmétique (Del Campo et al, 2000). C'est à ce domaine d'application que notre travail s'adresse.

### **c) Domaine pharmaceutique**

Les microalgues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des microalgues dans le domaine pharmaceutique par l'identification de nouvelles molécules naturelles (Hoppe, 1979). Dans ce contexte, la tubercidine, une molécule cytotoxique, a été identifiée chez la microalgue *Tolythrixbyssoides* ainsi que chez les cyanobactéries (Patterson et al, 1991). Cette molécule présente une action *in vitro*, effective contre un type de leucémie lymphoïde. Par ailleurs, les microalgues peuvent synthétiser des sulfolipides antiviraux (Gustafson et al, 1989) pour fortifier le système immunitaire.

L'utilisation d'extraits algaux à forte teneur en antioxydants, trouve des applications dans l'industrie pharmaceutique pour des thérapies contre certains types d'inflammation (Pulz et

al, 2004). Par ailleurs, les microalgues sont des sources de différentes vitamines qui sont encore à l'état de recherche dans le domaine pharmaceutique.

On retrouve *Chlorella* dans de nombreuses applications pharmacologiques. Cette microalgue a montré des résultats intéressants *in vitro* contre les effets de l'absorption de molécules toxiques (Morita et al, 1999) ; elle entre aussi en jeu dans des traitements contre l'hypertension (Okamoto et al, 1978). Elle a démontré des propriétés intéressantes dans le traitement du diabète chez la souris (Mizoguchi et al, 2008 ; Jong-Yuh et Mei-Fen, 2005). Elle présente de nombreuses propriétés immunologiques (Pugh et al, 2001 ; Konishi et al, 1990) et anti-cancéreuses (Justo et al, 2001).

#### d) Domaine énergétique

La valorisation des microalgues peut se traduire par la production de bioénergie sous différentes formes telles que l'électricité et/ou la chaleur par combustion directe de la biomasse, le biométhane après méthanisation de la biomasse, et la production de biocarburant ou d'hydrogène par culture de la microalgue (Carlsson et al, 2007).

Diverses recherches ont montré le potentiel intéressant la faisabilité technique et commerciale de la production de biométhane à partir de la biomasse marine (Chynoweth, 2002).

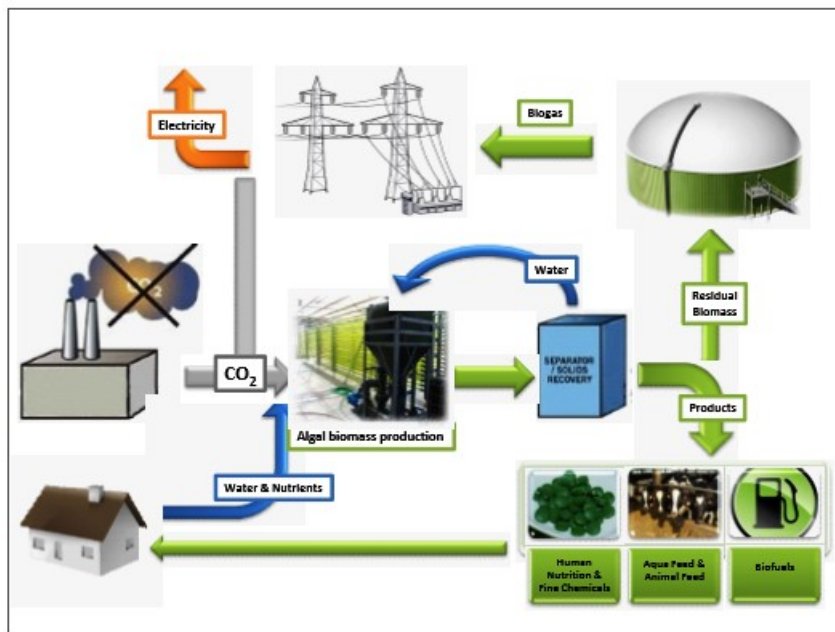


Figure 3. Production de biogaz à partir des microalgues (Powell et al, 2009)

Powell et al, (2009) suggèrent l'utilisation de *Chlorella vulgaris* dans un procédé, appelé Microbial Fuel Cell, de production d'électricité à partir des réactions d'oxydo-réduction qui se déroulent dans la cellule. Ce procédé en produisant de l'électricité permet également la réduction de CO<sub>2</sub> présent dans le milieu en le transformant en biomasse (Rösch et Posten, 2012).

Pour fabriquer du biocarburant, appelé biocarburant de troisième génération, les espèces de *Chlorella* sont des candidates prometteuses pour cette application grâce à leur fort contenu lipidique et leur capacité à croître rapidement (Xiong et al, 2008 ; Converti et al, 2009 ; Lv et al, 2010 ; Phukan et al, 2011). Les rendements en huile produit par les microalgues promettent d'être jusqu'à 30 fois plus grands à ceux du colza. Ils sont au centre des nouvelles recherches les plus prometteuses.

**Tableau 1. Contenu en huiles de différentes microalgues (Taher et al, 2011)**

<b>Microalgue</b>	<b>Contenu en huile (% poids sec de la biomasse)</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	25–80
<i>Chlorella protothecoides</i>	23–30
<i>Chlorella vulgaris</i>	14–40
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella salina</i>	14–20
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–65
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Spirulina maxima</i>	4–9
<i>Tetraselmis suecia</i>	15–23

Brennan et Owende, 2010, ont montré que la *Chlorella* est composée majoritairement par des carbohydrates (40 à 70%), de protéines (10 à 20%) et des molécules de faibles poids comme les acides gras et les acides aminés. Sa richesse en carbohydrates se révèle importante pour sa transformation en sucres solubles fermentescibles ayant un intérêt industriel dans la synthèse de biocarburant.

e) **Domaine environnemental**

Les principales applications environnementales sont le traitement des eaux usées et la consommation de CO<sub>2</sub> (figure 4).

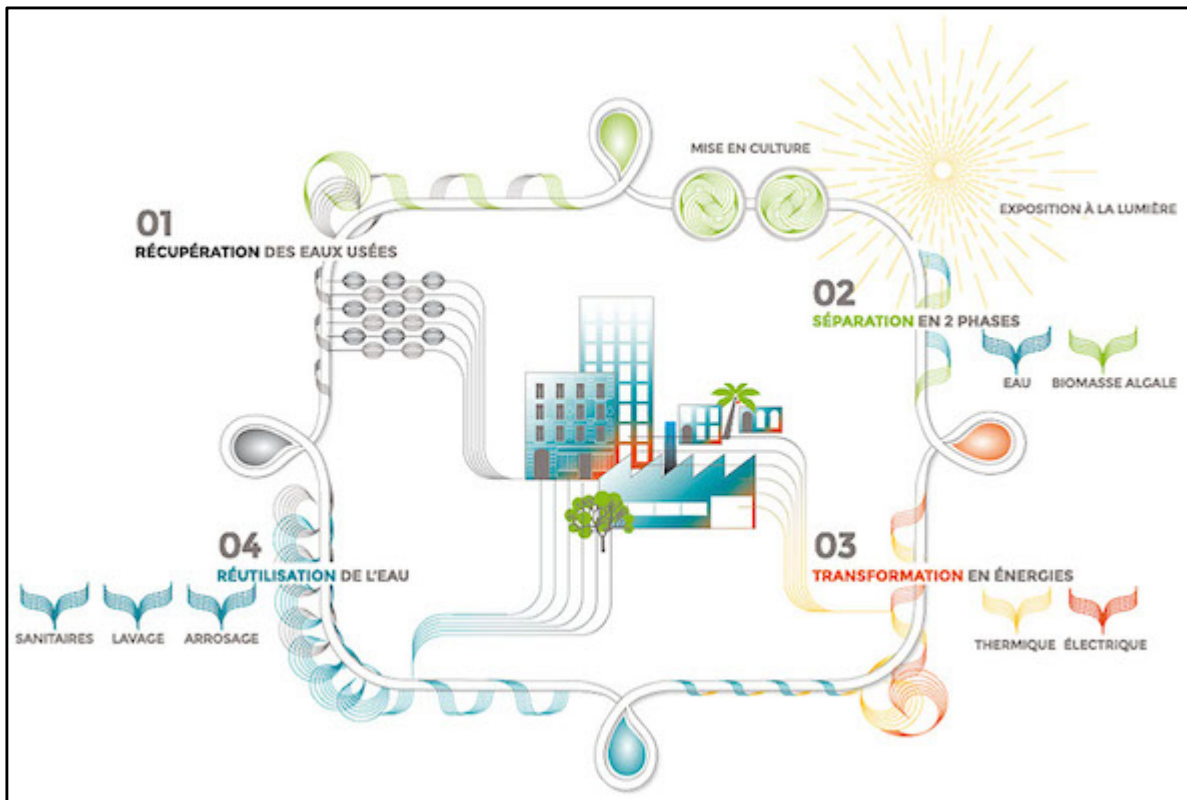


Figure 4. Processus de traitement des eaux par des microalgues

<http://www.faiteslepleindavenir.com/2013/11/05/lenergie-des-eaux-usees/>

Les eaux usées et les déchets organiques peuvent servir de nutriments pour les microalgues. En effet, les microalgues se nourrissent essentiellement d'azote et de phosphore, contenus en

grande quantité dans les eaux usées. La biomasse produite peut ensuite être stockée sous diverses formes et alimenter une chaudière.

Les microalgues ont une grande capacité d'accumulation des métaux lourds (Monteiro et al, 2013), elles sont donc très utilisées dans le traitement des eaux usées.

En effet, ces microorganismes qui forment une base d'écosystème marin, sont largement utilisés comme des bio-indicateurs de changements environnementaux et surtout dans l'évaluation des risques par les métaux (Levy et al, 2007).

La récolte de biomasse algale est réalisée principalement dans le traitement des eaux et la production de biocarburant, mais ses caractéristiques dépendent de l'application. D'après la figure 4, il est possible d'obtenir des microalgues à la concentration souhaitée par un procédé de récolte composé d'une ou deux étapes, qui implique une étape de récolte primaire qui forme une suspension de 2% à 7% des solides totaux en suspension suivie d'une étape de déshydratation secondaire qui produit une pâte d'algues de 15% -25% des solides totaux en suspension. La concentration obtenue dans les étapes de récolte est cruciale pour l'ensemble du processus, car il influence l'étape ultérieure de séchage (figure 5 ; Uduman et al, 2010 ; Shelef, 1984).

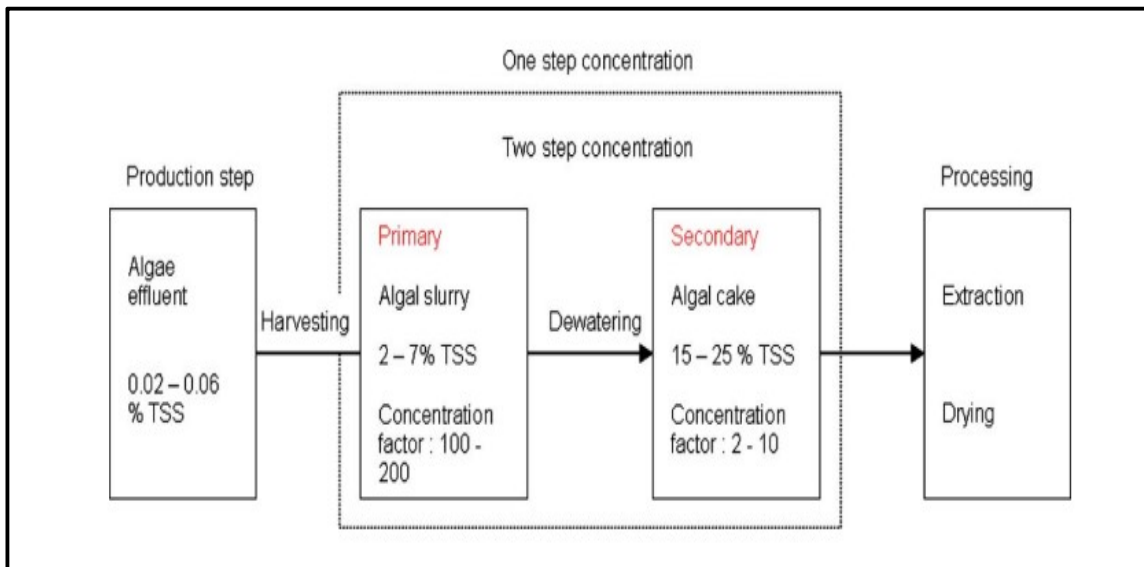


Figure 5. Schéma de processus de production et récolte des microalgues (Uduman et al, 2010)

Lee et al, (2013), ont utilisé une méthode différente et intéressante pour la séparation des microalgues, qui est le processus de floculation, ils ont prouvé que l'association des microalgues avec des bactéries (*Flavobacterium sp.*, *Terrimonas sp.*, *Sphingobacterium sp.*, *Rhizobium sp.* et *Hyphomonas sp.*) améliore la floculation jusqu'à 94% . Ces chercheurs ont

prouvé que les bactéries jouent un rôle fondamental dans ce phénomène en augmentant la taille des flocons résultant de la sédimentation du *Chlorella vulgaris*. En effet, ces résultats peuvent représenter une large piste de recherche en vue d'amélioration de la bioaccumulation des métaux par exemple.

La plupart des cellules de microalgues ont une gamme de taille entre 5 et 50  $\mu\text{m}$ . Ces cellules peuvent former des suspensions stables avec une surface cellulaire chimiquement réactive qui a une charge négative nette de surface due à l'ionisation des groupes fonctionnels.

La stabilité de ces suspensions de microalgues dépend des forces qui interagissent entre les particules elles-mêmes et les particules de l'eau (Tenney et al, 1969).

La récolte des cellules de microalgues par floculation est considérée comme une méthode supérieure pour les méthodes de récolte classiques telles que la centrifugation et la flottaison car elles permettent le traitement de grandes quantités de microalgues, ainsi que pouvant être appliquées à une large gamme d'espèces de microorganismes (Lee et al, 1998 ; Pushparaj et al, 1993). Bien que la floculation se soit avérée efficace pour concentrer les microalgues, le procédé seul peut ne pas être suffisant. Moraine et al, 1979, ont indiqué que les flocons de microalgues ont une densité proche et même en dessous de celle de l'eau lorsqu'ils sont exposés à la lumière, libérant l'oxygène photosynthétique.

### **3 Présentation du modèle d'étude**

#### **3.1 *Chlorella vulgaris***

*Chlorella vulgaris* est une microalgue verte d'eau douce appartenant à la classe des *chlorophycées*. Elle est unicellulaire eucaryote (Figure 6). Elle est découverte par un chercheur hollandais M.W. Beijerinck en 1890.

*C. vulgaris* a une taille qui varie de 3 à 5  $\mu\text{m}$  et se trouve sous deux formes ronde ou ellipsoïdale. Elle contient un chloroplaste pariétal qui se compose des caroténoïdes, de la chlorophylle *a* et *b*, un pyrénoïde, des thylakoïdes, du matériel génétique et des grains d'amidon (Clément-Larosière, 2012; Rowley, 2010). Cette microalgue a un mode de reproduction asexuée, la cellule-mère se divisant en quatre spores qui s'échappent et germent pour donner un organisme identique à celui qui les a produit (Richmond, 2004).



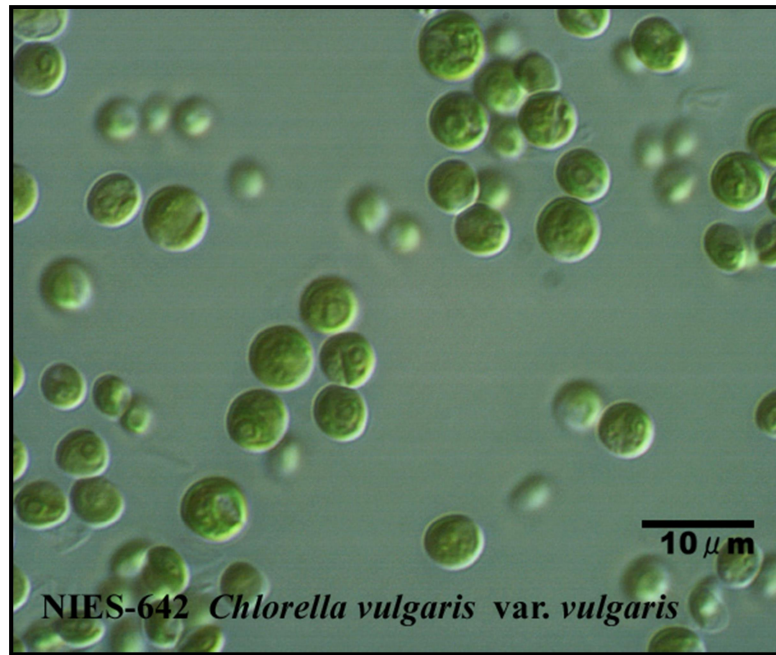


Figure 6. Vue microscopique de *Chlorella vulgaris*

<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0642.jpg>

La culture de *Chlorella vulgaris* est relativement facile, ce qui les rend utiles dans les études des laboratoires biologiques, physiologiques et biochimiques (Rowley, 2010).

Elle est présente de façon ubiquiste dans l'environnement aquatique et se trouve également dans les sols. Elle peut être cultivée dans un milieu organique ou inorganique simple. Sur le plan physiologique, elle est également tolérante à une large gamme de pH. Elle a un taux de croissance rapide, permettant d'analyser des effets sur plusieurs générations. Enfin, elle est utilisée en écotoxicologie pour comprendre les interactions de différents éléments présents dans le milieu de culture avec les membranes biologiques.



Tableau 2. Caractéristiques de la microalgue *Chlorella vulgaris*

<b>Groupe taxonomique</b>	Chlorococcales
<b>Dimensions</b>	< 10 µm de forme sphérique (observation au microscope)
<b>Membrane</b>	Membrane plasmique bi-couche lipidique
<b>Composition de la paroi</b>	Paroi cellulosique (résistance mécanique) Takeda et al, 1993): Glucosamine Sucres neutres Acides uroniques Protéines Divers

Ces organismes ont des caractéristiques qui les rendent intéressantes pour de multiples applications :

- Une sensibilité aux polluants, qui permet de les utiliser comme bioindicateurs dans des bioessais normalisés (tests de croissance) ou non (tests sur la fluorescence chlorophyllienne, sur les activités enzymatiques...).
- *Chlorella* est souvent très utilisée pour la détoxification des eaux usées par l'absorption des métaux lourds tel que l'arsenic (Karadjova et al, 2008), le thallium (Turner et Furniss, 2013), le chrome (Rai et al, 2013), le cuivre, le zinc, le cobalt et le manganèse (Chojnacka, 2007).
- *Chlorella vulgaris* possède deux familles d'enzymes particulièrement intéressantes, les phosphatases et les estérases. D'autres études ont confirmé la localisation membranaire de certaines de ces phosphatases et estérases. Ainsi, Brandes, (1956) a montré que certaines enzymes phosphatases sont situées à la surface de la cellule de *Chlorella vulgaris*. Les travaux de Barthet, (2003) ont, quant à eux, conclu l'existence d'estérases membranaires. Cette localisation est particulièrement intéressante puisqu'elle permet des réactions enzymatiques rapides (il n'est en effet pas nécessaire que le substrat diffuse à l'intérieur de la cellule). Certains cations sont particulièrement importants puisqu'ils jouent le rôle d'ions

activateurs dont le magnésium qui permet ainsi de stabiliser l'enzyme dans sa conformation la plus active (Holtz et al, 1999).

- Captage du dioxyde de carbone qui est un gaz à effet de serre (Clémont-Larosière et al, 2012).

### 3.2 *La photosynthèse*

Les organismes aquatiques, représentant qu'un pourcent de la biomasse totale, réalisent presque la moitié de l'activité photosynthétique sur terre. Parmi ces microorganismes, on cite les microalgues qui constituent le phytoplancton et sont à l'origine de la majorité de la production primaire aquatique (Falkowski et Raven, 2007).

La photosynthèse est réalisée par des réactions qui transforment l'énergie solaire, le dioxyde de carbone et l'eau en biomasse et oxygène. Les pigments récoltent la lumière et les réactions chimiques sont effectuées par des enzymes. L'efficacité photosynthétique est définie comme le rapport entre la biomasse produite et l'intensité lumineuse.

#### *a. Organites et molécules de la photosynthèse*

Les cellules photosynthétiques possèdent des chloroplastes, qui sont les organites dans lesquels se déroule la réaction de la photosynthèse (Wright, 2005). Un chloroplaste a la forme d'un disque aplati et mesure entre 2 et 10  $\mu\text{m}$  de longueur et environ 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Il possède son propre matériel génétique sous forme d'ADN circulaires, qui portent des gènes codant pour les protéines chloroplastiques.

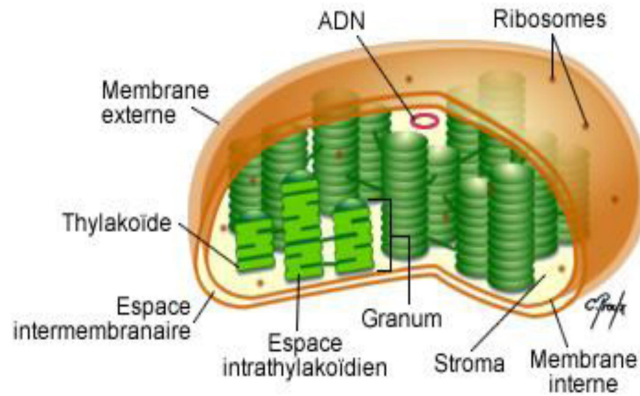


Figure 7. Schéma d'un chloroplaste

<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/la-photosynthese.html>

L'enveloppe du chloroplaste comporte deux membranes, une interne et une externe.

- La membrane externe est une double couche formée par des phospholipides, qui est perméable aux molécules polaires.
- La membrane interne entoure le stroma (partie interne du chloroplaste). Elle comporte des replis, appelés « thylacoïdes », qui se prolongent dans le stroma. Les thylacoïdes contiennent des pigments essentiels de la photosynthèse, notamment la chlorophylle (NemcovA et Kalina, 2000).

La chlorophylle est un pigment apte de capter l'énergie des photons lumineux. Elle est composée d'un noyau tétrapyrolique sur lequel est accrochée une chaîne carbonée (Wright, 2005).

### ***b. Mécanisme de la photosynthèse***

La photosynthèse se déroule en deux grandes étapes :

- ❖ Phase de photolyse (conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique), cette étape se déroule dans les membranes thylacoïdes des chloroplastes qui contiennent les pigments photosynthétiques, des protéines et des enzymes. Les trois pigments majeurs sont les chlorophylles (verts), les caroténoïdes (oranges) et les phycobiline présents dans les antennes des photosystèmes I et II. Ces pigments récoltent la lumière alors que les protéines et les enzymes permettent d'effectuer les réactions chimiques. Ces réactions chimiques

créent de l'énergie par la production d'un agent réducteur, appelé  $\text{NADPH}_2$  et d'un composé à haute énergie, appelée ATP (Cascallo, 2000; Richmond, 2007).

❖ Phase thermochimique, également connue comme le cycle de Calvin-Benson.

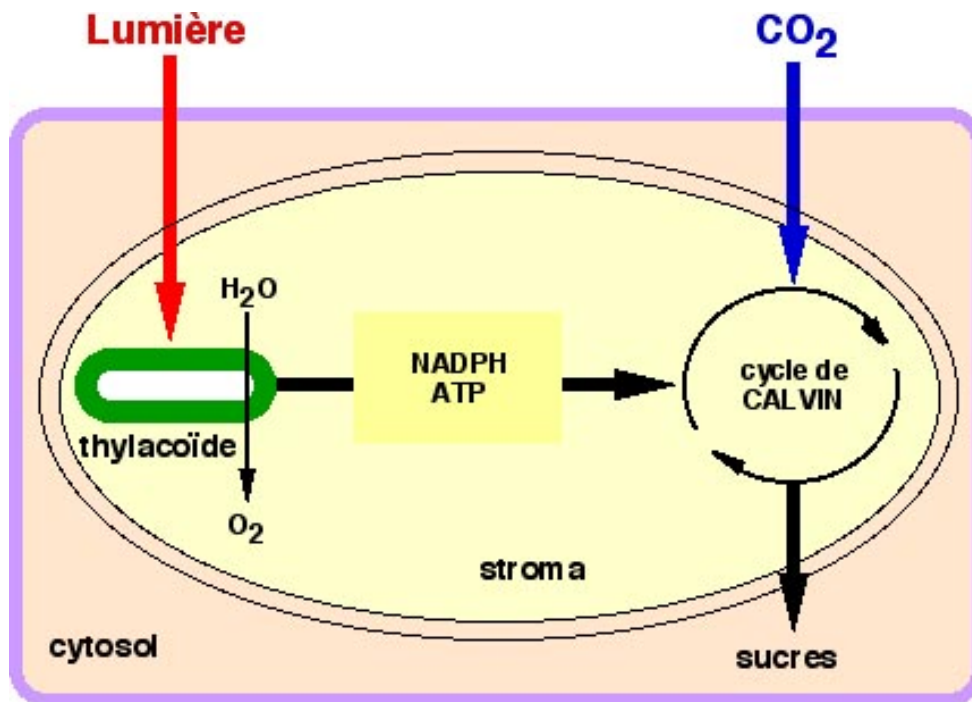


Figure 8. Schéma général de processus de la photosynthèse

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/19-conclusion.htm>

Le cycle de Calvin peut être décomposé en 3 étapes essentielles :

- L'incorporation de  $\text{CO}_2$  dans le RuBP (Ribulose Biphosphate): cette réaction est catalysée par la RubisCO (Ribulose bis Phosphate Carboxylase Oxygénase). Comme son nom l'indique, cette enzyme a deux fonctions carboxylase et oxygénase.
- La réduction de l'APG en triosesphosphate : elle se réalise en deux étapes catalysées par la phosphoglycérokinase (PGK), puis par le glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase (GAPDH). Au total on passe d'un acide à un aldéhyde à l'aide du NADPH (réduction) et d'une réaction intermédiaire faisant intervenir l'ATP.
- La régénération du RUBP : elle se réalise grâce à un ensemble de réactions faisant intervenir des sucres à différents nombres d'atomes de carbone : sucres en C6 (fructose), C4

(érythrose) et C7 (sédoheptulose). A partir de 5 triose-phosphates (C3P) ils se forment donc 3 pentose-phosphates (C5P).

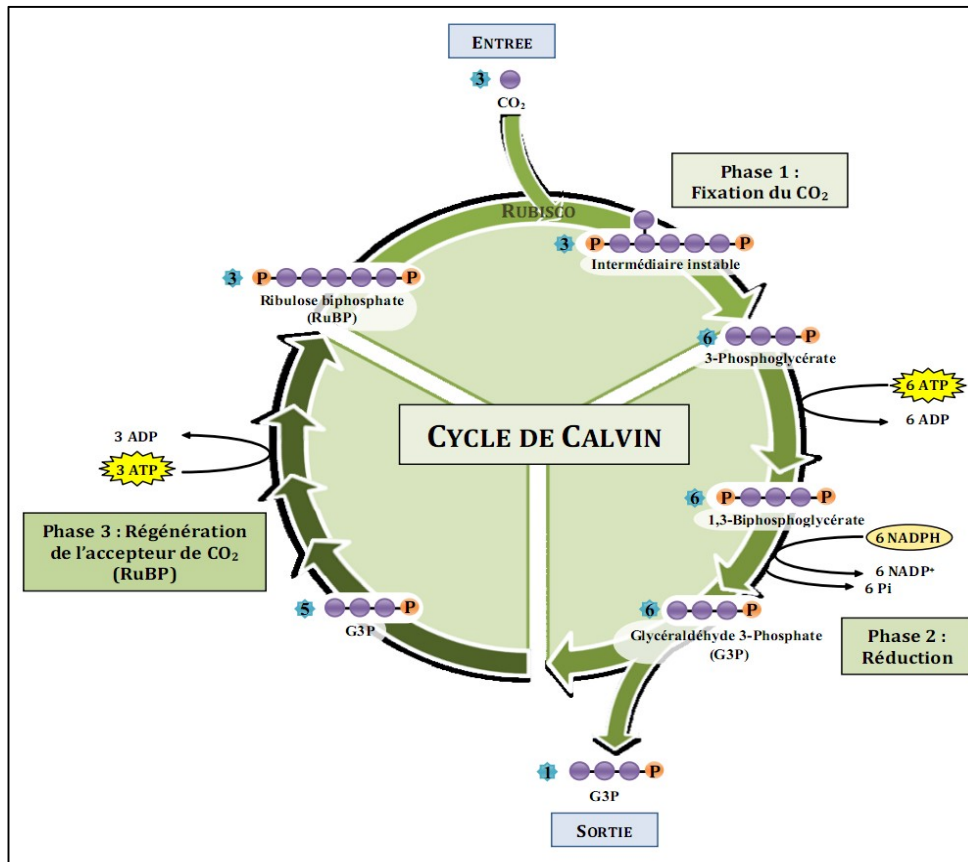


Figure 9. Schéma du cycle de Calvin

<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/la-photosynthese.html>

L'efficacité photosynthétique des algues est estimée à 9 %, beaucoup plus élevée que celles des plantes terrestres (entre 1 et 2 %) (Brennan and Owende, 2010).

Pour réaliser la photosynthèse et se reproduire, les algues ont besoin de nutriments, de lumière et de conditions particulières qui sont détaillées dans les sections 5 et 6.

## 4 La culture des microalgues

### 4.1 Les modes de culture

D'une façon générale, il existe deux modes d'opération pour cultiver les microalgues : En mode continu et mode batch.

#### ❖ mode continu

Le milieu de culture frais est apporté dans le réacteur de façon continue. Afin que le volume de la culture reste constant, l'excès de liquide contenant des algues est éliminé du réacteur par une surverse.

Plusieurs recherches ont montré que différentes espèces cultivées dans des systèmes continus ou semi-continus montrent une productivité plus importante que lorsqu'elles sont cultivées en batch (Ceron-Garcia et al, 2012; Filali et al, 2011; Sun et al, 2009; Tang et al, 2012; Wang et al, 2012).

Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire à l'intérieur du réacteur stable. La culture est débutée en mode batch jusqu'à ce que la concentration cellulaire souhaitée soit obtenue, puis le milieu de culture est injecté en continu. Ainsi, théoriquement, la culture se trouvera continuellement en phase exponentielle de croissance (Andersen, 2005).

Un bilan matière sur la biomasse entre  $t$  et  $t+dt$  donne :

$$Q X dt + V dX = r V dt \quad (1)$$

Avec :

$Q$  = débit de liquide sortant du réacteur ( $L h^{-1}$ ) supposé égal à celui d'entrée

$V$  = volume de culture ( $L$ )

$X$  = concentration cellulaire ( $cell L^{-1}$  ou  $g$  de matière sèche  $L^{-1}$ )

$r$  : vitesse de croissance égale à  $\mu X$  avec  $\mu$  vitesse spécifique de croissance ( $h^{-1}$ )

La vitesse de croissance  $r$  est définie comme la variation du nombre de cellules ou le poids de la biomasse dans un temps bien déterminé et par unité de volume. Différents modèles ont

été développés pour estimer  $\mu$ . Le modèle le plus connu est basé sur la loi de Monod dans le cas d'une limitation de la croissance par la lumière ou le substrat carbone.

A l'état d'équilibre et dans une culture en continu, le taux de biomasse est stable, on a donc :

$$\mu = \frac{Q}{V} = D \quad (2)$$

Avec D le facteur de dilution

❖ mode batch

Un inoculum de microalgues est ajouté à un volume de milieu. Durant toute la culture, les éléments essentiels ajoutés vont être consommés par les algues et leurs concentrations vont diminuer dans le milieu.

Quand la concentration de biomasse désirée est atteinte, la culture est arrêtée et la biomasse est récoltée.

Dans ce mode opératoire, on peut observer cinq phases de croissance (figure 10):

- ❖ Phase 1 « **La phase de latence** » : les cellules s'adaptent aux nouvelles conditions de culture.
- ❖ Phase 2 « **La phase d'accélération** » : les cellules ont accumulé des composés intracellulaires et ont doublé leur matériel génétique. La population commence à croître via la reproduction végétative. Les cellules se divisent en deux cellules filles identiques contenant chacune la moitié du contenu de la cellule mère et elles-mêmes se diviseront ensuite en deux (Andersen, 2005).
- ❖ Phase 3 « **La phase exponentielle** » : les cellules se multiplient très vite en observant une croissance exponentielle en fonction du temps. La vitesse de croissance de la culture est maximale. Les conditions du milieu sont optimales pour la croissance cellulaire.
- ❖ Phase 4 « **La phase stationnaire** » : la concentration des microalgues reste constante. Un des éléments essentiels manque (lumière, azote, phosphore, carbone...); la vitesse de croissance diminue et compense juste la mortalité.

❖ Phase 5 « **La phase de déclin** » : le taux de croissance est négatif, la majorité des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires ce qui engendre une diminution de cellules viables pour la reproduction.

Certaines espèces de microalgues sont aptes de se mettre en dormance cellulaire lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Elles pourront reprendre une activité métabolique lorsque les conditions seront à nouveau propices à leur développement (Richmond, 2004).

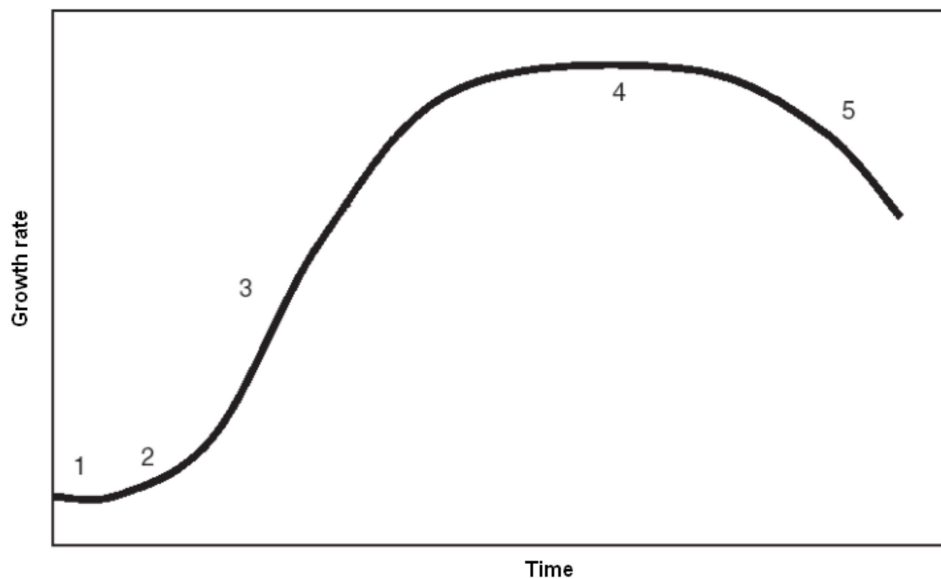


Figure 10. Cinétique de la croissance d'une microalgue

1) phase de latence, 2) phase d'accélération, 3) phase exponentielle, 4) phase stationnaire, 5) phase de déclin (Richmond, 2007).

Si la culture dans le réacteur est en mode batch, un bilan matière entre les instants  $t$  et  $t+dt$  donne :

$$V dX = r V dt \quad (3)$$

On obtient :

$$dX/dt = \mu X \quad (4)$$



$\mu$  n'est constant que dans la phase exponentielle. Il vient donc :

$$\mu = \frac{\text{Ln} \left( \frac{X}{X_0} \right)}{t - t_0} \quad (5)$$

X et  $X_0$  : concentrations cellulaires aux temps t et  $t_0$  respectivement (Kaewpintong et al, 2007)

Le temps de génération ou de doublement ( $t_d$ ) est défini comme le temps nécessaire à un nombre de cellules pour doubler leur nombre ou leur poids :

$$t_d = \text{Ln} (2) / \mu \quad (6)$$

Les cultures de microalgues en batch permettent d'appréhender les phénomènes cinétiques. Elles ont été largement utilisées pour étudier les phénomènes de limitation (Richmond, 2004).

#### 4.2 Les réacteurs de culture de microalgues

Les systèmes de production de microalgues sont contrôlés afin d'obtenir des productivités élevées. Aujourd'hui, ils peuvent être divisés en systèmes de culture à ciel ouvert ou « open ponds » et systèmes fermés appelés photo-bioréacteurs (Ahsan et al, 2008).

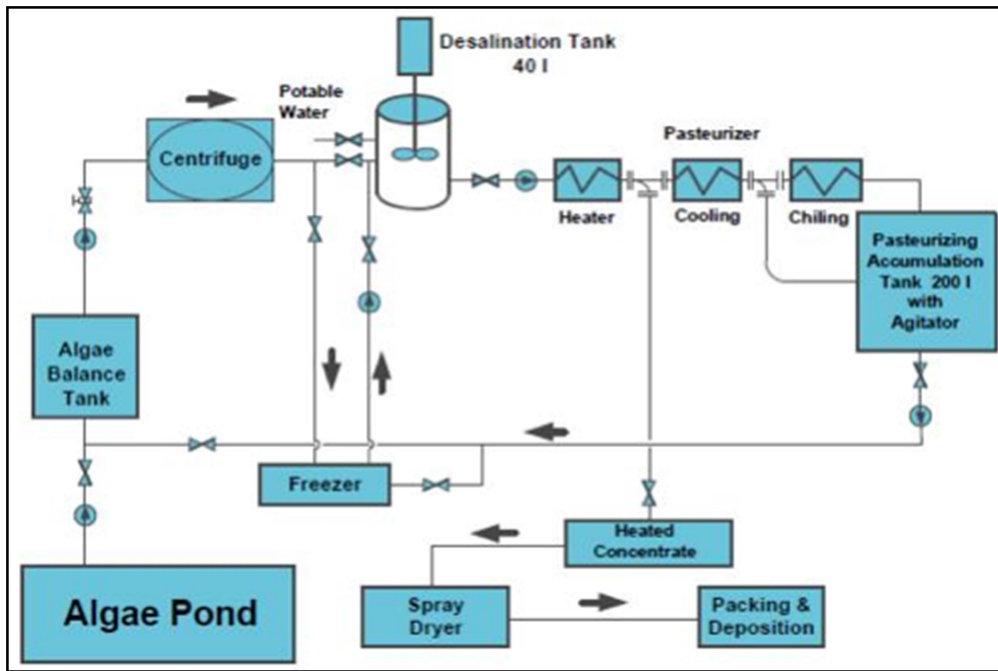


Figure 11. Schéma de production des microalgues à ciel ouvert

[www.seambiotic.com](http://www.seambiotic.com)

Les systèmes à ciel ouvert (figure 11) sont des bassins peu profonds, principalement classés en deux types : les bassins circulaires (figure 12 a) et les bassins du type « raceway » (figure 12 b). Les bassins du type « raceway » sont formés par une série de canaux en forme d’anneaux où le milieu liquide circule sous l’effet d’une roue (Figure 12, Chisti, 2007). Ces bassins sont les systèmes les plus utilisés, notamment pour la culture de *Dunaliella salina* (Chisti, 2007).



(a)



(b)

Figure 12. (a) bassin circulaire de culture de microalgue (b) bassin de type raceway

*[biochimej.univ-angers.fr](http://biochimej.univ-angers.fr)*

De nos jours, la production de microalgues à grande échelle est surtout développée dans les systèmes à ciel ouvert. Les pays producteurs de microalgues sont Israël, les États-Unis, la Chine, la Thaïlande, le Viêt-Nam et Taïwan. La moyenne de la productivité de biomasse sèche est de 10 à 25 g m<sup>-2</sup> jour<sup>-1</sup>, avec des concentrations de l'ordre de 0.5 g L<sup>-1</sup> (Becker, 1998; Lee, 2001).

Les photobioréacteurs, sont des récipients fermés, fabriqués en matériaux transparents pour permettre à la lumière de pénétrer à l'intérieur de la culture. Leur conception est optimisée de façon à avoir une bonne exposition à la lumière et ils permettent de contrôler tous les paramètres de culture : pH, température, oxygène, agitation etc....

Actuellement, ils existent plusieurs configurations de photo-bioréacteurs:

- les réacteurs tubulaires consistent en un ensemble de tubes transparents faits de verre ou d'acrylique. Généralement, ils fonctionnent en boucle fermée, la culture étant constamment recyclée. Le milieu de culture, le gaz carbonique peuvent être introduits en continu ou non. À la fin du cycle, la biomasse est récupérée (Richmond, 2007). Il est possible de réduire le diamètre des tubes pour maintenir le ratio surface / volume le plus

élevé possible. Ce type de photo-bioréacteur permet une bonne agitation, il est simple et très facile à nettoyer (figure 13, Wang et al, 2012)

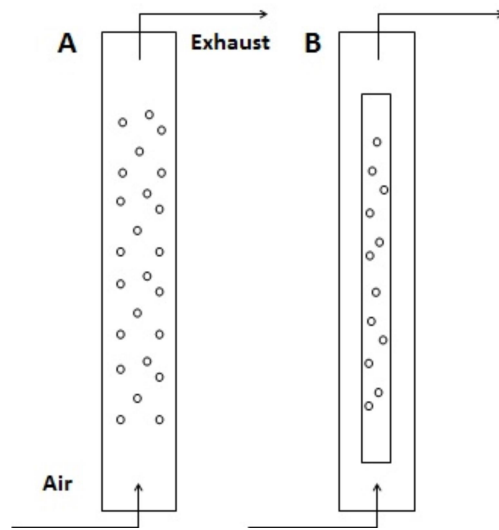


Figure 13. Schéma d'un photobioréacteur tubulaire

On trouve de nombreux autres types : serpentins, panneaux rigides, réacteurs annulaires (Richmond, 2007), sacs plastiques (Pulz, 2007) et colonnes à bulles (figure 14).





Figure 14. Différentes configurations des bioréacteurs des microalgues

<http://chantaldenullepartauquebec.com/>

Une comparaison entre les divers systèmes de culture montre que les photobioréacteurs ont des productivités les plus élevées puisque :

- le taux d'injection de gaz, les concentrations en nutriments, la température, le pH, l'oxygène dissous peuvent être parfaitement contrôlés.
- les microalgues ne sont pas contaminées par d'autres micro-organismes

- Le rapport entre la surface et le volume du réacteur est plus élevé par rapport aux bassins à ciel ouvert, ce qui permet une meilleure illumination et donc une plus grande productivité de la biomasse algale (Brennan et Owende, 2010).
- Les pertes d'eau par évaporation sont beaucoup moins importantes, et même quasi nulles, en comparaison avec les bassins à ciel ouvert. Dans des systèmes ouverts, l'évaporation provoque des changements significatifs des concentrations dans le milieu de culture.

## 5 L'impact des paramètres de culture sur la croissance des microalgues

### 5.1 L'énergie lumineuse

La photosynthèse se produit à des longueurs d'ondes comprises entre 400 et 700 nm qui correspondent à la gamme du « rayonnement photosynthétiquement actif ». Des études de Zemke et al, (2010) montrent que les algues utilisent entre 6 et 16 photons par cellule pour réaliser la photosynthèse (8 photons constituent la référence usuelle des auteurs). L'énergie lumineuse est exprimée en densité de flux de photons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Zemke et al, 2010).

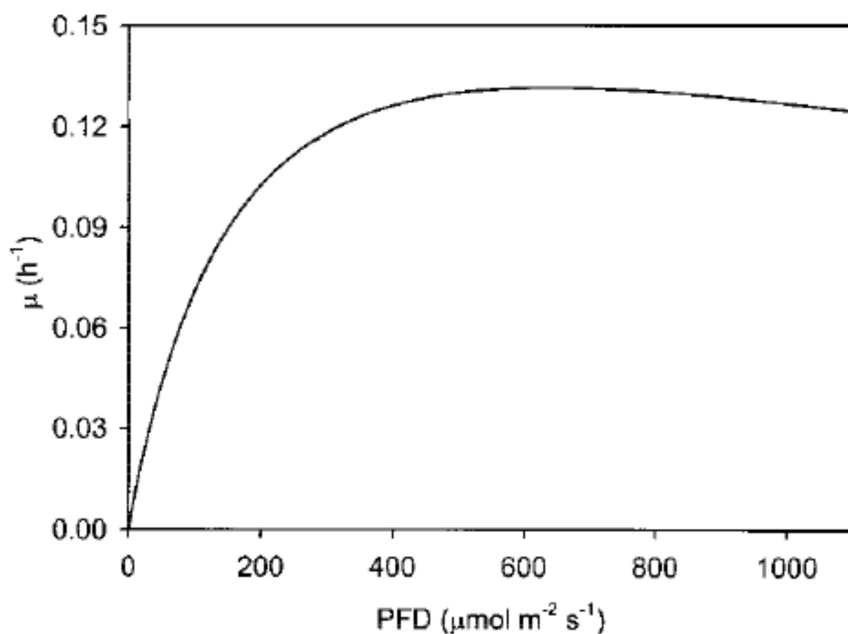
Les pigments des microalgues absorbent les photons qui transportent l'énergie lumineuse. Les types et les concentrations de pigments définissent le positionnement et la largeur du spectre d'absorption d'une espèce de microalgue. Dans le cas où une culture de microalgues est exposée à la lumière artificielle, la source peut être sélectionnée pour produire le spectre de lumière correspondant à l'absorption spécifique des pigments.

Selon la densité de flux de photons, les microalgues possèdent des réponses différentes. Afin d'étudier l'influence de l'éclairement sur la photosynthèse, on peut comparer le taux de croissance avec la densité de flux de photons, en obtenant une courbe divisée en trois régions (figure 15, Janssen et al, 2002).

La première région montre une relation linéaire entre l'activité photosynthétique et l'éclairement (la lumière est un facteur limitant). Pour des intensités lumineuses plus élevées, on observe un plateau où l'éclairement est saturé ou optimal, La troisième région contient des intensités lumineuses très élevées et une baisse d'activité photosynthétique; il existe donc une photoinhibition.

Si la culture de microalgues est réalisée en batch dans des bassins ouverts ou dans des photobioréacteurs, du fait de l'augmentation de concentration en biomasse au cours du temps la lumière diffuse de plus en plus difficilement dans la culture. Cette atténuation va affecter la productivité de la culture, d'où l'importance de créer une agitation adéquate dans le système de culture (Richmond, 2007; Zemke et al, 2010), pour exposer toutes les cellules au flux lumineux de surface.

Une augmentation de l'intensité lumineuse respectant les besoins de la microalgue peut stimuler son métabolisme au lieu de le stresser. Ainsi une forte intensité lumineuse va augmenter la biomasse, la consommation de carbone par le microorganisme et les ratios des éléments intracellulaires C : N, C : P et N : P (Subba Rao et al, 2005 ; Hill et Fanta, 2008 ; Soletto et al, 2008 ; Dubinsky et Schofield, 2010 ; Westerhoff et al, 2010). Toutefois, la réponse de la biomasse à une augmentation de l'intensité lumineuse et éventuellement à la photoinhibition va être en fonction de la condition physiologique de la cellule (Voronova et al, 2008). Par exemple, *Prymnesium parvum* ne présente pas une augmentation de sa vitesse spécifique de croissance lorsque l'intensité lumineuse est augmentée de 122 à 336  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Baker et al, 2007).



**Figure 15. Taux de croissance spécifique de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la densité du flux de photons.**

**PFD : Densité de flux de photons,  $\mu$  : Taux de croissance spécifique**

L'efficacité d'un photobioréacteur à produire de la biomasse algale est gouvernée en partie par la quantité de lumière qui pénètre dans la culture (Cornet, 2010). L'une des manières d'améliorer cette pénétration est d'ajuster la concentration en cellules dans le réacteur.

Une densité cellulaire élevée dense empêche la lumière d'atteindre la totalité des cellules et augmente les phénomènes de photo-ombrage alors qu'une faible densité de cellules augmente les risques de photoinhibition (Cornet, 2010). En effet, pour chaque intensité lumineuse, il existe une concentration cellulaire optimale (Qiang et al, 1998 ; Zijffers et al, 2010).

Une autre manière d'améliorer la pénétration de la lumière dans un réacteur est de diminuer le trajet parcouru par celle-ci et d'augmenter le rapport surface/volume du réacteur (Jacop-Lopes et al, 2009 ; Cornet, 2010 ; Zijffers et al, 2010).

## 5.2 *Le dioxyde de carbone*

Le dioxyde de carbone est un élément nécessaire pour la photosynthèse. Il est généralement admis qu'un kilo de microalgues absorbe entre 1,65 et 1,8 kg de CO<sub>2</sub>, car la biomasse de microalgues est composée de 45 % à 50 % de carbone (Doucha et al, 2005). Selon plusieurs études expérimentales, une injection d'air enrichi en CO<sub>2</sub> dans la culture favorise la croissance des algues. Des concentrations de CO<sub>2</sub>, de 1 à 15 v/v% ont été testées sur plusieurs espèces telles que *Chlorella vulgaris*, *Monoruphidium minutum*, *Scenedesmus*, et *Dunaliella tertiolecta* (Skjanes et al, 2007). Récemment, des études proposent l'utilisation de fumées de centrales électriques pour cultiver des microalgues car celles-ci consomment principalement le CO<sub>2</sub> et potentiellement d'autres gaz tels que NO<sub>x</sub> et SO<sub>x</sub> (Doucha et al, 2005). Néanmoins, il faut traiter les fumées avant de les injecter dans la culture (e.g. en contrôlant la température).

En plus du CO<sub>2</sub> gazeux, les algues peuvent utiliser les ions carbonate et bicarbonate.

## 5.3 *Les nutriments*

Les nutriments sont des éléments présents dans le milieu en faible quantité, mais nécessaires à la croissance et à la survie des algues. Dans le milieu naturel leur concentration va varier en fonction, des conditions environnementales ou des pollutions anthropogéniques. En laboratoire, leurs limitations sont rarement rencontrées parce que les milieux de culture



sont adaptés pour éviter toute carence en ces éléments. Les changements de concentrations vont avoir des répercussions sur les cellules des microalgues.

Les nutriments tels que le carbone, l'azote et le phosphore jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire et la composition biochimique des microalgues. Une altération de concentration en ces nutriments peut provoquer une teneur plus ou moins importante de lipides, de sucres ou des éléments tels que le  $\beta$ -carotène ou l'astaxanthin (Richmond, 2007).

La biomasse algale contient entre 5 et 10% d'azote. Les principales sources d'azote sont les ions nitrate, ammonium et l'urée, le nitrate étant le plus utilisé dans la culture de microalgues.

Selon plusieurs études, la carence en azote augmente la teneur en lipides pour certaines espèces de microalgues et pour d'autres, elle augmente la teneur en carbohydrates (Becker, 1994; Richmond, 2007). Lourenço et al, (2004) ont montré que l'azote est principalement utilisé pour la synthèse protéique. Néanmoins, il est également présent sous la forme d'azote inorganique ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), au sein des acides nucléiques (ARN et ADN) et en faible proportion dans la chlorophylle. De nombreuses études se sont penchées sur l'effet de la concentration en cet élément dans le milieu de culture. Chez *Chlorella vulgaris* (Bhola et al, 2010 ; Tam et al, 1996 ; Dragone, 2011 ; Lv et al, 2010) et *C. ellipsoidea* (Yang et al, 2011) une augmentation de la concentration en azote dans le milieu entraîne une augmentation de la biomasse, de la quantité de protéines et de chlorophylle par cellule.

Quant au phosphore, il est habituellement fourni sous forme d'orthophosphate et il joue un rôle important dans le transfert d'énergie et la biosynthèse des acides nucléiques dans les cellules. Comme l'azote, les carences en phosphore peuvent induire une augmentation de  $\beta$ -carotène ou d'astaxanthine (Sheehan et al, 1998; Richmond, 2007).

Le phosphore permet de réguler et réduire la toxicité des métaux par la formation des PPB (polyphosphate bodies) en maintenant des faibles niveaux cytoplasmiques de métaux. Cela a été démontré chez les diatomées *Amphora* et *Navicula* exposées au cuivre (Daniel et Chamberlain, 1981). Les PPB sont en partie importants chez des microalgues tolérantes et aussi sensibles aux métaux (Hashemi et al, 1994 ; Torres et al, 2008) dans la séquestration des métaux d'importance écologique comme Zn, Pb, Mg, Cd et Al.

Chez *Chlorella vulgaris*, le phosphate a une propriété détoxifiante, en effet, sa présence dans le milieu de culture permet de réduire la toxicité intracellulaire des métaux par la formation des polyphosphates qui se lient aux métaux et réduisent leur toxicité (Jensen et al, 1982; Twiss et Nalewajko, 1992; Lima et al, 2011; Ahii Chia et al, 2013) en maintenant un faible niveau cytoplasmique des métaux. Cette capacité a été démontrée pour les diatomées telles

qu'*Amphora* et *Navicula* qui ont été exposées au cuivre (Daniel et Chamberlain, 1981). Les phosphates sont importants chez les espèces tolérantes aux métaux (Hashemi et al, 1994) ainsi que chez des souches de microalgues sensibles aux métaux (Torres et al, 2008) ; ils interviennent dans la séquestration des métaux lourds et toxiques comme Zn, Pb, Mg, Cd et Al dans les microalgues.

En outre, le phosphore est un élément essentiel pour la cellule, Il intervient au cours de nombreux processus métaboliques (Chen et al, 2011). Il entre en jeu dans les chemins métaboliques régulant la division cellulaire, sa concentration cellulaire va donc avoir un impact direct sur la production de biomasse. Il est aussi nécessaire dans la cellule pour satisfaire les besoins énergétiques et de biosynthèse des organites (Moseley et al, 2006).

Une limitation en phosphore va entraîner une baisse de la biomasse, de la quantité de chlorophylle (Aii Chia et al, 2013), de polysaccharides et de protéines dans la cellule (Wykoff et al, 1998 ; Persic et al, 2009 ; Sun and Wang, 2009).

Le fer est important dans de nombreuses fonctions métaboliques de phytoplancton tels que le transport électronique dans le cycle de Calvin, la réduction d'ions nitrate et nitrite, la fixation de l'azote et la synthèse de la chlorophylle.

Le magnésium est un métal essentiel pour la croissance des algues, il joue un rôle important dans la photosynthèse (Encarnaç o et al, 2012). Le magnésium est en effet un élément central de la molécule de chlorophylle. Il est impliqué dans l'agrégation des ribosomes dans les unités fonctionnelles et dans la formation de catalase (Junior et al, 2006). Les travaux de recherche de Gorain et Bagchi (2013) ont montré que des carences en magnésium donnent une diminution du rendement de la production de biomasse et une hausse de la teneur des lipides chez *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus obliquus*.

Le présent travail s'attache à démontrer également l'effet du magnésium pour la croissance de *Chlorella vulgaris*.

#### 5.4 L'agitation

L'agitation lors de la culture des microalgues, est indispensable pour obtenir des productivités importantes de biomasse. Elle permet de mieux éclairer les cellules, de favoriser l'apport de CO<sub>2</sub> en améliorant le transfert gaz-liquide et d'éliminer l'oxygène produit qui pourrait être toxique à la culture.

L'agitation est réalisée fréquemment en injectant le gaz, air ou air enrichi en CO<sub>2</sub> dans le réacteur sous forme de fines bulles, ce qui crée une circulation du liquide dans le système (Converti et al, 2006).

Des études expérimentales ont montré qu'à faibles densités cellulaires, l'agitation n'a pas un effet significatif sur la productivité de la biomasse. Toutefois, lorsque les densités cellulaires commencent à augmenter, il est nécessaire de favoriser l'agitation à l'intérieur de la culture (Richmond, 2007; Eriksen, 2008).

Certaines recherches ont prouvé que le taux d'injection de gaz à haut débit peut endommager les cellules (Eriksen, 2008). Si le taux d'injection de gaz est trop élevé, les cellules risquent d'être cisailées par les bulles et endommagées. Il est donc nécessaire de trouver le débit le plus approprié pour éviter ce risque.

### 5.5 La température

La gamme de température la plus appropriée dépend de l'espèce de microorganisme à cultiver. Des études ont montré que les changements de température ont affecté la composition en acides gras des membranes cellulaires, qui assurent la stabilité et la fluidité des membranes, en particulier les thylakoïdes (Richmond, 2007). D'autre part, les changements de température affectent le métabolisme des acides gras, en transformant les acides gras insaturés en acides gras saturés. Chez certaines espèces, une diminution de la température favorise une augmentation des acides gras insaturés et vice-versa (par exemple *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* et *Botryococcus braunii*) (Sushchik et al, 2002). Des changements dans le taux des pigments (l'astaxanthine,  $\beta$ -carotène et cantaxanthine) ont été également observés lorsque la température a augmenté.

Lorsque la cellule est exposée à des températures basses, son métabolisme est ralenti, mais la quantité d'énergie absorbée par la photosynthèse reste identique, elle absorbe donc trop d'énergie par rapport à sa capacité à l'utiliser et souffre donc de photoinhibition (Hune et al, 1998).

Le contenu cellulaire va lui aussi varier avec la température. Par exemple, la quantité d'acides gras insaturés augmente avec une diminution de la température chez *S. platensis*, *C. vulgaris*, *B. Braunii* et *P. tricornutum* (Sushchik et al, 2003 ; Jiang et Gao, 2004).

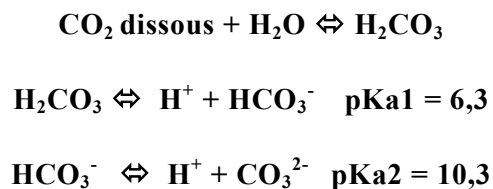
## 5.6 Le pH

Le pH dépend principalement de la concentration en carbone inorganique dans le milieu, sous forme de CO<sub>2</sub>, acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). En choisissant bien le pH de la culture, on peut obtenir une grande concentration en biomasse et en lipides pour certaines souches de microalgues.

Un pH élevé au delà de 9 peut provoquer la précipitation de certains sels de calcium (Becker, 1994; Sirisansaneeyakul et al, 2011). Mayo et al, (1997) ont montré que *Chlorella vulgaris* peut tolérer un pH très bas jusqu'à 3,0. En revanche, un pH final élevé (11) peut inhiber la croissance d'une autre souche de *Chlorella* (Yeh et al, 2010).

La variation de pH dans le milieu est liée aux variations des concentrations en diverses espèces de carbone inorganique dans le milieu de culture: CO<sub>2</sub> dissous, acide carbonique, bicarbonate, et carbonate. Ces variations sont dues à différents phénomènes : activités photosynthétiques, assimilation des ions nitrate, apport de CO<sub>2</sub> dans la culture, CO<sub>2</sub> produit lors de la respiration (Figure 16, Becker, 1994).

Les équilibres acidobasiques entre les quatre formes du carbone inorganique sont les suivantes :



**Figure 16. Equilibres du dioxyde de carbone dans l'eau**

Le pH extracellulaire est donc un facteur crucial pour maintenir une réserve de carbone en solution. Si le pH est inférieur à 5-6, l'espèce prépondérante en solution sera CO<sub>2</sub>, espèce très peu soluble qui de plus est consommée par les algues. Si le transfert de matière gazeuse n'est pas suffisant pour compenser cette consommation, on peut se trouver très vite en limitation de carbone. En augmentant le pH au dessus de pKa1, on constitue une réserve de bicarbonate qui évite l'épuisement de carbone. Il est donc important de maintenir une gamme de pH adéquate pour éviter la perte de dioxyde de carbone présent dans le milieu (Becker, 1994). Entre les pH intracellulaire et extracellulaire, il existe un équilibre

dépendant des conditions environnementales ce qui influe sur le fonctionnement de la cellule. De nombreux processus métaboliques sont dépendants du pH comme l'activité des enzymes (Bartual et Galvez, 2002).

### 5.7 Conclusion

En conclusion, pour obtenir une croissance optimale, il faut bien déterminer les paramètres suivants : température, intensité lumineuse, pH, salinité, concentrations des nutriments, agitation. Le Tableau 3 représente les gammes de variation de ces paramètres pour les microalgues et *Chlorella vulgaris* en particulier.

**Tableau 3. Données sur les paramètres de culture d'une microalgue**

Paramètres de culture*	Gamme* pour les microalgues	Commentaires*	Gamme pour <i>Chlorella vulgaris</i> **
Température	16 – 27 ° C	> 35 ° C température mortelle	25,0 ° C
Lumière	100 – 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Risque d'un surchauffage au-delà de 200 $\mu\text{mol}$	20,4 et 2400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
pH	7 – 9	8,2 – 8,7 optimal	6,5 début de l'expérience
Salinité	Variable	Légèrement inférieur à l'habitat naturel	Variable
Agitation	Agitation manuelle, orbitale, table à rouleau, injection d'air		Injection d'air avec ou sans enrichissement en CO <sub>2</sub>
* (Barsanti et Gualtieri, 2006) ** la présente étude			

## 6 Modes de culture

*Chlorella vulgaris* peut croître sous divers modes de culture :

- Autotrophe : c'est le mode de culture en masse basé sur la photosynthèse, sans apport de source de carbone organique. Les microalgues consomment le CO<sub>2</sub> pour la synthèse de la matière organique via la photosynthèse.
- Hétérotrophe : c'est un mode de culture rentable pour cultiver les microalgues à grande échelle, elles sont en effet capables d'utiliser le carbone organique comme source d'énergie. Ce mode de croissance élimine le besoin en lumière et il est ainsi possible d'obtenir des concentrations élevées en microalgues en système batch. Une amélioration est possible en batch alimenté ou avec recyclage de la biomasse après séparation membranaire, ce qui a permis d'obtenir des concentrations cellulaires au-dessus de 130 g. L<sup>-1</sup> (Chen, 1996).
- Mixotrophe : c'est un mode de culture combinant l'autotrophie et l'hétérotrophie. Il permet d'obtenir une grande quantité de biomasse ainsi qu'un taux de croissance élevé en même temps que la production de métabolites photosynthétiques.

## 7 La bioaccumulation des oligoéléments dans les microalgues

On désigne par **bioaccumulation**, en écotoxicologie, le processus d'absorption par lequel les êtres vivants peuvent accumuler/stocker des polluants dans leurs organismes. Chez les microorganismes aquatiques, c'est la somme des absorptions par contact et par ingestion, et celle par voie transbranchiale pour organismes aquatiques. La bioaccumulation n'implique pas forcément une augmentation de la concentration d'un polluant quand il passe du biotope à la biocénose.

La **bioconcentration** est un cas particulier de bioaccumulation. Elle est définie comme le processus par lequel une substance se trouve présente dans un organisme vivant à une concentration supérieure à celle de son milieu environnant. C'est donc l'augmentation directe de la concentration d'un contaminant lorsqu'il passe de l'eau à un organisme aquatique. Le facteur de concentration (FBC) peut être défini comme le rapport à l'équilibre de la concentration d'un élément dans un organisme à sa concentration dans le biotope (Veith et al, 1979; Ramade, 1992).

Ainsi, le concept de bioaccumulation résulte de la balance nette des processus d'accumulation, de stockage et d'excrétion d'une substance dans un organisme. La bioaccumulation, phénomène capital au niveau de l'organisme, est exprimée par la différence entre la quantité de métaux qui pénètre au travers des barrières biologiques et celle qui est éliminée vers le milieu extérieur (processus d'excrétion). Pénétration, stockage dans les organes cibles et élimination seront sous la dépendance des facteurs abiotiques du milieu, de la nature du contaminant et des caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'organisme ou de l'espèce considérée.

### *7.1 Les processus de bioaccumulation des métaux dans les microalgues*

De manière générale, deux processus principaux interviennent lors de l'internalisation d'un métal/métalloïde dans le milieu intracellulaire, après le transfert de l'espèce de la source vers la surface cellulaire: i) l'adsorption de l'espèce sur cette surface; ii) le transport de l'espèce à travers la membrane plasmique et sa diffusion dans la cellule (absorption); ces phénomènes dépendent notamment des concentrations extra- et intra- cellulaires ainsi que de la spéciation de l'élément (Sunda et Huntsman ,1998 ; Nourbakhsh et al, 1994). L'adsorption physique est rapide dès que l'algue vient en contact avec le métal, L'absorption ou bioaccumulation, est lente et liée à l'activité métabolique (Flogar et al, 2009).

#### *7.1.1 Adsorption à la surface cellulaire*

Les microalgues peuvent généralement être considérées comme des particules dont la stabilité est due à la charge de la surface cellulaire, négative pour une gamme de pH de 2,5 à 11,5.

Chez les algues, deux types de liaisons entraînent l'adsorption des éléments: i) des liaisons ioniques générées par la charge de surface négative; ii) des liaisons covalentes avec les groupements fonctionnels des protéines membranaires (principalement des groupes carbonyle et amino) (Macfie et Welbourn, 2000). La tendance à l'électroneutralité implique que les cations sont attirés tandis que les anions sont repoussés, ce qui induit une adsorption en général très faible des anions. L'attraction des cations est d'autant plus importante que le pH est élevé et la force ionique faible, à cause d'une charge surfacique accrue. Au contraire, les polluants anioniques ont plus tendance à être adsorbés à faible pH et forte force ionique.

Il a ainsi été montré que des concentrations croissantes en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}^+$  ont tendance à accroître l'adsorption de complexes métalliques chargés négativement, (Crist et al, 1981).

### 7.1.2 Transport à travers la membrane plasmique

#### a. Mécanismes généraux

Le transfert des éléments/molécules du milieu de culture à la cellule à travers la membrane plasmique est souvent considéré comme l'étape limitante, les phases de transfert externe à la cellule et de complexation à la surface cellulaire étant beaucoup plus rapides et complexes.

Il existe plusieurs types de transport :

- Le transport passif : réalisé par simple diffusion en fonction du gradient électrochimique à travers des canaux ioniques ou à travers la bi-couche phospholipidique, sans que la cellule dépense de l'énergie.
- Le transport facilité : la prise en charge de la molécule à transférer se fait par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire, sans dépense d'énergie
- Le transport actif : ce transport est assisté via un transporteur membranaire, contre le gradient de concentration, avec dépense d'énergie. Les prises en charge faisant intervenir des transporteurs membranaires suivent en général un modèle similaire au modèle de Michaelis-Menten.

Le flux d'internalisation ou de transfert à travers la membrane,  $\varphi$  (exprimé en  $\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ), est alors donné par l'équation de saturation (7) :

$$\varphi = \frac{V_m [I]}{K_m + [I]} \quad (7)$$

où  $[I]$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) est la concentration de l'ion en solution,  $V_m$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) est le flux d'internalisation maximal et  $K_m$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) est la constante de demi-saturation (Sunda et Huntsman, 1998).



**b. Cas des éléments anioniques**

Dans le cas des anions, le potentiel trans-membranaire étant négatif (de  $-100$  à  $-200$  mV), il est peu probable que la diffusion passive intervienne dans le transport ; les canaux anioniques sont plutôt responsables d'un flux d'anions (vers l'extérieur de la cellule). Pour expliquer la présence d'anions dans la cellule, on suppose des phénomènes de co transport avec des protons ou autres cations. (Barbier-Brygoo et al, 2000). Par exemple, la prise en charge du phosphate et du sulfate se fait via un mécanisme de symport du sodium ( $\text{Na}^+$ ) (Weiss et al, 2001). Les principaux anions présents dans les tissus cellulaires sont les ions nitrate, chlorure, sulfate et phosphate. Le carbonate (hydrogénocarbonate) est également présent à faible concentration. Les canaux assurant le transfert des ions  $\text{Cl}^-$  sont en général perméables à d'autres anions, mais pas aux oxyanions dont la taille est plus élevée (Simkiss et Taylor, 1995). Sulfate, phosphate, nitrate et carbonate sont pris en charge par d'autres transporteurs peu sélectifs, avec des fortes ou faibles affinités. Le transport membranaire des métaux sous forme d'oxyanions (molybdène, vanadium, chrome, arsenic, antimoine, sélénium, technétium...) pourrait faire intervenir des transporteurs de faible affinité. Ainsi, les nutriments en solution pourraient directement influencer l'accumulation d'oxyanions par compétition pour les mêmes voies d'assimilation.

**c. Cas d'éléments cationiques**

Les groupes fonctionnels de la surface cellulaire possèdent des charges négatives qui attirent les cations, notamment les cations métalliques, et peuvent créer des liaisons électrostatiques avec les métaux cibles (Andrade et al, 2005).

Les métaux lourds (cadmium, zinc, plomb, chrome,...) sont considérés comme des micropolluants puisqu'ils sont présents dans l'environnement à l'état de trace. Ils n'en demeurent pas moins des composés dangereux pour les êtres vivants, de par leur toxicité mais également leur persistance. En milieu aquatique, de nombreux paramètres influencent la spéciation des métaux lourds, notamment la présence de ligands, d'ions compétiteurs tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , les conditions redox, la température, le pH, la force ionique... (Campbell et al, 1987).

Tableau 4. Formes physicochimiques possibles des métaux dans le milieu aquatique

Formes physicochimiques possibles		Exemples
Ion métallique hydraté		$\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$
Complexe	organique	Al-citrate, Cu-fulvate
	inorganique	$\text{CuCO}_3$
Espèce colloïdale	organique	$\text{Cu}^{2+}$ - acide humique
	inorganique	$\text{Pb}^{2+}$ - $\text{MnO}_2$
Espèces particulières		Métaux associés à des minéraux, sols, argiles, bactéries, microalgues, matières organiques

Plusieurs réactions physico-chimiques ou biologiques conditionnant la spéciation d'un métal peuvent donc survenir dans un milieu aussi complexe que le milieu aquatique.

#### Les réactions de complexation-dissociation



Les ligands peuvent être minéraux ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ...), ou organiques (matière organique dissoute comme les acides humiques dissous) (Town et al, 2002) ou bien des composés organiques anthropogéniques (EDTA...) (Barbier, 2003) ou des microorganismes tel que les microalgues (Rai et al, 2013).

#### Les réactions d'adsorption-désorption sur d'autres supports

On peut ainsi trouver des particules d'origine organique ou biologique comme les bactéries ou le phytoplancton (Barbier, 2003; Mahdavi et al, 2013; Rai et al, 2013) mais également des résidus de dégradation de la matière organique ou des substances humiques. Les argiles, la silice peuvent aussi adsorber les métaux. Ce mécanisme est contrôlé par plusieurs facteurs comme le pH, la salinité, la surface spécifique des substrats, la concentration en ligands, ou en éléments compétiteurs ...

### 7.1.3. Exemples de quelques métaux

*C. vulgaris* peut accumuler plus de 70% de chrome dans sa paroi lorsqu'elle est cultivée en présence de ce métal en solution (0,1 à 100 ppm). (Rai et al, 2013). Cette étude a été exploitée pour déterminer des biomarqueurs de chrome. Le taux de croissance, la quantité de chlorophylle et de protéines contenues dans la cellule, l'activité des enzymes antioxydantes ont permis d'estimer les dommages métaboliques : création d'un stress oxydatif, changements biochimiques, destruction des pigments de la photosynthèse (diminution de la chlorophylle et des caroténoïdes).

Le cadmium est un polluant toxique qui a été largement étudié au cours des dernières décennies, il a de multiples effets sur les organismes vivants aux niveaux moléculaire, cellulaire et concentrations tissulaires (Pinto et al, 2003). Lee et Shin, (2003) ont montré que le cadmium induit un stress oxydatif dans des cellules d'algues. En générant des radicaux libres et des espèces réactives oxygénées. Les effets toxiques du métal conduisent à inactiver certaines enzymes et peuvent inhiber la phosphorylation oxydative (Lima et al, 2011).

Wang et Dei, (2001), ont montré l'influence de l'ion phosphate dans la régulation de l'absorption cellulaire du cadmium en *C. autotrophica*. Des carences en phosphate peuvent également être induites par le cadmium, car ce métal affecte le métabolisme du phosphore dans les algues (Nalewajko et Olaveson, 1995; Paulsson et al, 2002).

Une diminution de la croissance algale est généralement observée en présence de métaux lourds (Ting et al, 1991; Chouteau, 2004). Cette diminution dépend du métal considéré et de sa concentration. Ainsi, l'impact de différents métaux sur la croissance de l'algue marine *Phaeosactylum trinitum* a été étudié. Pour des concentrations similaires ou en présence d'un excès de cadmium, l'effet est plus important pour le cadmium que pour le zinc. Dans le cas contraire Si sa concentration est faible, si le zinc est en excès, c'est lui qui contrôle la toxicité (Wang et al, 1995; Khan et al, 2013).

La taille moyenne et la distribution de taille d'une population algale peuvent être modifiées par des métaux comme le cadmium et le zinc (Ting et al, 1991; Khan et al, 2013). L'augmentation de la taille moyenne des cellules de *Chlorella vulgaris* après une exposition à des concentrations de Cd ou de Zn supérieures à  $6 \cdot 10^{-5}$  M a été mise en évidence, l'effet le plus marqué apparaissant pour Cd. En ce qui concerne la distribution en taille des cellules, ces mêmes travaux ont montré que les réponses diffèrent selon les durées d'exposition aux toxiques et leurs concentrations ; l'exposition aux métaux augmente en général

l'hétérogénéité en taille et des effets importants ont été montrés pour des mélanges Cd-Zn dans des conditions où les métaux seuls ont peu d'influence (synergie).

Des effets sur les structures intracellulaires des algues peuvent également être observés lors d'expositions prolongées à des solutions contenant des métaux lourds. Des essais sur *Clamydomonas acidophila* ont montré qu'après un traitement avec du cadmium, du zinc ou du cuivre, les cellules algales présentaient des dommages structurels (Nishikawa et al, 2003). Le cadmium cause ainsi les changements les plus importants : augmentation des granules d'amidon, des vacuoles et des chloroplastes. Une nouvelle structure apparaît même puisque des dépôts non membranaires denses en électrons se forment dans les vacuoles.

Chez *Chlorella vulgaris* par exemple, en réponse à un stress par les métaux lourds, une hormone, la brassinolide, est produite pour aider la cellule à contrer ces effets cytotoxiques (Bajguz, 2010).

Toutefois certains métaux lourds comme le cuivre et le zinc sont indispensables à la vie, mais à des teneurs très faibles (Sunda et Huntsman, 1998); au delà ils deviennent toxiques. Ils entrent dans la cellule sous forme ionique grâce à des protéines de transport membranaire (Sunda et Huntsman, 1998). On remarque que la part de métaux intracellulaire est beaucoup plus faible que la part adsorbée sur la surface cellulaire (Zhou et al, 2012).

Chojnacka, (2007) a étudié la bioaccumulation de métaux par *C. vulgaris*. Selon ses résultats, la surface cellulaire contient trois groupes fonctionnels d'échange de cations responsables de la bioaccumulation. *C. vulgaris* contient des niveaux naturels assez élevés en microéléments: cuivre 380 mg kg<sup>-1</sup>, manganèse 690 mg kg<sup>-1</sup>, zinc 1,600 mg kg<sup>-1</sup> et chrome 240 mg kg<sup>-1</sup>.

La paroi cellulaire des algues contient non seulement des composés organiques, mais également des cations Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> (Davis et al, 2003; Rajfur, 2013). Lors de la bioaccumulation du cobalt par l'algue *Ascophyllum nodosum*, la libération de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> dans la solution a été observée (Kuyucak et al, 1989). Ainsi, lors de la bioaccumulation de Cr<sup>3+</sup> et Pb<sup>2+</sup>, une augmentation de la concentration en calcium a été observée dans la solution (das Graças Nunes Matos et al, 2009). Il s'agit d'un processus d'échange d'ions entre Ca<sup>2+</sup> fixé et les cations métalliques en solution (Das Graças Nunes Matos et al, 2009).

En se basant sur la littérature, les capacités de bioaccumulation de différents métaux chez les différentes espèces d'algues sont représentées dans le Tableau 5 :

**Tableau 5. Capacité de sorption des algues et conditions physico-chimiques de l'accumulation**

<b>Espèce d'algue</b>	<b>Capacité de bioaccumulation du métal (mg/g)</b>	<b>Références</b>
<i>Cladophora glomerata</i>	Cu; 15,0	(Yalçın et al, 2008)
<i>Cladophora glomerata</i>	Pb; 22,5	(Yalçın et al, 2008)
<i>Oedogonium</i>	Pb; 145	(Gupta et al, 2008)
<i>Nostoc sp.</i>	Pb; 93,5	(Gupta et al, 2008)
<i>Oedogonium</i>	Cd; 31,0	(Gupta et al, 2007)
<i>Spirogyra sp.</i>	Cr; 14,7	(Gupta et al, 2001)
<i>Spirogyra sp.</i>	Pb; 140	(Gupta et al, 2008)
<i>Spirogyra sp.</i>	Cu; 133,3	(Gupta et al, 2006)
<i>Ecklonia maxima</i>	Cu; 85-94	(Feng et al, 2006)
<i>Ecklonia maxima</i>	Pb; 227-243	(Feng et al, 2006)
<i>Ecklonia maxima</i>	Cd; 83,5	(Feng et al, 2006)
<i>Chlorella Vulgaris</i>	Cr ; 3,58	(Rai et al, 2013)
<i>Chlorella Vulgaris</i>	U; 14.3-28.3	(Vogel et al, 2010)

L'étude de l'interaction entre les contaminants et les surfaces biologiques suscite un intérêt croissant pour la compréhension des phénomènes écotoxicologiques, particulièrement la bioaccumulation et les transferts à travers les membranes cellulaires. Il est bien connu que les niveaux des concentrations en métaux dans les organismes ne sont pas le seul résultat de leur biodisponibilité dans l'environnement. Les processus impliqués sont très complexes et sont influencés par le contaminant (taille molécule, spéciation chimique, ...etc.), l'organisme récepteur (propriétés membranaires, composition chimique, processus actifs), et l'environnement intra et extracellulaire (température, pH, ... etc.).



En plus de son rôle dans la photosynthèse, ce cation est primordial pour l'agrégation des ribosomes et aussi pour le bon fonctionnement de certaines enzymes responsables de différentes activités cellulaires (Shaul, 2002).

Des recherches ont montré que l'ajout de sulfate de magnésium améliore la production de biomasse de *C. vulgaris* cultivée en mixotrophie (Sarma et al, 2014). La production de lipides a notamment été augmentée lorsque ce sel a été ajouté sous forme de nanoparticules. D'autres auteurs ont également constaté une meilleure production des lipides en ajoutant  $Mg^{2+}$  dans le milieu de culture de *C. vulgaris* (Gorain et al, 2013 ; Schowenk, 2012).

García-Pérez, (2014) ont montré l'effet flocculant du Mg sur *C. vulgaris*, ce qui permet de faciliter la récolte de l'algue. La précipitation d'hydroxyde de magnésium favorise aussi la floculation, le pH joue également un rôle important dans ce phénomène.

L'absorption de magnésium dans les microalgues reste cependant peu étudiée et ce sera l'objet de ce travail ce qui permettra d'élucider ces mécanismes complexes.

## 7.2 Les facteurs affectant la bioaccumulation

La bioaccumulation est affectée par certains paramètres :

- Extrinsèques : température, pH, concentration en métal, présence d'autres métaux, leurs interactions et concentrations, force ionique ...etc.
- Intrinsèques : concentration et type de la biomasse, viabilité des cellules, possibilité de régénération des cellules...etc.

Ces paramètres ont un grand impact sur l'efficacité de biosorption de métal et par conséquent sur la capacité totale de la bioaccumulation (Terry et Stone, 2002; Peña-Castro et al, 2004; Andrade et al, 2005; Hassler et al, 2005; Chojnacka, 2007; Worms et al, 2010).

### 7.2.1 Impact de la température

L'effet de la température sur la bioaccumulation des métaux chez les microalgues diffère selon le type du métal et de la microalgue.

Dans certains cas, la bioaccumulation augmente avec la température : la teneur en  $\text{Ni}^{2+}$  adsorbée par *C. vulgaris* est plus importante à température élevée (Aksu, 2002). Par contre la sorption de  $\text{Ni}^{2+}$  par *Oedogonium Hatei* révèle un caractère exothermique. L'augmentation de la température conduit à une diminution de la concentration en ions métalliques absorbés : à 298°K on trouve 42 mg Ni/g biomasse, contre 37,3 mg Ni/g biomasse à 318°K. Dans ce cas, les températures élevées peuvent endommager les centres actifs responsables de la sorption de Ni. La température optimale choisie pour mener les processus de sorption des métaux lourds par les algues *Oedogonium sp.*, *Nostoc sp.* et *Spirogyra sp.* était de 298°K (Gupta et al, 2010).

### 7.2.2 Impact du pH

L'effet du pH est primordial car il joue sur la spéciation du métal en solution et donc sa capacité à se lier avec les groupes fonctionnels à la surface de l'algue (Gupta et Rastogi, 2008). A faible pH les groupes fonctionnels se lient préférentiellement avec les ions  $\text{H}^+$ , ce qui va empêcher la liaison du métal à la surface. En revanche à un pH élevé, ces sites fonctionnels sont chargés négativement, ce qui favorise la liaison des cations métalliques avec les surfaces cellulaires (Gupta et Rastogi, 2008).

Plusieurs études ont prouvé que l'augmentation de la biosorption des métaux est liée à l'augmentation du pH. Par exemple et selon Monteiro et al, (2009, 2010) la bioaccumulation de  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  dans *Desmodesmus pleiomorphus* augmente pour des pH supérieurs à 4 - 5.



Le Tableau 6 montre la capacité de biosorption des métaux à différents pH chez *Chlorella vulgaris* :

**Tableau 6. Effet du pH sur la biosorption des métaux (Cu, Ni, Cr)**

Algue	pH	Capacité de biosorption du métal (mg/g de biomasse)	Références
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,5	Cu; 5,3	(Mehta et al, 2001)
	5,5	Ni; 14,1	(Mehta et al, 2001)
	5,0	Ni; 42,3	(Dönmez et al, 1999)
	2,0	Cr; 23,0	(Dönmez et al, 1999)

### 7.2.3 Impact de la concentration en métal

A priori, le niveau maximal de biosorption augmente avec l'augmentation de la concentration en métal de la solution ; éventuellement il atteint une saturation après avoir atteint le seuil de concentration en métal de la solution prévu par l'isotherme d'absorption (la Rocca et al, 2009).

La présence d'autres métaux dans le milieu peut affecter la biosorption des métaux. Il peut y avoir des interactions compétitives entre ces métaux et les sites de biosorption à la surface cellulaire des algues (Arief et al, 2008). Senthilkumar et al, (2006), ont montré une diminution de la bioaccumulation du zinc par l'algue *Ulva reticulata* quand la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent dans la solution.

Fraile et al, (2005) ont constaté que la présence de  $\text{Cd}^{2+}$  diminue la biosorption de  $\text{Zn}^{2+}$ . Selon Khan et al (2013), les associations  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  sont moins toxiques que  $\text{Zn}^{2+}$  seul, contrairement à  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  seuls. Dans certains cas l'effet combiné des métaux peut être bénéfique pour la bioaccumulation dans les microalgues (Khan et al, 2013).

#### 7.2.4 Impact de la spéciation chimique

De nombreuses recherches sur différents contaminants cationiques, ont montré que la concentration totale d'un élément prédit mal sa biodisponibilité. La prise en charge dépend fortement de la spéciation, qui dépend elle-même des paramètres physicochimiques, en particulier de la présence de ligands organiques et inorganiques pouvant former des complexes avec le métal.

Rappelons que dans les algues vertes, la matrice de la paroi cellulaire contient des hétéropolysaccharides ramifiés, avec des groupes carboxyle et sulfate et des protéines (10 à 70% de la paroi de la cellule) (Schiewer Wong, 2000; Siegel et Siegel, 1973). La surface de la cellule de la microalgue, qui peut donc être considérée comme une macromolécule polyfonctionnelle, se comporte comme un ligand hétérogène et contribue à la bioaccumulation extracellulaire.

Un grand effort de recherche a été mené ces dernières années pour prédire la spéciation de métaux cationiques et pour établir un lien entre cette spéciation et la disponibilité à divers organismes aquatiques (Campbell, 1995; Sunda et Huntsman, 1998; Fortin, 2000; Twiss et al, 2001; Campbell et al, 2002; Denison, 2002; Fortin et al, 2004). Des modèles ont été développés afin de formaliser ces concepts.

Le premier modèle énoncé, formulé par Morel (1983), est le FIAM (Free-Ion Activity Model). Ce modèle stipule que la toxicité ou la bioaccumulation d'un métal varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre. Dans ce cadre, l'interaction d'un métal avec une surface cellulaire peut impliquer le métal sous sa forme libre ( $Mz^+$ ), mais aussi sous une forme complexée (ML), à condition qu'il y ait possibilité de décomplexation au niveau du site de transport.

Ces dernières années, dans un souci de définir des critères de qualité de l'eau, le BLM (Biotic Ligand Model) a été développé. Les bases conceptuelles de ce modèle sont les mêmes que celles du FIAM. Il intègre la spéciation de l'élément en solution, la formation du complexe métal/ligand biotique et la réponse toxique induite par le complexe. Il prend en compte la possibilité d'assimilation de complexes métalliques, même si le métal libre est toujours considéré comme le plus biodisponible et toxique (De Schamphelaere et Janssen, 2002; Paquin, 2002 ; Niyogi et Wood, 2003; Denison, 2004).

### 7.2.5 Impact de la concentration en biomasse

La quantité de métaux adsorbée par les microalgues dépend bien évidemment de la concentration en biomasse dans la solution (Arief et al, 2008) car elle est directement liée au nombre de sites de liaison.

Cependant on peut observer une diminution de cette quantité lorsque la biomasse augmente, du fait de l'agrégation partielle des cellules, réduisant la disponibilité des sites et pouvant induire un effet stérique (Muñoz et al, 2006 ; Gupta et al, 2008).

Ahuja et al, (1999), ont montré que l'augmentation de la concentration en biomasse de 0,04 à 0,2 g L<sup>-1</sup> engendre une diminution de la concentration de métal adsorbé par unité de masse cellulaire. Gong et al, (2005), ont reporté la diminution de la bioaccumulation de Pb<sup>2+</sup> par *Spirulina maxima* de 121 à 21 mg g<sup>-1</sup> quand la concentration en biomasse passe de 0,1 à 20 g L<sup>-1</sup>.

### 7.2.6 Impact de la viabilité des cellules algales

Les cellules d'algues vivantes et mortes sont capables de jouer le rôle d'adsorbant de métaux (Kadukova et al, 2005 ; Doshi et al, 2007).

La biosorption des métaux par des cellules vivantes peut se faire par ad/ absorption passive ou active.

La biosorption des métaux par des cellules mortes se fait uniquement par un processus d'adsorption passif, sur la surface cellulaire. Les phénomènes réversibles d'adsorption permettent des cycles de sorption/désorption ainsi que la récupération du métal adsorbé (Mehta et al, 2005; kadukova et al, 2005). Enfin, les cellules mortes ne présentent pas les mêmes inconvénients que les cellules vivantes : pas besoin de nutriment, pas de sensibilité aux conditions chimiques de la solution (Donmez et al, 2002).

L'inactivation des cellules de microalgues par la chaleur avant biofixation conduit à des résultats variables. Monteiro et al, (2011), ont observé une baisse d'adsorption du zinc par *Scenedesmus obliquus* et *D. pleiomorphus* après une inactivation des cellules par la chaleur.

En revanche, Kadukova et Vircikova, (2005) ont montré que la performance de la biomasse morte par traitement thermique est meilleure.

## 8 Conclusion

Les microalgues sont connues par leur propriétés biochimiques très intéressantes qui leur offrent une large gamme d'exploitation dont la bioaccumulation des métaux. Dans ce sens, les microalgues sont largement utilisées dans l'absorption des métaux d'intérêt pour des fins industrielles, notamment le magnésium pour une application cosmétique. De plus, cette technique est moins coûteuse et plus rentable que la méthode chimique.

Les chapitres suivants vont porter sur l'étude de l'effet de magnésium dans une large gamme de concentrations sur la croissance de *C. vulgaris* et de sa bioaccumulation par les cellules, à partir d'une campagne expérimentale de culture en batch de la biomasse dans différents réacteurs, en mode d'autotrophie et de mixotrophie.

Dans les deux cas, la croissance des cellules et la cinétique de bioaccumulation de l'ion magnésium ont été suivies. Des bilans matière de cet ion différenciant absorption et adsorption ont été établis à différents stades de la culture. Un modèle mathématique décrivant la bioaccumulation de ce métal par *C. vulgaris* a été développé et ses paramètres identifiés. Les résultats expérimentaux confirment la validité du modèle proposé.

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

## 1 Culture de *Chlorella vulgaris*

### 1.1 Inoculum

L'inoculum de *C. vulgaris* CCAP 211/11B est mis en culture dans du milieu Bristol 3N modifié dans des erlenmeyers fermés par un bouchon en mousse (Fisher scientific, 11901935 - X100) pour assurer l'échange gazeux. Ces erlenmeyers sont maintenus à 25°C avec un apport d'air contenant une concentration en CO<sub>2</sub> de 1,5-2 % (v/v). Les cultures sont éclairées en continu avec une intensité lumineuse de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> et agitées à 101 rpm. Chaque semaine, l'inoculum est rafraîchi et dilué à 1% avec du milieu Bristol 3N modifié neuf.

### 1.2 Milieu de culture

*C. vulgaris* est mise en culture dans un milieu Bristol 3N modifié dont la composition est détaillée dans l'annexe I. C'est un milieu composé d'un mélange de trois solutions. Ces solutions sont préparées au préalable et conservées à 4 °C. Elles sont régulièrement renouvelées afin de minimiser le risque de précipitation ou de contamination par des microorganismes.

Avant chaque expérience, le milieu de culture est autoclavé à 120 °C, à une pression de 1.1 bar pendant 20 minutes.

La solution A du milieu Bristol contient du sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>) qui donne une concentration théorique de magnésium (Mg<sup>2+</sup>) de 7,4 mg L<sup>-1</sup> dans le milieu de culture.

### 1.3 Les réacteurs de culture de *C. vulgaris*

#### 1.3.1 L'incubateur

L'incubateur (figure 18) a permis de réaliser les précultures de *C. vulgaris* et des essais en erlenmeyers (100 mL de solutions) ; les conditions sont celles décrites en Chapitre II, 1.1.



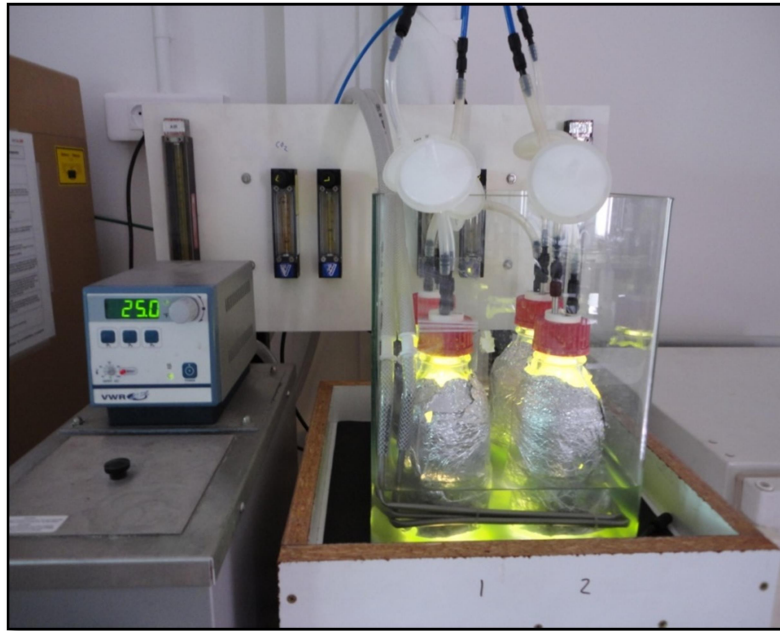
**Figure 18. Incubateur «Minitron» de culture de *C. vulgaris***

### 1.3.2 *Le micro pilote*

C'est le deuxième système de culture utilisé dans ce travail. C'est un micropilote monté au sein du laboratoire. Il contient quatre petits réacteurs de culture de volume réactionnel de 350 mL, éclairés à la base avec une intensité lumineuse de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (figure 19). Par ailleurs, ils sont enveloppés de papier aluminium pour éliminer l'effet de la lumière externe. Les réacteurs plongent dans un bac d'eau maintenu à une température de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  contrôlée par un cryostat.

Les débits du mélange air- $\text{CO}_2$  (proportion 98,5-1,5% à 98-2%) sont réglés par des débitmètres et l'alimentation se situe au sommet des réacteurs. Des filtres ( $0.2 \mu\text{m}$ ) sont montés à l'entrée et à la sortie du gaz pour assurer un environnement stérile pour les cultures. Les réacteurs sont équipés à leur base avec un diffuseur de gaz en verre fritté qui permet l'introduction du gaz sous forme de fines bulles assurant ainsi l'agitation.

Avant toute utilisation, ces réacteurs ainsi que le milieu de culture, les tuyaux d'air et les filtres sont stérilisés à l'autoclave ( $121^\circ\text{C}$ , 20 min). Les prélèvements et l'inoculation du micropilote se font dans un rayon de 20-30 cm autour de la flamme afin de préserver la stérilité du montage et de la culture.



**Figure 19. Montage du micropilote de la culture de *C. vulgaris***

### 1.3.3 Le photobioréacteur

Le photobioréacteur de type B plus BIOSTAT (Sartorius) d'un volume de 5 L est le troisième système de culture adopté dans ce travail (figure 20). Il est équipé d'une double enveloppe au sein de laquelle circule de l'eau distillée dont la température est contrôlée à 25°C par un cryostat.

Le débit de gaz (air/CO<sub>2</sub>) utilisé lors des expérimentations est de 500 mL min<sup>-1</sup> à 1 atm et 25°C. Le gaz passe par un filtre stérile (Millipore, 0,2 µm), puis entre dans le réacteur. Il ressort par le haut du réacteur en passant à nouveau par un filtre stérile (Millipore, 0,2 µm). Des mesures quotidiennes du débit gazeux sont effectuées à l'entrée et sortie du réacteur.

L'agitation du milieu de 750 rpm est assurée par un axe rotatif équipé de trois pales. Chaque pale est de diamètre de 65 mm et forme un angle de 45° par rapport à l'axe principal,

La pression de l'oxygène dissous et le pH sont suivis au cours de l'expérimentation par deux sondes de type Hamilton : une sonde à oxygène préalablement calibrée entre 0 et 100% (par rapport à l'équilibre avec l'air atmosphérique) et une sonde à pH calibrée entre 4 et 9,25 avant



chaque utilisation. Les valeurs sont affichées automatiquement sur l'écran du moniteur. Pour plus de précision, le pH de la culture est vérifié quotidiennement par un pH mètre externe (Fischer Bioblock scientifique, Consort C864) dont la sonde préalablement calibrée.

Le photobioréacteur est éclairé sur trois angles égaux, à l'aide de six lampes LED (IKEA LEDARE 130 lumen). Les lampes émettent dans les longueurs d'ondes similaires à la lumière naturelle.

Les intensités lumineuses émises par les lampes, entrantes et sortantes du réacteur sont mesurées à l'aide d'un photomètre (LI 250A, LI-COR, USA). Pour mesurer l'intensité lumineuse incidente la cellule du photomètre est tournée vers les lampes fluorescentes.

Le prélèvement des échantillons de la culture se fait en exerçant une pression en haut du réacteur par obstruction du gaz d'échappement, le liquide surpressé est récupéré à la sortie du tuyau de prélèvement dans un flacon en verre stérile muni à son bouchon d'un filtre millipore (0,2  $\mu\text{m}$ ) stérile. Ce système de prélèvement assure la stérilité des échantillons et de la culture dans le bioréacteur.

Le bioréacteur, le milieu de culture et tous les tuyaux utilisés sont autoclavés (121°C, 20 min) avant toute utilisation. L'inoculation du réacteur se fait dans un rayon de 20-30 cm autour de la flamme et en assurant un débit d'air stérilisé de 500 mL/min afin d'exercer une légère surpression dans le réacteur pour éviter le retour d'air et préserver ainsi la stérilité du montage.

### Modes de cultures conduites dans le photobioréacteur

Dans le photobioréacteur, deux modes de culture sont étudiés, en autotrophie (milieu Bristol 3 N modifié) et en mixotrophie (milieu Bristol 3N modifié et additionné de 10 g L<sup>-1</sup> de glucose). Dans les deux modes, les cultures sont réalisées en batch avec une aération continue d'air et CO<sub>2</sub> atmosphérique (0.035 % v/v) à 500 ml min<sup>-1</sup> tout le long de l'expérience.

Le réacteur est soumis à une illumination continue de 2900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mesurée à la surface interne du bioréacteur.

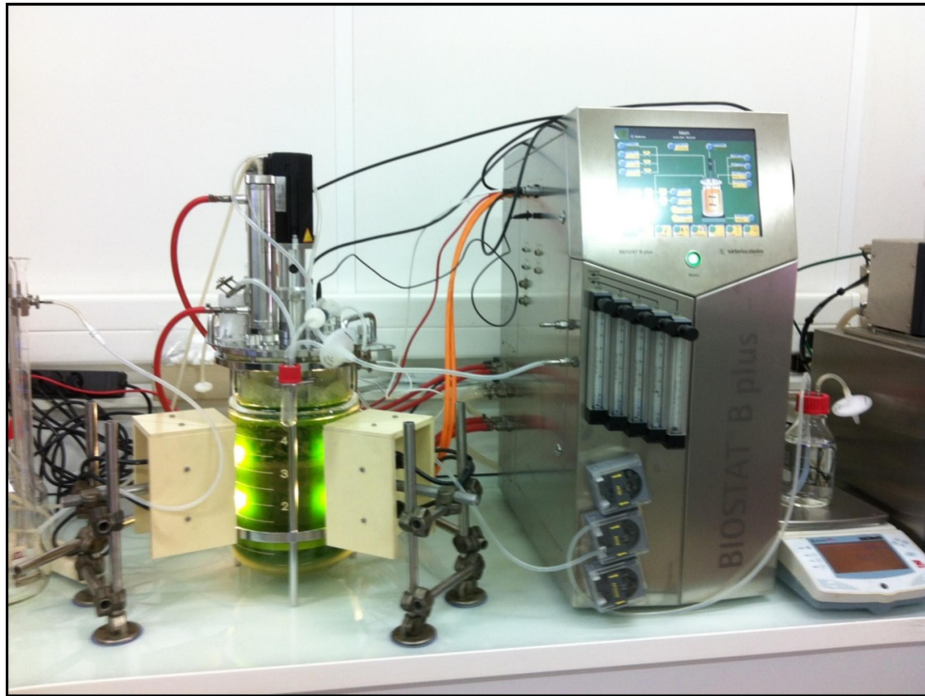


Figure 20. Culture cellulaire dans le photobioréacteur BIOSTAT

## 2 Méthodes d'analyse

### 2.1 Concentration cellulaire

Chaque jour les échantillons sont prélevés afin de suivre la croissance de l'algue. La concentration cellulaire est estimée via la mesure de la densité optique, le comptage cellulaire et la détermination de la matière sèche.

La densité optique est mesurée à la longueur d'onde  $\lambda = 800$  nm grâce à un spectrophotomètre (Spectromètre Cary 300 Scan UV- visible, Varian, pays).

Les comptages cellulaires sont réalisés avec un microscope (Zeiss) et des cellules de THOMA d'une part et grâce à un cytomètre de flux « Guava Easy Cyte » (Merck Millipore, pays) d'autre part. A noter que le cytomètre permet via la méthode ViaCount de déterminer le nombre et la viabilité des cellules. Les concentrations en *Chlorella vulgaris* des cultures utilisées dans cette étude varient de  $1.10^6$  à  $1.10^8$  cellules mL<sup>-1</sup>.

La masse sèche des cellules algales est déterminée en centrifugeant 10 mL de solution algale à 3500 rpm pendant 10 min. Le culot est récupéré dans une nacelle préalablement pesée à vide et passée 24 h à l'étuve à 105 °C pour éliminer l'humidité résiduelle. Après une nuit dans

l'étuve à 105°C et 30 minutes dans un dessiccateur, La nacelle est à nouveau pesée. La différence entre les deux pesées permet de calculer la masse algale sèche, puis en rapportant au volume de l'échantillon (10 mL) on détermine la concentration en masse sèche en  $\text{g L}^{-1}$ .

## 2.2 Concentration en Chlorophylle a dans les cellules

Selon la méthode décrite par Porra, (1990), un mélange 85% méthanol / 1.5 mmol/L de sodium dithionite, est ajouté aux culots obtenus après centrifugation des échantillons (10 min à 12000 rpm). L'extraction a lieu pendant 32 minutes à 40°C. Une seconde centrifugation est nécessaire avant de déterminer la concentration en chlorophylle dans le surnageant par mesure de son absorbance à  $\lambda = 664 \text{ nm}$  et  $\lambda = 650 \text{ nm}$ . Le protocole détaillé de cette méthode est présenté dans l'Annexe A4.

La concentration en chlorophylle a été déterminée avec la formule suivante:

$$\text{Chl a (mg L}^{-1}\text{)} = 16,41 A_{664} - 8,09 A_{650} \text{ (Porra, 1990)}$$

Avec

$A_{664}$  : l'absorbance de la culture mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 664 \text{ nm}$

$A_{650}$  : l'absorbance de la culture mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 650 \text{ nm}$

## 2.3 Taille des cellules

La taille des cellules a été mesurée à l'aide d'un granulomètre laser de type « Lixell, France » muni d'un logiciel « Qicpic ». Il permet d'analyser par diffraction laser des particules de taille allant de  $0,1 \mu\text{m}$  à  $1750 \mu\text{m}$ . Il se compose d'un système de dispersion au sein duquel transite l'échantillon dilué à analyser. L'échantillon est préalablement traité par ultrasonication pour éliminer les agrégats.

## 2.4 Concentrations en ion nitrate et en glucose

La détermination des concentrations en ions nitrates en solution a été effectuée par chromatographie ionique. Le principe de la méthode est détaillé dans l'annexe II.6.

Lors de la culture mixotrophe, la concentration en glucose a été suivie par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

## 2.5 Concentrations en magnésium dans la solution et dans la biomasse

Les concentrations en magnésium ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (Spectrophotomètre Cary 300 Scan UV-visible, Varian Inc., Netherlands) à une longueur d'onde  $\lambda = 202,6$  nm (Agilent technologies, France). Les échantillons sont centrifugés pour séparer le milieu (surnageant) de la biomasse (culot). Le magnésium non fixé par la biomasse est mesuré directement dans le surnageant.

L'extraction du  $Mg^{2+}$  accumulé dans les cellules de *C.vulgaris* est réalisée en se basant sur le protocole de Franklin et al, 2000 et Ma et al, 2003 avec des modifications mineurs.

Avant de procéder au protocole, tout le matériel (verrerie...) utilisé est d'abord incubé pendant 24 h dans l'acide nitrique (10 %) il est ensuite rincé avec l'eau ultrapure pour empêcher la précipitation du magnésium.

Le principe du protocole est de prélever  $40 \pm 0,1$  g de culture et centrifuger pendant 20 min à 3500 rpm. Par la suite, on ajoute de l'acide nitrique concentré au surnageant (10 mL). La concentration en ions magnésium dans le surnageant permet d'obtenir la fraction dissoute restante dans le milieu qui n'est pas encore captée par les algues.

Une seconde centrifugation du culot permet d'enlever les dernières gouttes restantes du surnageant et obtenir un culot bien distinct.

Le culot est resuspendu dans 15 mL d'EDTA qui est un agent dérochant des métaux attachés à la surface cellulaire et surtout qui n'entraîne pas des lyses cellulaires. La suspension est ensuite agitée puis centrifugé pendant 20min à 4000 rpm, une seconde centrifugation est nécessaire pour séparer le surnageant qui contient la fraction de magnésium extracellulaire du culot.

Le culot est séché sous une hotte à flux laminaire pendant deux jours et ensuite digéré avec l'acide nitrique concentré à 90°C pendant une nuit.

Finalement, une dilution du culot est nécessaire pour avoir une concentration en acide finale à 3%, ceci donne la fraction de  $Mg^{2+}$  intracellulaire.

Pour ce protocole, un prélèvement des échantillons en triplicata a été fait pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

## **Chapitre III : Bioaccumulation du magnésium par *C. vulgaris***

La première partie de ce chapitre présentera les cultures en batch et mode autotrophe réalisées dans des réacteurs de faible volume (100-300 mL) ainsi qu'une modélisation du phénomène global de bioaccumulation du magnésium. La deuxième partie montrera les cultures en batch réalisées dans le photobioréacteur (5 L) en mode autotrophe également. La troisième partie sera consacrée aux essais en mixotrophie dans le bioréacteur (ajout de glucose  $10 \text{ g L}^{-1}$ ), et la quatrième partie se consacrera à la comparaison des deux modes de culture entraine de croissance et d'accumulation de magnésium.

## **1 Cultures autotrophes en réacteurs de faibles volumes (100-300mL)**

Cette partie présente dans un premier temps la croissance en batch de *C. vulgaris* dans deux systèmes de culture de volume différent: le pilote (300 mL) et l'incubateur (100 mL). Dans un deuxième temps, l'effet d'ajouts de  $\text{Mg}^{2+}$  à différentes concentrations dans le milieu de culture sur la croissance de *C. vulgaris* en autotrophie sera étudié. Ces résultats ont permis la détermination d'un modèle décrivant la bioaccumulation du magnésium par *C. vulgaris* en autotrophie (lumière et  $\text{CO}_2$ ). La détermination des paramètres du modèle et sa validation expérimentale seront proposées pour clore cette étude.

### *1.1 Etude préliminaire :*



#### **Croissance des microalgues dans le microréacteur**

Les quatre réacteurs ont été simultanément mis en culture avec des volumes de 250 mL. La croissance de *C. vulgaris* a été suivie pendant 260 heures par des mesures quotidiennes de l'absorbance à 800 nm. Nous avons vérifié par ailleurs la proportionnalité de cette mesure par rapport à la concentration en biomasse.

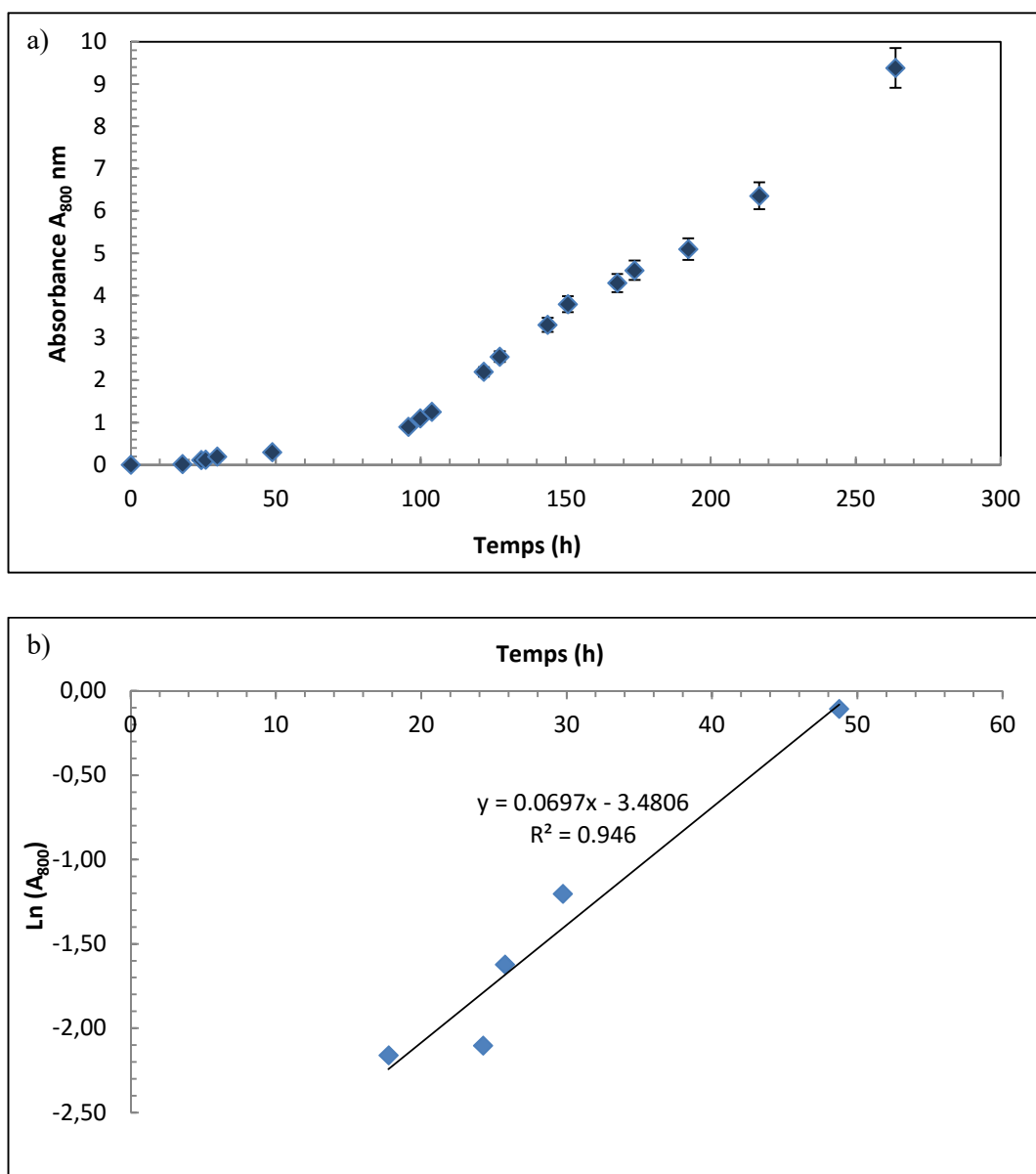


Figure 21. a) Courbe de croissance de *C. vulgaris* dans le micropilote b) La phase exponentielle de croissance

Les valeurs présentées dans le graphe (figure 21) sont les moyennes des mesures des quatre microréacteurs après correction des facteurs de dilution ; la reproductibilité est très bonne et l'erreur sur l'absorbance est de 2%.

On observe sur la figure 21 deux principales phases de croissance : une courte phase exponentielle (0-50 h) (Figure 21 b), et une phase linéaire (de 100-260 h). La phase



stationnaire n'est pas atteinte. Nous déduisons le taux de croissance  $0,069 \text{ h}^{-1}$ , il est relativement élevé par rapport à d'autres recherches bibliographiques (Clément Larosière et al, 2014). A la fin de l'expérience, nous avons obtenu une concentration cellulaire de  $1,6 \text{ g}$  de matière sèche  $\text{L}^{-1}$  équivalente à  $7,27 \cdot 10^7 \text{ cell mL}^{-1}$ .

Une phase linéaire de croissance a été également constatée par Miron et al, (2002), Myers, (1976) et Clément-Larosière et al, (2014). Elle est due à la limitation d'un élément essentiel pour la croissance. Les conditions de culture de l'algue dans le micropilote permettent une production importante de biomasse. La densité optique est un paramètre fiable pour la mesure de croissance. Cette fiabilité sera confirmée par les expériences ultérieures.

#### Suivi du magnésium dissous dans la culture

Une première expérience a été réalisée sur le milieu de culture non enrichi en magnésium ; sa concentration initiale mesurée est de  $9,23 \text{ mg L}^{-1}$ .

Des échantillons ont été prélevés quotidiennement et la concentration en magnésium résiduel dans le milieu est portée en fonction du temps sur la figure 22.

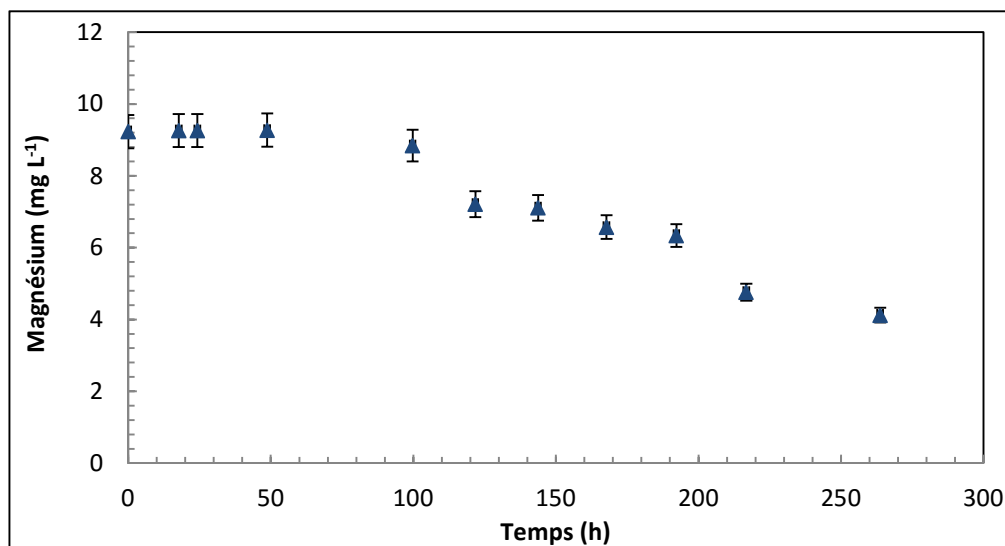


Figure 22. Cinétique d'élimination du magnésium dans le milieu de culture

La concentration de  $\text{Mg}^{2+}$  diminue au cours du temps, de  $9$  jusqu'à  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . On observe une relation linéaire entre le taux de magnésium éliminé du milieu et l'absorbance (Figure

23). Le phénomène d'élimination est donc intimement lié à la concentration en cellules algales.

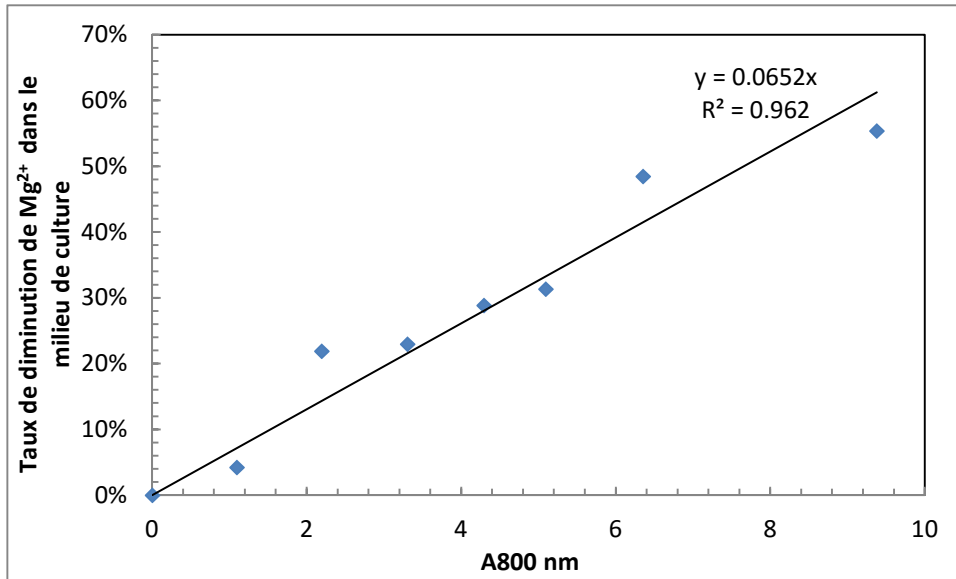


Figure 23. Corrélation entre la croissance cellulaire et le taux de magnésium éliminé.

Le taux de magnésium éliminé du milieu est calculé par :  $1-(C/C_0)$  avec C concentration en  $Mg^{2+}$  dissous dans le milieu à un instant t et  $C_0$  sa concentration initiale.

#### 🧪 Magnésium associé à la biomasse

Généralement, les microalgues accumulent un métal par deux processus :

- Adsorption sur la surface de l'algue: c'est le premier phénomène qui se produit lorsque le métal vient en contact avec l'algue.
- Absorption : c'est le passage du métal de la paroi extracellulaire dans le milieu intracellulaire.

Les réactions chimiques et biologiques qui entrent en jeu sont assez complexes, et ont été décrites d'une manière générale dans le chapitre I.

#### 🧪 Bilan matière en magnésium

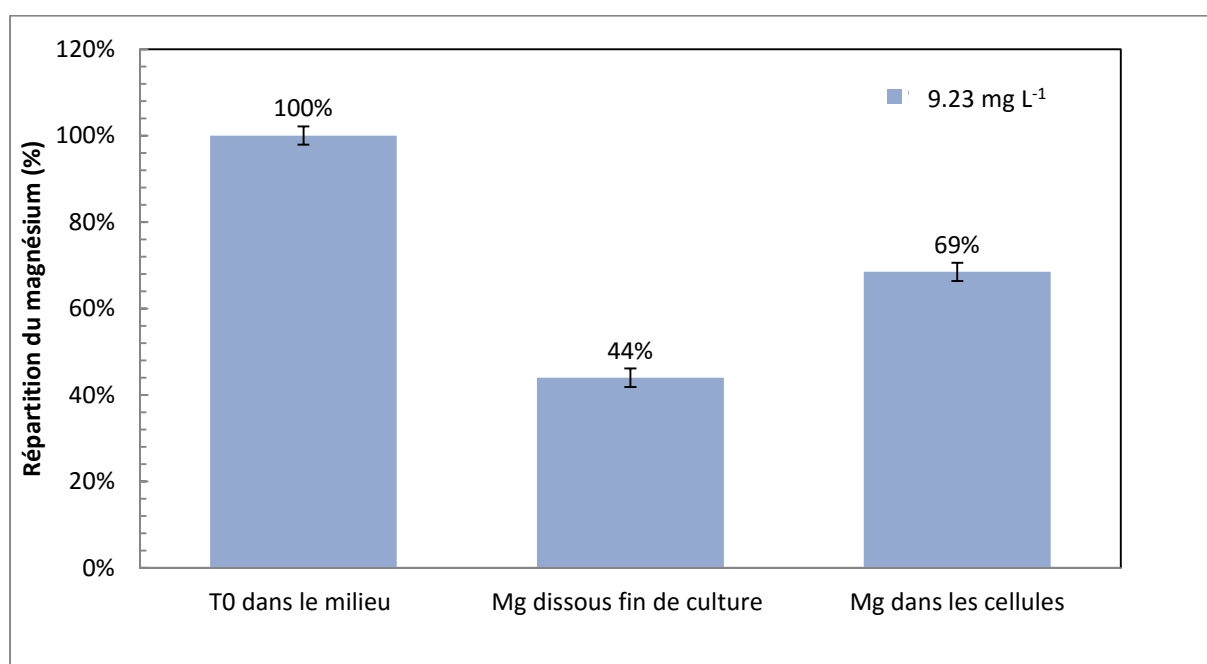
Le bilan matière en  $Mg^{2+}$  traduit le fait que tout le magnésium disparu du milieu de culture se retrouve soit adsorbé soit absorbé sur la biomasse.

Le bilan peut s'écrire entre l'instant 0 et l'instant t:

$$m_0 = m_d + m_{\text{extra}} + m_{\text{intra}}$$

Les paramètres  $m$  représentant les masses : initiale  $m_0$ , résiduelle dans le milieu à  $t$   $m_d$ , extracellulaire à  $t$   $m_{\text{extra}}$  et intracellulaire à  $t$   $m_{\text{intra}}$ .

Ces différentes masses sont calculées à partir des concentrations en magnésium mesurées dans le milieu de culture initial, dans le milieu de culture à  $t$  et dans les solutions d'EDTA et d'acide nitrique obtenues à la suite des traitements nécessaires pour l'extraction du magnésium de la biomasse (voir protocole chapitre II).



**Figure 24. Répartition du magnésium entre le milieu et la biomasse. Les hisogrammes présentent la moyenne de mesure des expériences en triplicata.**

La figure 24 montre la répartition du magnésium (moyenne de trois échantillons pour chaque réacteur) en fin de culture, exprimée en %. On constate une grande reproductibilité entre les essais de culture en pilote.

Les bilans sont validés à  $\pm 15\%$ . L'excès dans le bilan vient des erreurs inhérentes aux mesures des différentes concentrations. On peut en conclure que les seules causes de disparition du magnésium du milieu sont l'adsorption et l'absorption dans la biomasse.

L'algue accumule à la fin de l'expérience 68% de la quantité initiale du métal, dont 8% sont adsorbés et 60% absorbés dans le cytoplasme cellulaire. Le taux d'accumulation est très important et montre que cette espèce de microalgue est bien adaptée à la bioaccumulation de ce métal, On constate que la quantité adsorbée est très faible devant la quantité absorbée.

On vérifie donc que la méthode adoptée dans la bibliographie pour ce type d'étude est fiable et adéquate pour l'extraction de  $Mg^{2+}$  par *Chlorella vulgaris*.

### 1.2 Effet du magnésium sur la croissance de *C.vulgaris* (Article scientifique)

Cette partie est un article scientifique publié dans le journal « Algal research »

Accepté le 23 Mars 2015

*Algal research 9 (2015):291-296*

**Effect of magnesium ion concentration in autotrophic cultures of *Chlorella vulgaris***

Hela Ben Amor-Ben Ayed<sup>1</sup>, Behnam Taidi<sup>1</sup>, Habib Ayadi<sup>2</sup>, Dominique Pareau<sup>1</sup>

and Moncef Stambouli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CentraleSupélec, Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry

<sup>2</sup>Faculty of Sciences of Sfax, Biodiversity and Aquatic Ecosystems Lab, Ecology and Department of Planktonology, University of Sfax, Tunisia

**Abstract**

*Chlorella vulgaris* was grown autotrophically in shake-flask cultures in the presence of different initial magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ions concentrations in the range of 8.9-465.0 mg L<sup>-1</sup>. No inhibition of growth was observed even at the highest concentration of magnesium tested. An existing extraction method was modified and applied to the cultures in order to measure the magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ions associated with the biomass. A distinction was made between the magnesium adsorbed onto the cells and the magnesium absorbed which were more strongly associated with the biomass. The cells became saturated with absorbed  $Mg^{2+}$  at approximately 46.1 mg  $Mg^{2+}$  per g of DW biomass but the amount of adsorbed magnesium associated with the biomass increased in proportion with the initial concentration of this ion in the medium. The authors propose that the saturation level of the adsorbed magnesium was not reached in these experiments even at the highest concentration of magnesium tested. The experimental data of all magnesium concentration tested fitted well with an exponential model for the  $Mg^{2+}$  removal from the medium.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, metal ions uptake, magnesium ions, intracellular (absorption), extracellular (adsorption).

**Abbreviations and definitions:**

Absorption: intracellular accumulation

Adsorption: extracellular attachment to the cell wall

*C. vulgaris*: *Chlorella vulgaris*

$Mg^{2+}$ : Magnesium ions

EDTA: Di-sodium ethylenediaminetetraacetic acid

HNO<sub>3</sub>: Nitric acid

HCl: Hydrochloric acid

AAS: Atomic Absorption Spectrophotometry

$\mu$ : Specific growth rate (h<sup>-1</sup>)

A<sub>800</sub>: absorbance measured at 800 nm

DW: Dry weight (g solid residue per L of culture)

C: Mg<sup>2+</sup> ions concentration in the culture medium (mg L<sup>-1</sup>)

C<sub>0</sub>: Initial Mg<sup>2+</sup> ions concentration in the culture medium (mg L<sup>-1</sup>)

C<sub>eq</sub>: Equilibrium Mg<sup>2+</sup> ions concentration in the culture medium (mg L<sup>-1</sup>)

q: concentration of absorbed Mg<sup>2+</sup> ions in the cell (mg g<sup>-1</sup> DW)

Q: mass of Mg<sup>2+</sup> ions expressed in milligrams

V: Volume of culture

S: Cell external surface (m<sup>2</sup>)

R: Mg<sup>2+</sup> ions removal efficiency expressed in percent

k: Mg<sup>2+</sup> ions uptake kinetic constant

t: time (h)

Zn: Zinc

Cd: Cadmium

## Introduction

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ions are a growth factor for green microalgae such as *Chlorella vulgaris* and are a key component of chlorophyll (Vernon and Seely, 1966; Scheer, 1991). In this respect  $Mg^{2+}$  ions can be found in stoichiometric ratio to chlorophyll in photosynthetic tissues (Mehne-Jakobs, 1995, 1996; Dinç et al, 2012). The chlorophyll content of the microalgae is known to vary with the growth conditions such as light intensity (Wright and Jeffrey, 2005; Leonardos and Harris, 2006) and  $CO_2$  concentration (Clément-Larosière et al, 2014). Green algae are promising candidates for phytoremediation as they are widely available in temperate and tropical regions, and different species can be found in both fresh and marine waters (Zhang and Tanab, 2014). *Chlorella vulgaris* belongs to the Chlorophyceae family of green algae (Richmond, 2004), it is an eukaryotic organism (Pulz and Gross, 2004) that reproduces asexually (Richmond, 2004) by formation of autospores within the parent cell. Each autospore has its own cell wall (Hoek et al, 1995) and is released to form a new vegetative cell.

Many studies have demonstrated that microalgae have a great potential for metal removal (Monteiro et al, 2012). Microalgal suspensions are generally stabilised by a negative surface charge on the cell which is generated by hydroxyl, carboxyl, phosphate and /or sulphate groups (Vandamme et al, 2012). These could bind positively charged ions such as  $Mg^{2+}$  ions (Sukenik and Shelef, 1984).

Atomic absorption is commonly used to measure the concentration of metal ions (Rai et al, 2013; Sakellari et al, 2013; Asadpour et al, 2013; Mahmood et al, 2013; Wang et al, 2013; Khan et al, 2013). This method has several advantages including simplicity, high sensitivity, high selectivity and relative freedom from interference (Ghaedi et al, 2006) especially when compared with ionic chromatography where ions could interfere one with another (Breithaupt, 2004).  $Mg^{2+}$  ions could precipitate out of the solution at pH values higher than 9.5.

The aim of this study was on one hand, to develop a robust and reliable method for the measurement of accumulated  $Mg^{2+}$  ions in *C. vulgaris* and on the second hand, to build a model for the association of  $Mg^{2+}$  ions with the algae; this model would serve as a tool for optimisation of the bioaccumulation of  $Mg^{2+}$  ions in the organic biomass.

The methods adopted here would be potentially applicable to other micro-algae and other ions.

## Materials and methods

### 1. Strain and culture conditions

The strain *Chlorella vulgaris* CCAP211/e 11B (trebouxiophyceae) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP (UK).

The organism was grown in modified 3N-Bristol medium (MBM) (Clément-Larosière et al, 2014; Vernon and Seely, 1966). The basic  $Mg^{2+}$  ion concentration in MBM medium was theoretically  $7.4 \text{ mg L}^{-1}$ , unless enriched further. For the preparation of inoculum, the strain was maintained in liquid culture (50 ml in 250 mL flask), at  $25^{\circ}\text{C}$ , by weekly inoculation into fresh medium in an incubator under continuous orbital agitation (50 cm rotation diameter; 100 rpm; light intensity at the surface of the cultures at  $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). The atmosphere was fortified to 0.7-2.1%  $\text{CO}_2$  by volume. Flasks were closed with Foam bungs (Fisher scientific, 11901935 - X100) to allow the exchange of gases in the culture with the atmosphere.

A fresh algal culture 1% (v culture/v medium) incubated for 48-72 h was used as the inoculum for each experiment. The MBM medium was enriched with magnesium sulphate ( $\text{Mg SO}_4$ ) to adjust the different concentrations of magnesium ( $8.9$  to  $465 \text{ mg L}^{-1}$ ). After autoclaving, batch *C. vulgaris* cultures were incubated in MBM with different  $Mg^{2+}$  concentrations (100 mL in 500 mL flask) under the above conditions for 480 h.

### 2. Analytical methods

#### 2.1. Growth parameters

The optical density ( $A_{800}$ ) of the algal cultures was measured (Spectrophotometer Cary 300 Scan UV-visible, Varian Inc., Netherlands) at 800 nm in order to avoid potential interference of chlorophyll a and b (respective absorption maxima 664 nm and 650 nm). The solutions were appropriately diluted to obtain an absorbance between 0 and 1. The corrected absorbances were calculated from the measured ones with the dilution factors.

To determine the culture dry weight DW ( $\text{g L}^{-1}$ ) a culture sample (10 mL) was centrifuged (10 min., 1800 g). The pellet was washed through re-suspension in an equal volume of



deionized water, centrifuged again (10 minutes, 1800 g) and the final pellet was transferred into a dry pre-weight cup (24 h, 105°C). The pellet was dried overnight at 105°C and cooled in a desiccator containing dry silica gel prior to weighing.

Daily samples were removed from the incubator during the course of the experiment and cell growth was followed by DW measurements.

## 2.2. Mg<sup>2+</sup> ions concentration measurements

The dissolved Mg<sup>2+</sup> ions concentrations (mg L<sup>-1</sup>) in samples were determined using an Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) (Hitachi Z-2300, Japan). The analyses were performed with an air-acetylene flame and the appropriate Mg<sup>2+</sup> ions lamp (Agilent technologies, France). The absorbance was measured at 202.6 nm.

For the AAS calibration, ten replicate determinations were made for each calibration point. The measurement limit of the method was 0.15-20 mg L<sup>-1</sup> at 202.6 nm with a standard deviation 1-2% over the calibration range.

Prior to use for analytical purposes all plastic- and glasswares were soaked for at least 24 h in HNO<sub>3</sub> (65% w/v Merk, suprapur) and thoroughly rinsed with ultrapure water (Milli Q, Millipore). All dilutions were made with acidified (pH < 3 with HCl) Milli Q water to prevent metal precipitation. This included the preparation of the magnesium calibration solutions. Calibration solutions were made from 1000 mg L<sup>-1</sup> of Mg<sup>2+</sup> ions stock solution (Fischer scientific). Each experimental point was measured 5 times with AAS and in duplicate in order to maximise the reliability of the analysis.

### 2.2.1. Determination of the intracellular and extracellular magnesium concentrations

The concentrations of adsorbed and absorbed magnesium were determined by the procedure described by Franklin et al, 2000 and Ma et al, 2002 with minor modifications.

Triplicate flask cultures were set up for six initial magnesium (Mg<sup>2+</sup>) ion concentrations in the range of 8.9- 465.0 mg L<sup>-1</sup>. One flask at each concentration was used for daily sampling for the determination of cell concentration, dry biomass weight (DW) and dissolved Mg<sup>2+</sup> ions concentration (remaining dissolved in the medium). The remaining two flasks at each concentration were analysed only at the end of experiment to obtain a sufficient volume for the determination of intracellular and extracellular Mg<sup>2+</sup> ions concentration.

At the end of the experiment,  $40.0 \pm 0.1$  g of algal culture were retained from each flask in triplicate. The biomass was separated from the supernatant by centrifugation (1800 g; 20 minutes). Concentrated  $\text{HNO}_3$  (65%, v/v) was added to each supernatant to a final concentration of 3% (v/v). All supernatants (10 mL) were analysed in triplicate by AAS to determine the dissolved  $\text{Mg}^{2+}$  ions concentration.

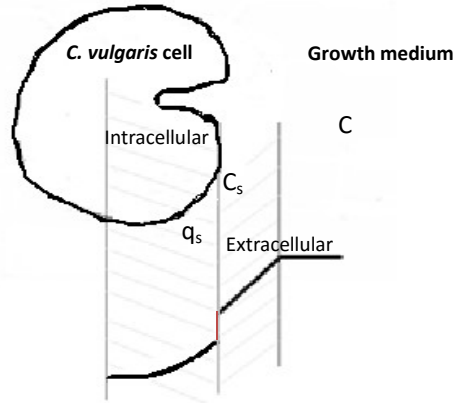
Extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  ions concentration: The algal pellet was re-suspended in EDTA (15 mL; 0.02 M). Preliminary experiments had shown that this EDTA treatment did not cause cell lysis (Chebil Ajjabi and Chouba, 2009). Samples were shaken for approximately 30 s to remove the  $\text{Mg}^{2+}$  ions adsorbed on the cell walls and subjected to centrifugation (20 min; 2300 g). All replicate supernatants were used to measure the extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  ions concentration by AAS without further acidification. The amount of  $\text{Mg}^{2+}$  ions adsorbed is expressed in mg per g DW ( $q_s$ ).

Intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  ions concentration: After the previous treatment, the algal pellets were left to dry in a laminar flow hood for 2 days and then digested with acid (2 mL concentrated  $\text{HNO}_3$ ). After standing for the first 30-40 min at room temperature, samples were put at  $90^\circ\text{C}$  overnight. After cooling at room temperature, samples were diluted with Milli-Q water (20 mL) and analysed for  $\text{Mg}^{2+}$  ions measurement by AAS. This gave the intracellular magnesium mean concentration in mg per g DW ( $q$ ).

The concentration of  $\text{Mg}^{2+}$  ions was thus determined in its three forms, namely dissolved, extracellular (adsorbed) and intracellular (absorbed).

### 3. Model development

The figure below illustrates the graphic representation of the model:



**Figure 1.** Profiles of magnesium ion concentration in the liquid phase and in the cell.  $C$  is the  $Mg^{2+}$  ions concentration in the growth medium ( $mg L^{-1}$ ),  $C_s$  its concentration in the liquid at the interface (cell-liquid) expressed in  $mg/L$  and  $q_s$  the concentration of magnesium ions adsorbed on the cell ( $mg Mg^{2+} g^{-1} DW$ ).

$Mg^{2+}$  ions are transferred from the liquid to the cell surface according to the film theory; at the surface of the cell a fast interfacial reaction of adsorption/desorption occurs, supposed to be at equilibrium according to a linear Langmuir relationship.

$$q_s = K_g \cdot C_s \quad \text{Eq(A.1)}$$

Generally  $q$  (Concentration of magnesium adsorbed by biomass) is smaller than  $q_s$ , except at equilibrium between both phases when there is no more transfer; then  $q = q_s = q_{eq}$  and  $C = C_{eq}$  where  $C_{eq}$  is the  $Mg^{2+}$  ions concentration in the liquid phase at equilibrium.

At equilibrium the mass balance can be written as follows:

$$V \cdot C_{eq} + (DW)_{eq} \cdot q_{eq} = V \cdot C_0 \quad \text{Eq (A.2)}$$

Where  $(DW)_{eq}$  is the equilibrium biomass, the same for all experiments.

As  $q_{eq} = K_g \cdot C_{eq}$ ,  $C_{eq}$  is proportional to  $C_0$ .

For the development of the model it was assumed that the global  $Mg^{2+}$  ions uptake by algae is a first order reversible reaction. The reaction rate is then given by:

$$r = K_g (C - C_{eq}) \quad \text{Eq (A.3)}$$

$r$  is the mass of magnesium taken by algae per time and interface units;  $k_g$  is the global kinetic constant. Assuming that the bioreactor is perfectly stirred, the mass balance is for a time interval  $dt$ :

$$V \cdot dC = K_g \cdot (C - C_{eq}) \cdot S \cdot dt \quad \text{Eq. (A.4)}$$

Where  $-V \cdot dC$  is the mass of  $Mg^{2+}$  ions transferred to the algae between  $t$  and  $(t + dt)$ ,  $V$  is the volume of liquid phase,  $S$  is the total interfacial area liquid-cell (cell surface). Assuming that  $C_{eq}$  is constant and  $k$  a (with  $a = S/V$ ) varies little, the integration of equation Eq (A.4) between 0 and  $t$  gives:

$$\frac{C(t) - C_e}{C_0 - C_{eq}} = e^{-K_g \cdot a \cdot t} \quad \text{Eq. (A.5)}$$

## Results and discussion

### 1. Algal growth in shake-flask cultures

The biomass concentrations expressed in  $A_{800}$  and in dry weight per volume can be used for following cell growth; they perfectly correlated in all cultures for the entire 480 h of incubation (Figure 2).

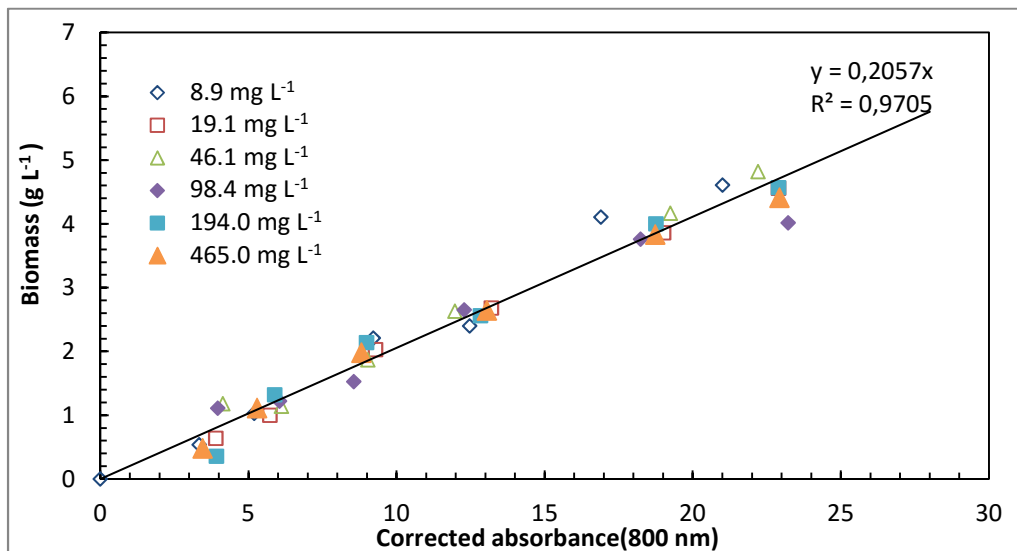
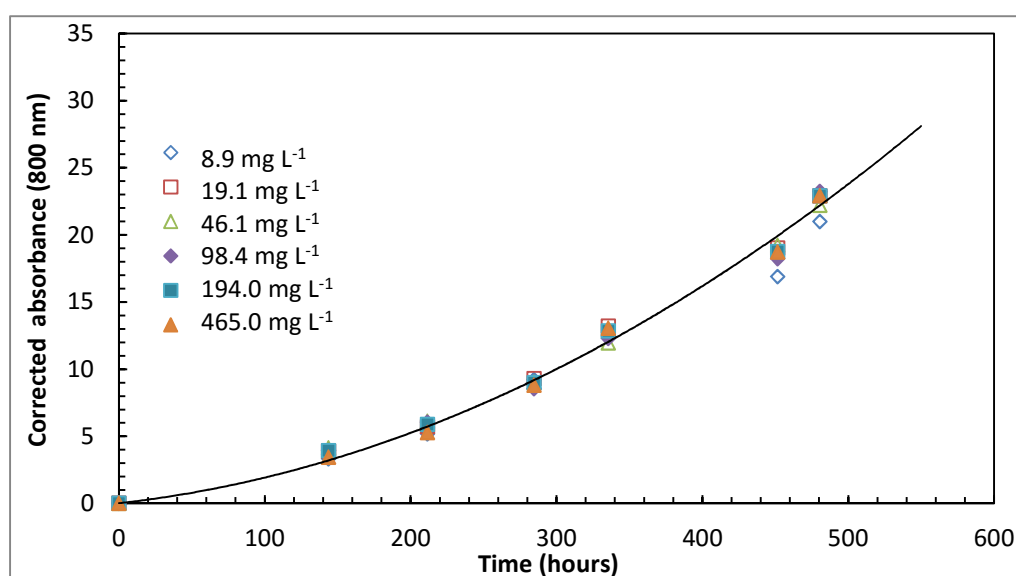


Figure 2. Correlation between different biomass measurements. Both  $A_{800}$  and DW were used as indicators of *C. vulgaris* growth. The correlation coefficient was good: 0.971.

The linear relationship between  $A_{800}$  and DW was valid over both the exponential and the linear growth phases. Their correlation was not surprising as  $A_{800}$  (absorbance) is routinely used as an indicator of biomass for single cell organisms (Hulatt and Thomas, 2011).

*C. vulgaris* was grown in shake-flask cultures in order to follow  $Mg^{2+}$  ions uptake during the incubation period. The growth of the algae has been followed for 480 h. As shown on figure 3, *C. vulgaris* continued to grow under autotrophic conditions without interruption in Bristol medium; different initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations 8.9; 19.1; 46.1; 98.4; 194.0 and 465.0  $mg\ L^{-1}$  were tested. In MBM medium all the concentrations of  $Mg^{2+}$  ions tested here were in excess of the limiting concentration necessary for the growth of *C. vulgaris*.



**Figure 3. Growth curves of *Chlorella vulgaris* at different initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations. The corrected absorbance  $A_{800}$  was calculated as explained in previous paragraph**

A preliminary growth test of *C. vulgaris* was carried out using the MBM medium without  $Mg^{2+}$  ions (data not shown). Practically no growth was observed.  $Mg^{2+}$  ions are indeed essential for algal growth; it is obviously crucial for photosynthesis as it is the central atom of chlorophyll (Mirón et al, 2002).

*C. vulgaris* grew with the same growth rate at all  $Mg^{2+}$  ions concentrations without any signs of inhibition even at the highest  $Mg^{2+}$  ions concentration, there was no inhibition of *C. vulgaris* growth (Figure 3). This supports the results reported by Sarma et al, 2014. For other metals, Huang et al, 2011, showed that an excess of Zn 5.23  $mg\ L^{-1}$  or Cd 9  $mg\ L^{-1}$  in the culture medium leads to a serious inhibition of *C. vulgaris* growth. Between 0 and 480 h

cell growth continued and no stationary growth phase was observed. Even after 480 h of incubation, a stationary phase was not observed and growth continued in a linear mode.

A final dry weight of  $4.4 \pm 0.1$  g DW L<sup>-1</sup> was measured for all the cultures irrespective of the different growth medium Mg<sup>2+</sup> ions concentrations. This result is greatly coherent with other published results (Ogbonna and Tanaka, 1998).

Clément -Larosière et al, 2014, found a maximal biomass concentration of  $4.14 \pm 0.18$  g DW L<sup>-1</sup> for an incident light intensity of  $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , and 13% (v/v) CO<sub>2</sub> after 9 days of incubation in photobioreactor. For the others conditions, Hulat et al, 2011, found a maximal biomass concentration of  $3.79 \pm 0.05$  g L<sup>-1</sup> with *Chlorella vulgaris* and  $3.60 \pm 0.74$  g L<sup>-1</sup> with *Daniella tertiolecta* ( $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) light and 4% (v/v) CO<sub>2</sub> for both algal species after 10 days of culture.

## 2. Mg<sup>2+</sup> ions removal from the growth medium

### 2.1. Dissolved Mg<sup>2+</sup> ions

To investigate Mg<sup>2+</sup> ions removal from the growth medium, the proportion of Mg<sup>2+</sup> ions concentration remaining in the culture, compared to the initial concentration was plotted versus time (Figure 4).

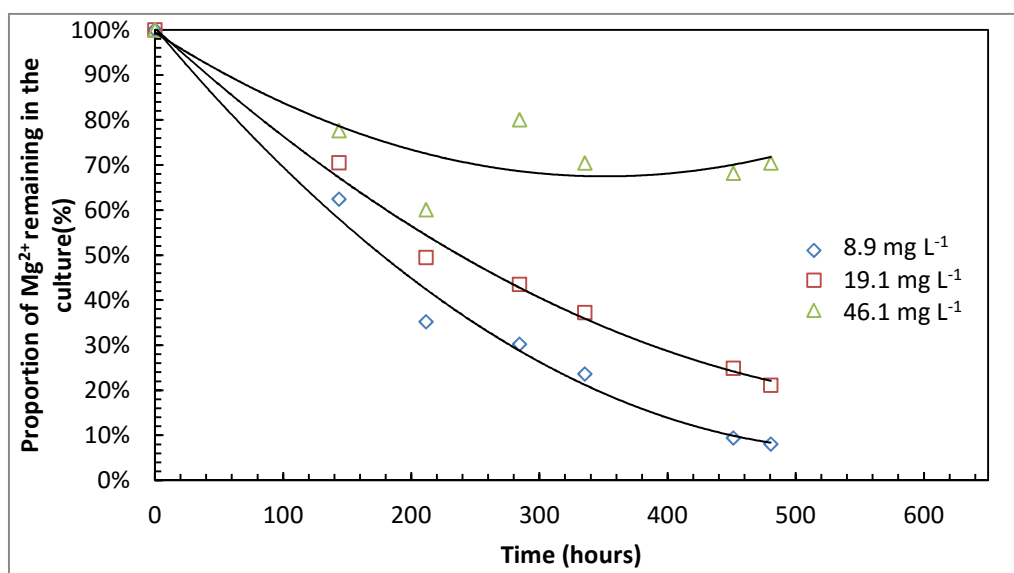


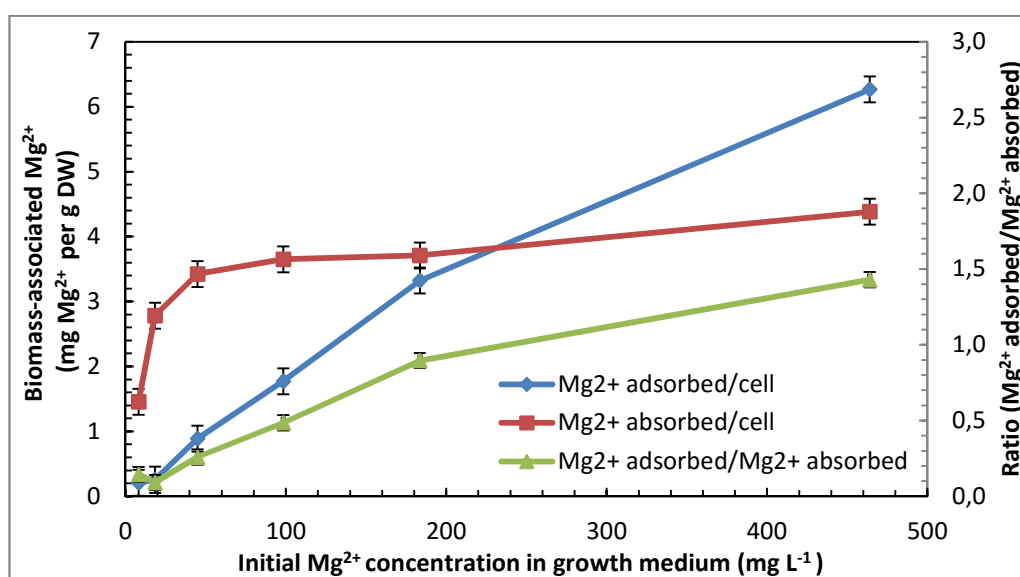
Figure 4. Fraction of Mg<sup>2+</sup> ions remaining in the medium versus time. The y-axis value represents the ratio  $C/C_0$ . Each point represents the mean of the analyses performed in duplicate samples.

*C. vulgaris* consumed  $Mg^{2+}$  ions during growth. The  $Mg^{2+}$  ions were almost completely removed from the medium when starting with small concentrations such as 8.9 and 19.1  $mg L^{-1}$ . But for initial concentrations as high as 46.1  $mg L^{-1}$ , a plateau was reached (Figure 4).

In order to better understand the phenomenon of  $Mg^{2+}$  ions uptake by the biomass, the proportions of adsorbed (extracellular) and absorbed (intracellular)  $Mg^{2+}$  ions were determined.

### 1.2. Extracellular (adsorbed) and intracellular (absorbed) $Mg^{2+}$ ions contents

At the end of experiment (480 h), the extracellular and intracellular  $Mg^{2+}$  ions concentrations were determined. The cells were harvested from each flask and treated in triplicates. The determination  $Mg^{2+}$  ions concentrations for each of the replicate samples were also performed in triplicates and the results for each culture are represented as a single average point around each means (Figure 5).



**Figure 5.** Repartition of  $Mg^{2+}$  ions in the *C. vulgaris* biomass after 480 h of growth. The adsorbed and absorbed  $Mg^{2+}$  ions concentrations are plotted against the left y-axis. The error bars are the standard deviations around each point (the mean) of each sample taken in triplicate, treated independently and then analysed in triplicate as previously explained.

The increase of the initial  $Mg^{2+}$  ions concentration in the medium lead to an increase of the metal uptake by cells, both intracellular and extracellular. Beyond 46.1  $mg Mg^{2+} L^{-1}$ , the biomass became saturated with the ions at 4  $mg Mg^{2+}$  per g DW. Increasing the  $Mg^{2+}$  ions concentration in the medium beyond 46.1  $mg L^{-1}$  did not result in a greater accumulation of

the ion within the biomass. The ratio adsorbed over absorbed - ions, increased with the initial medium  $Mg^{2+}$  ions concentration.

These results are in a good agreement with preliminary experiments performed under the same conditions at 9.5 and 25.8  $mg\ L^{-1}$   $Mg^{2+}$  ions (data not shown). The internal saturation level of the cells for these preliminary experiments had also been determined to be 4.5  $mg\ Mg^{2+}$  ions per g DW. As previously observed on Figure 5, these preliminary data confirmed that the adsorbed  $Mg^{2+}$  ions associated with the biomass increased proportionally with initial  $Mg^{2+}$  ions concentration in the medium.

In the present study, at initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations below 46.1  $mg\ L^{-1}$ , the amount of  $Mg^{2+}$  ions incorporated in the cell cytoplasm was higher than that adsorbed on the cell wall (Figure 5). This observation demonstrates that absorption plays an important role in the metal ion removal by *C. vulgaris*.

This is also consistent with results of a previous study; Knauer et al, 1997, showed that the main fraction (80%) of the total cellular copper content was located intracellularly, and only a small fraction (20%) was located on the surface of the cells. Additionally, the amount of zinc adsorbed to the cell wall increased from 5% to 80% of the total cellular content with increasing free Zn ions concentration in the medium (from  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M). On the other hand, Zhou et al, 2012, reported a different pattern for the removal of these metals ions by *S. subspicatus*. In their study, the proportions of zinc and copper adsorbed at the algal cell surface were much higher than those accumulated intracellularly. After 8 days of incubation, the adsorbed Zn reached 79.4% of the initial medium concentration of this ion (20  $mg\ L^{-1}$ ) and the adsorbed copper reached 73.2% of its initial medium concentration of 2  $mg\ L^{-1}$ . The differences observed could be due to the concentrations of Zn ions used by the two groups.

The kinetics of metal uptake by biologically active algae usually takes place in two readily identifiable stages: a rapid initial physical adsorption at the cell surface followed by a slow bioaccumulation via transport towards the interior of the cell (Flogar et al, 2009; Nourbakhsh et al, 1994). Physical adsorption is fast and occurs in a short time after the algae come into contact with the metal, Bioaccumulation often referred to as chemisorption related to metabolic activity (Nourbakhsh et al, 1994). In the present study, the  $Mg^{2+}$  ions were slowly removed from growth medium as the *C. vulgaris* population increased. The longer the incubation time, the more  $Mg^{2+}$  ions were associated with the algae.  $Mg^{2+}$  ions



absorption into the cells was more rapid than adsorption on the cell surface, as the concentration of adsorbed  $Mg^{2+}$  ions was generally smaller than that of absorbed ions. The intracellular  $Mg^{2+}$  ions concentration increased slowly with increasing initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations; however, beyond an initial growth-medium  $Mg^{2+}$  ions concentration of  $46.1 \text{ mg L}^{-1}$ , the amount of absorbed ions saturated the cells at an average concentration of  $4.5 \text{ mg}$  of  $Mg^{2+}$  ions per g DW. On the other hand, the extracellular  $Mg^{2+}$  ions continued to increase in proportion with the increase in the initial growth-medium concentration of this ion. The saturation phenomenon was not observed with adsorption.

### 3.3. Model of $Mg^{2+}$ ions uptake by *C. vulgaris*

In order to demonstrate the validity of the exponential model, a logarithm of the  $Mg^{2+}$  ions removal ratio  $\frac{C(t)-C_{eq}}{C_0-C_{eq}}$  was plotted as a function of time (Figure 6). When  $C_0$  was small ( $8.9 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $C_{eq}$  tended to zero.  $C_{eq}$  values were determined from the final measurement of  $Mg^{2+}$  ions (end of experiment 480 h) by AAS.

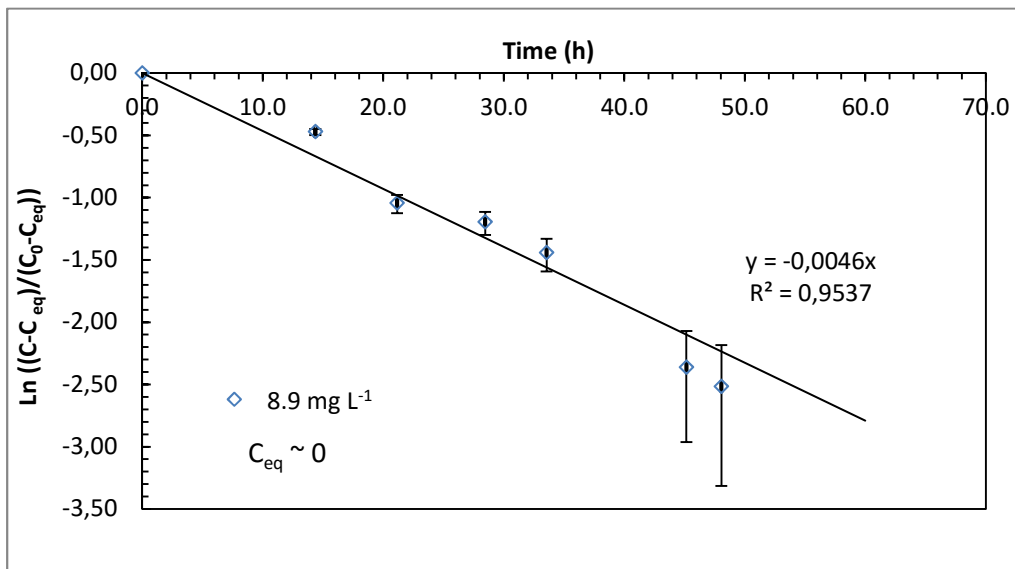
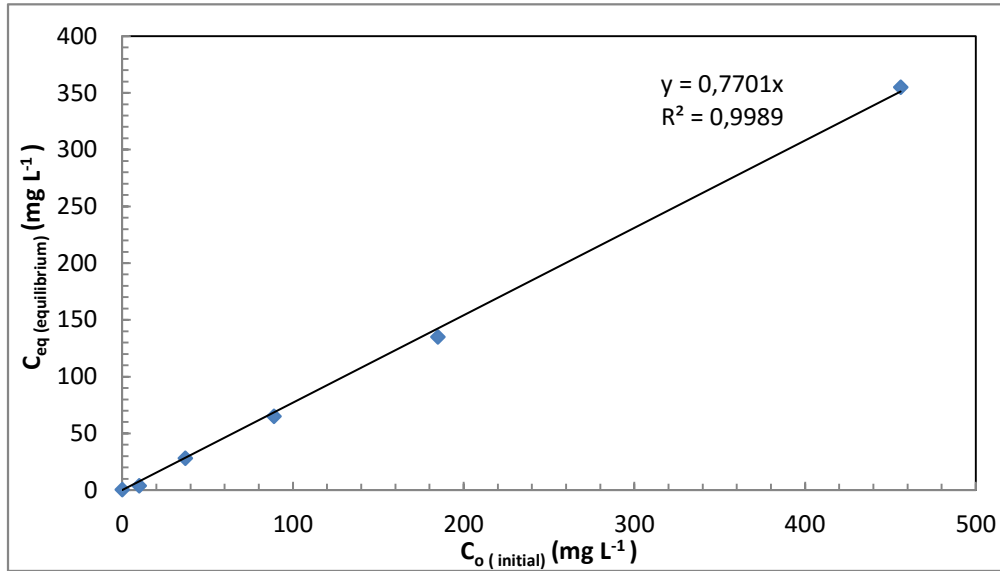


Figure 6. Modelling  $Mg^{2+}$  ions uptake by *C.vulgaris*

The experiment conducted with initial  $Mg^{2+}$  ions concentration of  $8.9 \text{ mg L}^{-1}$  presented on figure 6 confirmed the validity of the exponential model (kinetic constant  $k_g = 0.005 \text{ h}^{-1}$  (reaction rate); correlation coefficient of 0.954). The validity of model was also proven for all different initial  $Mg^{2+}$  ions concentration ( $8.9\text{-}465 \text{ mg L}^{-1}$ ).

As previously described in materials and methods, theoretically  $C_{eq}$  was proportional to  $C_0$  according to linear Langmuir law. This result was validated experimentally for all experiments with different initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations (Figure 7).



**Figure 7. Relationship between  $C_{eq}$  and  $C_0$ . The fitted line was made to go through the origin as in the absence of  $Mg^{2+}$  ions, no removal would occur.**

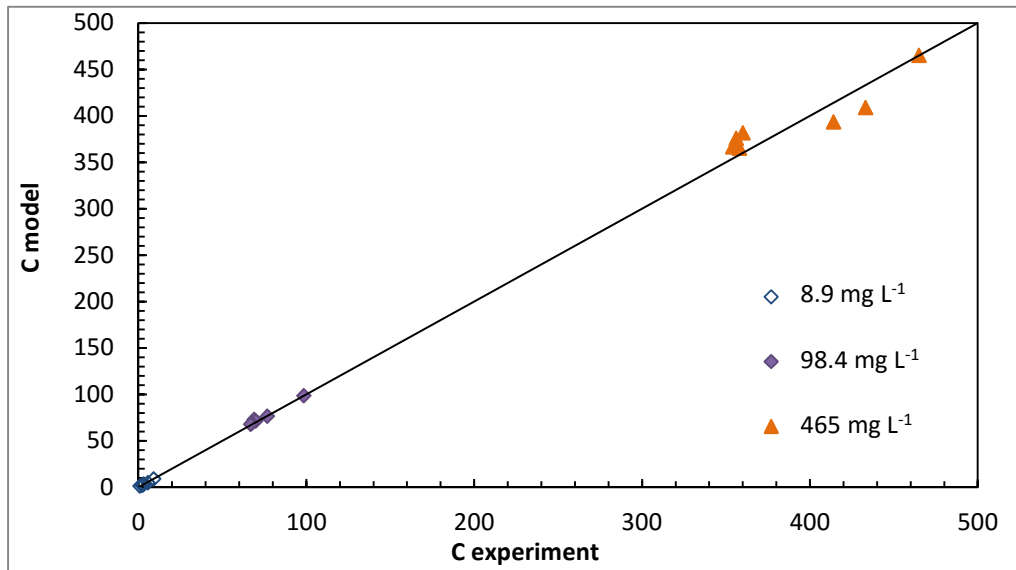
A clear relationship between  $C_{eq}$  and  $C_0$  was demonstrated.  $C_{eq}$  varied linearly with  $C_0$  where  $C_{eq} = 0.770.C_0$  (Figure 7). A small lag was observed for the first two points that corresponds to the small  $Mg^{2+}$  ions concentrations (8.9 and 19.1 mg L<sup>-1</sup>) compared to other points. This difference seems to be related to a change in the mechanism of ion removal, Gin et al, 2002, have previously reported an exponential model for the sorption (adsorption and absorption) of cadmium and copper by *Chlorococcum sp.* at 2.0 mg L<sup>-1</sup> and *Oocystis sp* at 2.0, 5.0, 8.0 and 10 mg L<sup>-1</sup> of cadmium.

The kinetic constant  $k_a$  is expected to be independent of  $C_0$  as shown in table 1:

**Table 1. Calculated parameters of exponential model  $(C - C_{eq}) = (C_0 - C_{eq}) e^{-k_g.a.t}$  where  $C_0$  is the initial  $Mg^{2+}$  ion concentration;  $k_g.a$  is the kinetic constant.**

$C_0$ (mg L <sup>-1</sup> )	8.9	98.4	465.0
$k_g.a \times 10^{-3}$ (h <sup>-1</sup> )	6.0	5.6	7.5
$k_g.a$ average $\times 10^{-3}$ (h <sup>-1</sup> )	6.4 $\pm$ 1.1		

Finally, in order to confirm the validity of the model, model  $Mg^{2+}$  ions concentration data were plotted versus of experimental  $Mg^{2+}$  ions concentration.



**Figure 8. Comparison of calculated and measured  $Mg^{2+}$  ions uptake by *C. vulgaris*. C model plotted against y axis were calculated from the exponential model  $C = C_{eq} + (C_0 - C_{eq})e^{-kg.a.t}$  Three initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations were presented here (8.9, 98.4 and 465 mg L<sup>-1</sup>).**

Figure 8 showed that experimental and model data were rather similar; this result confirms the validity of the exponential model for  $Mg^{2+}$  ions uptake by algae. This validity was proven not only for (8.9, 98.4 and 465 mg L<sup>-1</sup>; figure 8) but also for all initial  $Mg^{2+}$  ions concentrations tested in these experiments.

In the present study, we developed a global model that describes relatively well the  $Mg^{2+}$  ions transfer from liquid medium to the cells and uptake by the cells, this model will be refined in the future.

## Conclusion

*C. vulgaris* showed a good capability to remove  $Mg^{2+}$  ions from the growth medium with the highest efficiency observed at near 100%. The mass balances of  $Mg^{2+}$  ions in its three forms (dissolved, adsorbed and absorbed) were good, in the range of 85-118% for all the experiments at the different  $Mg^{2+}$  ions concentrations (8.9- 465.0 mg L<sup>-1</sup>). The method first published by Franklin et al, (2000) is suitable for the measurement of  $Mg^{2+}$  ions uptake in *C. vulgaris*.

The intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  ions became saturated at  $46.1 \text{ mg L}^{-1}$  of initial  $\text{Mg}^{2+}$  ions concentration in the growth medium and the adsorbed  $\text{Mg}^{2+}$  ions continued to be associated to the cell wall until the end of the experiment.

An exponential model for the removal of  $\text{Mg}^{2+}$  ions from the growth medium by *C. vulgaris* was developed which fitted well with the experimental data for all initial  $\text{Mg}^{2+}$  ions concentrations. This work reinforces the applicability of the exponential model for metal ion sorption in microalgae cultures.

The non-toxicity of  $\text{Mg}^{2+}$  ions (and  $\text{Cl}^-$ ) at high concentrations is a new and interesting result.

### 1.3 Modélisation de la cinétique de bioaccumulation du magnésium par les microalgues :

#### 1.3.1 Généralités

Un challenge important dans la géochimie de l'environnement est la détermination de la biodisponibilité des traces des composants essentiels et toxiques dans les microorganismes naturels. La spéciation chimique est un facteur qui joue un rôle considérable dans la prédiction de la biodisponibilité des métaux (Worms et al, 2006).

Au cours des 20 dernières années, les modèles d'équilibre ont été de plus en plus élaborés pour décrire la biodisponibilité des métaux dans les systèmes environnementaux, malgré le fait que les systèmes environnementaux sont toujours dynamiques et rarement à l'équilibre.

Dans ces modèles doivent être prises en compte les diminutions des espèces réactives et de la disponibilité du métal due à la compétition, à la complexation ou à d'autres réactions; en effet ces phénomènes réduisent la bioaccumulation du métal et ainsi ses effets biologiques.

Récemment, il est devenu évident que les réactions biologiques, physiques et chimiques qui se produisent dans la proximité immédiate de la surface biologique jouent également un rôle important dans le contrôle de la biodisponibilité des traces de métaux par des changements dans les flux limitants de bioaccumulation (Worms et al, 2006). Des exemples de limitation par des réactions biologiques (transport à travers la membrane), des réactions chimiques (dissociation de complexes métalliques) et des phénomènes physiques (diffusion) peuvent être rencontrés. En outre, l'organisme peut employer un certain nombre de stratégies d'internalisation biologiques pour contourner les limitations qui lui sont imposées par la physico-chimie du milieu (Worms et al, 2006).

On rencontre divers cas de figures pour le transport d'un métal: utilisation d'un site unique pour plusieurs métaux, utilisation de plusieurs sites pour un seul métal et cela complique la prédiction des effets de l'absorption. Enfin, à l'intérieur de la cellule, celle-ci est en mesure d'employer un grand nombre de stratégies, dont la complexation, le cloisonnement ou la production de ligands extracellulaires pour minimiser ou optimiser la réactivité du métal. La

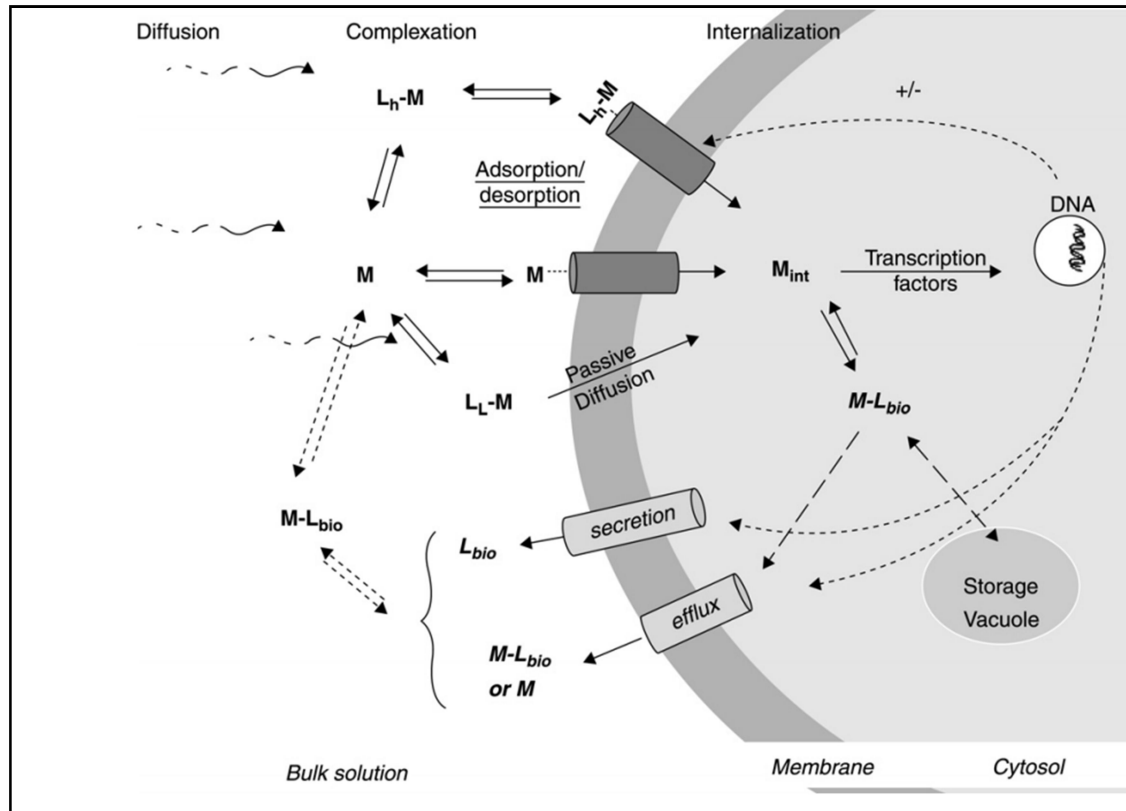
prédiction de la biodisponibilité des traces de métaux exigera donc des connaissances multidisciplinaires pour la compréhension des réactions se produisant au voisinage de l'interface biologique.

Généralement, la biodisponibilité des traces de métaux dans les eaux naturelles, y compris leur toxicité, semble être liée à leur capacité à traverser les barrières biologiques (par exemple la membrane plasmique) et on la prédit le plus souvent en considérant la concentration en métal (Franklin et al, 2002) ou les flux (Wilkinson et Buffle, 2004).

Le processus de bioaccumulation dépend non seulement des voies d'internalisation et de leur spécificité, mais aussi de la physico-chimie du milieu, de la taille et de la nature de l'organisme (Pinheiro et Leeuwen, 2001).

Néanmoins, une compréhension fondamentale plus approfondie du processus de bioaccumulation reste actuellement encore au stade de la recherche et nécessite les études :

- du comportement des espèces métalliques au cours de leur transport à partir du milieu de la solution de culture jusqu'à l'interface biologique,
- du transfert de l'espèce métallique à travers la membrane biologique,
- du rôle de l'organisme dans la modification de la chimie et la biologie du procédé d'absorption (Figure 25, Hudson, 1998 ; Morel et Hering, 1993 ; Wilkinson et Buffle, 2004 ; Worms et al, 2006).



**Figure 25. Modèle de conception des processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans la bioaccumulation (adsorption et absorption) d'un métal dans un micro-organisme biologique marin.**

**Légende**

**L** : ligand qui peut se lier au métal **M**

**Indices:** L lipophile; h hydrophile; bio biologique; int intracellulaire.

Les métaux et leurs complexes, doivent d'abord être transférés dans le milieu extérieur jusqu'à la surface de du micro-organisme. Les complexes métalliques sont souvent capables de se dissocier et de se réassocier au cours de leur transport vers la surface biologique. Le métal doit réagir avec un site sensible sur la membrane biologique (adsorption/désorption), suivi éventuellement par un transport biologique à l'intérieur de la cellule (internalisation). Chacun de ces phénomènes peut être limitant pour l'ensemble du processus de bioaccumulation. Les amplitudes relatives des différents flux varient en fonction de la nature chimique des composés accumulés, la taille et le type d'organisme et les conditions physico-chimiques (par exemple, pH, concentration en métal ou ligands potentiels de membrane) (Wilkinson et Buffle, 2004, Pinheiro et Van Leeuwen, 2001, Van Leeuwen, 1999). En outre,

certaines réponses biologiques aux métaux, notamment changement de pH à l'interface biologique, modifications de la charge de surface, influencent en retour la physico-chimie des métaux en solution et à l'interface et peuvent modifier ainsi le flux d'internalisation et la quantité de métal absorbé.

Dans de nombreux cas, le transport de métal à travers la membrane biologique est l'étape limitante et les autres réactions sont donc supposées à l'équilibre : équilibre thermodynamique entre les espèces métalliques dans la solution entre elles et avec les espèces liés à des sites sur la surface biologique (Slaveykova et Wilkinson, 2005 ; Campbell, 1995).

Par ailleurs, l'incorporation du métal dans le cytoplasme est une étape clé dans l'ensemble du processus de bioaccumulation. Contrairement aux processus qui se déroulent dans la solution, la membrane plasmique est biologiquement active et souvent en mesure de contrôler l'amplitude des flux d'internalisation selon les besoins de l'organisme. En raison du caractère hydrophobe global de la membrane biologique, seules les molécules neutres ou non polaires peuvent diffuser de façon passive dans le cytosol (sur la base du gradient de concentration entre les compartiments interne et externe et le coefficient de partage entre les phases aqueuses et lipidiques) (Worms et al, 2006).

Pour les métaux, ce mode de transport est pertinent pour les complexes métalliques de dithiocarbamate, organo-mercure et complexes de chlorure d'argent neutres (Aldrich et al, 2002 ; Phinney et Bruland, 1997). La grande majorité des espèces métalliques présentes dans l'environnement sont hydrophiles et leur transport à travers la membrane biologique est facilité par des protéines spécifiques.

Dans certains cas, l'incorporation des métaux à l'intérieur de l'organisme est facilitée par des transporteurs anioniques. Ce moyen de transport dépend étroitement de la spéciation des métaux, mais aussi de l'état des cellules.

Dans la majorité des cas, les métaux sont transportés comme des ions libres pour lesquels les sites de transport ont une forte affinité, mais la sélectivité n'est pas toujours élevée. En effet, l'un des mécanismes communs de toxicité est le remplacement d'un métal essentiel par un métal toxique à un emplacement donné (Bridges et Zalups, 2005).



Pour les bactéries et les algues vertes,  $\text{Ca}^{2+}$  réduit le processus d'incorporation de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  et par conséquent il réduit la toxicité par ces derniers (Bridges et Zalups, 2005; Ballatori, 2002).

Dans certains cas, les microorganismes s'adaptent à de faibles concentrations en métaux essentiels via:

- l'augmentation de la production des transporteurs (par exemple, l'absorption de Mn par *Thalassiosira pseudomonana* (Sunda et Huntsman, 1992)
- l'augmentation de l'affinité des transporteurs (par exemple, l'adsorption de Zn par *T. pseudomonana* (Sunda et Huntsman, 1998)

Généralement, les microorganismes ont des systèmes de transport très sensibles à leur milieu extérieur (Hannikenne et al, 2005). Chez le phytoplancton marin, une autorégulation de transport a été démontrée pour Mn, Cd et Zn qui affecte directement les flux d'internalisation de ces métaux (Sunda et Huntsman, 2000).

En plus de la modification de l'absorption cellulaire, les ions métalliques peuvent provoquer une variété de réponses cellulaires qui peuvent directement ou indirectement influencer leur biodisponibilité. L'accumulation d'un ion métallique à l'intérieur de la cellule est déterminée par sa capacité à interagir avec des protéines produisant ainsi des effets toxiques, par exemple :

- Une inactivation des protéines (par exemple, des enzymes) due à leurs interactions avec des métaux (Siripornadulsil et al, 2002; Ciriolo et al, 1994).
- Une interférence compétitive dans l'accumulation d'un métal par un autre (Clemens, 2001).
- Une induction d'un stress oxydatif suivi d'une lyse cellulaire (Elgarbly-Weiss, 2002; Sinha et al, 2003).

Généralement, les microorganismes ont développé des mécanismes de protection comme:

- la séquestration intracellulaire du métal par un agent complexant chélatant, ce qui rend le métal toxique moins disponible (Clemens, 2001). Par exemple chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la proline assure la protection cellulaire par la séquestration des métaux avant même la synthèse d'autres chélateurs comme les phytochélatines et métallothionines

(Yukiho et al, 1999; Mehra et Mulchandani, 1995). Des phytochélatines complexant des métaux sont détectées chez les microalgues, les levures et les bactéries.

- la compartimentation et le transport des métaux dans des compartiments sous-cellulaires
- l'élimination de l'excès des métaux incorporés dans la cellule. Par exemple *Cupriviadus metllidurans* est capable d'éliminer le nickel par l'activation de la synthèse de pompes spécifiques quand celui-ci rentre dans le périplasme (Gregor et al, 2005).
- la séquestration extracellulaire qui consiste à complexer le métal éliminé au niveau extracellulaire afin de diminuer sa biodisponibilité. Des études ont montré que les microalgues produisent des chélatants extracellulaires tels que polysaccharides, protéines, peptides et acides organiques qui sont capables de diminuer la concentration en métaux à proximité immédiate de la cellule (McKnight et Morel, 1979). Par exemple, dans les systèmes marins, le cuivre, le cadmium et le zinc peuvent être fortement complexés par le thiol (exsudat riche) et des acides aminés qui sont produits par le coccolithophoridés « *Emiliana huxleyi* » (Dupont et al, 2004 ; Leal et al, 2005).

### 1.3.2 Modèles publiés :

Les modèles d'équilibre ont été souvent adoptés et permettent globalement de prédire la biodisponibilité des métaux. Dans des conditions de pseudo-équilibre, la concentration de métal et sa spéciation sont les mêmes dans la solution globale et à l'interface membrane - liquide. En outre, la dynamique des complexes métalliques (mobilité en fonction de leur taille, labilité chimique ...) est considérée comme rapide et l'équilibre est maintenu à tout moment dans la solution. La bioaccumulation et les effets toxicologiques sont ensuite prédits à partir de la concentration de toutes les espèces en équilibre dans le milieu. (Campbell et al, 2002)

Les modèles d'équilibre permettant de prédire le rôle de la spéciation chimique sur la biodisponibilité des métaux sont souvent qualitativement cohérents avec les résultats expérimentaux. En effet la complexation (ligands organiques et inorganiques, (Slaveykova et al, 2003) et la compétition avec d'autres métaux (Slaveykova et Wilkinson, 2003) conduisent à une diminution de l'interaction du métal avec des sites d'absorption sur la surface de l'organisme et par conséquent à la réduction du taux d'accumulation du métal en question dans la cellule. En effet, la diversité biologique, physique et chimique au voisinage immédiat

d'une surface biologique joue un rôle important dans le contrôle de la biodisponibilité des traces de métaux (Worms et al, 2006).

Les modèles d'équilibre les plus élaborés pour prédire la biodisponibilité des métaux dans les systèmes environnementaux sont :

- FIAM : Free ion activity model (Worms et al, 2006)
- BLM : Biotic ligand model (Campbell et al, 2002 ; Worms et al, 2006) (figure 26)

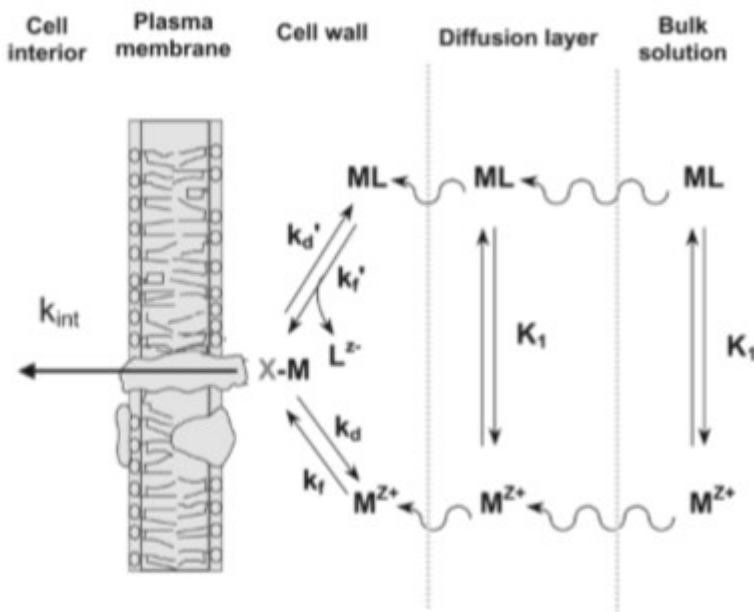


Figure 26. Modèle de conception des interactions metal- microalgue

#### Légende

$M^{Z+}$  : Ions métalliques libres

ML : Métal lié à un ligand dans la solution

M-X : Surface du complexe métallique

$K_1$  : Constante d'équilibre de formation de ML

$k_f$  et  $k_f'$  : Coefficients constants de formation de la surface du complexe métallique

$k_d$  et  $k_d'$  : Coefficients constants de dissociation de la surface du complexe métallique

$k_{int}$  : Coefficient constant d'« internalisation » ou de transport du métal à travers la membrane biologique.

Le modèle BLM dérive du modèle FIAM qui décrit les interactions du métal dissous avec un microorganisme marin et son accumulation à l'intérieur de la cellule.

Les étapes qui interviennent lors des interactions métal-algues sont : (i) transfert du métal de la solution vers la surface biologique, (ii) adsorption / complexation du métal avec des sites passifs au niveau de la surface externe de la paroi externe (cell wall) et (iii) l'internalisation du métal à travers la membrane plasmique (Campbell et al, 2002).

Le modèle BLM permet de prédire la biodisponibilité du métal en fonction de la spéciation chimique, avec un certain nombre d'hypothèses simplificatrices (Campbell et al, 2002). :

- Le transport du métal de la solution vers la paroi externe et la réaction d'adsorption complexation avec des sites spécifiques situées sur la surface externe de la cellule sont supposés rapides (équilibre atteint).
- L'interaction du métal avec la membrane plasmique se produit par une réaction d'échange de ligands, ce qui donne le complexe M-X-cellule
- La réponse biologique (absorption/internalisation) de l'organisme dépend la concentration du complexe M-X-cellule
- La concentration de {M-X-cellule} peut s'exprimer en fonction de la concentration de  $[M^{z+}]$  dans la solution par une loi d'adsorption de type Langmuir (Annexe III.2); la concentration des sites libres reste relativement constante si les métaux sont en trace
- La nature de la surface biologique ne varie pas dans le cas où le métal n'introduit pas des changements dans la nature de la membrane plasmique ou de ses transporteurs d'ions.

### 1.3.3 Présentation du modèle

Le modèle appliqué à *C. vulgaris* doit pouvoir prédire la bioaccumulation de magnésium par la biomasse. L'article précédent montre l'applicabilité d'une cinétique réversible de premier ordre aux données expérimentaux. A partir de ces données, il nous a été intéressant de développer et affiner le modèle et de déterminer ses paramètres. Le modèle élaboré dans notre travail est nouveau, original et global qui décrit tout le mécanisme détaillé du transfert de magnésium du milieu de culture vers la cellule algale.

Avant de procéder au développement du modèle, les notations et les hypothèses générales adoptées ont été récapitulées dans le tableau 7 afin de faciliter la compréhension:

**Tableau 7. Notations et hypothèses du modèle**

Notations	Hypothèses
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <math>[M]_{\infty}</math>: concentration en Mg dans la solution ( mg L<sup>-1</sup>de solution algale)</li> <li>➤ <math>[M]_0</math>: Concentration initiale de Mg dans le milieu de culture (mg L<sup>-1</sup>)</li> <li>➤ (MS): concentration en Mg adsorbé (mg/m<sup>2</sup> de surface d'algue) au niveau de l'interface 1 « i<sub>1</sub> »</li> <li>➤ <math>[MX]</math> : concentration en Mg lié à une protéine de transport X dans la membrane.</li> <li>➤ <math>[\bar{M}]</math> : concentration en métal au cœur de la cellule (mg/volume de l'algue)</li> <li>➤ <math>V_L, V_B</math> : volumes du liquide et de la biomasse respectivement</li> <li>➤ A : aire interfaciale (surface des algues)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sauf indication contraire, toutes les réactions aux interfaces sont supposées infiniment rapides (équilibre atteint)</li> <li>➤ <math>[X]</math> est en large excès donc <math>[X]_{i2} = [X]_0 = \text{constante}</math></li> <li>➤ S est en large excès</li> <li>➤ L'épaisseur de la paroi est négligeable devant l'épaisseur de la membrane plasmique</li> </ul>

La figure 27 montre toutes les étapes du transfert du magnésium du milieu de culture vers la biomasse. Chaque étape sera modélisée par la suite.

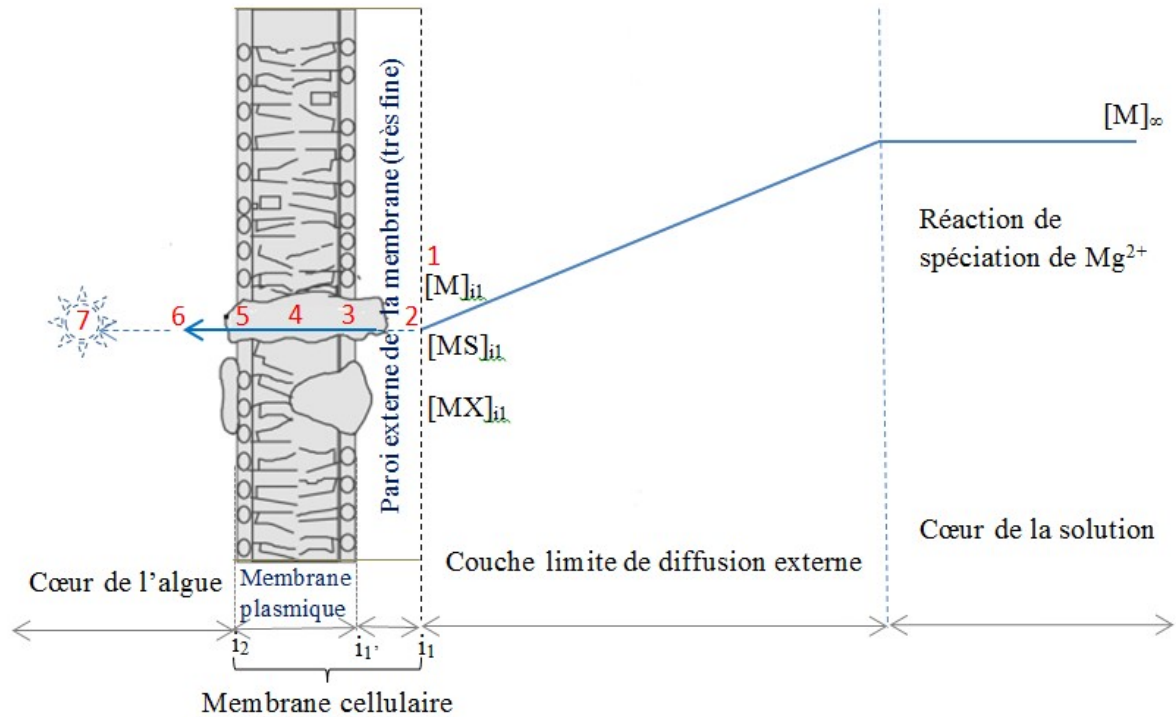


Figure 27. Transfert du magnésium du milieu de culture vers la cellule algale

**Légende**

$[M]_{\infty}$  : concentration en magnésium (Mg) dans le milieu de culture exprimée en  $\text{mg L}^{-1}$

$i_1$  : interface externe entre la paroi externe de la membrane cellulaire et la solution.

$i_1'$  : interface entre la membrane plasmique et la paroi externe de la cellule

$i_2$  : interface interne de la membrane plasmique de la cellule.

$[M]_{i1}$  : concentration en Mg dans la solution à l'interface  $i_1$  exprimée en  $\text{mg L}^{-1}$

$[MS]_{i1}$  : concentration en magnésium adsorbé à des sites spécifiques au niveau de l'interface  $i_1$  des cellules ( $\text{mg de Mg}^{2+}/\text{surface de cellules}$ )

$[MX]_{i1}$  : concentration en magnésium lié à des protéines de transport au niveau de l'interface  $i_1$  des cellules ( $\text{mg de Mg}^{2+}/\text{surface de cellules}$ ).

### Mécanisme détaillé du transfert du métal

Le transfert du métal de la solution vers l'intérieur des cellules algales peut être décrit par une succession d'étapes élémentaires (figure 27), partiellement inspirées de la littérature (Campbell et al, 2002, Worms et al 2006) :

- 1) Etape 1 : Diffusion externe de M du cœur de la solution (concentration  $[M]_{\infty}$ ) vers la surface externe de l'algue (concentration  $[M]_{i1}$ )
- 2) Etape 2 : Réaction d'adsorption/complexation avec les sites d'adsorption S au niveau de l'interface ( $i_1$ ) :  $M + S \Leftrightarrow MS$
- 3) Etape 3 : Réaction de prise en charge du métal adsorbé MS par un transporteur X, permettant de libérer les sites d'adsorption et d'assister le métal dans sa traversée de la membrane:  $MS + X \Leftrightarrow MX + S$

Cette réaction, dite « d'internalisation » a lieu dans la paroi poreuse externe de la membrane dont l'épaisseur est supposée très faible

- 4) Diffusion « assistée » à travers la membrane plasmique du complexe MX
- 5) Réaction de dissociation du complexe MX au niveau de l'interface ( $i_2$ ) avec libération du transporteur qui reste dans la membrane:  $MX \Leftrightarrow M + X$
- 6) Diffusion interne du métal M à l'intérieur du cytoplasme de la cellule
- 7) Réaction de complexation du métal avec un ligand bioactif L:  $M + L \Leftrightarrow ML$ , à l'intérieur du cytoplasme.

### Mise en équation du modèle

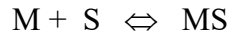
- 1) Transfert externe : le flux de transfert de M relatif à cette étape s'écrit en application du modèle de la couche limite :

$$J_{Ex} = k_L ([M]_{\infty} - [M]_{i1}) \quad (E1)$$

$J_{Ex}$  : flux de M transféré par unité de temps et unité de surface, du cœur de la solution vers la surface biologique externe de la cellule.

$k_L$ : coefficient de transfert externe

2) Adsorption sur la paroi externe de la cellule (interface  $i_1$ ) :



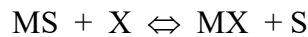
Cette réaction est à l'équilibre et modélisée par une équation de type Langmuir.

Dans le cas de l'adsorption de M en faible quantité par rapport au nombre de sites total (Annexe III.2), la concentration de sites vacants est constante et égale à la concentration totale  $(S)_0$ ; la loi se réduit alors à:

$$(MS)_{i1} = (S)_0 \cdot K_1 \cdot [M]_{i1} = K_1^* \cdot [M]_{i1} \quad (E2)$$

Avec:  $K_1^* = K_1 \cdot (S)_0$

3) Internalisation correspondant à la prise en charge de M par une protéine de transport « X » :



Cette réaction a lieu dans la paroi externe de la membrane (interface «i1») et est supposée infiniment rapide (constante d'équilibre  $K_2$ ):

$$[MX]_{i1} = K_2^* \cdot (MS)_{i1} \quad (E3)$$

Avec :  $K_2^* = K_2 \cdot \frac{[X]}{[S]}$

$K_2^*$  peut être considérée constante car X et S étant en large excès par rapport à M, leurs concentrations  $[X]$  et  $[S]$  sont constantes.



4) Diffusion assistée de MX à travers la membrane plasmique :

Cette diffusion, supposée monodirectionnelle et pseudo-stationnaire, obéit à la loi de Fick ; en négligeant la courbure compte tenu de l'épaisseur très faible de la membrane, il vient:

$$-D \left( \frac{d[\text{MX}]}{dr} \right)_r = -D \left( \frac{d[\text{MX}]}{dr} \right)_{r+dr}$$

Avec :

D : diffusivité effective de l'espèce MX dans la membrane ;

r : coordonnée spatiale dans la membrane

[MX] : concentration du complexe MX

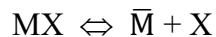
On néglige la courbure compte tenu de l'épaisseur très faible de la membrane :  $S(r) = S(r+dr)$

Le flux de diffusion s'écrit alors :

$$J_{\text{Me}} = \frac{D}{\delta} ([\text{MX}]_{i_1} - [\text{MX}]_{i_2}) \quad (\text{E4})$$

$\delta$  : Épaisseur moyenne de la membrane

5) Décomposition du complexe MX et libération de la protéine de transport selon la réaction et de M dans la cellule:



On notera  $\bar{\text{M}}$ , l'espèce M non complexée dans la cellule.

$$K_3 = \frac{[\bar{\text{M}}] \cdot [\text{X}]}{[\text{MX}]} \quad (\text{E5})$$

Cette réaction a lieu à l'interface  $i_2$  :

$$[MX]_{i2} = \frac{1}{K_3^*} \cdot [\bar{M}]_{i2} \quad (E5')$$

Avec :  $K_3^* = \frac{K_3}{[X]_{i2}}$

6) et 7) Diffusion interne et réaction de complexation couplées

La diffusion interne de M et la réaction de complexation par un ligand bioactif L ont lieu en tout point du cytoplasme. Les bilans matière associés donnent lieu à des équations différentielles dont le traitement mathématique est complexe et lourd. Nous proposons une approche originale inspirée de celle habituellement utilisée dans la modélisation de la catalyse hétérogène.

On introduit le concept « d'efficacité » dans la cellule,  $\eta$ , définie par (Annexe III.4) :

$$\eta = \text{efficacité} = \frac{\text{Vitesse de réaction observée}}{\text{Vitesse de réaction si la diffusion interne était infiniment rapide}}$$

Sachant que dans l'hypothèse d'une diffusion infiniment rapide, la concentration de M au sein de la cellule serait égale en tous points à celle à l'interface, ( $[\bar{M}] = [\bar{M}]_{i2}$ ), la vitesse globale observée de la réaction s'écrit alors:

$$r_{\text{obs}} = \eta \cdot k_{\text{cin}} \cdot ([\bar{M}]_{i2} - [\bar{M}]_{\text{eq}}) \quad (E6)$$

Avec  $r_{\text{obs}}$ , vitesse de réaction (quantité de M complexé par L par unité de temps et de volume de microalgue),  $k_{\text{cin}}$  constante cinétique de cette réaction;  $[\bar{M}]_{i2}$  et  $[\bar{M}]_{\text{eq}}$  concentrations de M à l'interface  $i_2$  et à l'intérieur de la cellule à l'équilibre.

Les expressions des flux J de transfert (ramenés à l'unité de surface des algues) et de la vitesse  $r_{\text{obs}}$  (ramenée à l'unité de volume des algues), sont:

$$J_{\text{Ex}} = k_L ([M]_{\infty} - [M]_{i1}) \quad (E1)$$

$$J_{\text{Me}} = \frac{D}{\delta} ([MX]_{i1} - [MX]_{i2}) \quad (E4)$$

$$r_{\text{obs}} = \eta \cdot k_{\text{cin}} \cdot ([\bar{M}]_{i2} - [\bar{M}]_{\text{eq}}) \quad (E6)$$

On a donc en régime pseudo stationnaire:  $A J_{Ex} = A J_{Me} = V_B r_{obs}$

La vitesse globale de bioaccumulation du métal par les algues (ramenée à l'unité de volume d'algue) s'écrit alors en fonction des concentrations en métal dans la solution aqueuse d'algues :

$$r_g = k_g \cdot ([M]_{\infty} - [M]_{eq}) \quad (E7)$$

Où :

$[M]_{eq}$  : Concentration de M à l'équilibre au sein de la solution aqueuse d'algues.

$k_g$  est le coefficient global de transfert du métal prenant en compte les différentes étapes élémentaires du processus.

En combinant les équations (E1, E4, E6 et E7) et en tenant compte des relations de proportionnalité entre les concentrations au niveau des interfaces (hypothèse du transfert interfacial infiniment rapide), on obtient (Annexe III.5) :

$$\frac{1}{k_g} = \frac{1}{k_L \cdot a_{sp}} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot \frac{a_{sp} \cdot D}{\delta}} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^* \cdot \eta \cdot k_{cin}} \quad (E8)$$

Où  $a_{sp}$  est la surface spécifique des algues :  $a_{sp} = A / V_B = 6 / d$ , avec  $d$  diamètre des cellules, qui a été trouvé constant lors des cultures. Donc  $a_{sp}$  est une constante.

Cette relation correspond à la loi d'additivité des résistances au transfert.

- $\frac{1}{k_g}$  : Résistance globale au transfert de M du cœur de la solution algale externe vers le cœur des cellules,
- $\frac{1}{k_L \cdot a_{sp}}$  : Résistance à la diffusion externe du métal M
- $\frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot \frac{a_{sp} \cdot D}{\delta}}$  : Résistance au transport à travers la membrane cytoplasmique
- $\frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^* \cdot \eta \cdot k_{cin}}$  : Résistance combinée « diffusion interne - réaction d'absorption/bioaccumulation » du métal au sein de la cellule (Annexe III)

**Remarque :** La constante cinétique globale  $k_g$  est indépendante de la concentration initiale en métal  $[M]_0$ , ce qui est une conséquence directe de l'ordre 1 des réactions mises en jeu. Elle est constante au cours du temps.

### Bilans matière

Le bilan matière du magnésium entre les instants 0 et t s'écrit :

$$\left( \text{Quantité initiale de M introduite} \right) = \left( \text{Quantité résiduelle dans la solution} \right) + \left( \text{Quantité adsorbée "extracellulaire"} \right) + \left( \text{Quantité absorbée "intracellulaire"} \right)$$

Soit,

$$V_L \cdot [M]_0 = V_L \cdot [M]_\infty + Q_{\text{ads}} + Q_{\text{abs}} \quad (\text{E9})$$

- La quantité de M adsorbée s'écrit :  $Q_{\text{ads}} = A \cdot (MS)$

Avec A, la surface totale des microalgues à l'instant t et (MS), la concentration en magnésium adsorbé, donnée par l'équation de Langmuir qui se réduit à l'équation (E2) en cas de faible adsorption ( $K_1 \cdot [M] \ll 1$ ).

Il vient donc:  $Q_{\text{ads}} = A \cdot K_1^* \cdot [M]_{\text{il}} \quad (\text{E10})$

A l'équilibre:  $(Q_{\text{ads}})_{\text{éq}} = A_{\text{éq}} \cdot K_1^* \cdot [M]_{\text{il éq}} \quad (\text{E11})$  et  $[M]_{\text{il éq}} = [M]_{\text{éq}}$

Donc finalement :  $(Q_{\text{ads}})_{\text{éq}} = A_{\text{éq}} \cdot K_1^* \cdot [M]_{\text{éq}}$

- La quantité absorbée s'écrit :  $Q_{\text{abs}} = V_B \cdot ([\bar{M}] + [\bar{ML}])$

Avec  $[\bar{M}]$  (respectivement  $[\bar{ML}]$ ) la concentration moyenne de M absorbé libre (respectivement lié) dans le cœur de la cellule selon la réaction (R4) :



L'application de la loi d'action de masse à la réaction (R4) conduit à l'équation :

$$[\overline{ML}] = \frac{K_4 \cdot [\overline{L}]_0 \cdot [\overline{M}]}{1 + K_4 \cdot [\overline{M}]} \quad (\text{E12}) \quad \text{avec } [L]_0 \text{ concentration totale de L.}$$

La quantité absorbée s'écrit :

$$Q_{\text{abs}} = V_B \cdot ([\overline{M}] + [\overline{ML}]) = V_B \cdot [\overline{M}] \cdot \left(1 + \frac{K_4 \cdot [L]_0}{1 + K_4 \cdot [\overline{M}]}\right) \quad (13)$$

Deux cas limites peuvent être envisagés:

1.  $K_4 \cdot [\overline{M}] \ll 1$  : L est en grand excès devant M

$$Q_{\text{abs}} = V_B \cdot [\overline{M}] \cdot (1 + K_4 [L]_0) \quad (13.a)$$

A l'équilibre  $Q_{\text{abs eq}} = V_{\text{Beq}} \cdot [\overline{M}]_{\text{eq}} \cdot (1 + K_4 [L]_0)$

2.  $K_4 \cdot [\overline{M}] \gg 1$  M est en excès devant L, cas beaucoup moins probable que le premier

$$Q_{\text{abs}} = V_B \cdot ([\overline{M}] + [L]_0) \quad (13.b)$$

A l'équilibre  $Q_{\text{abs eq}} = V_{\text{Beq}} \cdot ([\overline{M}]_{\text{eq}} + [L]_0)$

### Exploitation des équations de bilan de matière

Nous avons montré (Annexe III) que les concentrations en Mg dans la solution aqueuse externe,  $[M]$  et dans le cœur des cellules  $[\overline{M}]$ , sont reliées à l'équilibre par l'équation (14) :

$$[\overline{M}]_{\text{éq}} = K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^* \cdot [M]_{\text{éq}} \quad (14)$$

Le bilan matière s'écrit finalement dans le cas le plus probable où L est en excès devant M dans la cellule ( $K_4 \cdot [\overline{M}] \ll 1$ ) :

$$V_L \cdot [M]_0 = [M]_{\text{éq}} \cdot (V_L + A_{\text{éq}} \cdot K_1^* + V_{\text{éq}} \cdot K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^* \cdot (1 + K_4 \cdot [\overline{L}]_{\text{éq}})) \quad (\text{E15})$$

**Remarque :** ainsi, la concentration en métal à l'équilibre  $[M]_{\text{éq}}$  est proportionnelle à la concentration initiale en métal  $[M]_0$  au moins dans le cas d'un large excès de ligand bioactif L.

### 1.3.4 Validation expérimentale du modèle

#### Validation du modèle cinétique exponentiel

Les résultats obtenus en culture batch sont exploités pour valider le modèle. Sur la figure 29, on trace :

$$\text{Ln} ([M]-[M]_{\text{eq}})/([M]_0-[M]_{\text{eq}}) = \text{fonction (temps)}$$

Pour chacune des concentrations initiales en métal.

La linéarité des courbes obtenues atteste de la validité du modèle cinétique (figure 29).

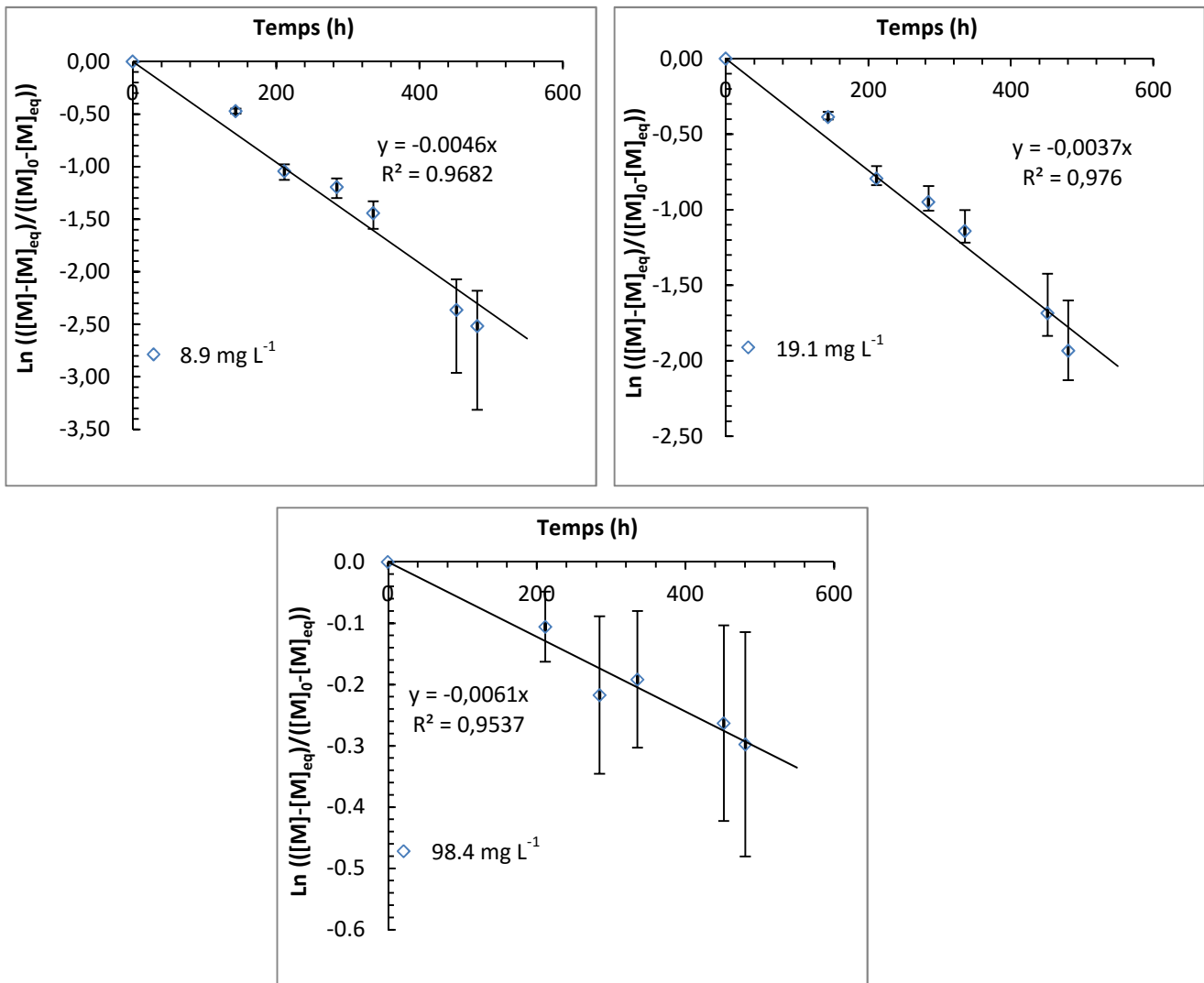


Figure 28. Modélisation de la bioaccumulation du Mg par les cellules

Nous allons maintenant examiner les diverses caractéristiques du modèle et vérifier qu'elles correspondent aux résultats expérimentaux.

### ✚ Proportionnalité entre les concentrations initiales en magnésium et les concentrations d'équilibre

Les concentrations en Mg mesurées à la fin de chaque culture (480 h) considérées à l'équilibre ( $M_{eq}$ ) ont été tracées en fonction des concentrations initiales utilisées (figure 29).

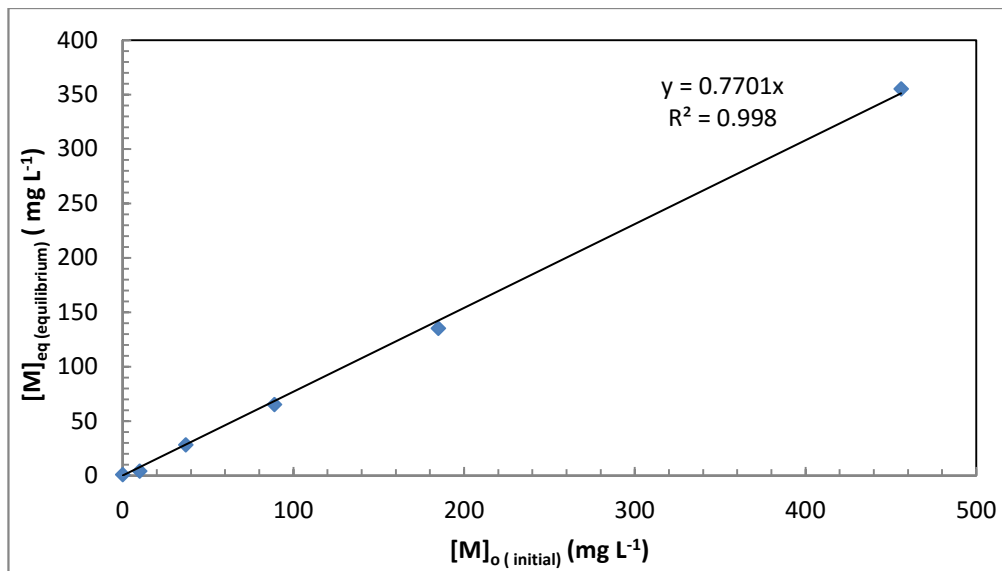


Figure 29. Proportionnalité entre  $[M]_{eq}$  et  $[M]_0$

Le graphe 29, montre une relation linéaire entre  $[M]_0$  et  $[M]_{eq}$  avec un coefficient de corrélation 0.770. Un léger décalage a été observé pour les deux premiers points correspondant à des faibles concentrations (8,9 et 19,1 mg L<sup>-1</sup>), dû probablement aux imprécisions de mesure ou à un autre mécanisme apparaissant à faible concentration en magnésium.

✚ **La constante cinétique du modèle  $k_g$  est indépendante de la concentration initiale en magnésium  $[M]_0$**

Tableau 8. Les valeurs numériques du modèle exponentiel

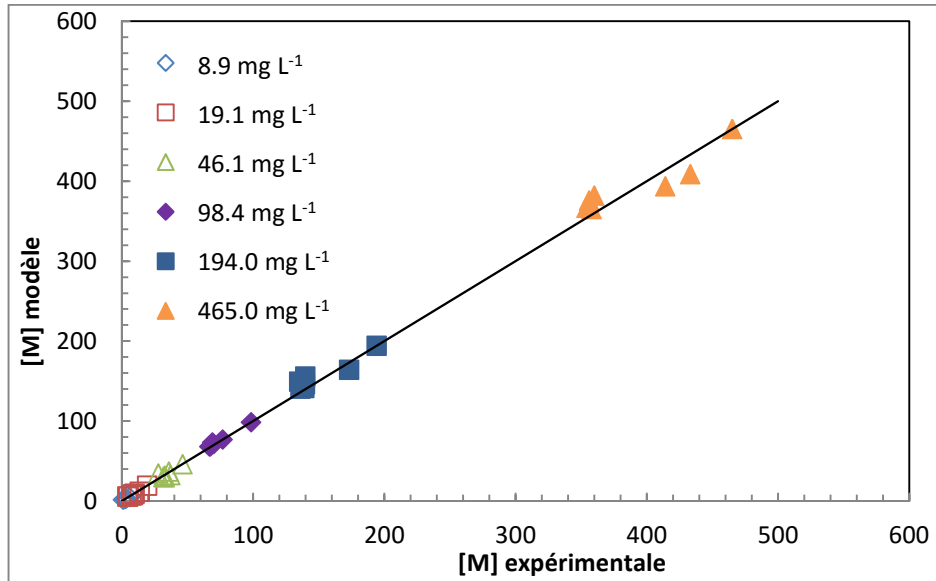
$[M]_0$ (mg L <sup>-1</sup> )	8.9	19.1	46.1	98.4	194.0	465.0
$k.a \times 10^{-3}$ (h <sup>-1</sup> )	6.0	5.0	5.0	5.6	7.6	7.5
$k.a$ moyenne $10^{-3}$ (h <sup>-1</sup> )	6.4 ± 1.1					

$k a$  est ici le produit de la constante cinétique  $k$  et de  $a = A / V_L$ . On trouve avec  $k_g$  la relation suivante :  $k_g = k a / a_{sp}$  avec  $a_{sp} = A / V_B$ , constante dans tous les essais. Le Tableau 8 montre que la constante cinétique du modèle exponentiel  $k a$  semble être la même quelle que soit la concentration initiale en magnésium utilisée. On en déduit donc que  $k_g$  est également constante et ne dépend pas de la concentration initiale en magnésium.

✚ **Comparaison entre les concentrations en magnésium calculées par le modèle ( $M_{\text{modèle}}$ ) et les concentrations en magnésium mesurées ( $M_{\text{expérimentale}}$ )**

Afin de valider le modèle de bioaccumulation de magnésium proposé, nous le comparons aux valeurs expérimentales obtenues pour les cultures de *C. vulgaris* cultivées à différentes concentrations en Mg<sup>2+</sup> de 8,9 à 465,0 mg L<sup>-1</sup> dans l'incubateur. Les Figures 30 et 31 présentent la comparaison entre les mesures expérimentales et les données du modèle pour la bioaccumulation de magnésium par la biomasse.

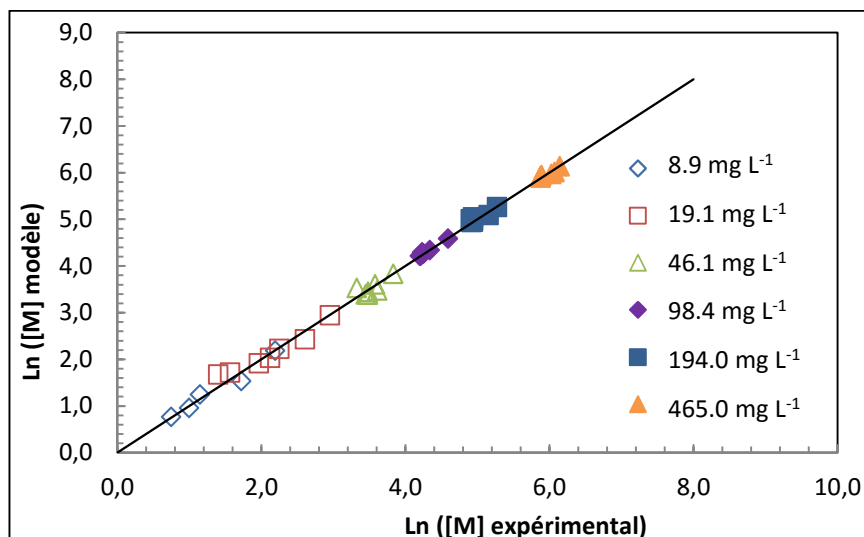




**Figure 30. Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs du modèle**

La figure 30 montre que les valeurs prédites du modèle sont très similaires aux valeurs expérimentales d'où l'applicabilité du modèle exponentiel à toutes les valeurs expérimentales pour toutes les concentrations en Mg testées.

Ces mêmes résultats ont été représentés en échelle logarithmique (Figure 31) afin de bien montrer les points à faible concentration en magnésium.



**Figure 31. Représentation logarithmique des valeurs du modèle et des valeurs expérimentales**

Les Figures 30 et 31 ci-dessus, montrent que le modèle exponentiel est tout à fait adapté pour représenter la cinétique d'absorption de Mg par les cellules de *C. vulgaris* cultivées dans l'incubateur dans une large gamme de concentration en métal testée.

### 🔧 Validation des modèles de l'adsorption et de l'absorption

La figure 32 montre les concentrations de magnésium absorbé dans les cellules et adsorbé à leur surface, à l'équilibre en fonction de la concentration initiale du métal. La courbe bleue montre que la concentration adsorbée à l'équilibre est bel et bien proportionnelle à la concentration initiale du métal et par voie de conséquence à sa concentration à l'équilibre, comme le modèle le prédisait.

$$(Q_{ads})_{\text{éq}} = A_{\text{éq}} \cdot K_1^* \cdot [M]_{\text{éq}} \quad (\text{E11})$$

Par ailleurs, la quantité absorbée, donnée par l'équation (E13) avec ses deux cas limites décrit s'écrit :

$$Q_{\text{abs}} = V_B \cdot ([\bar{M}] + [\overline{ML}]) = V_B \cdot [\bar{M}] \cdot \left(1 + \frac{K_4 \cdot [L]_0}{1 + K_4 \cdot [\bar{M}]}\right) \quad (\text{E13})$$

Si l'on considère les deux cas limites :

$$\text{Magnésium en concentration faible : } Q_{\text{abs eq}} = V_{\text{Beq}} \cdot [\bar{M}]_{\text{eq}} \cdot (1 + K_4 [L]_0) \quad (\text{E13.a})$$

On trouve que la concentration en magnésium adsorbée est proportionnelle à  $[\bar{M}]_{\text{eq}}$  d'après 13a et donc à sa concentration initiale. C'est ce que l'on observe sur la Figure 32, au début de la courbe rouge ; pour une concentration initiale inférieure à 20 mg L<sup>-1</sup>, on retrouve la proportionnalité.

Lorsque le magnésium est en concentration initiale forte (> 46.1 mg L<sup>-1</sup>), la quantité absorbée ne varie plus en fonction de la concentration initiale, indiquant une saturation des cellules (figure 32). Là encore le modèle peut expliquer ce comportement.

$$\text{Nous avons trouvé par le modèle que } Q_{\text{abs eq}} = V_{\text{Beq}} \cdot ([\bar{M}]_{\text{eq}} + [L]_0) \quad (\text{E13.b})$$

A partir de 46,1 mg L<sup>-1</sup>, on considère donc que tout L est complexé par M. Si l'on augmente la concentration initiale en magnésium, il ne peut être absorbé que sous forme libre et cette absorption est limitée par la solubilité du magnésium libre dans la cellule. Donc à partir de 46,1 mg L<sup>-1</sup>,  $[\bar{M}]_{\text{eq}}$  est constant et par suite  $Q_{\text{abs eq}}$ .

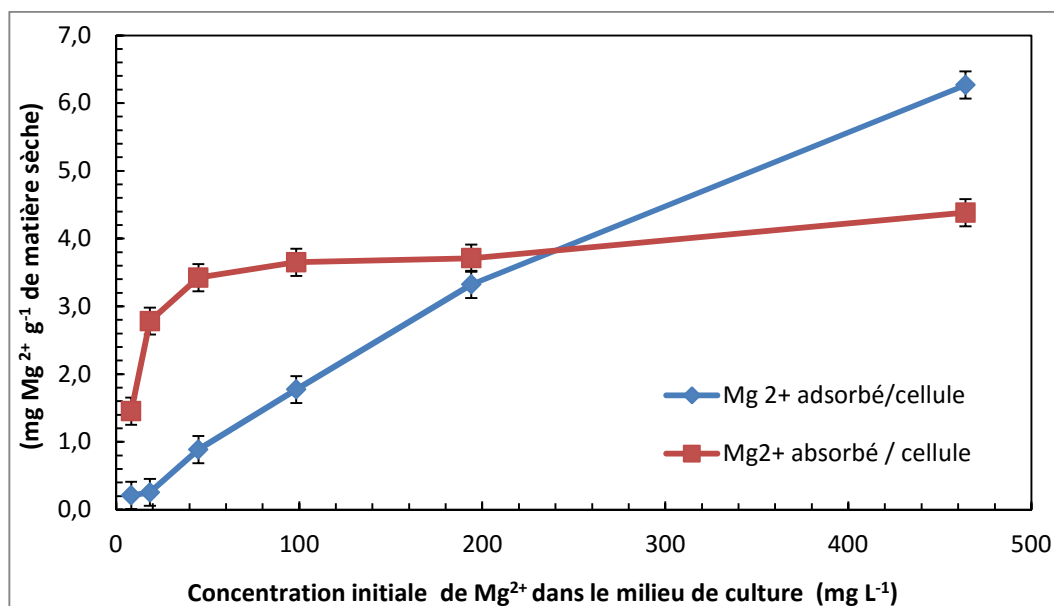


Figure 32. Les quantités de magnésium adsorbées et absorbées par *C. vulgaris*

#### 1.4 Conclusion

L'étude de la croissance en autotrophie de *C. vulgaris* dans les deux systèmes de culture en mode batch a permis de montrer la faisabilité de l'utilisation de cette espèce pour la bioaccumulation de magnésium.

En effet, différentes concentrations en cet oligoélément (8,9 à 465 mg L<sup>-1</sup>) ont été testées. Ceci a montré que Mg<sup>2+</sup> n'est pas toxique pour les algues même à grande concentration.

Nous avons constaté dans cette étude que pour une culture de *C. vulgaris* dépourvue de Mg<sup>2+</sup>, aucun signe de croissance n'a été observé.

Les méthodes expérimentales de dosage des différentes formes de magnésium : dissous dans le milieu, adsorbé au niveau des parois cellulaires externes et absorbé au niveau du cytoplasme des cellules, sont donc validées. Les bilans matières en magnésium à différents temps de la culture sont respectés à 99% pour toutes les expériences réalisées en autotrophie dans l'incubateur et dans le pilote, ce qui est excellent.

La cinétique d'absorption est assez lente. Les cultures de *C. vulgaris* en autotrophie réalisées dans les deux systèmes de cultures ont permis, en 480 h d'absorber la majorité (> 80%) du

magnésium présent dans le milieu (concentration initiale inférieure à 20 mg L<sup>-1</sup>). Pour des temps de culture plus courts (200 h), les microalgues n'ont accumulé que 20% du magnésium.

A faibles concentrations initiales en Mg<sup>2+</sup>, inférieures à 20 mg L<sup>-1</sup>, les microorganismes ont accumulé la quasi-totalité de la concentration en Mg<sup>2+</sup> ajoutée initialement dans le milieu de culture. Plus on augmente la concentration en magnésium dans le milieu, plus l'absorption par les cellules est importante. A partir de 46,1 mg de Mg<sup>2+</sup> L<sup>-1</sup> dans le milieu de culture, les cellules sont saturées en Mg<sup>2+</sup> intracellulaire (4 mg de Mg<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> de matière sèche), mais cet ion continue à s'adsorber sur les parois cellulaires sans qu'une saturation ait été observée. La quantité absorbée était plus importante que celle adsorbée sur les parois cellulaires.

Cette étude a également permis la proposition d'un modèle exponentiel pour la bioaccumulation de magnésium dans *C. vulgaris* et la détermination des paramètres associés. Le modèle est innovant et global car il permet de décrire et de modéliser toutes les étapes du transfert de magnésium, du milieu de culture (cœur de la solution) jusqu'au cytoplasme cellulaire (cœur de la cellule), contrairement aux modèles précédemment publiés (BLM et FIAM) qui ne permettent de décrire que quelques étapes de transfert du métal sans les modéliser.

Le modèle a été validé de façon très satisfaisante par nos résultats expérimentaux.

La répartition de Mg<sup>2+</sup> entre adsorption et désorption et le modèle de sa bioaccumulation seront par la suite testés sous de nouvelles conditions de culture de *C.vulgaris* dans les études suivantes.

## 2 Cultures autotrophes de *C. vulgaris* dans le photobioréacteur de 5 L à une concentration donnée de magnésium

Dans un second temps, nous avons suivi les concentrations en magnésium, résiduelles dans le milieu de culture, extracellulaire et intracellulaire au cours de la croissance ; l'objectif était d'abord, de déterminer la cinétique d'accumulation des ions et d'identifier les parties adsorbées et absorbées à différents temps de la culture.

Dans un troisième temps, nous avons testé l'applicabilité du modèle cinétique développé précédemment.

L'utilisation du photo-bioréacteur permet de réaliser des expériences en conditions parfaitement contrôlées, au niveau physique (temps, température, agitation...) comme au niveau chimique (débit d'air, pression d'oxygène, pH...). Le grand volume de liquide permet d'échantillonner tout au long de la culture pour déterminer les quantités de magnésium adsorbé et absorbé à différents stades de la croissance.

Les expériences ont été réalisées en duplicata dans le même bioréacteur et dans les mêmes conditions de culture et de concentration initiale en magnésium ajoutée dans le milieu (16 mg L<sup>-1</sup>), afin de confirmer la fiabilité et la précision des résultats ainsi que la validité des méthodes adoptées.

### 2.1 *Bioaccumulation de Mg<sup>2+</sup> par C. vulgaris en autrophie dans le photobioréacteur (Article scientifique)*

(Partie soumise sous forme d'article scientifique dans le « Journal of Microbiology and Biotechnology »)

## Magnesium Uptake by the Green Microalga *Chlorella vulgaris* in Batch Cultures

Hela Ben Amor-Ben Ayed<sup>1</sup>, Behnam Taidi<sup>1</sup>, Habib Ayadi<sup>2</sup>, Dominique Pareau<sup>1</sup> and Moncef Stambouli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CentraleSupélec, Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup> Faculty of Sciences of Sfax, Biodiversity and Aquatic Ecosystems Lab, Ecology and Department of Planktonology, University of Sfax, Tunisia

### Abstract

The accumulation (internal and superficial distribution) of magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ions by the green freshwater microalga, *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*), was investigated under autotrophic cultures in a stirred photo-bioreactor. The concentrations of the three forms of  $Mg^{2+}$  ion (dissolved, extracellular, and intracellular) were determined with atomic absorption spectroscopy during the course of *C. vulgaris* growth. The proportions of adsorbed (extracellular) and absorbed (intracellular)  $Mg^{2+}$  ions were quantified. The concentration of the most important pigment in algal cells, chlorophyll *a*, increased over time in proportion to the increase in the biomass concentration, indicating a constant chlorophyll/biomass ratio during the linear growth phase. The mean-average rate of  $Mg^{2+}$  ion uptake by *C. vulgaris* grown in a culture medium starting with  $16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $Mg^{2+}$  ions concentration was measured. A clear relationship between the biomass concentration and the proportion of the  $Mg^{2+}$  removal from the medium was observed. Of the total  $Mg^{2+}$  ions present in the culture medium, 18% was adsorbed on the cell wall and 51% was absorbed by the biomass by the end of the experiment (765 h). Overall, 69% of the initial  $Mg^{2+}$  ions were found to be removed from the medium. This study supported the kinetic model based on a reversible first-order reaction for  $Mg^{2+}$  bioaccumulation in *C. vulgaris*, which was consistent with the experimental data.

Key words: *Chlorella vulgaris*, metal ions uptake, adsorbed  $Mg^{2+}$  (extracellular), absorbed  $Mg^{2+}$  (intracellular), photo-bioreactor

## Introduction

Different culture systems can be used to grow microalgae. These photo-bioreactors can be open or closed. The open systems (Lee 2001) tend to be less costly, but the closed systems allow better control of the culture conditions (Lee 1986). For the present study the Bplus BioStat stirred cylindrical photo-bioreactor, with additional LED light fitted to its exterior, was used.

Microalgae have received much attention in recent years because of their potential for metal removal (Monteiro et al, 2012). The biosorption of metal ions depends on the specific surface properties of the biomass, its concentration and the physicochemical parameters of the solution (temperature, pH, initial metal-ion concentration) (Wilde and Benemann 1993; Sag and Kutsal 1995; Li et al, 2004).

The metal ion removal by microorganisms has been suggested to consist in two stages. The first stage seems to be a rapid physical and/or chemical adsorption to the extracellular cell wall in contact with the metal ions in solution. The second stage consists in an absorption into the cell that is related to metabolic activity. Each step has its own kinetics. As a result the metal ions could exist in three forms in the system, namely free in solution, adsorbed extracellularly and absorbed intracellularly (Folgar et al, 2009; Nourbakhsh et al, 1994).

Magnesium, unlike toxic heavy metals, is essential for the growth and development of microalgae; it occupies a central position in the chlorophyll molecule and influences the activity of the photosynthetic enzymes. In addition, magnesium acts with other chlorophyll compounds as antennae to capture the electrons (light energy) necessary for photosynthesis reactions (Carvalho et al, 2011). This metal ion also influences other enzymes responsible for different cell activities (Sarma et al, 2014). Besides the chlorophyll content of the microalgae depends on the growth conditions such as temperature (Sehna et al, 2014), light intensity (Leonardos and Harris, 2006) and CO<sub>2</sub> (Clément-Larosière et al, 2014). So magnesium has a crucial interest for the cells and its behavior is then interesting to investigate. Furthermore, a biomass enriched in magnesium could have potential cosmetic applications.

Consequently, this work was intended to study the bioaccumulation of magnesium in *Chlorella vulgaris* in order to understand the different processes in action and produce an enriched biomass for cosmetic tests. The removal of Mg<sup>2+</sup> from the culture medium by *C.*

*vulgaris* was investigated in a batch photo-bioreactor. The adsorbed and absorbed  $Mg^{2+}$  concentrations by biomass were measured during the culture process. In addition, the model of bioaccumulation of this metal previously published (Ben Amor-Ben Ayed et al, 2015) was confirmed by these new experimental data.

## Materials and methods

### 1. Strain and growth conditions

The strain *Chlorella vulgaris* CCAP211/e 11B (trebouxiophyceae) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP (UK). The medium used was the Modified 3N-Bristol Medium (MBM) (Larosière et al, 2014; Vernon and Seely 1966). The basic  $Mg^{2+}$  concentration of this medium is about  $7.4 \text{ mg L}^{-1}$  but its concentration was always measured precisely prior to experiments.

The strain was maintained in liquid culture (50 mL in 250 mL flask), at  $25^{\circ}\text{C}$ , in a lit incubator under continuous orbital agitation (50 cm rotation diameter; 100 rpm, light intensity at the surface of the culture  $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and air enriched with 0.7-2.1% v/v of  $\text{CO}_2$ ). The pre-culture for each experiment was prepared by inoculation in a fresh medium at 1% (v culture/v medium) and incubation under the above conditions for 48-72 h. The flasks of pre-cultures were stoppered with foam bungs (Fisher scientific, 11901935 - X100) to allow sterile gaseous exchanges between the culture and the atmosphere.

### 2. Stirred photo-bioreactor batch culture conditions

A baffled “Biostat B plus” bioreactor (Sartorius, Germany; 5L working volume) was used; it was equipped with 3-bladed segment impellers (UniVessel 5L), each inclined at  $45^{\circ}$  from the horizontal axis. The planar diameter of the impellers was 65 mm. The lower impeller was at the bottom of the rotating axis, just above the sparger ring. A rotation of 750 rpm was used in order to obtain a homogeneous culture. The temperature was controlled at  $25^{\circ}\text{C}$  with the aid of an external water jacket. Continuous aeration with sterile air (0.2  $\mu\text{m}$  Sartorius gas filter) at  $500 \text{ mL.min}^{-1}$  (1 atm.  $25^{\circ}\text{C}$ ) was used. This meant that the culture was fed with the atmospheric concentration of  $\text{CO}_2$  (0.035 % v/v), approximately equivalent to  $8.6 \times 10^{-5} \text{ g C per minute}$ . The airflow rates into and out of the bioreactor were measured daily. The culture was continuously illuminated from the outside by 6 LED lamps (IKEA Ledare 130 lumen, 2700 Kelvin,  $27^{\circ}$  dispersion angle). The total light intensity at the inner surface of the bioreactor was measured at  $2900 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . This measurement was



performed when the bioreactor was empty, but the water jacket full of water, resulting in an absorption of 35% of the incident light, the color of light being unchanged. All light intensities were measured with a photometer (LI250A, LI-COR, USA).

The culture pH was not controlled with addition of chemicals but the pH reading from the internal probe (Hamilton, EF-Set 12/325/2 K8-HM-UniVessel 5/10l) was recorded and verified daily against a freshly calibrated bench-top pH meter (Fischer Bioblock scientific, Consort C 864). Both pH meters were calibrated in the range 4.01-7.00 at the beginning of the experiment and the bench-pH meter was calibrated in the range of 7.00-9.21 towards the end of the experiment. A polarographic oxygen probe (Hamilton, 12/325/2-L-HM-Univessel 5-10L) was used to monitor the dissolved oxygen concentration in the culture. This was set to indicate 100% just before inoculation of the continuously stirred and aerated medium, with 100% indicating equilibrium with air; the scale 0 to 100% referred to the degree of equilibrium reached, and was directly related to the concentration of oxygen dissolved in the liquid. The inoculation of the bioreactor with *C. vulgaris* was carried out with 1% of pre-culture prepared as described above, which corresponded to  $1.6 \times 10^5$  cell mL<sup>-1</sup>.

### 3. Analytical methods

#### 3.1. Growth parameters

The cell concentrations were determined by microscopy (Carl Zeiss Axioplan Imaging 2, Germany) using a Thomas counting chamber of 0.1 mm depth and expressed in cell mL<sup>-1</sup>. The culture was diluted with deionised water to give a final cell concentration of 200-300 cells over the entire volume of the counting chamber consisting of 256 cubes of 0.1 mm<sup>3</sup>. The cells present in all the 256 “cubes” were counted and the cell concentration was calculated using the dilution factor.

Absorbance measurements were also used in order to follow growth. The absorbance (A800) of the algal cultures was measured (Spectrophotometer Cary 300 Scan UV-visible, Varian Inc., Netherlands) at 800 nm after dilution; this quantity is known to be proportional to the cell concentration.

The dry weight concentration of the biomass DW (g L<sup>-1</sup>) was determined by subjecting 10 mL of culture to centrifugation (10 minutes, 1800 g). The pellet was washed through re-suspension in an equal volume of deionized water, subjected to centrifugation again (10

minutes, 1800 g) and the final pellet transferred into a dry pre-weight cup. The pellet was dried for 24 h at 105°C and cooled in a desiccator containing dry silica gel prior to weighing.

The cell viability was obtained using a GUAVA easyCyte™ flow cytometer (Merck Millipore) with the ViaCount (14-0155) method and the cell size was measured using a Mastersizer laser granulometer (Malvern, France).

Daily samples were generally removed from the bioreactor, except during the exponential growth (0-70 h) in which two samples were analyzed daily. The specific growth rate ( $\mu$ ) was determined using the absorbance data. A semi-log relationship was used to determine the  $\mu$  value during the exponential phase (0 to 70 h; 6 points and  $R^2$  of above 0.948).

### 3.2. Measurement of the chlorophyll concentration

In order to determine the chlorophyll *a* concentration, a modified extraction method of Porra (1990) was used. Three samples (in triplicate) per day were removed from the bioreactor and subjected to centrifugation (5 minutes; 6400 g). An aqueous solution of 85% methanol containing 1.5 mmol L<sup>-1</sup> of sodium dithionite was added to the pellet. The samples were extracted at 40°C for 32 minutes and then re-centrifuged (5 minutes; 6400 g). The absorbance of the supernatant was measured at 664 and 650 nm (Spectrophotometer Cary 300 Scan UV-visible, Varian Inc., Netherlands). The chlorophyll *a* content was calculated according to the Porra's formula (1990).

### 3.3. Estimation of the nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration

Samples were first filtered through C18 and 0.2  $\mu$ m filters prior to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> analyses in order to retain all proteins and macromolecules that can interfere with the analysis.

The NO<sub>3</sub><sup>-</sup> analyses were carried out with ionic chromatography using a Dionex AS11-HC column. The run conditions are as follows: system Dionex DX-500, conductimetric detector CD20, column (CR-ATC, P/N 060477) (4 mm) with a guard column AG11-HC. The eluent was KOH (30 mmol L<sup>-1</sup> at 1.5 mL min<sup>-1</sup>). This eluent concentration was lower than the one recommended by the column manufacturer, leading to slightly higher retention times than those that would have expected. The total pressure applied was of approx. 2,300 psi at 30°C. Each injection was made with a sampling loop of 20  $\mu$ L. Chromatograms were recorded with the Peaknet software (Dionex) on a Pentium PC. The system was installed in a Class 10,000 clean room and all samples were handled under a Class 100 laminar flow hood.

### 3. 4. Measurement of the magnesium concentrations

In order to measure the  $Mg^{2+}$  concentration, an atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Hitachi Z-2300, Japan) was used: air-acetylene flame; measurement of the absorbance was performed at 202.6 nm with the appropriate magnesium lamp (Agilent technologies, France). The standard deviations for the calibration scale (0.15 to 20.0 mg L<sup>-1</sup>) were in the range 1 to 2%.

The full set of glassware was soaked for at least 24 h in HNO<sub>3</sub> (10% w/v Merck Suprapur, France) and thoroughly rinsed with ultrapure water (Milli-Q, Millipore, France) before use, and all samples were diluted with acidified (less than pH 3 adjusted with hydrochloridric acid) Milli-Q water to prevent metal precipitation. Each acidified calibration solution was prepared from a 1000 mg L<sup>-1</sup> magnesium stock solution (Fischer scientific) and measured 5 times in order to acquire the precision and the accuracy of the analysis.

### 3.5. Determination of intracellular and extracellular magnesium concentrations

The concentrations of extra- and intracellular magnesium were estimated using adapted published methods (Franklin et al, 2000; Ma et al, 2003), with minor modifications as published in our previous work (Ben Amor- Ben Ayed et al, 2015).

$Mg^{2+}$  uptake by algae between times 0 and t, Q (mg), was calculated as follows:

$$Q = (C_0 - C) V \quad \text{Eq. (A.1)}$$

and compared with the initial magnesium mass in the liquid:  $m_0$  (mg) =  $V C_0$ . The removal efficiency is then expressed by  $Q / m_0$ .

In the previous equations  $C_0$  and  $C$  are the magnesium concentrations in the algal culture at times 0 and t, expressed in mg L<sup>-1</sup> and  $V$  is the total volume of culture in L (supposed to be constant along the experiment).

### 3.6. Model for magnesium uptake

The model for  $Mg^{2+}$  uptake by algae in a photobioreactor culture supposed a reversible reaction of first order with respect to the magnesium concentration in the liquid. This model has been already published with all details (Ben Amor-Ben Ayed et al, 2015). As a result, the model is given by the following equation:

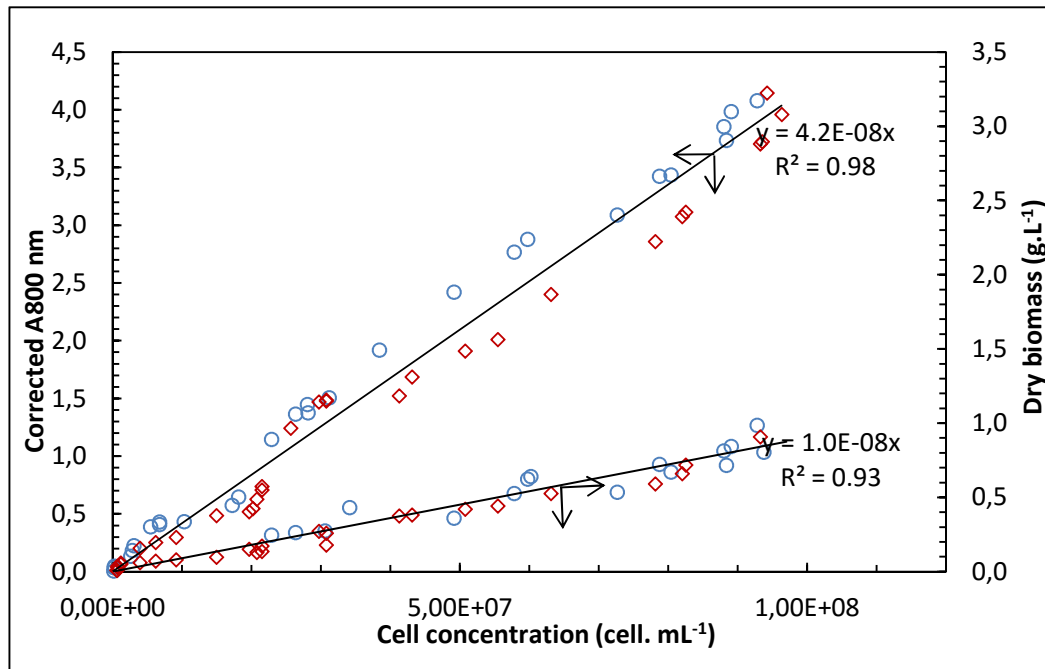
$$\frac{C(t)-C_{eq}}{C_0-C_{eq}} = \exp^{-k_g a t} \quad \text{Eq. (A.2)}$$

Where  $C_{eq}$  is the  $Mg^{2+}$  ion concentration at equilibrium and  $k_g$  a the kinetic constant.

## Results and discussion

### 1. Algal growth and nutrient consumption in a stirred photo-bioreactor

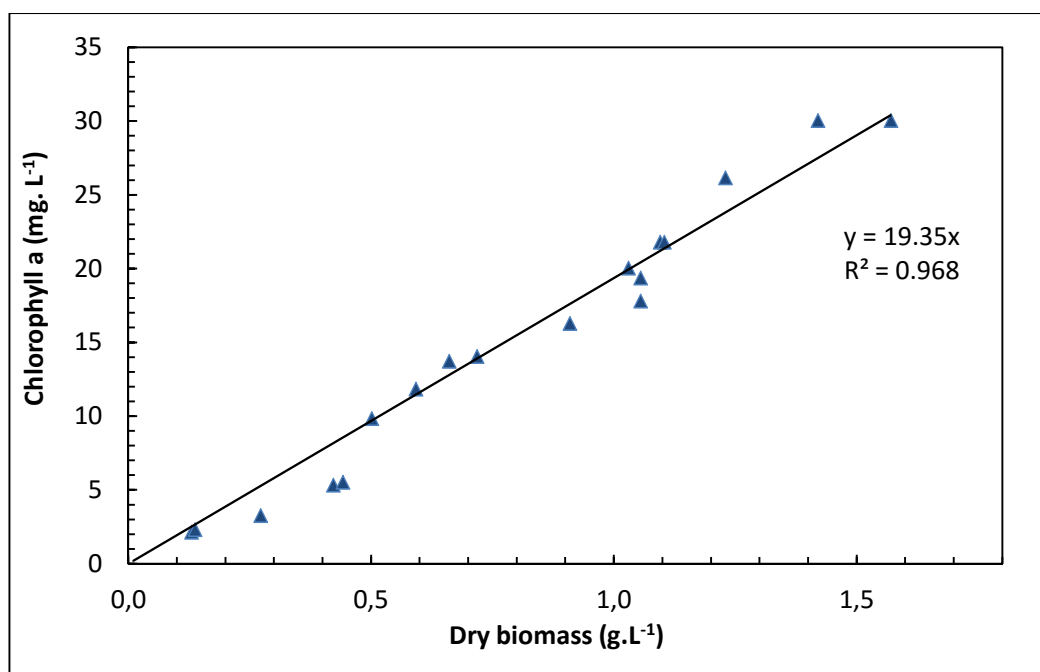
Two independent experiments were performed in the photobioreactor, each lasting 32 days (765 h). The initial  $Mg^{2+}$  concentration was measured at  $16 \text{ mg.L}^{-1}$  in the inoculated Bristol medium. The cell concentrations ( $\text{g.L}^{-1}$ ) and ( $\text{cells. mL}^{-1}$ ) as well as the absorbance ( $A_{800}$ ) of the culture at 800 nm were measured for each sample (Figure 1).



**Figure 1** Relationship between different biomass measurements; cell number concentration (cells/ml), corrected absorbance, and dry-weight biomass concentration (g DW/l). The corrected absorbance ( $A_{800}$ ) was calculated by taking into account the dilution factor

Figure 1 shows a proportionality with a good accuracy between growth parameters, absorbance, cell concentration, and dry biomass weight concentration, as previously reported by Rocha et al. 2003. We found the following correlations:  $A_{800} = 4.2 \times 10^{-8} N$  and  $DW (\text{g.L}^{-1}) = 1.1 \times 10^{-8} N$  with  $N$  cell concentration in cells per ml. The average dry weight of one cell was then calculated and found to remain constant at  $1.1 \times 10^{-11} \text{g}$  throughout the experiments, which corresponds to published values for this organism (Ting et al. 1991).

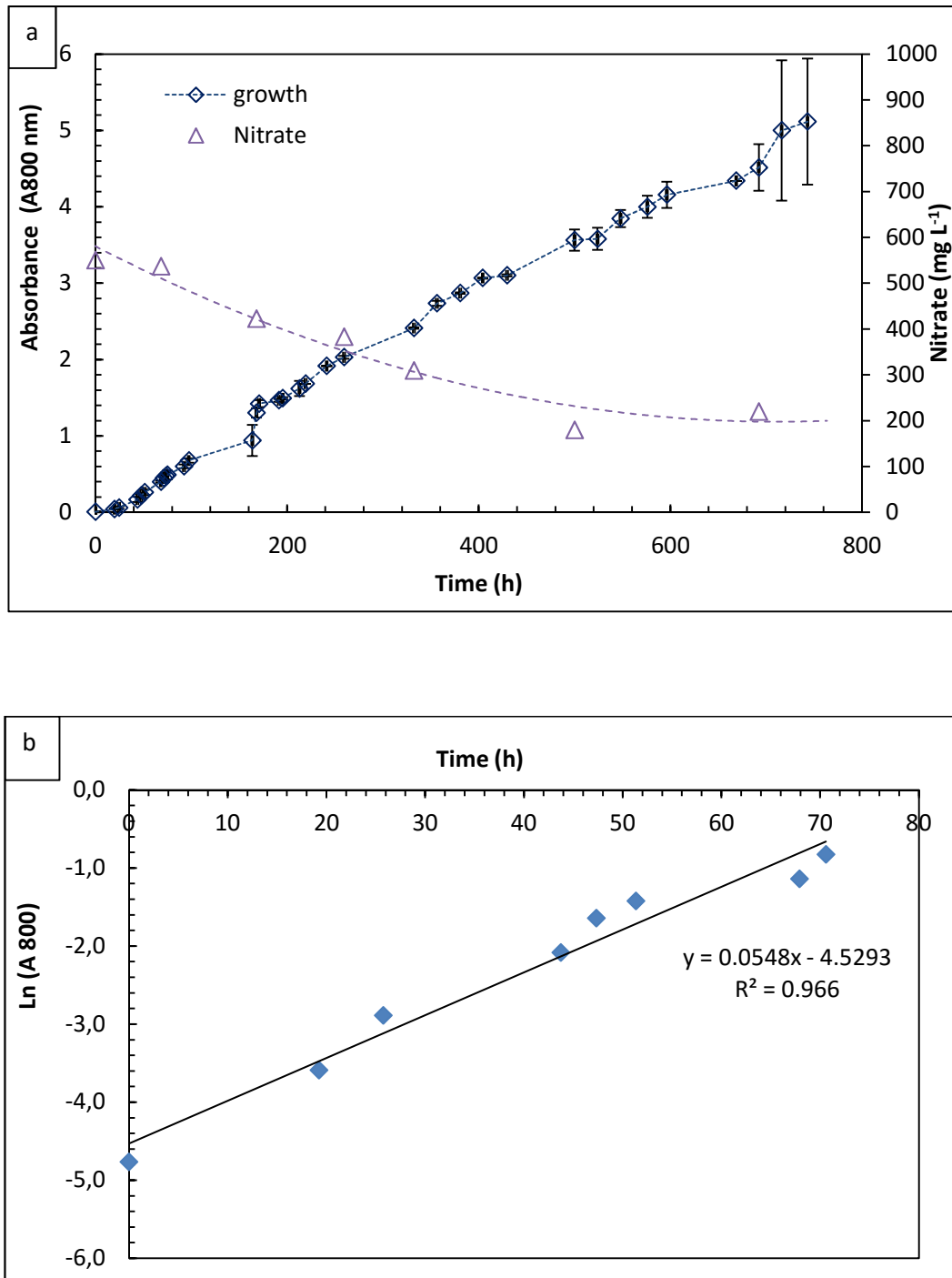
Chlorophyll *a* is the major photosynthetic pigment in *C. vulgaris* cells (Carvalho et al. 2011), and its concentration in the culture increased in step with the increase in the biomass, indicating a constant chlorophyll/cell ratio throughout the experiment (Figure 2). The constant ratio of (chlorophyll *a*)/(g DW) suggests the possibility that in autotrophic cultures, the chlorophyll concentration could be used as an indication of the photosynthetic biomass (Peeken 1997). Further studies are required to confirm these results.



**Figure 2 Relationship between chlorophyll content and dry biomass during the culture. The chlorophyll *a* was extracted in triplicate samples during the experiment (765 h); the results presented here are the average of the three values.**

The microalgal culture grew exponentially for the first 70 h. This phase was then followed by an apparently linear growth phase that lasted until the end of the experiment (765 h). During the entire experiment, the viability remained at 96%, and the average cell size was constant at 4.4  $\mu\text{m}$  diameter. The concentration of nitrate, the sole nitrogen source, decreased with the increasing biomass, but this nutrient was never completely exhausted (Figure 3a).

*C. vulgaris* consumed nitrate ions available in the medium during the autotrophic growth phase; however, it was not completely consumed even by the end of the experiment.



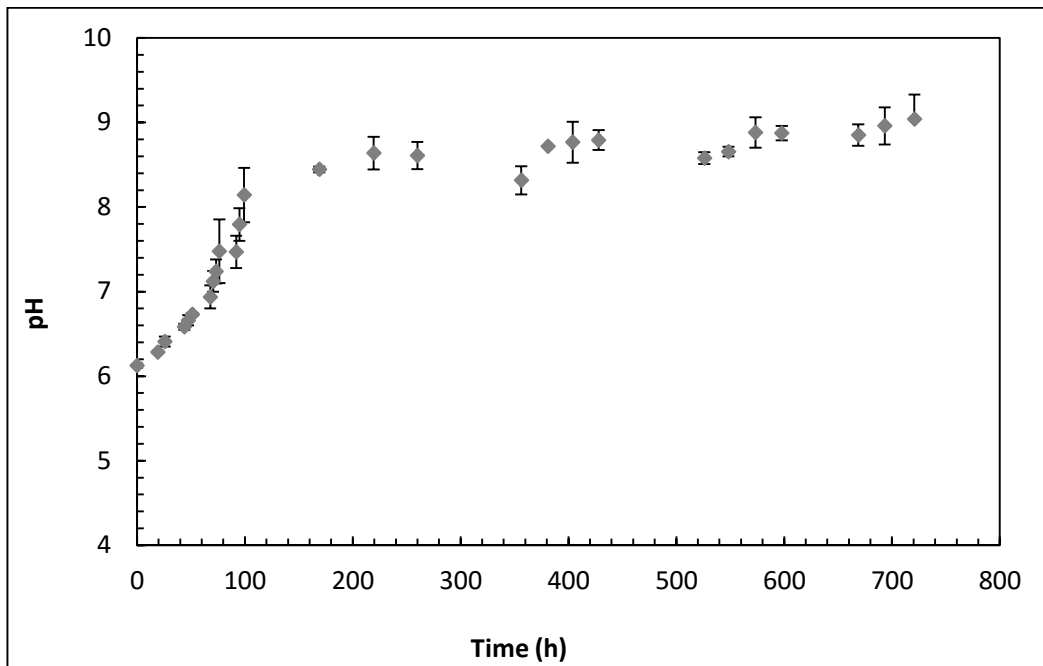
**Figure 3 a) Growth curve of *C. vulgaris* grown in a stirred photo-bioreactor and consumption of nitrate during culture. Absorbance measured at 800 nm of wavelength. The nitrate concentration in the medium measured during the experiment with ionic chromatography b) exponential growth phase**

The maximum specific growth rate ( $\mu$ ) was determined from the absorbance data during the exponential growth phase, at  $0.055 \text{ h}^{-1}$  (Figure 3 b), according to a published method proposed by Wood et al. (2005). This value of  $\mu$  is relatively higher than that ( $0.041 \text{ h}^{-1}$ ) found by Clément-Larosière et al. 2014 for *C. vulgaris* grown in a batch bubble-column photo-bioreactor, but was close to that reported by Perner Nochta et al. 2007 at  $0.058 \text{ h}^{-1}$  for

the same strain in a batch tubular bioreactor equipped with helical static mixers and plates. The cell concentration reached  $2 \times 10^7$  cell.mL<sup>-1</sup> by the end of the exponential growth phase and  $1 \times 10^8$  cell.mL<sup>-1</sup> by the end of the experiment (765 h). No stationary phase was observed in either experiment.

The linear growth phase described in this study was considerably longer than previously reported (Clément-Larosière et al. 2014, Mirón et al. 2002, Myers 1976) and could be related to the specific growth conditions used here, the bioreactor geometry, and the mode and intensity of illumination. Under the conditions used in this study, light limitation is strongly suspected.

The pH change was followed during *C. vulgaris* growth (Figure 4). The pH increased initially from 6 to 8 during the exponential growth phase. After exponential growth (70 h) and during the linear growth phase, the pH remained constant at 8.5 and increased slightly towards a value of 9. The initial increase in pH has been reported (Chisti, 2008) to be linked to a decrease in the CO<sub>2</sub> concentration in the medium, although it could also be linked to changes in the ionic concentration of other medium components. With a decrease in the photosynthetic activity during the linear growth phase, a balance between CO<sub>2</sub> dissolution and utilization must have been achieved that could suggest an explanation for the stability of the pH during this growth phase.



**Figure 4** Kinetic profile of pH during *C. vulgaris* culture. Each pH value represents the mean of the pH measurement performed in both experiments

In one experiment, the dissolved oxygen concentration was followed with a dissolved-oxygen (dO<sub>2</sub>) electrode. The dO<sub>2</sub> concentration was constant at 100% until 90 h (corresponding approximately to the exponential phase) and then decreased to 60% by the end of the experiment. This indicates a consumption of O<sub>2</sub> from 90 h onwards, probably due to respiration occurring as photosynthesis decreased. This observation could suggest light limitation of the cultures.

This hypothesis of light limitation was tested by the addition of 50% more LED light. A slight increase in dO<sub>2</sub> was observed (data not shown), supporting the hypothesis that growth was limited by light. The extra source of light was removed after 10 min, upon which the dO<sub>2</sub> trace returned to its original position. This observation strengthens the case in favour of light limitation from 90 h onwards under the conditions used in this experiment; however, other supporting data would be necessary to prove this definitively.

With respect to carbon, it is more difficult to state whether it was limiting growth or not. Gaseous CO<sub>2</sub> was continuously supplied into the reactor at a rate of  $8.6 \times 10^{-5}$  g C. min<sup>-1</sup>, giving a total calculated input of 3.93 g C during the experiment (765 h). Assuming that the biomass contains 50% C by weight, it is possible to calculate the mass of carbon absorbed by the cells over the experiment; with the final DW concentration being 1 g/l and the volume 5 L, the corresponding carbon mass was then 2.5 g. The necessary amount of carbon for *C. vulgaris* growth was accordingly  $5.45 \times 10^{-5}$  g of C. min<sup>-1</sup>. The carbon supply into the bioreactor was higher than necessary. At first glance, it could seem improbable that the culture was limited in carbon, but the limitation strongly depends on the transfer rate of CO<sub>2</sub> from gas to liquid, which is difficult to measure in the absence of a dissolved CO<sub>2</sub> probe. It is not possible to conclude whether the culture was carbon-limited or not. Further experiments would be necessary, for example with air enriched with different concentrations of CO<sub>2</sub>. All indications are that the culture was probably light (energy) limited. After light limitation was reached, the constant supply of the limiting 'nutrient', energy in this case, would have resulted in a linear growth phase, as it would be under carbon limitation with a carbon supply at a constant rate.

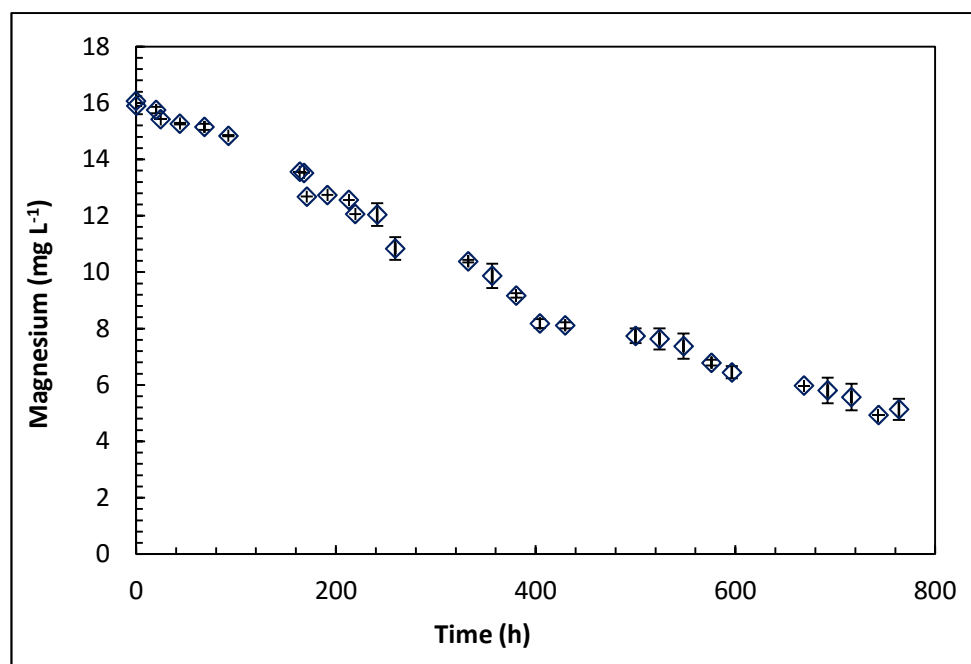
A high degree of reproducibility was observed between the results of the duplicate experiments for their entire duration (765 h).



## 2. Magnesium concentrations

### 2.1. Dissolved $Mg^{2+}$ ion concentration

The concentration of  $Mg^{2+}$  decreased during the course of the experiment but was never completely exhausted (Fig. 5). The final dissolved  $Mg^{2+}$  concentration in the medium was approximately  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  at the end of the experiment.



**Figure 5** Kinetic profile of dissolved  $Mg^{2+}$  ions in the growth medium.

**Dissolved  $Mg^{2+}$  ion concentration in the medium measured daily during the experiment with AAS and plotted versus time of culture.**

### 2.2. Extracellular (adsorbed) and intracellular (absorbed) $Mg^{2+}$ ion concentrations

The dissolved (residual in the culture medium, i.e. not removed by algae) and biomass-associated  $Mg^{2+}$  ion concentrations (adsorbed and absorbed) were determined early (330 h), in the middle (550 h), and at the end (765 h) of the experiment. Each sample was treated in triplicate for  $Mg^{2+}$  ion analysis, and then each measurement was performed in triplicate. The amount of  $Mg^{2+}$  ions removed through daily sampling was taken into consideration when calculating the magnesium mass balance.

As the cells grew, the dissolved  $Mg^{2+}$  ion concentration decreased and the biomass-associated  $Mg^{2+}$  ion increased. The absorbed and adsorbed ion amounts increased with time and cell concentration (Figure 6), the absorbed (intracellular)  $Mg^{2+}$  ion amount always being

greater than the adsorbed (extracellular) one.  $Mg^{2+}$  mass balances accounted for  $90 \pm 2.0\%$  of the initial mass in the culture, the shortage being related to analytical imprecisions.

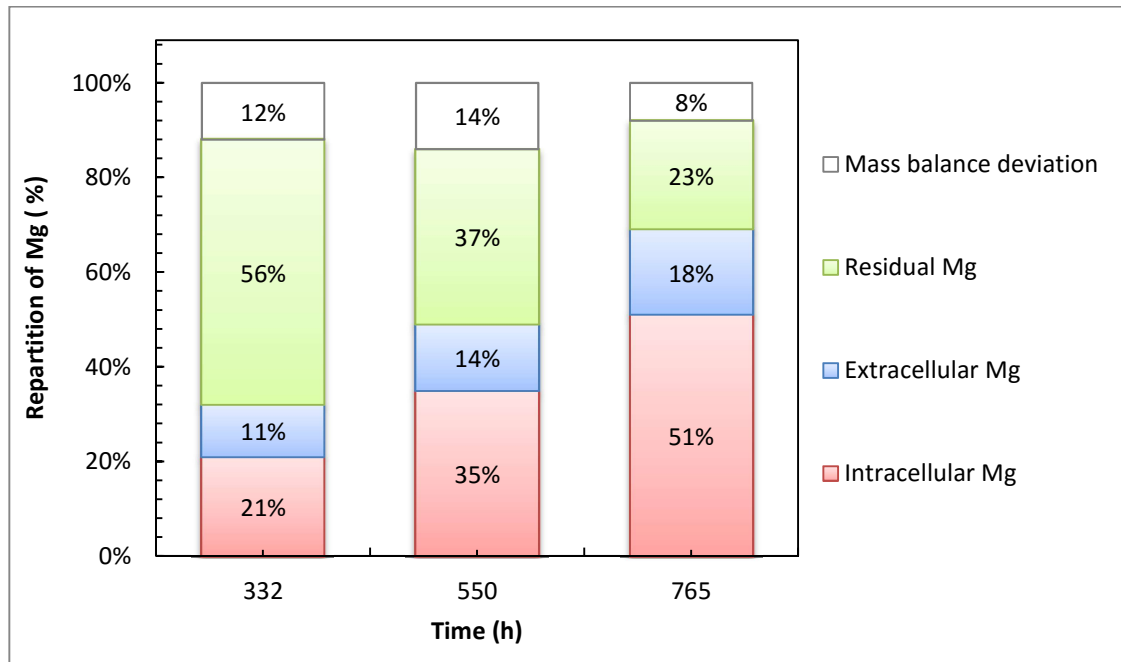


Figure 6 Distribution of  $Mg^{2+}$  ions in the culture of *C. vulgaris* during growth.

‘Dissolved  $Mg^{2+}$ ’ indicates the residual quantity of these ions in the growth medium during the course of the *C. vulgaris* growth. The partition of  $Mg^{2+}$  within the biomass was determined at three time points during growth. Each stack represents the mean of the analysis performed in triplicate samples (mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ). The mass balance deviation refers to the amount of  $Mg^{2+}$  that could not be accounted for, between the amount of  $Mg^{2+}$  added at the start of the experiment and that found in sampling. The difference in the results between Experiments 1 and 2 was 4%.

At the end of the experiment, 69% of  $Mg^{2+}$  was associated with the microalgal biomass. Of this, 18% was adsorbed and 51% was absorbed.  $Mg^{2+}$  ion removal from the growth medium was directly related to cell growth.  $Mg^{2+}$  bound to the cell surface increased over time as  $Mg^{2+}$  was absorbed into *Chlorella* cells. Adsorption was always less significant than absorption, probably due to differing kinetics. This result is in good agreement with our previous study (Ben Amor-Ben Ayed et al. 2015).

The method first published by Franklin et al. 2000 was found to be convenient for the measurement of  $Mg^{2+}$  uptake in *C. vulgaris* and for following its profile. When the starting concentration of this ion was  $16 \text{ mg.L}^{-1}$ , *C. vulgaris* was able to remove the majority of  $Mg^{2+}$  ions from the growth medium by 765 h. A relatively high efficiency (69%) was

obtained, but this was measured over a long period, representing a removal rate of  $0.034 \text{ mg Mg}^{2+} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Model for  $\text{Mg}^{2+}$  ion uptake by *C. vulgaris*

The experiments conducted at the initial  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of  $16.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  confirmed the validity of the exponential model (Figure 7).

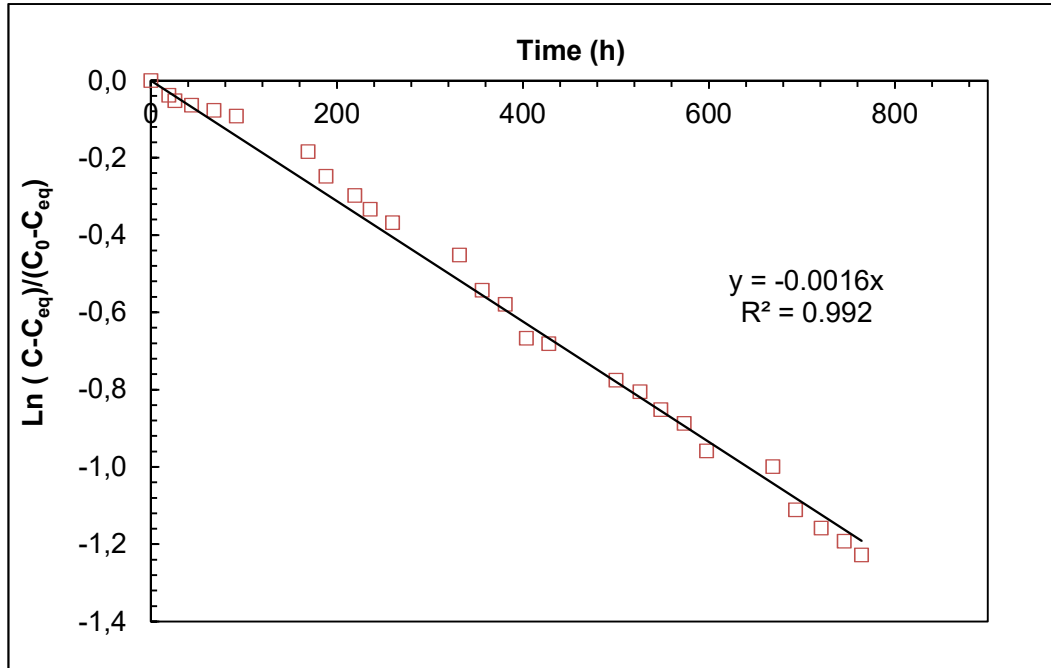


Figure 7 Modelling  $\text{Mg}^{2+}$  ion uptake by *C. vulgaris*. Semi-logarithmic plot of the magnesium removal

ratio  $\frac{C(t) - C_{eq}}{C_0 - C_{eq}}$  versus time. At initial Mg concentration  $C_0$  of  $16.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $C_{eq}$  is close to zero. The

difference in the results between Experiments 1 and 2 was 1%.

The modelling results are in good agreement with our previously published work (Ben Amor-Ben Ayed et al. 2015) and with another published work (Gin et al. 2002) that presented an exponential model for the sorption (adsorption and absorption) of cadmium and copper by *Chlorococcum olefaciens* at initial concentrations of  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of each metal and *Oocystis pusilla* at initial concentrations of 2.0, 5.0, 8.0, and  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of cadmium.

The work presented here reinforces the application of this model for metal ion sorption in microalgae cultures, and this modelling work will be further extended in future studies.

In the present study, we confirmed the possibility of magnesium bioaccumulation by *C. vulgaris* in a batch photo-bioreactor and determined the repartition of the metal ions between the cell wall and the cell interior; however, the rate of accumulation must still be improved

before possible industrial applications. For this purpose, further experiments are needed in order to identify the optimal set of conditions for a quicker accumulation. The global model previously developed (Ben Amor-Ben Ayed et al. 2015).

that describes  $Mg^{2+}$  transfer from the liquid medium to the cells was confirmed with these data. In future experiments, we will apply similar modelling to different growth conditions and develop a phenomenological model describing all of the steps of the global process (external transfer, adsorption, internal transfer, etc.).

## 2.2 Conclusion

La culture de *C. vulgaris* en autotrophie dans le bioréacteur en batch montre une longue croissance linéaire du à la limitation d'un élément essentiel à la croissance.

Après une longue période de culture (765 h) dans le bioréacteur, les cellules de *C. vulgaris* ont accumulé 69 % de la concentration en magnésium initialement présente dans le milieu de culture. Ce taux est relativement élevé et intéressant pour une application industrielle. Ceci étant l'amélioration des conditions de culture de la microalgue peut être intéressante pour optimiser l'absorption du  $Mg^{2+}$  par les cellules. La partie suivante montrera les résultats de culture de *C. vulgaris* en conditions de mixotrophie et la répartition du magnésium dans la culture.

### 3 Cultures mixotrophes en batch de *C. vulgaris* dans le photobioréacteur à une concentration donnée en magnésium

Une des étapes pour que le procédé étudié à l'échelle du laboratoire puisse être conçu à une échelle industrielle est de trouver les meilleures conditions de culture permettant d'avoir une bioaccumulation optimale de magnésium dans une durée de temps plus courte et plus économique.

Cette étape permet dans un premier temps d'étudier le comportement de croissance de *C. vulgaris* en présence simultanée de la lumière et du glucose dans son milieu de culture. Cependant, les cultures autotrophes précédemment décrites ont tendance à donner lieu à une faible densité cellulaire en raison de l'auto-ombrage qui se produit après la croissance exponentielle en arrivant à une certaine concentration cellulaire  $2 \cdot 10^7$  cell mL<sup>-1</sup>. Cet artefact empêche la lumière disponible d'être suffisante pour toutes les cellules phytoplanctoniques. Cela conduit à une longue phase linéaire décrite dans le chapitre précédent. Ceci à l'échelle pratique n'est pas très satisfaisant compte tenu du coût élevé de longue période de culture et le temps mis pour avoir accumulé plus de Mg<sup>2+</sup> dans la biomasse.

Généralement dans les cultures des microalgues en mixotrophie, le carbone organique présent dans le milieu de culture, est utilisé par la biomasse et la production d'énergie par l'intermédiaire d'un métabolisme hétérotrophe, qui se traduit par l'évolution du CO<sub>2</sub> et peut stimuler l'assimilation autotrophique du carbone (Li et al, 2014). En se basant sur cette hypothèse, un approvisionnement externe en CO<sub>2</sub> peut être moins nécessaire à une croissance mixotrophe, réduisant ainsi les coûts de production (Li et al, 2014).

En outre, cette partie s'applique à étudier l'adsorption et l'absorption du magnésium en mixotrophie vis-à-vis la présence de 10% de glucose dans le milieu de culture.

La concentration en magnésium utilisée dans cette étude est de 17 mg L<sup>-1</sup> qui est similaire à 16 mg L<sup>-1</sup> utilisée en autotrophie dans les expériences précédentes dans le but de comparer le comportement des microalgues vis-à-vis au glucose ajouté dans le milieu de culture par rapport à la bioaccumulation du métal.

Dans un troisième temps, cette étude s'attache à tester le modèle ainsi défini dans les chapitres précédents dans les conditions de culture de *C. vulgaris* en mixotrophie.

Par ailleurs, les conditions de culture en mixotrophie impliquent des processus complexes ; intensité de la lumière, température, substrats organique et inorganique qui sont des facteurs essentiels de la croissance et qui ont un impact sur l'accumulation de  $Mg^{2+}$ .

### *3.1 Croissance et bioaccumulation de $Mg^{2+}$ par *C. vulgaris* en conditions de culture en mixotrophie (Article scientifique)*

(Partie soumise sous forme d'article scientifique dans le journal « Journal of Phycology »)

## Mixotrophic growth and magnesium bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*

Hela Ben Amor-Ben Ayed<sup>1</sup>, Behnam Taidi<sup>1</sup>, Habib Ayadi<sup>2</sup>, Dominique Pareau<sup>1</sup>  
and Moncef Stambouli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CentraleSupélec, Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry

<sup>2</sup>Faculty of Sciences of Sfax, Biodiversity and Aquatic Ecosystems Lab, Ecology and  
Department of Planktonology, University of Sfax, Tunisia

### Abstract

This study investigated the  $Mg^{2+}$  ion uptake by *Chlorella vulgaris* grown in stirred photo-bioreactor under mixotrophic growth conditions (light, 10 g.L<sup>-1</sup> of glucose and atmospheric CO<sub>2</sub>). The glucose and nitrate consumption by the algal culture was measured during the experiments. *Chlorella vulgaris* grew autotrophically, without glucose consumption, until the end of the exponential growth phase and the exhaustion of nitrate (sole nitrogen source). During the transition to the stationary growth phase, glucose was rapidly exhausted.

The cellular chlorophyll *a* concentration decreased during exponential growth, indicating a decrease of photosynthetic activity, then remained constant at low level during heterotrophic growth.

The mean rate of  $Mg^{2+}$  ion uptake by *Chlorella vulgaris* growing in a culture medium with 17.7 mg.L<sup>-1</sup> of  $Mg^{2+}$  was measured. The proportions of dissolved, extracellular and intracellular magnesium ions were estimated using published methods.

A clear relationship between the biomass concentration and  $Mg^{2+}$  ion removal from the medium was observed.  $Mg^{2+}$  ion uptake continued until the stationary growth phase.

The removal rate was lower during heterotrophic growth (3.44 mg  $Mg^{2+}$ . g<sup>-1</sup> of dry biomass) than autotrophic growth (6.0 mg  $Mg^{2+}$ . g<sup>-1</sup> of dry biomass).

At the end of the experiment (330 h), 90 % of the initial magnesium amount in the medium was associated with the microalgal biomass, of which 4% was adsorbed and 86% absorbed by cells. A kinetic model based on a reversible first order reaction for magnesium bioaccumulation in *Chlorella vulgaris* was developed which fitted well with experimental data.



Keywords: *Chlorella vulgaris*, glucose, magnesium, absorption (intracellular), adsorption (extracellular).

### Abbreviations and definitions

*C. vulgaris*: *Chlorella vulgaris*

Mg<sup>2+</sup>: Magnesium ion

AAS: Atomic Absorption Spectrophotometry

EDTA: Di-sodium ethylenediaminetetraacetic acid

MBM: Modified 3N-Bristol Medium

HNO<sub>3</sub>: Nitric acid

HCl: Hydrochloric acid

A<sub>800</sub>: Absorbance measured at 800 nm

μ: Specific growth rate (h<sup>-1</sup>)

DW: Dry weight (g solid residue/L of culture)

C: Magnesium ion concentration in the culture medium (mg L<sup>-1</sup>)

C<sub>0</sub>: Initial magnesium ion concentration in the culture medium (mg L<sup>-1</sup>)

C<sub>eq</sub>: Equilibrium magnesium ions concentration in the culture medium (mg L<sup>-1</sup>)

t: time (h)

k: Magnesium ions uptake kinetic constant

### Introduction

The normally-autotrophic green microalgae *C. vulgaris* can grow heterotrophically if presented with a preferred organic carbon source (Shi et al, 2000, Lee 2004, Chen 2006, Qiao et al, 2009) or mixotrophically that is by simultaneous autotrophic and heterotrophic metabolisms (Ogbonna et al, 1997, Lee 2004).

The ability of this organism to use different organic compounds for growth under both dark and light conditions is not particularly surprising since the capacity for heterotrophic,

photoheterotrophic and/or mixotrophic growth exists in many species of green algae (Droop, 1974). Moreover, *C. vulgaris* can use various organic carbon sources such as glucose that was used for this study. Glucose and other organic substrates can stimulate the growth of this alga even under adequate lighting (Isabel Orús et al, 1991; Ogawa & Aiwa, 1981; Ogbonna et al, 2002).

Many researchers have studied microalgae as a possible solution to environmental problems (Craggs et al, 1997; Monteiro et al, 2012) due to their ability to take up various species of nitrogen (Hong and lee, 1993; Kim et al, 2000), to absorb CO<sub>2</sub> (Clement-Larosière et al, 2014) and to assimilate heavy metals (Monteiro et al, 2012; Kim and Smith, 2001).

We have previously reported that *Chlorella vulgaris* could accumulate a relatively large amount of magnesium ion (Ben Amor-Ben Ayed et al. 2015). This metal is very important for photosynthesis as it occupies part of the chlorophyll molecule and influences the activity of the photosynthetic enzymes (Sarma et al. 2014). This property renders *Chlorella vulgaris* of industrial interest for the recovery/elimination of useful metals such as magnesium from aqueous media.

One aim of this study was to examine the way in which *Chlorella vulgaris* grew under mixotrophic culture conditions by providing it simultaneously with two energy sources, light and glucose, and two carbon sources, CO<sub>2</sub> and glucose. A second aim was to investigate the Mg<sup>2+</sup> ion accumulation (extracellular and intracellular) under these conditions and finally to investigate further the validity of the previously reported model (Ben Amor-Ben Ayed et al. 2015) for the Mg<sup>2+</sup> biomass-association. One application of this study could be to enrich *Chlorella vulgaris* with magnesium for cosmetic purposes.

## **Materials and methods**

### **1. Microorganism and culture medium**

The strain *Chlorella vulgaris* CCAP211/e 11B (trebouxiophyceae) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP (UK).

The medium used was the modified 3N-Bristol medium (MBM) (Clement-Larosière et al. 2014, Vernon and Seely 1966), in which the sole nitrogen source is nitrate at a concentration of 547.03 mg.L<sup>-1</sup>. Glucose was added to the medium at a concentration of 10 g.L<sup>-1</sup> (Fisher chemical). The Mg<sup>2+</sup> ion concentration of this medium is normally 7.4 mg.L<sup>-1</sup>, but in this

study it was raised to approximately  $18 \text{ mg.L}^{-1}$  in order to compare with the autotrophic culture of *Chlorella vulgaris* at the same  $\text{Mg}^{2+}$  concentration.

## 2. Bioreactor cultures

The cylindrical stirred tank “Biostat B plus” bioreactor (Sartorius, Germany; 5L working volume) was used for *Chlorella vulgaris* culture, it was fitted with 3-bladed segment impellers for efficient mixing (UniVessel 5L), each inclined at  $45^\circ$  from the horizontal axis. The planar diameter of the impellers was 65 mm. The rotation speed of 750 rpm was used in order to obtain a homogeneous culture.

The total light intensity at the inner surface of the bioreactor was measured (LI250A, LICOR, USA) at  $2900 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  achieved by 6 LED lamps (IKEA LEDARE 130 lumen, 2700 Kelvin,  $27^\circ$  dispersion angle).

The culture temperature was maintained at  $25^\circ\text{C}$  by circulating attemperated water through a double envelope. Continuous aeration with sterile air ( $0.2 \text{ } \mu\text{m}$  Sartorius gas filter) at  $500 \text{ mL air.min}^{-1}$  (1 atm.  $25^\circ\text{C}$ ) was used to supply both oxygen and  $\text{CO}_2$  to the culture. The inlet and outlet airflow rates were measured daily.

The inoculation of the bioreactor with *Chlorella vulgaris* was performed by the addition of 1% (v/v) of pre-culture, which gave a cell concentration of  $2 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$  at the start of the experiment. The pre-culture was prepared in MBM medium containing  $10 \text{ g.L}^{-1}$  of glucose (50 mL in 250 mL flask) and was grown for 72-96 h in an incubator under continuous orbital agitation (50 cm rotation diameter; 100 rpm, light intensity at the surface of the culture  $20 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$  and air enriched with 0.7/2.1% v/v of  $\text{CO}_2$ ). The flasks were stoppered with foam bungs (Fisher scientific, 11901935 - X100) to allow sterile gaseous exchange between culture and atmosphere.

## 3. Analytical methods

### 3.1. Growth parameters

Three methods were used to measure the biomass concentration: cell number/L; dry weight concentration; absorbance at 800 nm.

The cell number per liquid volume or cell concentration was determined by counting the cells with a microscop (Carl Zeiss axioplan imaging 2, Germany) and Thomas counting chamber of 0.1 mm depth. The culture was first diluted with deionised water to give a final

cell concentration of 200-300 cells over the entire volume of the counting chamber consisting of 256 cubes of  $0.1 \text{ mm}^3$ . The cell concentration was calculated by multiplying the cell number determined in the counting chamber by the dilution factor.

The dry weight (DW) concentration of biomass ( $\text{g L}^{-1}$ ) was determined by the following method. The sample was first centrifuged (10 minutes, 1800 g). The pellet was washed through re-suspension in an equal volume of deionized water and centrifuged again (10 minutes, 1800 g). The resulting pellet was transferred into a dry pre-weighed ceramic cup and heated (24 h,  $105^\circ\text{C}$ ). After drying, the pellet was cooled in a desiccator and weighed.

The absorbance ( $A_{800}$ ) of the algal cultures was measured at 800 nm (Spectrophotometer Cary 300 Scan UV-visible, Varian Inc., Netherlands) after appropriate dilution. The cell viability was obtained using a GUAVA easyCyte™ flow cytometer (Merck Millipore) with the ViaCount (14-0155) method.

In order to follow the growth rate, three samples were removed from the bioreactor daily during the exponential phase (0-74h) and in the other phases only one sample was analysed per day.

### 3.2. Determination of the glucose concentration

Samples were removed from the bioreactor to measure the remaining glucose concentration in the medium in order to follow its consumption by the algae. These measurements were performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Ultimate 3000, column: HPX-87H). The eluent was sulphuric acid (2mM). A total pressure of approximately 870 psi at  $45^\circ\text{C}$  was used. All samples were first filtered through C18 and 0.2 microns filters before the analyses in order to retain all proteins and macromolecules that could alter the HPLC column.

### 3.3. Determination of the nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentration

The  $\text{NO}_3^-$  analyses were carried out by ionic chromatography using a Dionex AS11-HC column. The conditions are as follows: system Dionex DX-500, conductimetric detector CD20, column (CR-ATC, P/N 060477) (4 mm) with a guard column AG11-HC. The samples were first filtered through C18 and  $0.2 \mu\text{m}$  filters. The eluent was KOH ( $30 \text{ mmol L}^{-1}$  at  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ ) and its concentration was lower than the one recommended by the column manufacturer leading to slightly longer retention times. The total pressure was about 2,300 psi at  $30^\circ\text{C}$ . A sampling loop was used to each injection of  $20 \mu\text{L}$ . All samples

were treated under a Class 100 laminar flow hood. The system Dionex DX-500 was installed in a Class 10,000 clean room.

#### 3.4. Determination of chlorophyll concentration

A modified extraction method of Porra (1990) was used in order to measure the chlorophyll *a* concentration. Three samples per day were removed from the bioreactor cultures and centrifuged (5 minutes; 6400 g). The pellets were resuspended in an aqueous solution of 85% methanol containing 1.5 mmol L<sup>-1</sup> of sodium dithionite. The samples were made at 40°C for 32 minutes and then re-centrifuged (5 minutes; 6400 g). The absorbance of the supernatant was measured at 664 and 650 nm (Spectrophotometer Cary 300 Scan UV-visible, Varian Inc., Netherlands). The Porra's formula (1990) was used to calculate the chlorophyll *a* concentration.

#### 3.5. Determination of magnesium ion concentration

An atomic absorption spectrophotometer AAS (Hitachi Z-2300, Japan) was used in order to measure the Mg<sup>2+</sup> ion concentration: air-acetylene flame; absorbance at a wavelength of 202.6 nm with the specific Magnesium lamp (Agilent technologies, France). The standard deviations for the calibration scale (0.15 to 20.0 mg L<sup>-1</sup>) were in the range 1 to 2%.

The sample dilutions were carried out with Milli Q water acidified with HCl (Ph < 3) to prevent metal precipitation. All glassware used was soaked for 24 h in 10% (v/v) HNO<sub>3</sub> (prepared with 65% w/v Merk, suprapur) and thoroughly rinsed with ultrapure water (Milli Q, Millipore) before use. The calibration solutions were prepared from 1000 mg L<sup>-1</sup> magnesium stock solution (Fischer scientific) and measured 5 times in order to acquire the precision of the analysis.

#### 3.6. Estimation of adsorbed and absorbed magnesium concentrations

The concentrations of adsorbed (extracellular) and absorbed (intracellular) magnesium were determined by the procedure described by Franklin et al, (2000) and Ma et al, (2003) with minor modifications as published in our previous work (Ben Amor- Ben Ayed et al, 2015).

#### 3.6. Magnesium bioaccumulation modelling

A reversible reaction of first order with respect to the magnesium concentration in the liquid was assumed for Mg<sup>2+</sup> ions uptake by the algae culture in the photobioreactor. This model

has been already published with all details (Ben Amor-Ben Ayed et al, 2015). As a result, the model is given by the following equation.

$$\frac{C(t)-C_{eq}}{C_0-C_{eq}} = e^{-kg \alpha t} \quad \text{Eq. (A.1)}$$

Where  $C_0$ ,  $C(t)$  and  $C_{eq}$  are the  $Mg^{2+}$  ions concentrations ( $mg L^{-1}$ ) in the algal culture supernatant at times 0, t and t equilibrium and k a the volumic kinetic constant.

## Results and discussion

### 1. Algal growth characteristics in a stirred photo-bioreactor

*Chlorella vulgaris* was grown in duplicate and independent stirred photo-bioreactor cultures under potentially mixotrophic conditions in order to investigate  $Mg^{2+}$  ion accumulation in the presence of glucose. Each experiment lasted 310 h. The initial glucose and  $Mg^{2+}$  ion concentrations were  $10 g.L^{-1}$  and  $17.7 mg.L^{-1}$  in the inoculated Bristol medium, respectively. The absorbance  $A_{800}$ , the cell concentration N (number of cell. $mL^{-1}$ ) and the dry weight concentration DW ( $g.L^{-1}$ ) were measured daily, after proper dilution for the absorbance measurements. These three growth parameters showed a satisfying degree of proportionality for the duplicate experiments (Figure 1), and confirmed the results of Rocha et al. (2003). “Corrected absorbance” refers to the absorbance measured with diluted samples and multiplied by the dilution factor.

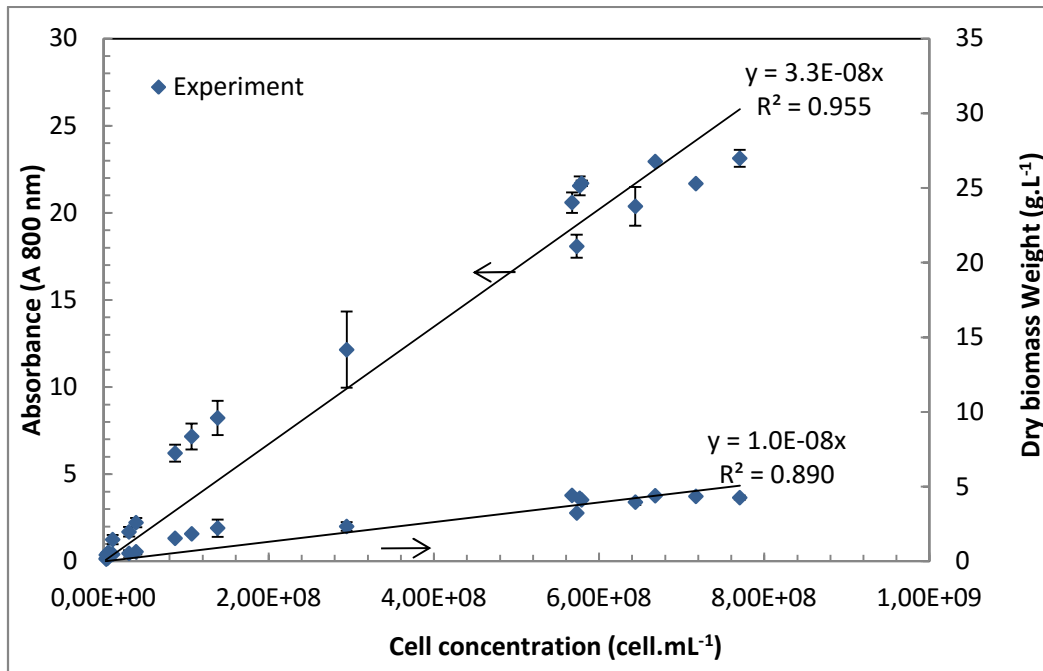
The following correlations were obtained:

$$A_{800} = (3.3 \times 10^{-8}) N \text{ (cell } mL^{-1}) \text{ and DW (g } L^{-1}) = (1.0 \times 10^{-8}) N \text{ (cell } mL^{-1}).$$

The average dry weight of a cell was calculated and found to remain constant at  $1.1 \times 10^{-11} g$  throughout the experiments, which corresponds to published values for this organism (Ting et al.1991).

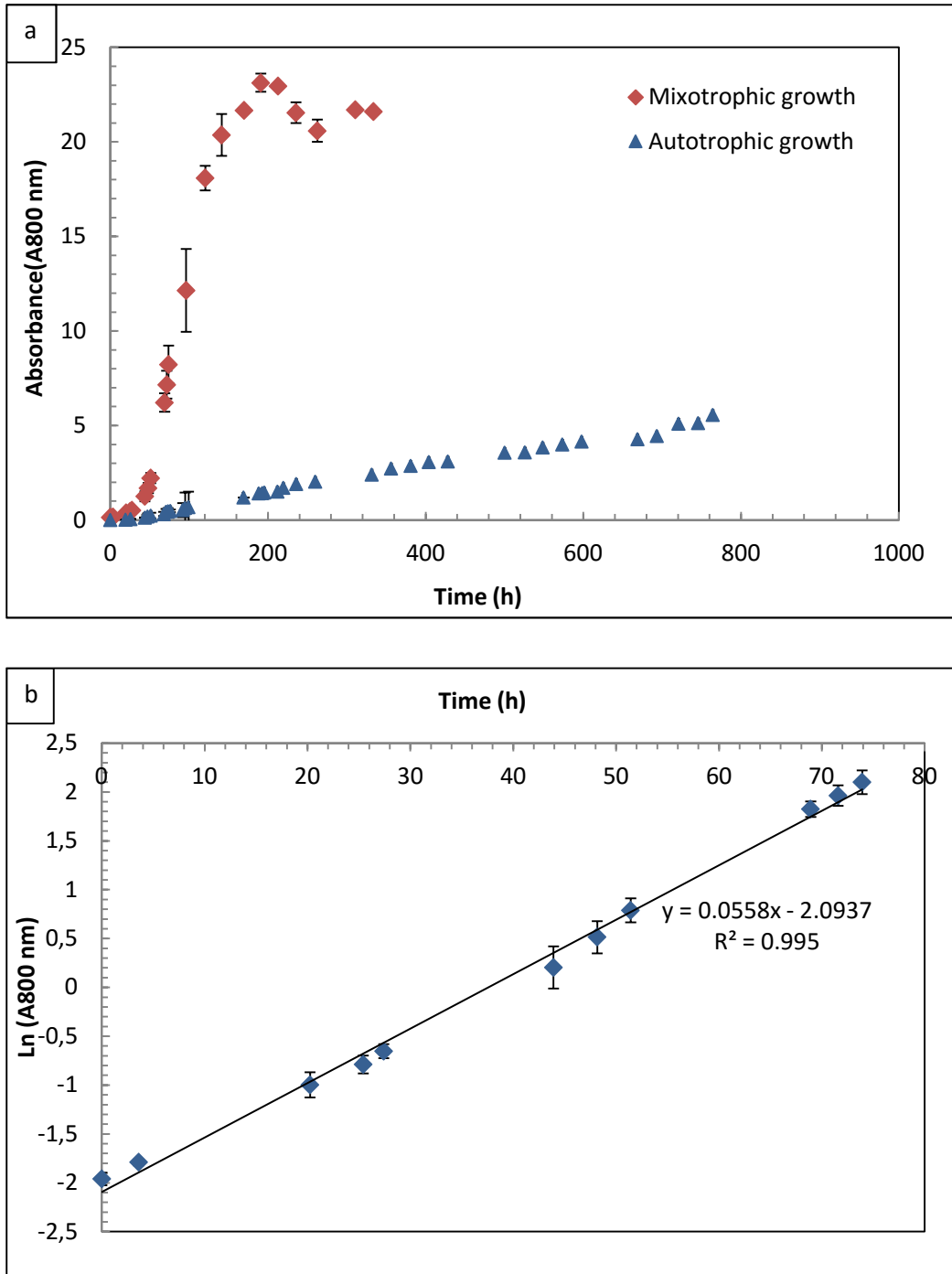
The growth curves in both autotrophic (765 h) and mixotrophic (310h) culture conditions were presented in the same figure (Figure 2 a). The specific growth rate ( $\mu$ ) for mixotrophic culture was determined from the absorbance data during the exponential growth phase at  $0.056 h^{-1}$  (Figure 2 b) according to the method proposed by Wood et al. (2005).

The  $\mu$  value was relatively close to that reported by Perner Nochta et al. 2007 ( $\mu= 0.06 h^{-1}$ ) for the same strain in a batch tubular bioreactor equipped with helical static mixers and plates.



**Figure 1. Relationship between the different growth parameters: corrected absorbance and dry weight concentration were plotted against cell concentration for both experiments.**

The *C. vulgaris* cell concentration after 310 hours of culture was higher ( $A_{800}= 23$  corresponding to  $8.8 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup>) than the biomass concentration obtained ( $A_{800}= 5$  corresponding to  $2 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup>) after 765 h of autotrophic culture in the photo-bioreactor (Figure 2). Cell viability remained at  $96 \pm 2\%$  throughout the experiments. These results are in good agreement with Lee et al. 1996, who investigated the mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* with glucose (18 g.L<sup>-1</sup>) and reported a higher cell concentration compared to autotrophic growth.



**Figure 2.** a) Growth curves for both experiments under mixotrophic and autotrophic growth conditions. Corrected absorbance versus time of incubation . b) Semi log plot of the exponential growth phase of both experiments under mixotrophic conditions. The best line of fit was plotted by selecting the maximum number of consecutive experimental points that gave the highest correlation coefficient ( $R^2$ ).



For mixotrophic culture conditions, glucose and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentrations were followed with time (Figure 3). Glucose was not significantly consumed during the exponential phase; the growth was then autotrophic during this phase of the culture. The end of the exponential growth phase coincided with nitrate exhaustion, suggesting a limitation by nitrogen. Three growth phases can be observed: exponential, transition and stationary phases. During the transition phase, glucose was removed from the growth medium suggesting heterotrophic growth. The exhaustion of glucose approximately corresponded to the start of the stationary phase as the cell concentration became stable. There were slight differences in glucose consumption and cell growth between the duplicate experiments in the transition phase; elsewhere the repeatability between the experiments was very high.

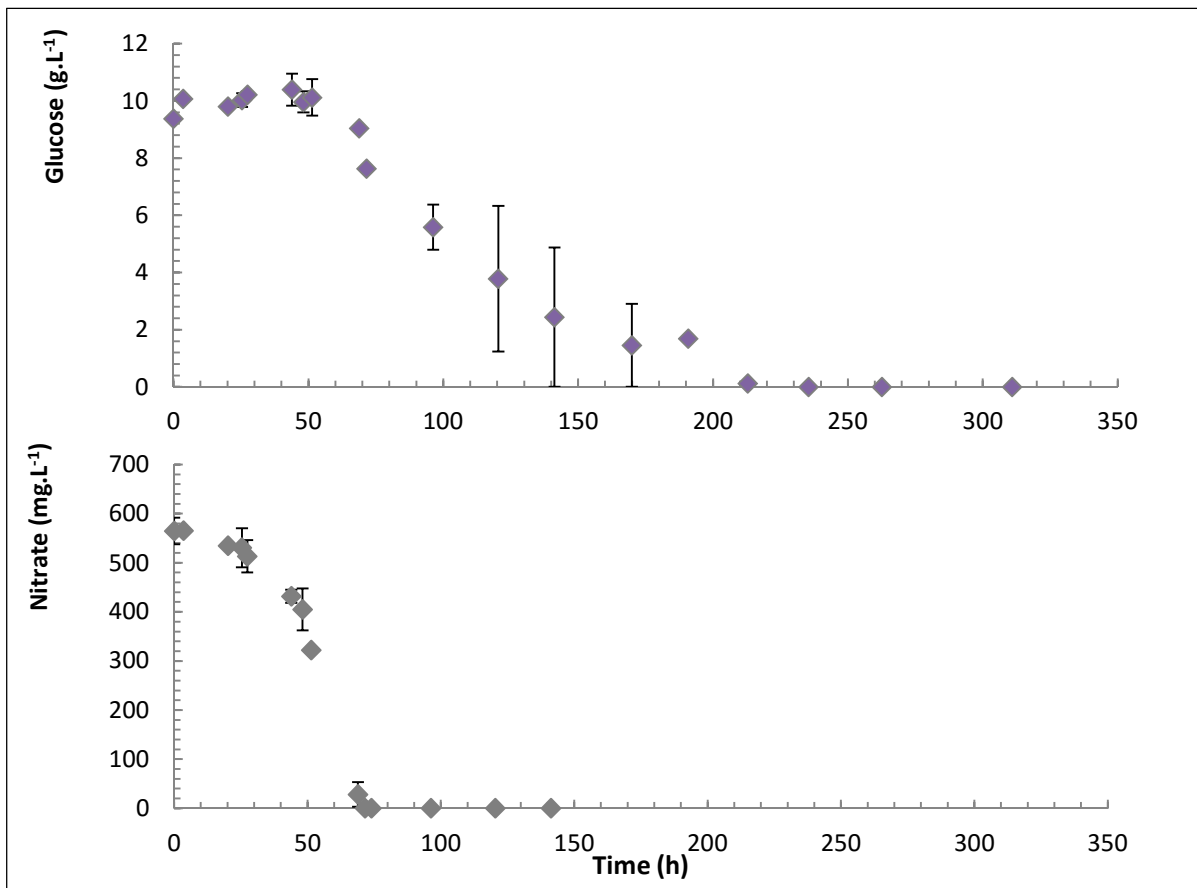


Figure 3. Glucose and nitrate concentrations profiles during *Chlorella vulgaris* growth. The dispersion of measurements are presented in the figure with error bars

*Chlorella vulgaris* exhibited a preference for autotrophic growth as long as nitrogen was available but after complete nitrogen exhaustion, it switched to glucose consumption.

The average cellular chlorophyll *a* content (mg chlorophyll *a* per g DW) decreased sharply during the exponential phase and remained approximately constant at a low value afterwards (Figure 4). This could be explained by supposing lipid accumulation after the exhaustion of nitrate in the culture. This behaviour was also observed by Illman et al. (2000), Li et al. (2008) for the same microorganism in mixotrophic culture. After exponential growth in this study, the cellular chlorophyll content became constant at  $5 \times 10^{-11}$  mg per cell. According to Kong et al. (2011) a high glucose concentration ( $> 5\text{g.L}^{-1}$ ) inhibited chlorophyll production.

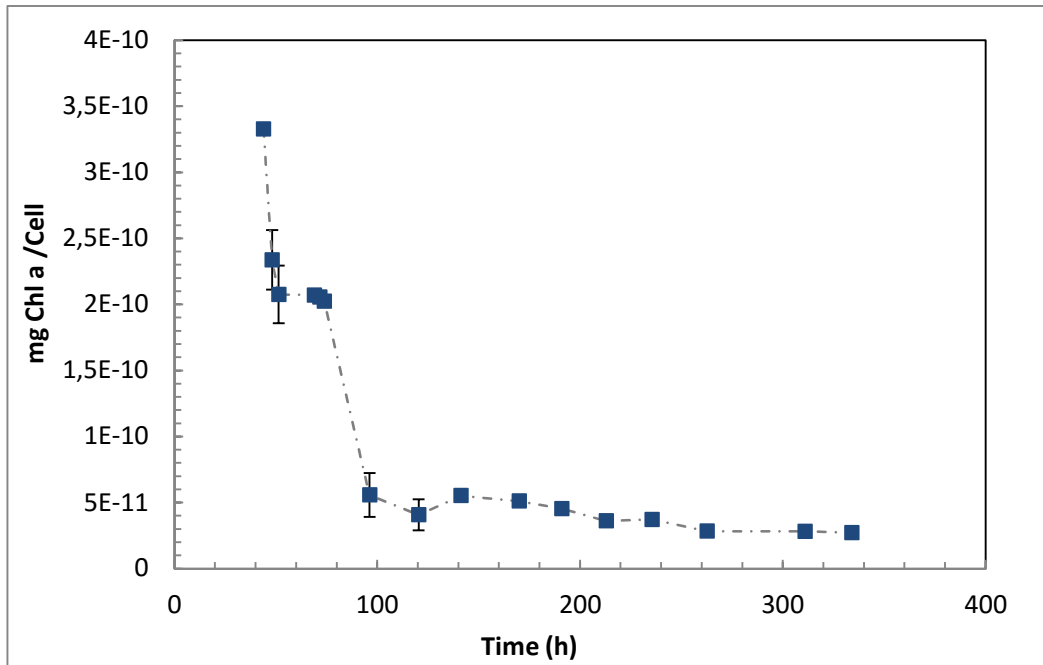


Figure 4. Average cell-chlorophyll *a* content during *Chlorella vulgaris* culture

## 2. Removal of $\text{Mg}^{2+}$ ions by algae from the growth medium

### 2.1. Dissolved $\text{Mg}^{2+}$ ion amount

The dissolved and biomass-associated  $\text{Mg}^{2+}$  ion concentrations were determined early on (74 h), in the middle (170 h) and at the end (310 h) of the experiment. Each measurement was performed in triplicate.

From the dissolved  $Mg^{2+}$  ion concentration the removal yield was calculated  $(C_0-C)/C_0$  and plotted against the biomass concentration (Fig.5a). A clear linear relationship was obtained confirming the direct relation between  $Mg^{2+}$  ion removal and cells growth.

Magnesium removal went on even after the end of the exponential phase until almost total removal (Fig.5a).  $Mg^{2+}$  ion uptake continued during the heterotrophic growth phase; the uptake of this ion does not seem to be only related to chlorophyll production.  $Mg^{2+}$  ion is also implicated in the activation of glycolytic enzymes for glucose metabolism (Dombek and Ingram 1998).

## 2.2. Biomass associated magnesium ions

The extracellular and intracellular (adsorbed and absorbed)  $Mg^{2+}$  ion amounts increased during the experiment (Fig. 5b), the absorbed  $Mg^{2+}$  ion amount being always greater than the adsorbed amount. By the end of the experiment (310 h), *C. vulgaris* had adsorbed 4 % of the total  $Mg^{2+}$  ions on its cell wall and 86 % had been absorbed into the cells. As a result, 90 % of the initial  $Mg^{2+}$  ion content ( $17.7 \text{ mg.L}^{-1}$ ) had been taken up from the medium. The calculated magnesium mass balances accounted for  $97 \pm 2.0\%$  of the initial amounts of the ion. Compared with our previous publication (Ben Amor-Ben Ayed et al. 2015), the accumulation of magnesium by algae in potentially-mixotrophic culture was lower than that in autotrophic culture. At the end of the experiment (310 h), *Chlorella vulgaris* absorbed on average 3.44 mg of  $Mg^{2+}$  ions per g of dry biomass whereas in autotrophic photo-bioreactor cultures (765 h), 6.0 mg were absorbed per g of dry biomass . It is then effective to use autotrophic followed by heterotrophic conditions to obtain more biomass and to maximize  $Mg^{2+}$  ion accumulation.

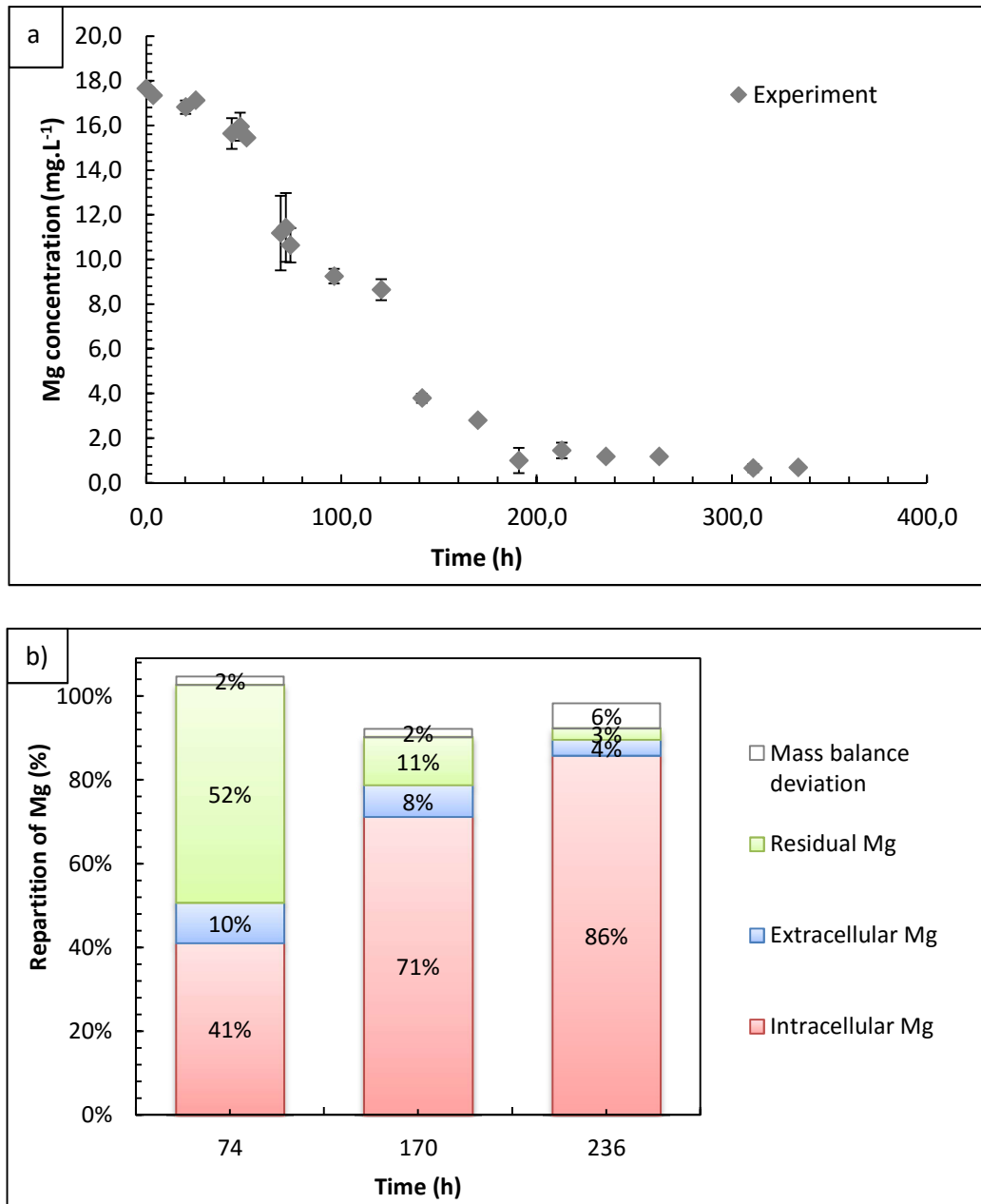


Figure 5 a) Removal of Mg<sup>2+</sup> ions by *Chlorella vulgaris* from the growth medium b) Repartition of Mg<sup>2+</sup> ions in the *C. vulgaris* biomass during growth.

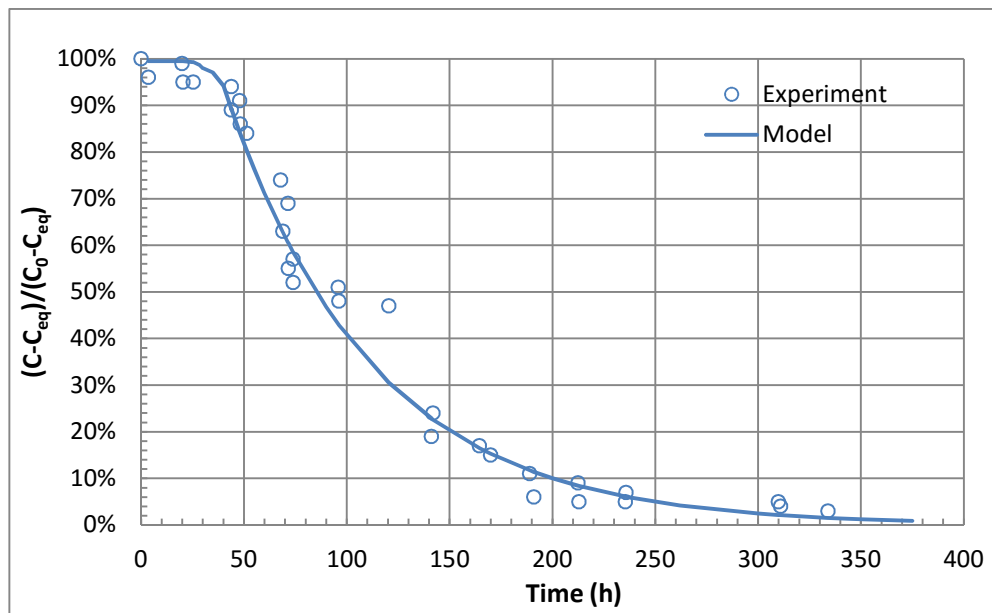
The mass balance deviation refers to the amount of Mg<sup>2+</sup> ions that could not be accounted for, between the initial amount of Mg<sup>2+</sup> ions and that found in the sample. The difference in the results between experiments was presented by the error bars.

The cell wall of *Chlorella vulgaris* is rich in glycoprotein consisting of anionic carboxylate groups that have a strong binding affinity with metal cations such as Mg<sup>2+</sup> ions (Macfie and Welbourn 2000).

As an interpretation, the  $Mg^{2+}$  bioaccumulation mechanism is as a result of a coupling between mass transfer and biochemical reactions. The external transfer  $Mg^{2+}$  from the solution to the algae depends essentially on the hydrodynamics and the biochemical reactions largely depend on the physiology of the cells and the growth limitations (light...).

### 3. Model for $Mg^{2+}$ ion accumulation by *C. vulgaris*

The experimental results were plotted versus the predicted model curve (Fig. 6). They fitted well with the exponential model for  $Mg^{2+}$  ion uptake by *Chlorella vulgaris* confirming its applicability.



**Figure 6.** Comparison of model and measured  $Mg^{2+}$  ion uptake by *C. vulgaris*. The exponential model is represented by the solid line and the experimental data by the symbols. The concentrations  $C$ ,  $C_0$  and  $C_{eq}$  are the  $Mg^{2+}$  ion concentrations at times:  $t$ ,  $t_0$  and at equilibrium respectively.

These results were in good agreement with our previous published work (Ben Amor – Ben Ayed et al. 2015) where we developed an exponential model for the  $Mg^{2+}$  ion uptake by *Chlorella vulgaris* in shake-flask autotrophic cultures with different initial  $Mg^{2+}$  ion concentrations ( $8.9-465 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Two differences were found by comparison with our previous work (Ben Amor – Ben Ayed et al. 2015); firstly  $C_{eq}$  seems to be negligible and secondly  $Mg^{2+}$  ion uptake starts after a lag time of 45 h from the beginning of the experiments.

Further work is needed to find suitable explanations for these different behaviours.

This model described well the  $Mg^{2+}$  ion uptake by *Chlorella vulgaris*. Future experiments will be performed to explore  $Mg^{2+}$  ion uptake under different glucose and initial  $Mg^{2+}$  ion concentrations.

### Conclusion

*Chlorella vulgaris* biomass production under mixotrophic conditions was significantly higher than in autotrophic cultures. The nitrate exhaustion brought about the end of the exponential phase and it coincided with the start of glucose consumption; there was nevertheless no direct evidence of true mixotrophy where glucose and  $CO_2$  would be incorporated into the biomass simultaneously. Even in the presence of glucose, *C. vulgaris* adopted an autotrophic metabolism before the exhaustion of the nitrogen source. The chlorophyll *a* was an indicator of photosynthetic activity and was followed during the experiment. The specific growth rate was  $0.056\text{ h}^{-1}$  close to that reported by Perner Nochta et al. (2007) at  $0.058\text{ h}^{-1}$  for the same strain in a batch tubular bioreactor culture.

Starting with an initial  $Mg^{2+}$  ion concentration of  $17.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in the growth medium, *Chlorella vulgaris* accumulated  $3.44\text{ mg}$  of  $Mg^{2+}$  per g of dry biomass in mixotrophic growth and  $6.0\text{ mg}$  of  $Mg^{2+}$  per g of dry biomass in autotrophic growth.  $Mg^{2+}$  ion removal by biomass from growth medium was directly related to the cells concentration and their physiology. During autotrophy, the cells need magnesium to synthesize chlorophyll for photosynthesis, so the cells accumulate a larger amount of magnesium. In contrast, during heterotrophic growth less  $Mg^{2+}$  is required by the cells as they switch to using glycolysis and respiration.

This study confirms our previous results (Ben Amor – Ben Ayed et al. 2015) that *Chlorella vulgaris* is a suitable microorganism for  $Mg^{2+}$  ion uptake and the method first published by Franklin et al. 2000 is applicable for the measurement of  $Mg^{2+}$  ion uptake in *Chlorella vulgaris*.

The micro-organism showed a preference for autotrophic growth even in the presence of glucose. Later on during the experiment, there was no evidence for mixotrophic growth although this could not be excluded neither. The duplicate experiments were highly reproducible, throughout the entire duration of the experiments (310 h) and for all the different methods measured.

The experimental data fitted well with the exponential model for  $\text{Mg}^{2+}$  ion uptake by *Chlorella vulgaris* cells. The work presented here confirms the application of this model for metal ion sorption in microalgae cultures and the modelling work will be further pursued as in additional experiments.

This study presents promising results for the development at industrial scale of *Chlorella vulgaris* cultures with high cell production and  $\text{Mg}^{2+}$  ion uptake.

## 4 Comparaison de la croissance de *C. vulgaris* et de la fixation du magnésium dans les deux modes de culture (autotrophie et mixotrophie)

### Croissance de *C. vulgaris*

Après la phase exponentielle, en conditions d'autotrophie (figure 33), la lumière devient limitante et la croissance se ralentit ; en conditions de mixotrophie, le glucose commence à être consommé après cette phase exponentielle et la cellule entre dans une phase d'hétérotrophie prépondérante où la lumière n'est plus importante, d'où une croissance encore forte après la période exponentielle et une stagnation à épuisement du glucose (200 h).

Les vitesses spécifiques de croissance maximales  $\mu$  sont identiques pour les deux modes de culture et égales à  $0.055 \text{ h}^{-1}$  (avant 70 h). Entre 70 et 200 h la vitesse de croissance en mixotrophie est plus forte que la vitesse en autotrophie.

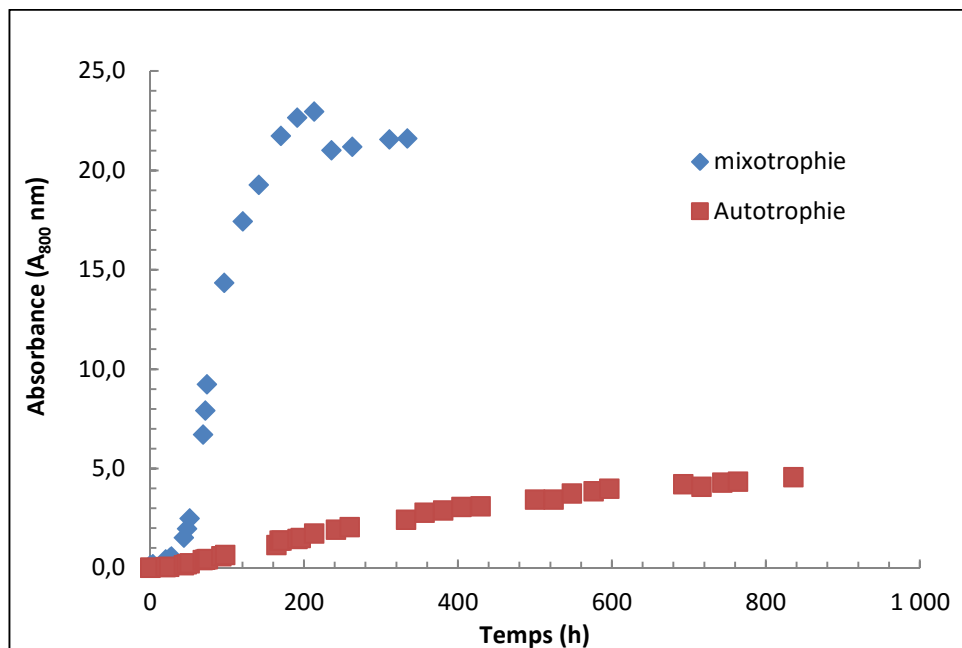


Figure 33. Courbes de croissance de *C. vulgaris* dans les deux modes de culture



✚ Baisse de la concentration en magnésium dans la phase liquide

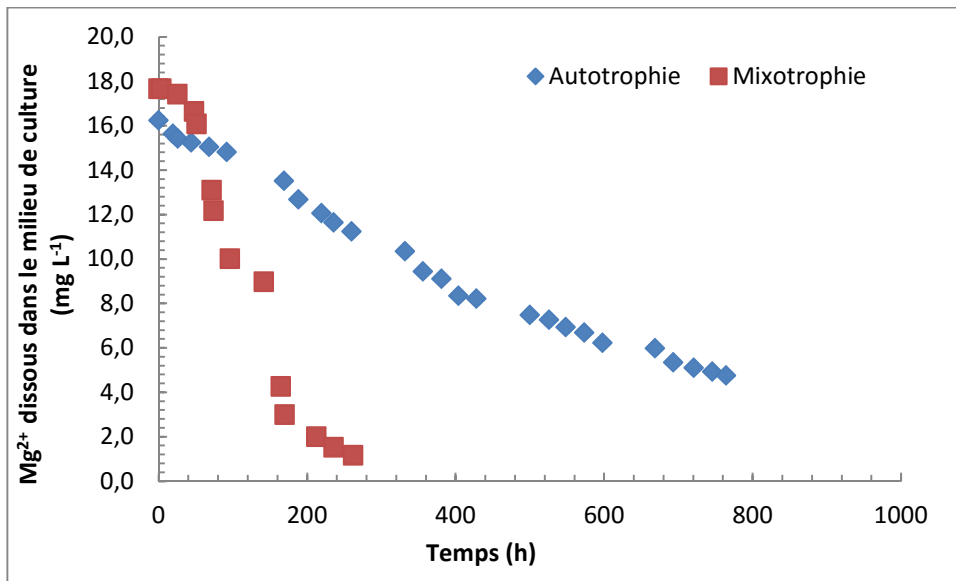


Figure 34. Magnésium dissous résiduel dans le milieu de culture en modes d'autotrophie et de mixotrophie

La figure 34 montre une baisse plus importante du magnésium résiduel dans le milieu de culture en mixotrophie ; ce résultat est évidemment en lien étroit avec la croissance des algues qui est beaucoup plus forte dans ce mode.

On peut chiffrer la vitesse globale de bioaccumulation de Mg par *C. vulgaris* grâce au modèle :

$$k_g a (\text{Auto}) \approx 0,005 \text{ h}^{-1}$$

$$k_g a (\text{Mixo}) = 0,012 \text{ h}^{-1}$$

La différence est essentiellement due à la partie **a**, qui est plus grande en mixotrophie qu'en autotrophie car proportionnelle à la surface des algues, donc à la concentration de biomasse.

### Quantités adsorbées et adsorbées

Afin de comparer le comportement de fixation du magnésium par la biomasse dans les deux modes de culture, on a tracé le rapport Mg bioaccumulé (adsorbé et absorbé) /  $A_{800\text{ nm}}$ , équivalent au rapport Mg bioaccumulé / biomasse, en fonction du temps (figure 35). Les résultats montrent que ce rapport devient rapidement constant dans les deux cas entre 100 et 200 h. En revanche, il est beaucoup plus grand en autotrophie qu'en mixotrophie (2,5 fois plus).

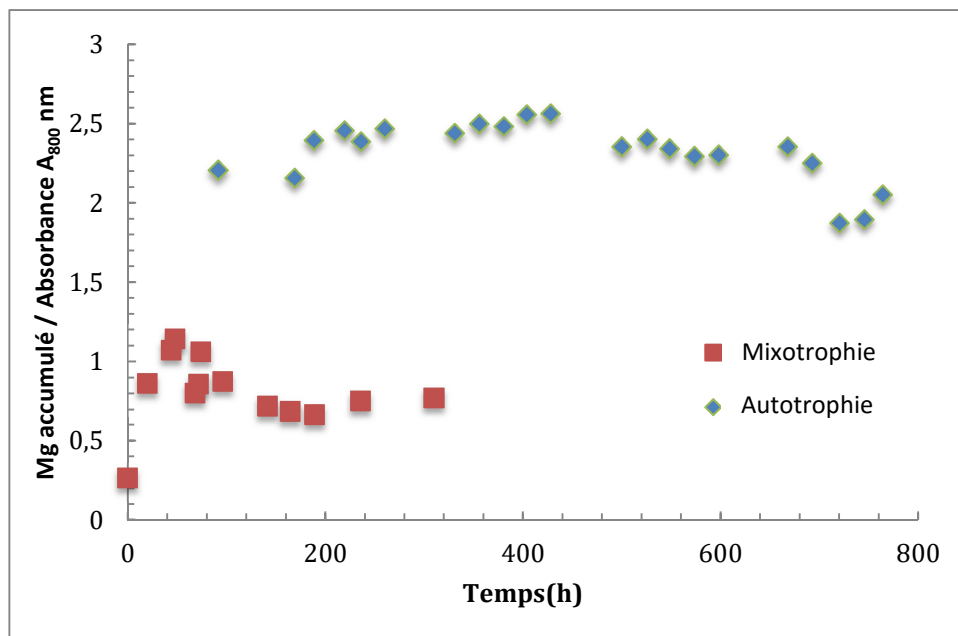


Figure 35. Magnésium adsorbé et absorbé par la biomasse dans les deux modes de culture

Pour expliquer ces comportements différents, nous allons comparer les quantités adsorbées et absorbées. Il est important de se rappeler que le mécanisme de bioaccumulation de Mg résulte d'un couplage entre transfert de matière et réaction biochimique. Le transfert externe de Mg du cœur de la solution vers les algues dépend essentiellement de l'hydrodynamique (elle-même liée à la quantité de biomasse pour une agitation fixée) et la réaction biochimique dépend en grande partie de la physiologie des cellules et des limitations (lumière, ingrédients, ...).

En supposant les vitesses d'adsorption et d'absorption très grandes devant les autres, on peut comparer les vitesses respectives de croissance et de transfert externe pour les deux modes de fonctionnement (autotrophie, mixotrophie) et pendant les différentes phases de croissance des microalgues.

La vitesse de transfert externe est proportionnelle au produit «  $k_L a$  », comme on l'a vu précédemment ;  $k_L$  est le coefficient de transfert du magnésium dans la phase externe, inversement proportionnel à l'épaisseur de la couche limite et «  $a$  » l'aire interfaciale par unité de volume de liquide. «  $k_L$  » dépend essentiellement de l'hydrodynamique du milieu ; à agitation constante, comme c'est le cas dans tous les essais, l'épaisseur de la couche limite augmente lorsque la turbulence du milieu décroît, donc lorsque la concentration des algues augmente. Quant à «  $a$  », il augmente proportionnellement à la concentration des algues. Les deux effets peuvent se compenser et le produit  $k_L a$  pourrait donc rester à peu près constant.

Rappelons qu'entre 0 et 70 h les deux modes de culture donnent des résultats identiques car les deux cultures en phase exponentielle sont en mode autotrophe ; la vitesse spécifique de croissance est de  $0,055 \text{ h}^{-1}$  pour les deux modes.

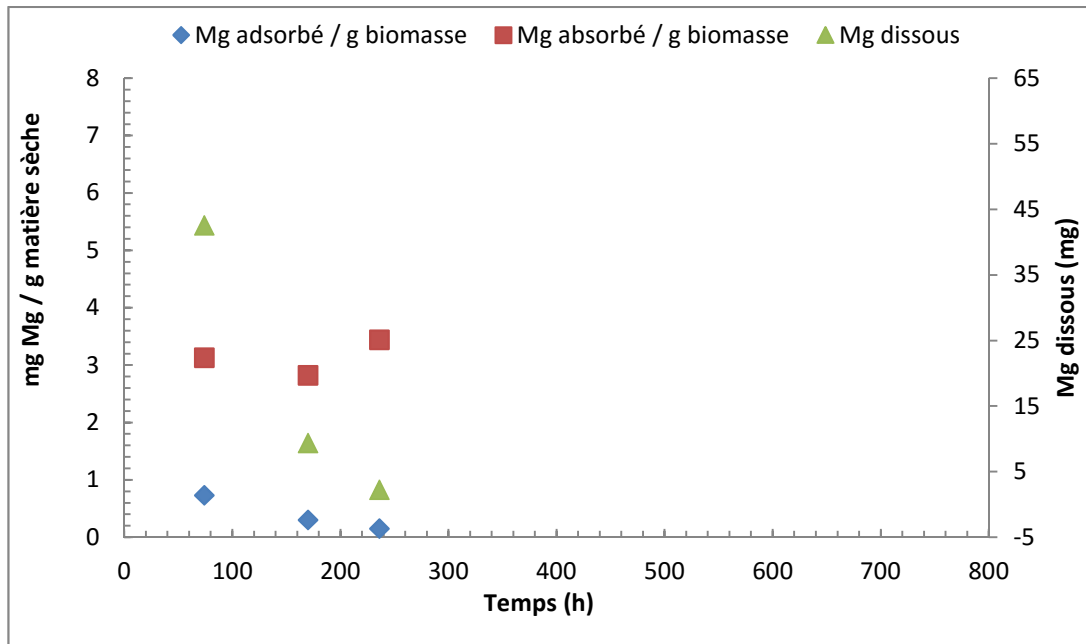
### ***MIXOTROPHIE (figure 36)***

Supposons qu'en mixotrophie, la vitesse de croissance soit supérieure à la vitesse de transfert. En effet la vitesse de croissance est très importante jusqu'à 200 h.

Le développement de la surface des microalgues est plus rapide que le transfert externe, donc la surface s'appauvrit en Mg. Il n'y a pas d'accumulation de magnésium à la surface car l'absorption est rapide et la quantité adsorbée est donc très faible.

La quantité absorbée reste constante après 100 h, malgré l'augmentation notable de volume d'algue, car l'accumulation globale est contrôlée par le transfert externe et celui-ci varie peu si le produit «  $k_L a$  » reste à peu près constant.

Après 200 h, la croissance s'arrête, la biomasse a une concentration constante et il n'y a plus de magnésium dans le milieu. Donc la quantité absorbée par unité de biomasse ne peut que rester constante.



**Figure 36. Répartition du magnésium par biomasse de *C. vulgaris* en conditions de culture en mixotrophie**

#### ***AUTOTROPHIE (figure 37)***

Dans le cas de la culture en autotrophie, on considèrera que la vitesse de transfert est plus grande que la vitesse de croissance. La vitesse de croissance est faible après la fin de la phase exponentielle, donc le développement de la surface aussi. Le transfert externe est alors assez rapide pour alimenter la surface en magnésium. Les quantités adsorbées sont donc significatives, mais toujours inférieures aux quantités absorbées.

Les quantités adsorbées et absorbées spécifiques (par unité de biomasse) varient très peu après 300 h. Si la croissance contrôle le phénomène global, la vitesse d'accumulation du magnésium est liée à la vitesse de croissance et probablement lui est proportionnelle, ce qui explique les valeurs constantes des quantités adsorbées et absorbées spécifiques.

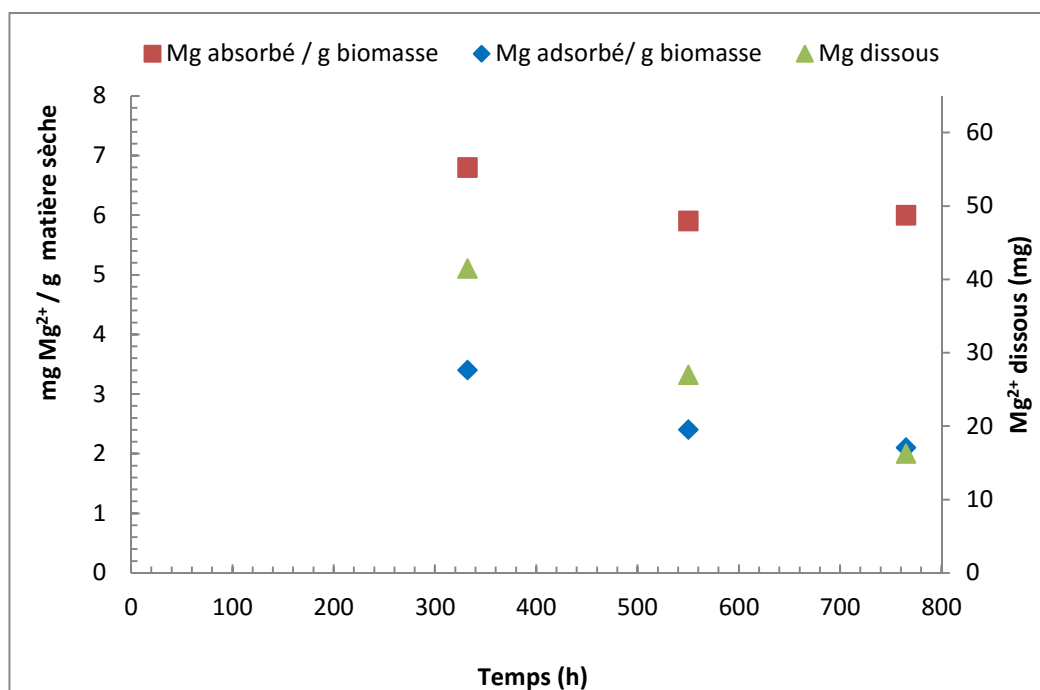


Figure 37. Répartition du magnésium par biomasse en conditions de culture d'autotrophie

Les quantités absorbées spécifiques sont 2,5 fois plus fortes en autotrophie qu'en mixotrophie. Ceci peut être expliqué par un état physiologique des cellules différent dans ces deux modes de culture. En autotrophie les cellules ont besoin de magnésium pour synthétiser les chlorophylles responsables de la photosynthèse ; les cellules chlorophylliennes accumulent donc une quantité plus importante de magnésium. En revanche, en mixotrophie, la croissance est liée à la respiration et à la glycolyse qui nécessitent moins de magnésium.

## **Conclusions et Perspectives**

Le spectre d'utilisation des microalgues dans différents domaines est devenu de plus en plus large, notamment dans le domaine de traitements des eaux usées grâce à leur pouvoir de bioaccumulation des métaux lourds. Cependant, l'emploi des microalgues dans le secteur cosmétique paraît très innovant. C'est dans ce secteur que ce travail de thèse se situe ; il a eu pour but d'étudier la faisabilité de la bioaccumulation de magnésium par *C. vulgaris* cultivée dans différents systèmes de culture en autotrophie et mixotrophie tout en déterminant la répartition de ce métal aux niveaux extracellulaire et intracellulaire. Dans un deuxième temps nous avons modélisé son accumulation par les algues.

### Cultures en autotrophie

Dans un premier temps, des essais de culture de *C. vulgaris* ont été menés dans de petits volumes (100 et 300 mL) afin d'optimiser les paramètres de culture avant de passer à plus grande échelle : débits d'air et de CO<sub>2</sub>, intensité de lumière, température. Nous avons considéré trois espèces de magnésium : magnésium dissous en solution, magnésium adsorbé sur la paroi cellulaire et magnésium absorbé dans la cellule. Les quantités respectives de ces trois espèces ont été mesurées et les bilans matière sont toujours respectés à 15% près, montrant la validité des méthodes expérimentales et des hypothèses.

Nous avons obtenu une capacité de production de biomasse et d'accumulation de magnésium importante et très intéressante par rapport aux valeurs trouvées pour l'accumulation d'autres métaux dans la littérature.

Les cultures de *C. vulgaris* en autotrophie ont été réalisées sur des temps assez longs. Au début (200 h), les cellules n'ont pas absorbé la majorité du magnésium initial. En effet, pour absorber plus de 80% du magnésium initial, il a fallu attendre de l'ordre de 700 h.

Les cultures de *C. vulgaris* à des fortes concentrations de magnésium, jusqu'à 465 mg L<sup>-1</sup>, ne montrent pas d'effet inhibitoire sur la croissance en autotrophie ; les courbes de croissance sont les mêmes à toutes les concentrations du métal (8,9 - 465 mg L<sup>-1</sup>). Par conséquent le magnésium n'est pas toxique à ces niveaux de concentration, contrairement à ce qu'on trouve dans la littérature concernant l'accumulation d'autres métaux.

Les résultats montrent que la bioaccumulation de ce métal est directement liée à la biomasse microalgale et croît avec celle-ci.

Pour des concentrations de  $Mg^{2+}$  initiales faibles (inférieures à  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), quasiment tout le magnésium présent en solution est bioaccumulé. A partir de  $46 \text{ mg L}^{-1}$ , les microalgues se saturent au niveau intracellulaire avec une concentration voisine de 4 à 7 mg de magnésium par g de biomasse sèche. En revanche, l'adsorption extracellulaire continue à augmenter sans saturation observée à ce niveau-là.

Le magnésium qui s'adsorbe à la surface cellulaire au cours de la croissance est rapidement transféré à l'intérieur du cytoplasme cellulaire. En effet, les quantités de métal intracellulaires sont toujours plus importantes que les extracellulaires.

Des expériences longues ont également été menées en photobioréacteur de 5 L. Après une phase exponentielle de 70 h, les cultures ont montré une longue phase apparemment linéaire qui semble due à l'épuisement d'un des substrats. Nous avons identifié la lumière comme facteur limitant par suite des phénomènes d'auto-ombrage liés aux fortes concentrations de biomasse obtenues. Nous avons montré que le  $CO_2$  n'était pas limitant.

Différents paramètres ont été suivis : la concentration de magnésium en solution, les quantités de magnésium adsorbé et absorbé, la concentration de chlorophylle dans les cellules. Une excellente reproductibilité a été observée pour les mesures de ces différents paramètres de culture.

La quantité de chlorophylle par cellule reste constante tout au long de la culture et il existe une relation claire entre le magnésium absorbé à l'intérieur des cellules et la teneur en chlorophylle. Une étude plus poussée pourrait être intéressante pour une compréhension fine de cette relation.

Ce microorganisme montre un taux élevé d'accumulation, supérieur à 69 % du magnésium initial dans les cultures en batch dans le photobioréacteur. A une concentration initiale de 16 mg de  $Mg^{2+}/L$  dans le milieu de culture, 18% sont adsorbés sur les parois cellulaires et 51% sont absorbés à l'intérieur des cellules à la fin de la culture (765 h).

Le modèle développé à partir des essais en petits réacteurs a été validé pour les cultures à plus grand volume dans le photobioréacteur. Ces résultats confirment l'applicabilité de la



cinétique du premier ordre à la bioaccumulation de magnésium par la biomasse de *C. vulgaris*.

### Cultures en mixotrophie

Cette étude de culture en mixotrophie montre des résultats intéressants avec une production cellulaire plus importante et une bioaccumulation de magnésium nettement plus importante et plus rapide que celle obtenue en conditions de culture autotrophiques.

Au cours de la croissance, les cellules ont montré une préférence nette pour l'autotrophie pendant les premières heures de culture (74 h) en utilisant la lumière et le CO<sub>2</sub> atmosphérique comme source de carbone et les ions nitrate comme source d'azote. L'épuisement de ces derniers et une limitation par la lumière correspondent à la fin de la phase exponentielle et à partir de là les cellules ont commencé à consommer rapidement le glucose comme source d'énergie et carbone, quittant le mode d'autotrophie pour passer au mode de mixotrophie.

Dès que le glucose est épuisé, les cellules entament la phase stationnaire, la croissance est compensée par la mortalité et la concentration des cellules devient constante. Cependant, un ajout de glucose juste avant la phase stationnaire pourrait probablement être intéressant pour prolonger la production de biomasse et retarder notablement la phase stationnaire.

D'autre part, pendant une quarantaine d'heures après le début de culture, en mixotrophie, l'accumulation de magnésium reste faible, ce qui correspond à peu près à la phase exponentielle autotrophe. Par contre après cette phase le magnésium est accumulé même au cours de la phase stationnaire jusqu'à épuisement, pour des concentrations initiales voisines de 15 mg L<sup>-1</sup>. Les cellules accumulent 90 ± 2% du métal à la fin de culture (300 h). Le taux de Mg accumulé / biomasse est bien moins important qu'en autotrophie (2.5 fois moins). Ceci est lié à un état physiologique différent des cellules.

Le magnésium adsorbé / biomasse est toujours moins important que celui absorbé / biomasse. Dès que l'ion magnésium s'attache à la surface de la cellule, il s'absorbe rapidement à l'intérieur.

## Modélisation

Nous avons développé un modèle original pour la bioaccumulation de magnésium dans *C. vulgaris* et déterminé ses paramètres, en supposant que la taille des cellules varie peu, ce qui a été validé expérimentalement. Une cinétique réversible de premier ordre est applicable aux résultats expérimentaux obtenus.

Le paramètre  $k_g a$ , produit de la constante cinétique globale et de l'aire interfaciale spécifique, a été déterminé pour tous les essais ; on a démontré que  $k_g$  était constant pour toutes les concentrations de  $Mg^{2+}$  testées. Ce résultat est très intéressant car il montre que le phénomène de bioaccumulation est le même dans toutes les conditions étudiées.

Le modèle proposé décrit globalement les effets de l'adsorption et de l'absorption. Ces phénomènes comportent des étapes complexes, mêlant transfert externe à la cellule, adsorption et pénétration dans la cellule ; ce dernier phénomène est lui-même composé d'un transfert à l'intérieur de la cellule couplé avec une réaction chimique de complexation interne. Le modèle d'adsorption sur la paroi est celui de Langmuir et la modélisation du transfert interne, inspirée des modèles mis en œuvre en catalyse hétérogène, est très innovante et permet de prendre en compte les vitesses respectives de la diffusion interne et de la complexation interne. Ce modèle global rend bien compte des résultats expérimentaux.

De façon schématique  $Mg^{2+}$  est transféré du cœur de la phase liquide vers la paroi des cellules, ce phénomène est décrit par le modèle de la couche limite, c'est le transfert externe. Au niveau adsorption on suppose qu'à l'interface les espèces sont à l'équilibre (type loi de Langmuir). Le magnésium adsorbé pénètre alors dans la cellule selon un mécanisme de diffusion de Fick à travers la membrane, avant d'être complexé par une ou des espèces intracellulaires, ce qui lui permet d'être solubilisé dans la cellule.

Le modèle proposé a pu être validé par les résultats expérimentaux obtenus pour toute la gamme de concentration de  $Mg^{2+}$  utilisée dans les cultures de *C. vulgaris* en autotrophie et en mixotrophie.

Par rapport à l'abondance des études liées aux microalgues, cette étude a mis en lumière des comportements originaux, confirmé la grande complexité des phénomènes physiologiques mis en jeu et éclairé une partie d'entre eux. Les résultats obtenus sont très intéressants et encourageants vis à vis d'une production de cellules *C. vulgaris* dopées en magnésium à

l'échelle industrielle. En effet l'intégration de magnésium dans la biomasse algale est un atout certain pour le développement de produits cosmétiques innovants, présentant des propriétés intéressantes, en s'affranchissant de l'ajout de substances chimiques potentiellement nocives.

### **Perspectives**

Ce travail de thèse a montré des résultats prometteurs et encourageants pour la bioaccumulation du magnésium par *C.vulgaris*.

Pour mener de façon rigoureuse ce projet jusqu'au développement industriel, plusieurs études restent à faire :

- Compréhension fine de la phase apparemment linéaire observée dans la culture de l'algue en autotrophie (mesures précises des concentrations d'oxygène et de CO<sub>2</sub>, dissous, de l'intensité de lumière à différents temps de la culture dans le bioréacteur...)
- Essais menés en mixotrophie avec des concentrations plus importantes en glucose
- Essais en hétérotrophie pure par l'emploi de glucose comme seule source de carbone sans lumière et étude de bioaccumulation de magnésium dans ces conditions
- Détermination du mode de culture le plus favorable et le plus rentable vis-à-vis de l'accumulation du métal avec une étude des effets de pH et de la température sur celle-ci.
- Essais en fed batch avec un apport continu de milieu frais contenant du glucose à la culture de l'algue en mixotrophie ; étude de la croissance, de l'adsorption et de l'absorption de magnésium.
- Localisation des ions accumulés dans les cellules par microscopie électronique et identification des compartiments /organites cellulaires dans lesquels se situe le métal.
- Affinage du modèle proposé vis à vis de l'internalisation du métal dans la cellule de microalgue
- Etude de l'état du métal en situation d'adsorption et d'absorption cellulaire, identification des ligands associés
- Extrapolation à l'échelle industrielle

Par ailleurs cette étude consacrée à *C. vulgaris* et au magnésium peut être étendue, au moins en terme de méthodologie, à d'autres métaux et d'autres microalgues comme *D. salina* connue aussi, pour son pouvoir de biosorption de métaux lourds.

## **Références bibliographiques**

**Aldrich A.P., Kistler D., Sigg L. 2002.** Speciation of Cu and Zn in drainage water from agricultural soils, *Environ. Sci. Technol.* 33 : 3615-3621.

**Adams-Phillips L., Barry C., Kannan P., Leclerc J., Bouzayen M., Giovannoni J. 2004.** Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Mol. Biol.* 4: 387-404.

**Ahii Chia M., Lombardi A.T., Da Garicia Melão M., Parrish C.C. 2013.** Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic toxicology* 171-182.

**Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M., Huntington, T., Hasan, M. 2008.** A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestical animals and fish .

**Ahuja P., Gupta R., Saxena R.K. 1999.** Zn<sup>2+</sup> biosorption by *Oscillatoria angustissima* Prerna. *Process Biochemistry* 34 : 77-85.

**Aksu Z. 2002.** Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto *Chlorella vulgaris*.

**Andersen R. A. 2005.** Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press.

**Andrade A.D., Rollemberg M.C.E., Nobrega J.A. 2005.** Proton and metal binding capacity of the green freshwater alga *Chaetophora elegans*. *Process Biochemistry* 40: 1931-1936.

**Arief V.O., Trilestari K., Sunarso J., Indraswati N., Ismadji S. 2008.** Recent Progress on Biosorption of Heavy Metals from Liquids Using Low Cost Biosorbents: Characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. *Clean* 36 : 937- 962.

**Arroyo T.H. 2011.** Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy* 35: 2245-2253.

**Asadpour Y.A., NejatkhahManavi P., Baniamam M. 2013.** Evaluating the Bioaccumulation of Nickel and Vanadium and their effects on the Growth of *Artemia urmiana* and *A. franciscana*, *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12 :183-192.

**Bajguz A. 2011.** Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of environmental contamination and toxicology* 60 : 406–416.

**Baker, J., Grover, J. P., Brooks, B. W., Urena-Boeck, F., Roelke, D. L., Errera, R., Kiesling, R.L. 2007.** Growth and toxicity of *Prymnesium parvum* (haptophyta) as a function of salinity, light, and temperature. *Journal of phycology* 43: 219-227.

**Barbier- Brygoo H., Vinauger M., Colcombet J., Geneviève E., Frachisse J.M., Maurel C. 2000.** Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 199-218.

**Barbier F.** Le cadmium. Etude bibliographique. Solaize: Service Central d'Analyse, 2003, 10 p.

**Barsanti L., Gualtieri P. 2014.** Algal culturing in: *Algae : anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor and francis group, LLC.

**Barthet L. 2003.** Contribution à l'évaluation de l'impact sur les écosystèmes de la valorisation de résidus de procédés thermique en BTP. Thèse de doctorat, institut nationale des sciences appliquées de Lyon 221p.

**Bartual A., Gálvez J.A. 2002.** Growth and biochemical composition of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at different pH and inorganic carbon levels under saturating and subsaturating light regimes. *Botanica Marina* 45 : 491-501.

**Ballatori N. 2002.** Transport of toxic metals by molecular mimicry, *Environ.Health Perspect.* 110 : 689-694.

**Becerra Celis G.P. 2009.** Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Thèse de Doctorat, Ecole supérieure d'électricité, Gif-sur-Yvette (France).

**Becker, E.W. 1994.** (ed.) *Microalgae Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press.

**Ben Amor-Ben Ayed H., Taidi B., Ayadi H., Pareau D., M. Stambouli . 2015.** Effect of magnesium ion concentration in autotrophic cultures of *Chlorella vulgaris*. *Algal Research* 9 : 291- 296.

**Benemann, J.R., Koopman, B.L., Weissman, J.C., Oswald, W.J.1997.** Solar energy conversion with microalgal sewage treatment ponds. Proc. Annual Meeting of the American Section of the International Solar Energy Society 1-5.

**Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S. K., Subburamu, K., Sanniyasi, E., Bux, F. 2011.** Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111: 377–382.

**Brandes D., Elston R.N. 1956.** An Electron Microscopical Study of the Histochemical Localization of Alkaline Phosphatase in the Cell Wall of *Chlorella vulgaris*. *Nature* 177: 274-275.

**Breithaupt D.E. 2004.** Identification and Quantification of Astaxanthin Esters in Shrimp (*Pandalus borealis*) and in a Microalga (*Haematococcuspluvialis*) by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Using Negative Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization, *Journal of agricultural and foodchemistry* 52: 3870-3875.

**Brennan L., Owende P. 2010.** Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.

**Bridges C.C., Zalpus R.K.2005.** Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*204: 274-308.

**Cacallo A. 2000.** These de doctorat: Conception, controle et fonctionnement d'un photobioréacteur pour la culture en mode continu de la cyanobactérie *Spirulina platensis*.

**Campbell P.G.C., Errecalde O., Fortin C., Hiriart-Baer V.P., Vigneaul B. 2002.** Metal bioavailability to phytoplankton applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology* 133 : 189-206.



**Campbell P.G.C., Tessier A. Current status of metal speciation studies. 1987.** In Patterson T.W. and Passino R. Eds. Proceedings of the international symposium on metals speciation, separation and recovery. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, USA, 201-224

**Campbell P.G.C. 1995.** in: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), Metal speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, John Wiley and Sons, Chichester., 45-102

**Carlsson, A.S., van Beilen, J.B., Möller, R., Clayton, D. 2007.** Micro-and macro-algae: utility for industrial applications, In: Bowles D, editor. Outputs from the EPOBIO project. UK: CPL Press. 82.

**Cerón-García, M.C., Macías-Sánchez M.D., Sánchez-Mirón A., García-Camacho, Molina-Grima E. 2013.** A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. Applied Energy 103:341-349.

**Chakraborti S., Chakraborti T., Mandal M., Mandal A., Das S., Ghosh S. 2002.** Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. Mol Cell Biochem 238: 163-79.

**Chebil Ajjabi L., Chouba L. 2009.** Biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  from aqueous solutions by dried marine green macroalga *Chaetomorpha linum*, Journal of Environmental Management 90: 3485-3489.

**Chen F., Zhang Y. 1997.** High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed batch system. Enzyme and Microbial Technology 20: 221-224.

**Chen G.Q., Chen F. 2006.** Growing phototrophic cells without light. Biotechnol. Lett. 28:607-16.

**Chen M., Tanga, H., Maa, H., Holland, T. C., Nga K. Y. S., Salley S. O. 2011.** Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology 102: 1649-1955.

**Chisti Y. 2007.** Biodiesel from Microalgae. In : Bio-technology Advances 25 : 294-306.

- Chojnacka K. 2007.** Using biosorption to enrich the biomass of *Chlorella vulgaris* with microelements to be used as mineral feed supplement . World J Microbiol Biotechnol. 23:1139-1147.
- Chong K., Wang W.X. 2001.** Comparative studies on the biokinetics of Cd , Cr, and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Environmental Pollution 115: 107-121.
- Chouteau C., Dzyadevych S., Chovelon J.M., Durrieu C. 2004.** Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae Biosensors and Bioelectronics 19 : 1089–1096.
- Chubanov V., Gudermann T., Schlingmann K.P. 2005.** Essential role for TRPM6 in epithelial magnesium transport and body magnesium homeostasis. Pflugers Arch. 451: 228-34.
- Chynoweth D.P.** Review of biomethane from marine biomass. University of Florida. 2002.
- Clément-Larosière B., Lopes F., Gonçalves A., Taidi B., Benedetti M., Minier M., Pareau D. 2014.** Carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities, Engineering in Life Sciences 14 : 509-519.
- Clemens S. 2001.** Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-786.
- Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P., Del Borghi M. 2009.** Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 48 (6), 1146-1151.
- Cornet J.F. 2010.** Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. Chemical Engineering Science 65 (2), 985–998.
- Craggs R. J., McAuley P. J., Smith V. J. 1997.** Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. Water Res. 31: 1701-1707.

**Crist R.H., Oberholser K., Shank N., Nguyen M. 1981.** Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* 15:1221-1217.

**Ciriolo M.R., Civitareale P., Carri M.T., Martino A.De., Galiazzo F. Rotilio G. 1994.** Purification and characterization of Ag, Zn –superoxide dismutase from *saccharomyces cerevisiae* exposed to silver . *J. Biol. Chem* 269: 25783-25787.

**Daniel G.F., Chamberlain A.H 1981.** Copper Immobilization in Fouling Diatoms. *Botanica Marina* 24: 229-244.

**Das Graças Nunes Matos M., Gouveia Diniz V., Augusto Moraes de Abreu C., Knoechelmann A., Lins da Silva V. 2009.** Bioadsorption and ion exchange of Cr<sup>3+</sup> and Pb<sup>2+</sup> solutions with algae. *Adsorption* 15: 75–80.

**Davis T. A., Volesky B., Mucci A. 2003.** A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae .*Water Research* 37 :4311-4330 .

**Dawes, C.J., Mathieson, A.C. 2008.** *The Seaweeds of Florida.* University Press of Florida, Gainesville.

**De la Noüe J., De Pauw N. 1988.**The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances* 6:723-770.

**Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. 2000.** Carotenoid and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth- promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research* 36: 2941-2948.

**Dinç E., Georgina Ceppi M., Szilvia Tóth Z., Bottka S., Schansker G. 2012.** The chl *a* fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl*a/b* ratio remains unaffected, *Biochimica et Biophysica Acta.* 1817:770-779.

**Dönmez G., Aksu Z .2002.** Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella species*. *Process Biochemistry* 38 : 751-762.

**Dönmez G., Aksu Z., Öztürk A., Kutsal T. 1999.** A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae *Process Biochemistry* 34 : 885-892.

- Doshi H., Ray A., Kothari I.L. 2007.** Biosorption of Cadmium by Live and Dead *Spirulina*: IR Spectroscopic, Kinetics, and SEM Studies.
- Doucha J., Straka F., Lívanský K. 2005.** Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp. in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 17 (5): 403–412.
- Dragone G., Teixeira J. A. 2011.** Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy* 88, 3331-3335.
- Droop M. R. 1974.** Heterotrophy of carbon. In Stewart, W. D. P. & Pierce, C. E. (Eds.) *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs, University of California Press, Los Angeles, pp: 530-59
- Dubinsky Z., Schofield O. 2010.** From the light to the darkness: thriving at the light extremes in the oceans. *Hydrobiologia* 639: 153–171.
- Dupont C., Nelson R., Bashir S., Moffet J., Ahner B. 2004.** Novel copper- binding and nitrogen –rich thiols produced and exuded by *Emiliana huxleyi* . *Limnol. Oceanogr* 49: 1754-1762.
- Elin R.J., Hosseini J.M., Gill J.R. 1994.** Erythrocyte and mononuclear blood cell magnesium concentrations are normal in hypomagnesemic patients with chronic renal magnesium wasting. *J. Am. Coll. Nutr.* 13: 463-6.
- Eriksen, N.T. 2008.** The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters.* 30: 1525-36.
- Eryilmaz I.E., Ozakca D.U., Kozak A. , Tuney I. 2013.** Determining the nitrite stress on green algae *Chlorella vulgaris* chloroplast. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 40 : 1-2.
- Falkowski, P. G., Sukenik, A., Herzig, R. 1989.** Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (haptophyceae) relative abundance of chloroplast proteins<sup>1</sup>. *Journal of Phycology* 25 (3), 471–478.
- Feng D., Aldrich C. 2004.** Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxima*. *Hydrometallurgy* 73:1-10.

**Ferro Y., Perullini M., Jobbagy M., Bilmes S. A., Durrieu C. 2012.** Development of a Biosensor for Environmental Monitoring Based on Microalgae Immobilized in Silica Hydrogels. *Sensors* 12: 16879-16891.

**Filali R., Tebbani S., Dumur D. Isambert A. Pareau D, Lopes F. 2011.** Growth modelling of the green microalga *Chlorella vulgaris* in an air-lift photo-bioreactor. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*. 18 :10603-10608.

**Florence T.M. 1982.** The speciation of trace elements in waters . *Talanta* 29: 345-364.

**Folgar S., Torres E., Pérez-Rama M., Cid A., Herrero C., Abalde J. 2009.** *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium, *Journal of Hazardous Materials* 165: 486-493.

**Fortin C., Dutel L., Garnier-Laplace J.2004.** Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 : 974-981.

**Fortin C., Campbell P.G.C. 2001.** Thiosulfate Enhances Silver Uptake by a Green Alga: Role of Anion Transporters in Metal Uptake. *Environ. Sci. Technol.* 35 : 2214-2218.

**Fraile A., Penche S., González F., Blázquez M. L., Muñoz J. A., Ballester A. 2005.** Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chemistry and Ecology* 21 : 61-75.

**Franklin N.M., Stauber J.L., Apte S.C., Lim R.P. 2002.** Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays, *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 742-751.

**Franklin N.M., Stauber J.L., Markich S.J., Lim R.P. 2000.** pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.), *Aquat. Toxicol.* 48: 275-289.

**García-Pérez S., Beuckels A., Vandamme D., Depraetere O., Foubert I., Parra R., Muylaert K. 2014.** Influence of magnesium concentration, biomass concentration and pH on flocculation of *Chlorella vulgaris* J. *Algal Research* 3: 24–29

**Ghaedi M., Fathi M.R., Shokrollahi A., Shajarat F. 2006.** Highly Selective and Sensitive Preconcentration of Mercury Ion and Determination by Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy. *Analytical Letters* 39, 1171-1185.

**Gin K.Y.H., Tang Y.Z., Aziz M.A. 2002.** Derivation and application of a new model for heavy metal biosorption by algae, *Water Research* 36: 1313-1323.

**Glodmann J.C., Riley C.R., Dennett M.R. 1982.** The effect of pH in the intensive microalgal cultures. II. Species competition. *J. Exp.Mar. Biol. Ecol.* 57:15-24.

**Gong R., Ding Y., Liu H., Chen Q., Liu Z. 2005.** Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *spirulina maxima* biomass. *Chemosphere* 58:125-130.

**Gorain P.C., Bagchi S.k., Mallick N.2013.** Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environmental Technology* 34: 1887-1894.

**Gordon H. T., Bauernfeind J. C. 1982.** Carotenoids as food colorants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18–59.

**Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardoso, M.T., Palavra, A.F., Mendes, R.L. 2007.** Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry* 101:717-723.

**Guiry, M. 2008.** Seaweed Site [Online]. Available from :<http://www.seaweed.ie/default.lasso> [Accessed 15 mars 2010]

**Hoek C.V., Mann D., Jahns H. 1995.** *Algae: an introduction to phycology*, pp:1-625.

**Günther T. 2006.** Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg<sup>2+</sup>. *Magnesium Research* 19 (4): 225-36.

**Gunther T. 2006.** Mechanisms, regulation and pathologic significance of Mg<sup>2+</sup> efflux from erythrocytes. *Magnes Res* 19: 190-8.

**Gupta V.K., Rastogi A., Nayak A.2010.** Biosorption of nickel onto treated alga (*Oedogonium hatei*): Application of isotherm and kinetic models. *Journal of Colloid and Interface Science* 34 : 533-539.

**Gupta V.K., Rastogi A.2008.** Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials* 152 : 407-414.

**Gupta V.K., Rastogi A.2008.** Biosorption of lead (II) from aqueous solutions by non-living algal biomass *Oedogonium* sp. and *Nostoc* sp.—A comparative study Vinod. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 64: 170-178.

**Gupta V.K., Rastogi A.2008.** Equilibrium and kinetic modelling of cadmium (II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium* sp. from aqueous phase.*Journal of Hazardous Materials* 153:759–766

**Gustafson, K.R., Cardellina, J.H., Fuller, R.W., Weislow, O.S., Kiser, R.F., Snader, K.M., Patterson, K.M.L., Boyd, M.R. 1989.** AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *Journal of the National Cancer Institute.* 81: 1254-1258.

**Gregor G., Beate F., Nies D.H. 2005.** Control of expression of periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals* 18: 437-448.

**Holtz R.L., Imam M.A. 1999.** Hydrogen storage characteristics of ball-milled magnesium – nickel and magnesium-iron alloys. *Journal of materials scientific* 34: 2655-2663.

**Hong S., Lee N.H. 1993.** Growth of *Spirulina platensis* in effluents from wastewater treatment plant of pig farm. *J. Microbiol. Biotechnol.* 3: 19-23.

**Hoppe, H.A. 1979.** Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (eds), *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin -New York, pp: 25-119.

**Huang Z., Li L., Huang G., Yan Q., Shi B., Xu X. 2009.** Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc, *Aquatic Toxicology* 91 : 54-61.

**Hudson R.J.M. 1998.** Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of nonequilibrium effects, *Sci. Total Environ.* 219: 95–115.

**Hulatt C.J., Thomas D.N. 2011.** Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors, *Bioresour. Technol.*102:5775-5787.

**Huner N. P. A., Öquist G., Sarhan F. 1998.** Energy balance and acclimation to light and cold. *trends in plant science* 3 (6): 224-230.

**Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W. 2000.** Increase in chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme Microb. Technol.* 27: 631-635.

**Jacob-Lopes E., Revah S., Hernández S., Shirai K., Franco T. T.2009.** Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemical Engineering Journal* 153: 120-126.

**Janssen M., Tramper J., Mur L.R., Wijffels R.H. 2002.** Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthesis efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering.* 81: 193-204.

**Jiang H., Gao K. 2004.** Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 40, 651–654.

**Jong-Yuh C., Mei-Fen S. 2005.** Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life sciences* 77 (9), 980–990.

**Justo G. Z., Silva M. R., Queiroz M. L. S. 2001.** Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 23 :119–132.

**Kadukova J., Vircikova E. 2005.** Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environment International* 31 : 227-232.

**Kaewpintong K., Shotipruk A., Powtongsook S., Pavasant P. 2007.** Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology* 98, 288–295.

**Kawano S. 1998.** Dual mechanisms of  $Mg^{2+}$  block of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Receptors Channels* 5: 405-16



- Khan, S., Naz, A., Asim, M., Ahmad, S., Yousaf, S., Muhamad, S. 2013.** Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach seedlings grown on freshly contaminated soil. Pak. J. Bot. 45: 501- 508.
- Kim M.H., Chung W.T., Lee M.K., Lee J.Y, Ohh S.J, Lee J.H., Park D.H, Kim D.J., Lee H.Y. 2000.** Kinetics of removing nitrogenous and phosphorus compounds from swine waste by growth of microalga, *Spirulina platensis*. J. Microbiol. Biotechnol. 10: 455-461.
- Kim M.K., Smith R. E. H. 2001.** Effect of ionic copper toxicity on the growth of green alga, *Selenastrum capricornutum*. J. Microbiol. Biotechnol. 11: 211-216
- Knauer K., Behra R., Sigg L. 1997.** Effects of free  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions on growth and metal accumulation in freshwater algae, Environmental Toxicology and Chemistry 16: 220-22.
- Konishi F., Tanaka K., Kumamoto S., Hasegawa T., Okuda M., Yano I., Yoshikai Y., Nomoto K. 1990.** Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. Cancer immunology, immunotherapy : CII 32 : 1–7.
- Kradjova I.B, Slaveykova V.I. , Tsalev D.L. 2008.** The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater. Aquatic toxicology 87: 264-271
- Kuyucak N., Volesky B. 1989.** Accumulation of cobalt by marine alga Biotechnology and Bioengineering .
- La Rocca N., Andreoli C., Giacometti G.M., Rascio N., Moro I. 2009.** Responses of the Antarctic microalga *Koliella antarctica* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) to cadmium contamination. Photosynthetica 47 (3): 471-479.
- Lee J., Cho D.H., Ramanan R., Kim B-H , Oh H.M., Kim H.S. 2013.** Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology 131:195-201.
- Lee M.Y., Woung S. H. 2003.** Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. Journal of Applied Phycology 15:13-19.
- Lee Y.K. 2004.** Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In Richmond, A. (Ed.) Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 116-24.

**Lee B.Y.K. 2001.** Carbon Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential, *Journal of Applied Phycology*. 13, pp: 307-315.

**Leonardos N., Harris G.N. 2006.** Comparative effect of light on pigments of two strain of *Emiliana Huxleyi* (haptophyta). *J. phycol.* 42: 1217-1224.

**Levy J, Stauber J, Dianne F. Jolley . 2007.** Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment* 387 : 141–154

**Li L., Gao N., Deng Y., Yao J., Zhang K. 2012.** Characterization of intracellular and extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystic aeruginosa* and formation of AOM- associated disinfection byproducts and odor & taste compounds. *Water resaech* 46: 1233-1240.

**Littler, D. S., Littler, M. M. 2000.** *Caribbean Reef Plants*. Offshore Graphics, Washington, D.C.

**Lorenz R. T., Cysewski G. R. 2000.** Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends biotechnology*, 18, 160–167.

**Lourenço S. O., Barbarino E., Lavín P. L., Marquez U. M., Aida E. 2004.** Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology* 39 (1), 17–32.

**Lv J.M., Cheng L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L. 2010.** Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 101: 6797-6804

**Leal F., Vasconcelos T., Van den Berg C. 2005.** Copper – induced release of complexing ligands similar to thiols by *Emiliana huxleyi* in seawater cultures, *Limnol . Oceanogr.* 44: 1750-1762.

**Ma M., Zhu W., Wang Z., Witkaamp G.J. 2003.** Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid, *Aquat. Toxicol.* 63: 221-228.

**Macfie P., Welbourn M. 2000.** The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the intracellulaklar green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Con. Tox.* 39 : 413-419.

**Mahdavi H., Liu Y., Ulrich A.C. 2013.** Partitioning and bioaccumulation of metals oil sands process affected water in indigenous *Prachlorella kessleri*. *Chemosphere* 90:1893-1899.

**Mahmood S., Ishtiaq S., Malik M.I., Ahmed A.2013.** Differential Growth And Photosynthetic Responses And Pattern Of Metal Accumulation In Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Cultivars At Elevated Levels Of Lead And Mercury, *Pak. J. Bot.* 45: 367-374.

**Mallick N. 2003 .** Biotechnological potentiel of *chlorella vulgaris* for accumulation of Cu and Ni from single and metal solutions. *World journal of Micro & Bio* .19: 695-701.

**Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N., Jan. 2010.** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (1): 217-232.

**Mayo A.W. 1997.** Effects of temperature and pH on the kinetics growth of unialaga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environment Federation* 69: 64-72.

**Mehne-Jakobs B. 1995.** The influence of Magnesium deficiency on carbohydrates concentrations in Norway spruce (*Piceaabies*) needles, *Tree Physiol.* 15: 577-584.

**Mehne-Jakobs B. 1996.** Magnesium deficiency treatment causes reductions in photosynthesis of well-nourished Norway spruce, *Trees* 10: 293-300.

**Mehra R., Mulchandani.1995.** Glutathione – mediated transfer of Cu (II) into phytochelatins. *Biochem. J.* 307: 697-705.

**Mehta S. K., Gaur J.P. 2001.** Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris* . *Ecological Engineering* 18 : 1-13.

**Mirón A.S., Cerón García M.C., Camacho F.G., Grima E.M., Chisti Y. 2002.** Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 1015-1023.

**Mizoguchi, T., Takehara, I., Masuzawa, T., Saito, T., Naoki, Y., Sep. 2008.** Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *Journal of medicinal food* 11 (3), 395–404.

**Monteiro C.M., A.P.G. Marques P.M.L. Castro, Malcata F.X. 2009.** Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. *Biodegradation* 20 : 629-641.

**Monteiro C.M., Castro P.M.L., Malcata FX. 2012.** Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Progress.* 28: 299-311.

**Monteiro C.M., Fonseca S.C., Castro P.M.L., Malcata F.X. 2011.** Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal, *J. Appl. Phycol.* 23:97–103

**Monteiro C.M., P.M.L. Castro, Malcata F.X. 2010.** Cadmium Removal by Two Strains of *Desmodesmus pleiomorphus* Cells. *Water Air Soil Pollut.* 208:17-27.

**Moraine, G. Shelef, A. Meydan, and A. Levi. 1979.** Algal single cell protein from wastewater treatment and renovation process. *Biotechnol. Bioeng.* 21 : 1191-1207,

**Morel F.M.M. 1983.** Principles of Aquatic Chemistry. Wiley InterScience, New York, NY, USA.

**Morel F.M.M., Hering J.G.1993.** Principles and Applications of Aquatic Chemistry, Wiley Interscience, New York.

**Morita K., Matsueda T., Iida T., Hasegawa T.1999.** *Chlorella* accelerates dioxin excretion in rats. *The Journal of Nutrition* 129 (9): 1731–1736.

**Moseley J.L., Chang C.W., Grossman A. R. 2006.** Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell* 5 (1): 26-44.

**Myers J. 1976.** Growth characteristics of algae in relation to the problems of mass culture in Burlew, J.S. (Ed.), *Algal culture: from laboratory to pilot plant*, Carnegie institution of Washington, Washington, D.C., pp: 37- 54.

**McKnight D., Morel F. 1979.** Release of weak and strong copper- complexing agents by algae , *Limnol. Oceanogr* 24: 823-837.

**Neff J.M. 2002.** Bioaccumulation in marine organisms : effect of contaminants from oil well produced water. The netherlands, Amsterdam.

**Nemcov A. Y., Kalina T. 2000.** Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) . *Algological Studies* 100 : 95-105

**Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I. , Tominaga N. 2003.** Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism *FEMS Microbiology Ecology* 44 : 253-259

**Nourbakhsh M., Sag Y., Özer D., Aksu Z., Kutsal T., Çağlar A. 1994.** A Comparative Study of Various Biosorbents for Removal of Chromium (VI) Ions from Industrial Waste Waters , *Process Biochemistry* 29: 1-5.

**Ogbonna J. C., Ichige E., Tanaka H. 2002.** Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58:532–538.

**Ogbonna J.C., Tanaka H.C. 1998.** Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/ dark cycles, *Bioresour. Technol.* 65: 62-72.

**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: 1229-1234

**Okamoto K., Iizuka Y., Murakami T., Miyake H., Suzuki T.1978.** Effects of *Chlorella alkali* extract on blood pressure in SHR. *Japanese heart journal* 19 (4): 622– 623.

**Paquin P.R., Santore R.C., Farley K.J., Kavvadas C., Wu K.B. Mooney K., Winfield R.P., Di Toro D.M. 2003.** (eds) . Metals in aquatic systems: a review of exposure, bioaccumulation, and toxicity models in: *Health and Environmental Research* .

**Patterson G.M.L., Baldwin C.L., Bolis C.M., Caplan F.R., Karuso H., Larsen L.K., Levine I.A., Moore R.E., Nelson C.S., Tschappat K.D., Tuang G.D., Furusawa E., Furusawa S., Norton T.R., Raybourne R.B. 1991.** Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *Journal of Phycology*. 27:530-536.

**Paulsson M., Mansson V., Blanck H. 2002.** Effects of zinc on the phosphorus availability to periphyton communities from the river Göta Älv. *Aquatic Toxicology* 56 : 103-113.

**Pérez J.A.M., García-Ribera R., Quesada T., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. 2008.** Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *paenibacillus jamilae*, *World. J. Micorbiol. Biotechnol.* 24: 2699-2704.

**Perner Rochta I., Lucumi A., Posten C. 2007.** Photoautotrophic cell and tissue culture. *Eng. Live .Sci.*7: 127-135.

**Persic V., Horvatic J., Has-Schön E., Bogut I. 2009.** Changes in N and P limitation induced by water level fluctuations in nature park kopackirit (croatia): nutrient enrichment bioassay. *Aquatic Ecology* 43 (1): 27–36.

**Phinney J.T. Bruland K.W.1997.** Effects of dithiocarbamate and hydroxyquinole additions on algal uptake of ambient copper and nickel in South San Francisco Bay water. *Estuaries* 20: 66-76.

**Phukan M. M., Chutia R. S., Konwar B. K., Katakai R. 2011.** Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Applied Energy* 88 (10).

**Pinheiro J.P., Van Leeuwen H.P. 2001.** Metal speciation dynamics and bioavailability. 2. Radial diffusion effects in the microorganism range. *Environ. Sci. Technol.* 35: 894-900.

**Pinto A. P., Mota A.M. de Varennes A., Pinto F.C. 2004.** Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of Total Environment* 326: 239-247.

**Porra R. 1990.** The assay of chlorophylls a and b converted to their respective magnesium rhodochlorin derivatives by extraction from recalcitrant algal cells with aqueous alkaline methanol: Prevention of allomeization with reductant, *Biochim. Biophys. Bioenerg*, 1015: 493-502.

**Powell E., Mapiour M. L., Evitts R. W., Hill G. A. 2009.** Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half cell. *Bioresource Technology* 100 (1): 269–274

**Pugh N., Ross S. A., ElSohly H. N., ElSohly M. A., Pasco D. S. 2001.** Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta medica* 67 (8): 737–742.

**Pulz O., Gross W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae, Minireview, *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 635- 648.

**Pulz O. 2007.** Performance Summary Report. Evaluation of GreenFuel's 3D Matrix Algae Growth. Engineering Scale Unit. APS Red Hawk Power Plant. [online] Available from: [http://moritz.botany.ut.ee/~olli/b/Performance\\_Summary\\_Report.pdf](http://moritz.botany.ut.ee/~olli/b/Performance_Summary_Report.pdf) [Accessed 26 September 2007] .

**Pushparaj B., Pelosi E., Torzillo G., Materassi R. 1993.** Microbial biomass recovery using a synthetic cationic polymer. *Bioresource Technology* 43 : 59-62.

**Qiang H., Zarmi Y., Richmond A. 1998.** Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *European Journal of Phycology* 33 (02), 165–171. 7

**Qiao H., Wang G., Zhang X. 2009.** Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. *J. Phycol.* 45:1153- 62.

**Quamme A., de Rouffignac C. 2000.** Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney gary. *Frontiers in Bioscience* 5:694-711

**Quamme G.A., De Rouffignac C. 2000.** Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front. Biosci.* 5: 694-711.

**Rai U.N., Singh N.K., Upadhyay A.K., Verma S. 2013.** Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L.: Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresource Technology* 136: 604- 609.

**Rajfur M. 2013.** Algae - Heavy Metals Biosorbent / Glony - Biosorbent Metali Ciężkich. Ecological Chemistry and Engineering 20 : 23-40.

**Reinhart R.A. 1988.** Magnesium metabolism. A review with special reference to the relationship between intracellular content and serum levels. Arch Intern Med. 148: 2415-20.

**Richmond A. 2004.** Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, pp.1-588.

**Richmond A. 2007.** Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science.

**Rösch C., Posten C. 2012.** (eds). Introduction to the thematic Focus. Technikfolgenabschätzung Theorie und Praxis. Karlsruher institute für Technologie.

**Rocha J.M., Gracia J.E., Henriques M.H. 2003.** Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. Biomol. Eng. 20: 237- 242.

**Ross, A., Jones, J., Kubacki, M., Bridgeman, T. 2008.** Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behavior. Bioresource Technology 99: 6494–6504

**Rowley W. M. 2010.** Nitrogen and phosphorus biomass-kinetic model for *Chlorella vulgaris* in a biofuel production scheme.

**Sakellari A., Karavoltos S., Theodorou D., Dassenakis M., Scoullas M. 2013.** Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves *M. galloprovincialis*, *P. radiata*, *V. verrucosa* and *C. chione* in Mediterranean coastal microenvironments: association with metal bioavailability. Environ. Monit. Assess. 185: 3383- 3395.

**Sarı A., Tuzen M. 2008.** Biosorption of Pb (II) and Cd (II) from aqueous solution using green alga (*Ulva lactuca*) biomass. Journal of Hazardous Materials 152 : 302-308.

**Saris N.E., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A. 2000.** Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin Chim Acta 294: 1-26

**Sarma S.J., Das R.K., Brar S.K., Bihan Y.L., Buelna G., Verma M., Soccol C.R. 2014.** Application of magnesium sulfate and its nanoparticles for enhanced lipid production by mixotrophic cultivation of algae using biodiesel waste, Energy 78: 16-22.



**Scheer H.** 1991. Chlorophylls, (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp.1-1257.

**Schmitz C., Deason F., Perraud A.** 2007. Molecular components of vertebrate magnesium homeostasis regulation. *Magnes. Res.* 20: 6-18

**Schwenk J.R.** 2012. Effects of magnesium sulfate, digestate, and other inorganic nutrients on the phototrophic growth of the green microalga *Scenedesmus dimorphus*. Master Of Science In Chemical Engineering . Cleveland State University 1-71.

**Sehna L., Váci P., Barták M.** 2014. Effect of temperature and increased concentration of CO<sub>2</sub> on growth and photosynthetic activity of polar alga *Trebouxia* sp. *Czech Polar Reports* 4: 47- 56.

**Senthilkumar R., Vijayaraghavan K., Thilakavathi M., Iyer P.V.R., Velan M.** 2006. Seaweeds for the remediation of wastewaters contaminated with zinc(II) ions. *Journal of Hazardous Materials B136* :791-799.

**Serra A., Guasch H., Admiraal H.G. , Van der Geest S., Van Beusekom A.M.** 2010. Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: The role of chemical, physiological and community- related factors. *Ecotoxicology* 19: 770-780.

**Shaul O.** 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals* 15: 309-323.

**Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P.**1998. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program—biodiesel from algae. NREL/TP580-24190. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development.

**Shelef G. A., Sukenik A., Green M.** 1984. Microalgae harvesting and processing: A literature review, Report, Solar Energy Research Institute, Golden Colorado, Seri/Str-231-2396.

**Shi X.M., Zhang X.W., Chen F.** 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb. Technol.* 27:312-8.

**Simkiss K, Taylor M.G.** 1995. Transport of metals across membranes. In: Tessier , A., Turner, D.R. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems . John Wiley& Sons, New-York 1-44.

**Sinha S., Bhatt K., Pandey K., Singh S., Saxena R. 2003.** Interactive metal accumulation and its toxic effects under repeated exposure in submerged plant *Najas indica cham*, Bull. Environ. Toxicol. 70: 696-704.

**Skjanes K., Lindblad P., Muller J. 2007.** Bio CO<sub>2</sub> – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. Biomolecular Engineering 24: 405-413.

**Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. 2003.** A. Ceresa, E. Pretsch, Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*, Environ. Sci. Technol. 37:1114-1121.

**Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. 2003.** Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*, Environmental Chemistry Letters 1: 185-189.

**Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. 2005.** Predicting the bioavailability and metal complexes of metals : critical review of the biotic ligand model , Environ . Chem. 2: 9-24.

**Soletto D., Binaghi L., Ferrari L., Lodi A., Carvalho J. C. M., Zilli M., Converti A. 2008.** Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulsefeeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. Biochemical Engineering Journal 39 (2): 369–375.

**Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006.** Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 8796.

**Stolz, P., Obermayer B. 2005.** Manufacturing microalgae for skin care. Cosmetics Toiletries, 120: 99-106.

**Siripornadulsil S., Traina S., Verma D., Sayre R. 2002.** Molecular mechanism of proline – mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic micro-algae, Plant Cell 14:1501-1516.

**Subba D.V., Pan Y., Al-Yamani F. 2005.** Growth and photosynthetic rates of *Chlamydomonas plethora* and *Nitzschia frustula* cultures isolated from Kuwait bay, Arabian gulf, and their potential as live algal food for tropical mariculture. Marine Ecology 26 (1): 63–71.

**Sukenik A., Shelef G. 1984.** Algal autoflocculation-verification and proposed symbiotic *Chlorella* species, *Phytochemistry* 31: 3103-3104.

**Sumi Y. 2009.** *Microalgae Pioneering the Future -Application and Utilization*, Life Science Research Unit, quarterly review No.34.

**Sun Y., Wang C. 2009.** The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus, Zn<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub>, and light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14 (2), 225–231.

**Sunda W.G, Huntsman S.A., 1992.** Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater, *Limnol.Oceanogr.* 37: 25-40.

**Sunda W., Huntsman S.A., 1998.** Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. *The science of Total Environment* 219:165-181.

**Sunda W., Huntsman S.A., 2000.** Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: implications for oceanic Cd cycling. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1501-1516.

**Sushchik, N. N., Kalacheva, G. S., Zhila, N. O., Gladyshev, M. I., Volova, T. G., May 2003.** A temperature dependence of the intra- and extracellular Fatty-Acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (3): 374–380.

**Taher H., Al Zuhair S., Al-Marzouqi A., Haik Y., Farid M.2011.** An review of enzymatic transesterification of microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. *Enzyme research.*25p.

**Takeda H. 1993.** Chemical Composition of Cell Walls as a taxonomical Marker. *I.Plant. Res.* 106: 195-200.

**Taylor, W. R. 1960.** *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas.* University of Michigan Press, Ann Arbor.

**Taylor, W. R. 1957.** *Marine algae of the northeastern coast of North America.* University of Michigan Press, Ann Arbor.

**Tenny M.K., Echelberger W.F., Roland Jr., Schuessler G., Pavoni J.L. 1969.** Algal Flocculation with Synthetic Organic Polyelectrolytes. *Applied Microbiology* (18): 965-971

**Ting Y.P., Lawson F., Prince I.G. 1991.** Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*: II. Multi-Ion Situation. *Biotechnology and bioengineering* 37: 445- 455.

**Torres M.A., Barros M.P., Campos S.C.G., Pinto E, Rajamani S., Sayre R.T., Colepicolo P.2008.** Biochemical markers in algae and marine pollution : Areview. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1-15.

**Touyz R.M. 2004.** Magnesium in clinical medicine. *Front Biosci.* 9: 1278-93.

**Turner A., Furniss O. 2012.** An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of thallium in the coastal marine environment using the macroalga , *Ulva lactuca*. *Marine Pollution Bulletin* 64:2720-2724.

**Twiss M.R., Nalewajko C.1992.** Influence of phosphorus nutrition on copper toxicity to three strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Journal of phycology* 28: 291-298.

**Hanikenne M., Kramer U., Demoulin V., Baurain D. 2005.** A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschizon merolae*. *Plant. Physiol.* 137: 428-446.

**Hashemi F., Leppard GG Kushner D.J. 1994.** Copper Resistance in *Anabaena variabilis*: effects of Phosphate Nutrition and Polyphosphate Bodies. *Microb. Ecol.* 27:159-176.

**Uduman N., Qi Y., Danquah M.K., Forde1 G.M., Hoadley A. 2010.** Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuel. *Journal of renewable and sustainable energy* 2: 1-15.

**Vandamme D., Foubert I., Fraeye I., Meesschaert B., Muylaert K. 2012.** Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications, *Bioresource Technology* 105: 114-119.

**Vannela R., Verma S.K. 2006.** Cu<sup>2+</sup> Removal and recovery by Spi SORB: batch stirred and up-flow packed bed columnar reactor systems. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 29: 7-17.

**Varela D. E., Willers, Crawford, D. W. 2011.** Effect of zinc availability on growth, morphology, and nutrient incorporation in a coastal and an oceanic diatom. *Journal of Phycology.* 47(2): 302-312.

**Vernon L.P., Seely G.R. 1966.** The Chlorophylls, (eds.), Academic press, London, New York, , pp:1-671.

**Vogel M., Günther A., Rossberg A., Li B., Bernhard G., Raff J. 2010.** Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity . Science of the Total Environment 409 : 384-395.

**Voronova E. N., Konyukhov I. V., Pogosyan Yu. S. I., Rubin A. B. 2008.** Changes in the condition of photosynthetic apparatus of a diatom alga *Thalassiosira weissflogii* during photoadaptation and photodamage. Russian Journal of Plant Physiology 56 (6), 753– 760.

**Wang N.X, Li B., Deng X.H, Miao A.J., Ji R., Yang L.Y. 2013.** Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes, Water research 47: 2497-2506.

**Wang W.X. DEI Robert C.H. Xu Y. 2001.** Cadmium uptake and trophic transfer in coastal plankton under contrasting nitrogen regimes. Progress series 211: 293-298.

**Weiss M., Haimovich G., Pick U. 2001.** Phosphate and sulfate uptake in the halotolerant alga *Dunaliella* are driven by Na<sup>+</sup> -symport mechanism. J. Plant.Physiol. 158:1519-1525.

**Wen, Z., Johnson, M. B. 2009.** Microalgae as a feedstock for biofuel production, Virginia Cooperative Extension Publication pp: 442-886.

**Wilde K.L., Stauber J.L., Markich S.J., Franklin N.M., Brown P.L. 2006.** The Effect of pH on the Uptake and toxicity of Copper and Zinc in a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella sp.*). Arch.Environ .Contam.Toxicol. 51:174-185.

**Wilkinson K.J., Buffle J. 2004.** in: H.P. van Leeuwen, W. Köster (Eds.), Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces, John Wiley and Sons, Chichester.

**Wood M., Everroad C.2005.** Measuring growth rates in microalgal cultures in Anderson, R.A.A (ed.), Algal Culturing techniques, Elsevier academic press, pp: 269-286.

**Worms I., Simon D.F, Hassler C.S., Wilkinson K.J. 2006.** Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. Biochimie 88: 1721-1731.

**Wright S.W. & Jeffrey S.W. 2005.** Pigment markers for phytoplankton production, hand book of environmental chemistry. Springer verlag, Berlin, pp: 71-104.

**Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q. 2008.** High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied microbiology and biotechnology* 78 (1): 29-36.

**Yalçın E., K. Çavuşoğlu, Maras M., Büyükoğlu M. 2008.** Biosorption of Lead (II) and Copper (II) Metal Ions on *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (Chlorophyta) Algae: Effect of Algal Surface Modification. *Acta Chim. Slov.* 55 : 228-232.

**Yang J., Lia X., Hua H., Zhang X., Yua Y., Chen Y. 2011.** Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents. *Applied Energy* 88, 3295–3299.

**Yeh K.L., Chang J.S., Chen W.M. 2010.** Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.* 10 (3), 201–208.

**Yuan-Kun L., Sun-Yeun D., Chye-Hock H., Chin-Seng L. 1996.** Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 8: 163-169.

**Yukiho Y., Osamu T., Hiroyuki F., Kastuji M. 1999.** Effect of glutathione on arsenic accumulation by *Dunaliella Salina*, *Applied Organometallic Chemistry* 13: 89-94.

**Zemke PE, Wood BD, Dye DJ. 2010.** Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass energy* 145.

**Zhang A., Cheng T.P., Altura B.M. 1992.** Magnesium regulates intracellular free ionized calcium concentration and cell geometry in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1134: 25-9.

**Zhang W., Tanab N.G.J., Li S.F.Y. 2014.** NMR-based metabolomics and LC-MS/MS quantification reveal metal-specific tolerance and redox homeostasis in *Chlorella vulgaris*, *Mol. BioSyst.* 10: 149-160.

**Zhou G.J., Peng F.Q., Zhang L.J., Ying G.G. 2012.** Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella*, *Environmental Science and Pollution Research* 19: 2918-2929.

**Zijffers J.W.W., Schippers K. J., Zheng K., Janssen M., Tramper J., Wijffels R. H. 2010.** Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.) 12 (6):708–718.

## **Annexes**



**Annexe1: Milieu Bristol 3N modifié (Bischoff and Bold, 1963)**

Ce milieu comprend trois solutions A, B et microéléments.

Chacune de ces solutions sera préparée séparément et conservée au frais à l'abri de la lumière.

Composition du milieu de culture :

Solution A :

	Masse / 250 mL	Masse/ 1L	Concentration massique dans le milieu Bristol 3N	Concentration molaire dans le milieu Bristol 3N (mol L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	18.75 g	75 g	0.75 g	0.0088
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	625 mg	2.5 g	25 mg	1.93 <sup>E</sup> -4
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.875 g	17.5 g	75 mg	3.045 <sup>E</sup> -4
FeEDTA	500 mg	2.0 g	20 mg/l	5.75 <sup>E</sup> -5

Solution B :

	Masse / 250 mL	Masse/ 1L	Concentration massique dans le milieu Bristol 3N	Concentration molaire dans le milieu Bristol 3N (mol/L)
$K_2HPO_4$	1.875 g	7.5 g	75 mg	0.00043
$KH_2PO_4$	4.375 g	17.5 g	175 mg	0.00128

Solution de microéléments

	Masse / 250 mL	Poids/ 1L	Poids/L de milieu	Concentration (mol/L)
$H_3BO_3$	715 mg	2.86 g	2.86 mg	$4.61^E-5$
$MnCl_2, 4H_2O$	452.5 mg	1.81 g	1.81 mg	$1.20^E-5$
NaCl	0.5 g	2.0 g	20 mg	$3.41^E-4$
$ZnSO_4, 7H_2O$	55 mg	220 mg	220 $\mu$ g	$1.149^E-6$
$CuSO_4, 7H_2O$	20 mg	80 mg	80 $\mu$ g	$4.221^E-7$
$MoO_3$ 85%	9 mg	36 mg	36 $\mu$ g	$2.5^E-7$

Pour préparer 1 litre de milieu, mélanger :

10 mL de la solution A

10 mL de la solution B

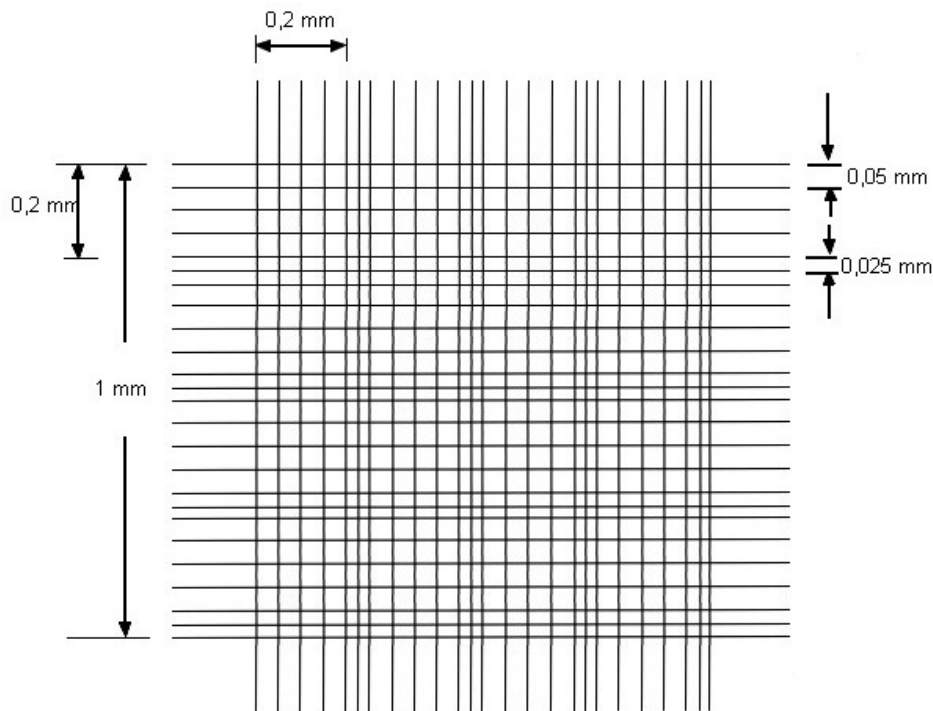
1 mL de la solution microéléments

Ajuster à 1L avec l'eau distillée

## Annexe II : Protocoles d'analyses

### *Annexe II.1. Comptage cellulaire au microscope par la cellule de thoma*

Le principe de la méthode consiste à effectuer, à l'aide d'un microscope optique, un dénombrement des cellules microalgales présentes dans un volume connu de la cellule de Thoma et dans les limites des 16 grands carrés composés chacun à son tour par 16 petits carrés. Le volume total des 16 grands carrés de  $10^{-4}$  mL.



**Figure 38. Cellule de Thoma**

Sachant que :

$$\text{Aire} = 0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^2 ; \text{Volume} = 0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 = 2,5 \times 10^{-7} \text{ mL}$$

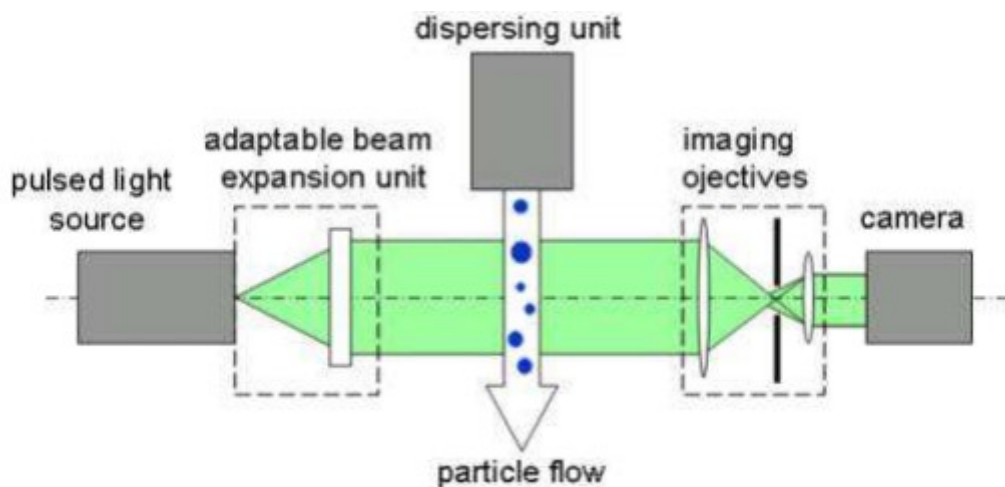
La concentration cellulaire (cellule mL<sup>-1</sup>) est calculée donc avec l'équation suivante:

$$\text{Nombre de cellule totales} = \frac{\text{Nombre de cellules comptées}}{\text{nombre de carrés}} \cdot 4 \cdot 10^6$$

### ***Annexe.II.2. Principe de la méthode de mesure de la taille et la concentration cellulaire au granulomètre laser***

Le granulomètre à diffraction laser permet de donner des distributions granulométriques rapides et précises. Il est capable de mesurer des plages de tailles de particules allant du nanomètre au millimètre. La méthode granulométrique résulte de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident. En effet, les particules présentes sur le chemin d'un faisceau de rayons laser diffractent les rayons lumineux en fonction du diamètre de ces particules. La mesure se base sur l'analyse de la tâche de diffraction du faisceau.

L'image du faisceau est diffractée via une lentille convergente en forme d'anneaux sur un détecteur (caméra) situé dans le plan focal (Figure 39). Le traitement mathématique donne un diamètre moyen et la distribution en taille des particules en se basant sur une distribution en volume.



**Figure 39. Principe de granulomètre laser**

Dans ce travail de thèse, des essais de mesure de la taille des cellules des microalgues ont été réalisés sur le granulomètre avec un système d'analyse d'image, de diffraction laser de type QICPIC (Sympatec) et un système de dispersion de particules de type LIXELL (figure 40). La lentille (0,2 mm) a été utilisée dans ce dispositif. L'apport de la solution algale est assuré à l'aide d'une pompe. Avant de commencer l'analyse, l'échantillon est soumis à une

étape de sonication (utilisation des ultra-sons pendant 5 à 10 minutes) dans le but de rompre les agrégats cellulaires suivi d'une étape de dilution selon la concentration cellulaire à mesurer. Le logiciel de traitement des données utilisé (WINDOX) est introduit dans une unité centrale permettant de positionner la lentille dans le plan focal et de mesurer la concentration moyenne de l'échantillon ainsi que sa distribution en fonction de la taille des particules. La précision des mesures est estimée à  $\pm 5\%$  pour cette méthode. En comparaison avec d'autres techniques de comptage, cette méthode permet la rapidité des analyses, la reproductibilité en garantissant la précision des mesures cohérentes et satisfaisantes.

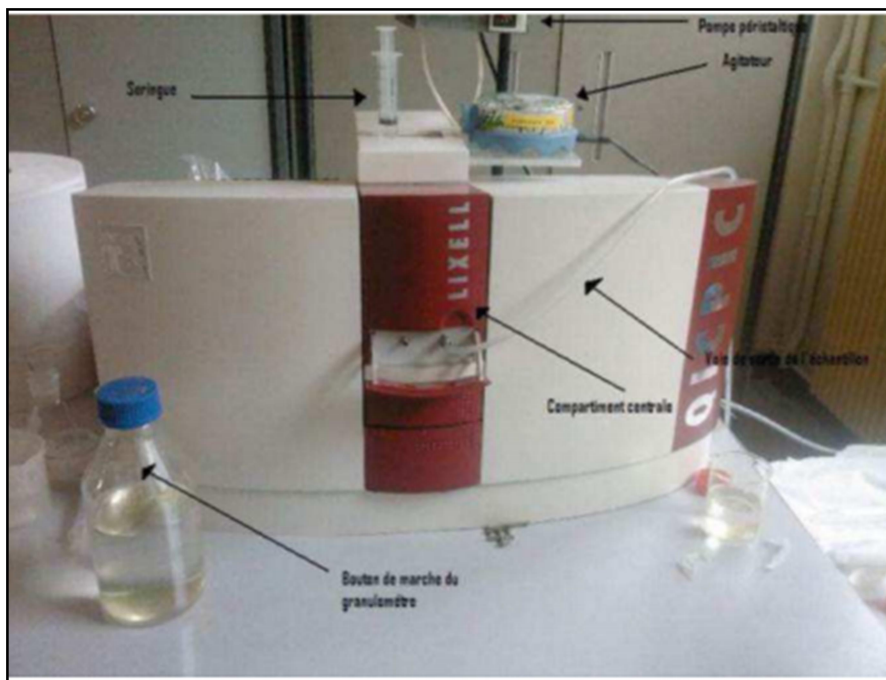


Figure 40. Granulomètre laser QICPIC (SympaTEC)

#### ✚ Mesure de l'intensité lumineuse

La mesure de l'intensité lumineuse est réalisée via un photomètre avec un capteur LICOR LI-190 SA relié à un boîtier de mesure de genre LI-250. La mesure est obtenue en effectuant la moyenne de trois mesures réalisées à des endroits préalablement définies sur la surface du réacteur. La précision de mesure est évaluée à  $\pm 0,4\%$  fournie par le constructeur. Trois modes de mesures ont été effectuées sur le photobioréacteur vide, l'intensité lumineuse incidente par orientation du capteur vers la source de lumière et l'intensité lumineuse entrante à l'intérieur du bioréacteur.

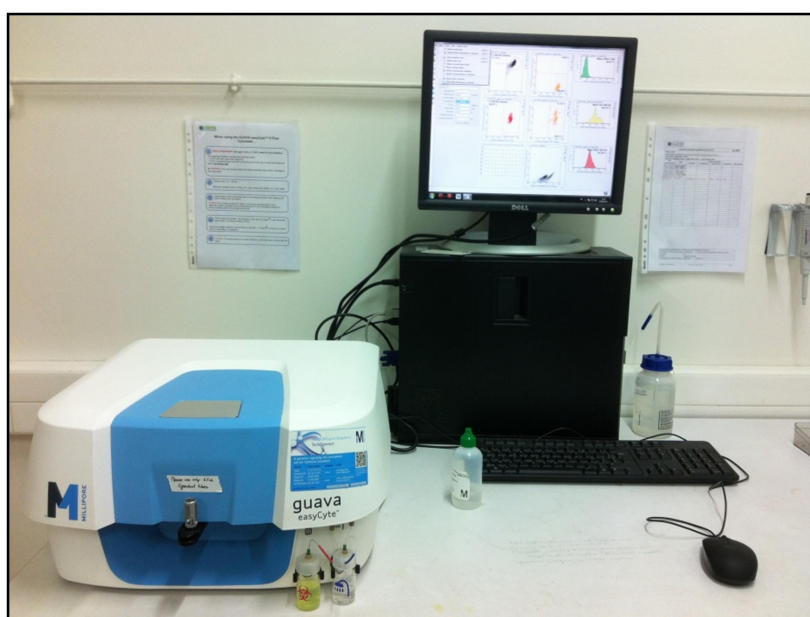
### **Annexe.II. 3 : Protocole de mesure de la viabilité et la concentration cellulaire au cytomètre de flux GUAVA**

Le cytomètre de flux à base de cellules, fournit un large éventail d'applications. Il permet ainsi d'étudier le dépistage, le phénotypage cellulaire, et le suivi de la croissance cellulaire. C'est dans cette dernière optique d'application, l'appareil a été exploité dans cette thèse.

Afin de suivre la croissance de *C. vulgaris*, le comptage et la viabilité cellulaire ont été suivis par le cytomètre de flux « Guava easy cyte » (figure 41) en utilisant la méthode « ViaCount ».

#### **Principe de la méthode**

Le réactif « ViaCount » permet de colorer différemment les cellules viables et mortes selon leur perméabilité aux colorants spécifiques à la liaison à l'ADN dans le réactif. La fluorescence de chaque colorant est résolue, ce qui donne l'évaluation quantitative des cellules nucléées viables et mortes présents dans une suspension.



**Figure 41. Cytomètre de flux « Guava EasyCyte »**

Le système compte les événements nucléés colorés, ensuite utilise les propriétés de diffusion vers l'avant (FSC) afin de distinguer à partir de la suspension, les noyaux libres et les débris cellulaires pour déterminer un nombre précis de cellules.

Avant chaque utilisation, une calibration du type « EasyChek » a été réalisée pour s'assurer de la précision et la reproductibilité des mesures. Cette calibration se fait par une solution préparée avec des réactifs spécifiques fournis par le constructeur.

Chaque échantillon doit être diluée afin d'être dans la bonne gamme de mesure, un volume du réactif « ViaCount » équitable au volume de l'échantillon doit être ajouté à celui-ci. Après une bonne agitation au vortex, le mélange échantillon et réactif est par la suite analysé au logiciel ViaCount. Ce logiciel doit procéder à un ajustement des paramètres de détection (FSC) du nuage cellulaire qui s'affichait à l'écran juste avant de passer à l'analyse.

Le Logiciel contient un algorithme de « EasyFit » permet une meilleure sélection des cellules vivantes, des cellules mortes et des débris cellulaires lorsque ces populations présentent un chevauchement dans un ou plusieurs paramètres. L'algorithme « EasyFit » effectue une analyse tridimensionnelle. En outre, il est plus précis car il est beaucoup moins affecté par la présence de débris contaminants.

Cependant, dans ce travail de thèse, une analyse manuelle de données a été faite sur ce logiciel qui contient un marqueur de viabilité, ainsi qu'un marqueur de l'apoptose ce qui permet de distinguer entre les deux populations cellulaires. Le logiciel affiche alors les résultats en fonction des paramètres du marqueur. Les résultats comprennent un nombre précis des cellules viables, le nombre total de cellules (cellules mL<sup>-1</sup>) et du pourcentage de viabilité de la biomasse. La mesure des cellules est donnée en se basant sur le facteur de dilution et le volume initial de l'échantillon.

Les résultats ViaCount sont enregistrés dans un fichier de données y compris tous les informations d'acquisition pour tous les échantillons.

En comparaison avec d'autres méthodes, cette technique permet d'assurer des mesures rapides et reproductibles. En plus, elle permet une calibration simple ainsi qu'une souplesse opératoire.

#### ***Annexe.II.4. Protocole d'extraction et de quantification de la chlorophylle a***

##### *Protocole de préparation de l'échantillon*

Afin d'extraire la chlorophylle des cellules de *C. vulgaris* au cours de la croissance, des échantillons de 1 mL de culture sont prélevés et centrifugés 10 minutes à 6440 g. Ensuite,

---

1mL d'une solution de méthanol 85% contenant 1.5 mmol.L<sup>-1</sup> de sodium dithionite est ajouté sur le culot. Le sodium dithionite permet de casser les ponts disulfures des protéines de la paroi cellulaire, ce qui rend ainsi la paroi plus poreuse au méthanol (Porra, 1990). Ensuite, les échantillons sont placés à 40°C pendant 32 minutes. Tout au long de protocole, les échantillons sont gardés à l'obscurité afin d'éviter toute dégradation de la chlorophylle par la lumière (McIntyre and Cullen, 2005). Après extraction, les échantillons sont re-centrifugés (10 minutes, 6440 g). Les surnageants sont gardés pour mesurer leur absorbances aux longueurs d'ondes 664 et 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Il est possible de déterminer la concentration en chlorophylle *a* et *b* (Porra, 1990) en se basant sur les équations suivantes:

$$\text{Chl } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 16.41 A_{664} - 8.09 A_{650}$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 30.82 A_{650} - 12.57 A_{664}$$

Avec

$A_{664}$ : Absorbance de la culture mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 664$  nm

$A_{650}$ : Absorbance de la culture mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 650$  nm

#### ***Annexe.II.5. Analyse de la fraction en carbone, hydrogène, azote et soufre intracellulaire de *Chlorella vulgaris* (CHNS)***

Afin de suivre l'évolution de carbone et d'azote au cours de la croissance des algues, des analyses CHNS ont été fait à l'aide d'un analyseur élémentaire FLASH 2000 series CHNS/O analyser. (Thermo Scientific) (Figure 42).



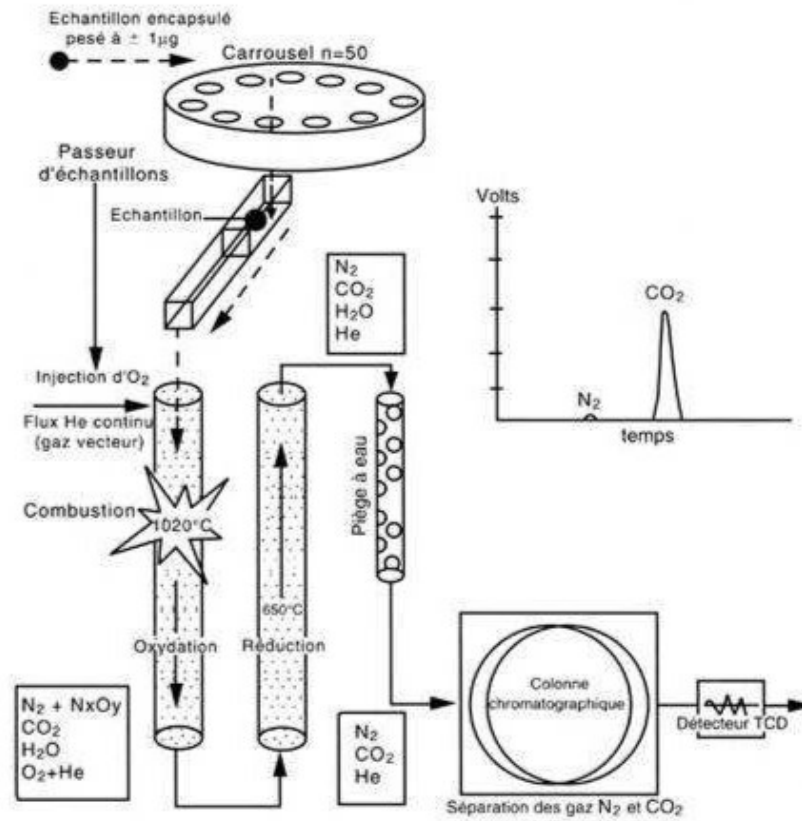


Figure 42. Principe de fonctionnement de l'analyseur élémentaire

### Principe de l'appareil

L'analyse élémentaire par combustion fait intervenir deux tubes installés en série dans une enceinte calorifugée dont chacun est chauffé indépendamment. Le premier tube est le siège de la réaction d'oxydation et le deuxième celle de réduction (figure 42).

Les réactions :

Dans le tube de gauche (CHNS)



$C \rightarrow CO_2 \rightarrow CO_2$  dont le cuivre est le catalyseur de réduction

$H \rightarrow H_2O \rightarrow H_2O$

$S \rightarrow SO_3 \rightarrow SO_2$

Dans le tube de droite (CN)

$NO_x \rightarrow N_2$

$CO_2 \rightarrow CO_2$  combustion

$H_2O \rightarrow H_2O$

$SO_2 \rightarrow SO_3 \rightarrow SO_3$

Toutefois, afin de s'affranchir des problèmes de fractionnement isotopique, il faut que la combustion soit totale. Dans ce contexte, beaucoup de précautions sont donc prises. Tout d'abord, un excès d'oxygène est apporté lors de la combustion de l'échantillon.

L'échantillon est emballé dans des capsules d'étain qui ont la propriété d'augmenter rapidement la température de 300°C. Enfin, le tube est conditionné à l'aide des catalyseurs de la réaction d'oxydation (oxydes de cuivre) de telle manière à ce que l'échantillon tombe dans la zone la plus chaude du tube.

Après réduction à l'aide de paillettes de cuivre réduit, le gaz passe par un piège à eau constitué de perchlorate de magnésium -  $Mg(ClO_4)^2^-$  couramment dénommé « anhydron ».

Il entre ensuite dans une colonne chromatographique, qui sépare les différents gaz élémentaires avant leur introduction dans le catharomètre (détecteur).

Le principe de mesure du détecteur est basé sur la conductibilité thermique du gaz (Thermal Conductivity Detector – TCD). Le capteur compare la conductivité du gaz de la référence et celle à analyser grâce à un détecteur filament.

Le détecteur est un catharomètre basé sur la mesure des variations de conductivité thermique d'un flux de gaz. Il possède deux circuits gazeux, un circuit de référence où circule le gaz vecteur pur (Hélium) et un circuit de mesure balayé par un flux gazeux comportant le gaz vecteur ainsi que les gaz dégagés par la combustion des échantillons (azote moléculaire et dioxyde de carbone).

### Protocole de préparation des échantillons

1. L'échantillon prélevé de la culture algale est centrifugé (10 min, 1800 g), le culot est lavé et recentrifugé à (10 min, 1800 g).
2. Le culot est séché au four à 105°C pendant 24 h
3. Le culot sec est pesé (0.8 à 2 mg maximum) sur la balance de précision et prélevé dans des capsules d'étain
4. Les capsules sont minutieusement pliées dans une forme d'un petit carré compacte (~2mm x 2mm) pour empêcher la rentrée d'air.
5. Les capsules sont ensuite placées dans l'injecteur de l'analyseur.
6. L'analyse est démarrée

### ***Annexe II.6. Protocole de dosage de Nitrate par la chromatographie ionique***

Afin de suivre l'évolution de nitrate au cours de la croissance des microalgues, des échantillons sont prélevés quotidiennement pour analyse à la chromatographie ionique de type Dionex DX-500.

#### *Principe de l'appareil*

Le principe de fonctionnement est basé sur la séparation des ions au travers d'une colonne chargée positivement, dans le cas de séparation des anions comme les nitrates dans notre cas. Les ions à doser sont séparés sur la colonne. Le temps de rétention dans la colonne est caractéristique de chaque ion (figure 43).

Dans ce dispositif, l'éluant est une solution de KOH (30 mmol.L<sup>-1</sup> à 1.5 mL.min<sup>-1</sup>). Les différents constituants de l'échantillon pénètrent dans un suppresseur chimique, qui élimine le cation de l'éluant (K<sup>+</sup>). Ce dernier a une conductivité trop importante et fournit un proton (H<sup>+</sup>). Les anions de l'échantillon qui sont transformés sous forme acide, sont ensuite détectés et mesurés par conductimétrie.

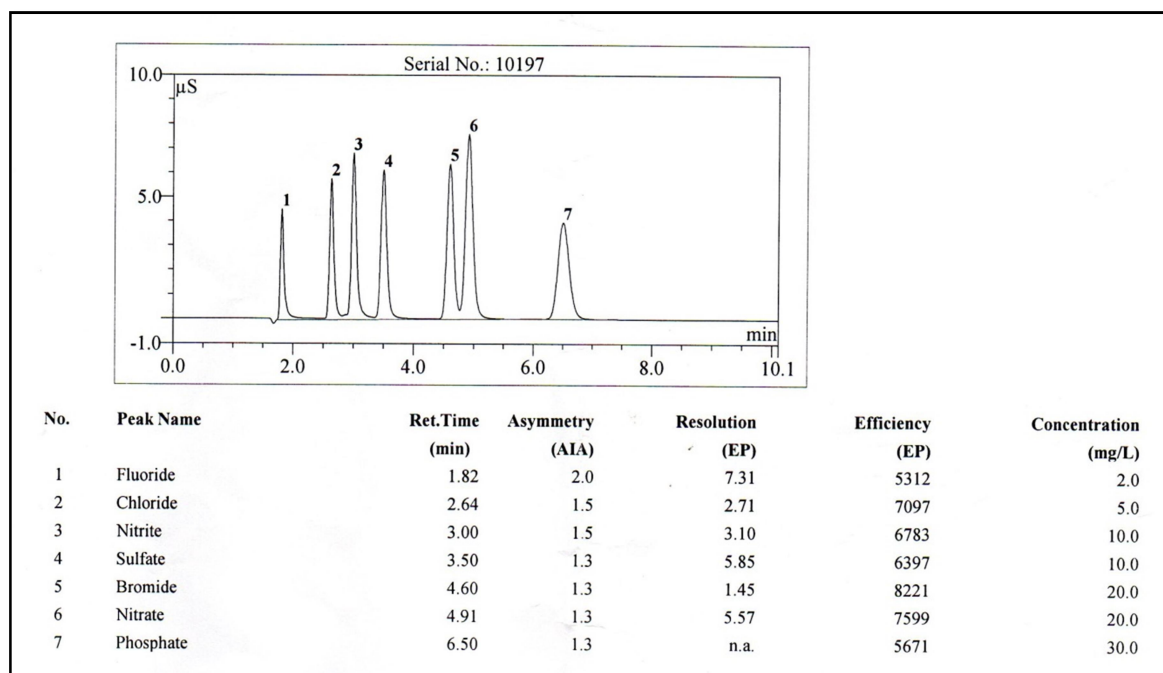


Figure 43. Le chromatographe Dionex contenant les temps de retention de différents anions

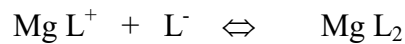
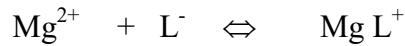
#### ✚ Préparation des échantillons

- Les échantillons de la culture de *C. vulgaris* sont centrifugés pendant 10 minutes à 1800g
- Les surnagants sont passés à travers des tubes filtrants C18 (PTFE) de type chromabond (lavés au préalable au méthanol et à l'eau distillée) sous un appareil à vide sous pression afin de retenir tout (la matière organique, protéines, macromolécules ...) ce qui risque de colmater la colonne de la chromatographie.
- Les échantillons filtrés sont injectés dans l'appareil à l'aide d'une seringue reliée à un filtre Dionex OnGuard Cartridge II H (Thermoscientific-121019-1-H) pour empêcher des interférences des anions avec la matrice et garantir une meilleure séparation.

## **Annexe III : Mécanisme de bioaccumulation de $Mg^{2+}$ par la biomasse**

### ***Annexe III.1. Spéciation chimique du magnésium***

Dans le cœur de la solution, il y a toutes les espèces plus ou moins liées du magnésium :



La répartition entre ces espèces dépend du Ligand (L), sa nature et sa concentration et des autres paramètres chimiques, notamment le pH (Worms et al, 2006).

Par soucis de simplification, notons M, l'espèce Mg concernée (C'est aussi bien  $Mg^{2+}$  ou  $MgL\dots$ ).

### ***Annexe III.2. Loi d'adsorption « Langmuir »***

L'un des premiers modèles pour l'adsorption d'une espèce sur une surface simple mis en avant par Irving Langmuir en 1916. Il suppose qu'une surface est constituée d'un certain nombre de sites équivalents où une espèce peut coller physiquement ou chimiquement. Ainsi, le cas du Magnésium qui s'attache au niveau de ces sites probablement via deux mécanismes d'adsorption :

- Une adsorption physique par interactions de van der Waals est appelé physisorption.
- Une adsorption chimique par la formation d'une liaison covalente est appelé chimisorption.

L'adsorption d'une molécule M sur un site S peut être décrite par la réaction :



A l'équilibre :

$$K_{eq} = \frac{(MS)}{[M] \cdot (S)} \quad (I)$$

Le bilan sur les sites s'écrit :

$$(S)_0 = (S) + (MS) \quad (II)$$

Avec (S) : concentration de sites libres (ramenée à l'unité de surface de l'algue)

(S)<sub>0</sub> : concentration totale de sites

(MS) : concentration de sites occupés par M

[M] : concentration du métal libre en solution exprimée en mg L<sup>-1</sup>

(I) et (II) donnent :

$$(MS) = (S)_0 \cdot \frac{K_1 \cdot [M]}{1 + K_1 \cdot [M]}$$

Avec

$$K_1 = \frac{k_f}{k_d}$$

K<sub>1</sub> : constante d'équilibre d'adsorption

k<sub>f</sub> : constante de vitesse de formation

k<sub>d</sub> : constante de vitesse de dissociation.

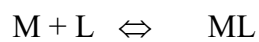
Deux cas limites peuvent être envisagés :

1) K<sub>1</sub> [M] << 1 (faible adsorption): (MS) = (S)<sub>0</sub> · K<sub>1</sub> · [M]

2) K<sub>1</sub> [M] >> 1 (saturation) : (MS) = (MS)<sub>max</sub> = (S)<sub>0</sub> = constante

### ***Annexe III.3. Réaction réversible de premier ordre***

La réaction s'écrit :



Avec M : Métal et L : Ligand

La vitesse de la réaction est :

$$r = \vec{k} \times [M] \times [L] - \tilde{k} \times [ML]$$

A l'équilibre :  $r = 0 = \vec{k} \times [M] \times [L] - \tilde{k} \times [ML]_{eq}$

Supposant que  $[L] \gg [M]$  et  $[ML]$

Donc la vitesse peut s'écrire :

$$r = \vec{k} \times [L] ([M] - [M]_{eq}) - \tilde{k} \times ([ML]_{eq} - [ML])$$

Par stoechiométrie :

$$[ML]_{eq} - [ML] = [M]_{eq} - [M]$$

Il vient donc :

$$r = (\vec{k} [L] + \tilde{k}) \times ([M] - [M]_{eq})$$

#### *Annexe III.4. Approche « catalyse hétérogène »*

$$\eta = \text{efficacité} = \frac{\text{Vitesse de réaction observée}}{\text{Vitesse de réaction si la diffusion interne était infiniment rapide}}$$

Sachant que  $\eta$  (efficacité) est fonction du critère de Thiele  $\emptyset$

$$\emptyset = d \times \sqrt{\frac{k_{cin}}{D}}$$

Avec les deux cas limites :

- Régime chimique d'où  $\eta = 1$

$$\emptyset \ll 1 \text{ soit } d \times \sqrt{\frac{k_{cin}}{D}} \ll 1 \quad \text{ou encore } k_{cin} \ll \ll D$$

Régime diffusionnel d'où  $\eta \sim z/\emptyset_s$

$$\eta = \frac{z}{d} \times \sqrt{\frac{k_{cin}}{D}}$$

### **Annexe III.5. Développement du flux global et de la vitesse de bioaccumulation de magnésium**

$$\frac{J_g}{K_g} = ([M] - [M]_{i1}) + ([M]_{i1} - [M]_{eq}) \quad (E7')$$

D'où:

$$[M] - [M]_{i1} = \frac{J_{diff\ Ex}}{k_1 \cdot a}$$

Avec  $k_1$ : coefficient de transfert externe

$a$  : aire spécifique des microalgues d'où  $a = \text{surface} / \text{volume} = 6/d$  avec  $d$  : diamètre des microalgues.

D'après les relations (E1) et (E2) :

$$[M]_{i1} = \frac{(MS)_{i1}}{K_1^*} = \frac{[MX]_{i1}}{K_1^* \cdot K_2^*}$$

La relation (E7') devient:

$$\frac{J_g}{k_g} = \frac{J_{diff\ Ex}}{k_1 \cdot a} + \frac{[MX]_{i1}}{K_1^* \cdot K_2^*} - \frac{[MX]_{i2}}{K_1^* \cdot K_2^*} + \frac{[MX]_{i2}}{K_1^* \cdot K_2^*} - [M]_{eq} \quad (E8)$$

La restriction de (E8) donne



$$\frac{J_g}{k_g} = \frac{J_{\text{diff Ex}}}{k_1 \cdot a} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^*} \cdot ([MX]_{i1} - [MX]_{i2}) + \frac{[MX]_{i2}}{K_1^* \cdot K_2^*} - [M]_{\text{eq}} \quad (\text{E9})$$

D'après les relations (E1) et (E4), la relation (E9) peut s'écrire :

$$\frac{J_g}{k_g} = \frac{J_{\text{diff ext}}}{k_1 \cdot a} + \frac{J_{\text{diff,M}}}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot \frac{D \cdot a}{\delta}} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} \cdot [M]_{i2} - [M]_{\text{eq}}$$

$$\frac{J_g}{k_g} = \frac{J_{\text{diff ext}}}{K_1 \cdot a} + \frac{J_{\text{diff,M}}}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot \frac{D \cdot a}{\delta}} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} \cdot [M]_{i2} - \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} \cdot [\bar{M}]_{\text{eq}} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} \cdot [\bar{M}]_{\text{eq}} - [M]_{\text{eq}}$$

$$\frac{J_g}{k_g} = \frac{J_{\text{diff ext}}}{K_1 \cdot a} + \frac{J_{\text{diff,M}}}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot \frac{D \cdot a}{\delta}} + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} \cdot ([M]_{i2} - [M]_{\text{eq}}) + \frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} \cdot [M]_{\text{eq}} - [M]_{\text{eq}} \quad (\text{E10})$$

On va procéder en deux étapes :

$$\frac{1}{K_1^* \cdot K_3^* \cdot K_2^*} = ?$$

$$K_1 : \text{Constante d'équilibre } M + S \Leftrightarrow MS \quad \text{d'où} \quad K_1 = \frac{(MS)_{\text{eq}}}{(S)_{\text{eq}} \cdot [M]_{\text{eq}}} \quad (\text{E11})$$

$$K_2 : \text{Constante d'équilibre } X + MS \Leftrightarrow MX + S \quad \text{d'où} \quad K_2 = \frac{[MX]_{\text{eq}} \cdot (S)_{\text{eq}}}{[\bar{X}]_{\text{eq}} \cdot (MS)_{\text{eq}}} \quad (\text{E12})$$

$K_3$  : Constante d'équilibre de la décomposition du complexe  $MX$ ;  $MX \Leftrightarrow M + X$  d'où

$$K_3 = \frac{[\bar{X}]_{\text{eq}} \cdot [M]_{\text{eq}}}{[MX]_{\text{eq}}} \quad (\text{E13})$$

(La barre pour simplifier que c'est dans le cœur de l'algue que cette réaction a lieu)

En remplaçant par les relations (E11), (E12) et (E13), on obtient :

$$\frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} = \frac{[M]}{[\bar{M}]}$$

Alors que :

$K_1^* = K_1 \cdot (MS)_{\max}$  (15) à noter  $(MS)_{\max} = (S)_{\max} = (S)_0 =$  nombre totale de sites d'adsorption

$$K_2^* = K_2 \cdot \frac{[X]}{(S)_0} \quad (16)$$

$$K_3^* = \frac{K_3}{[X]} \quad (17) \text{ à noter } [X] \text{ supposé en excès, soit } [X] = [X]_0$$

D'après les relations (14), (15) et (16), la relation 10 devient :

$$\frac{1}{K_1^* \cdot K_2^* \cdot K_3^*} = \frac{1}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3}$$

La vitesse de bioaccumulation du métal M (ici Mg) s'écrit :

$$r_g = k_g ([M] - [M]_{eq})$$

#### **Annexe IV : Rôle de Magnésium dans le corps humain**

- Chez l'être humain, le magnésium est très important dans le métabolisme physiologique. C'est parmi les cations intracellulaires le plus abondant et est un cofacteur essentiel dans plus de 300 réactions enzymatique (Touyz, 2004). En particulier, le  $Mg^{2+}$  joue un rôle crucial dans des processus biologiques tels que le métabolisme énergétique, la synthèse des acides nucléiques et des protéines, la fonction du cytosquelette, l'homéostasie ionique, la progression du cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité et de la stabilité membranaire (Touyz, 2004).

- Le  $Mg^{2+}$  est également exigé par tous les enzymes impliquées dans le transfert de groupe phosphoryle des réactions telles que des protéines-kinases et des phosphatases (Par exemple ATPases) (Touyz, 2004, Saris et al, 2000). Par conséquent, il occupe un rôle central dans le contrôle de la signalisation intracellulaire et la phosphorylation des protéines. Par ailleurs, ce métal contrôle le taux d'autres cations, ainsi, il est étroitement impliqué dans la régulation du taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans l'homéostasie. Cependant une carence en  $Mg^{2+}$  engendre une augmentation du taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Zhang et al, 1992). Particulièrement, le  $Mg^{2+}$  favorise l'absorption de  $Ca^{2+}$  au niveau du réticulum endoplasmique dans la cellule en stimulant une ATP contrôlant le transport membranaire au

sein de ces organites (Chakraborti et al, 2002). En outre, il régule le flux de  $\text{Ca}^{2+}$  sortant du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en stimulant une protéine échangeuse  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , et notamment le flux intrant dans la cellule en agissant sur des L-canaux de  $\text{Ca}^{2+}$  et en interférant avec des récepteurs de la ryanodine au niveau du réticulum endoplasmique (Chakraborti et al, 2002, Kawano et al, 1998).

- Dans le corps, le  $\text{Mg}^{2+}$  est principalement absorbé par le tractus gastro-intestinal, des tissus cardiaques, squelettiques, musculaires et rénales. Il est localisé dans trois compartiments: au niveau des os (65%), au niveau intracellulaire (34%) et au niveau extracellulaire (1%) (Gunther, 2006 ; Reinhart, 1988). La concentration de cet ion est étroitement contrôlée au 0.9-1.0 mM dans le plasma sanguin (Chubanov, 2005). Dans le sérum, environ 70 à 80% de ce cation existe dans sous forme ionique libre biologiquement actif (libre), tandis que le reste est lié à la circulation des protéines (par exemple albumine) (20-30%) ou complexé à des anions (par exemple, le phosphate, le citrate, le bicarbonate) (1-2%) (Saris et al, 2000 ; Elin et al, 1994).

- L'absorption trans-cellulaire du magnésium est accomplie par des mécanismes actifs secondaires impliquant une absorption de cet ion par des canaux  $\text{Mg}^{2+}$  et une exportation latérale par une protéine échangeuse sodium-magnésium (Quamme et de Rouffignac, 2000 ; Schmitz et al, 2007).

- Le magnésium est non seulement important dans les processus métaboliques et physiologiques de l'être humain, mais aussi, il est indispensable pour le développement des plantes et particulièrement les microalgues dont son effet a été étudié dans ce travail de thèse.

Figure 1. Les différentes formes des microalgues.....	7
Figure 2. Les vastes domaines d'application des microalgues (Rösch et Posten, 2012) .....	8
Figure 3. Production de biogaz à partir des microalgues (Powell et al, 2009).....	10
Figure 4. Processus de traitement des eaux par des microalgues.....	12
Figure 5. Schéma de processus de production et récolte des microalgues (Uduman et al, 2010) .....	13
Figure 6. Vue microscopique de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	15
Figure 7. Schéma d'un chloroplaste .....	18
Figure 8. Schéma général de processus de la photosynthèse .....	19
Figure 9. Schéma du cycle de Calvin .....	20
Figure 10. Cinétique de la croissance d'une microalgue .....	23
Figure 11. Schéma de production des microalgues à ciel ouvert.....	25
Figure 12. (a) bassin circulaire de culture de microalgue (b) bassin de type raceway.....	26
Figure 13. Schéma d'un photobioréacteur tubulaire .....	27
Figure 14. Différentes configurations des bioréacteurs des microalgues.....	28
Figure 15. Taux de croissance spécifique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en fonction de la densité du flux de photons.....	30
Figure 16. Equilibres du dioxyde de carbone dans l'eau .....	35
Figure 17. Structures de chlorophylles a, b, d (E), et c1, c2 (F). .....	45
Figure 18. Incubateur «Minitron» de culture de <i>C. vulgaris</i> .....	54
Figure 19. Montage du micropilote de la culture de <i>C. vulgaris</i> .....	55
Figure 20. Culture cellulaire dans le photobioréacteur BIOSTAT .....	57
Figure 21. a) Courbe de croissance de <i>C. vulgaris</i> dans le micropilote b) La phase exponentielle de croissance.....	63
Figure 22. Cinétique d'élimination du magnésium dans le milieu de culture.....	64
Figure 23. Corrélation entre la croissance cellulaire et le taux de magnésium éliminé.....	65
Figure 24. Répartition du magnésium entre le milieu et la biomasse. Les hisogrammes présentent la moyenne de mesure des expériences en triplicata. ....	66
Figure 25. Modèle de conception des processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans la bioaccumulation (adsorption et absorption) d'un métal dans un micro-organisme biologique marin. ....	86
Figure 26. Modèle de conception des interactions metal- microalgue.....	90
Figure 27. Transfert du magnésium du milieu de culture vers la cellule algale .....	93
Figure 28. Modélisation de la bioaccumulation du Mg par les cellules.....	101
Figure 29. Proportionnalité entre $[M]_{eq}$ et $[M]_0$ .....	102
Figure 30. Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs du modèle .....	104
Figure 31. Représentation logarithmique des valeurs du modèle et des valeurs expérimentales .....	104
Figure 32. Les quantités de magnésium adsorbées et absorbées par <i>C. vulgaris</i> .....	106
Figure 33. Courbes de croissance de <i>C. vulgaris</i> dans les deux modes de culture .....	143
Figure 34. Magnésium dissous résiduel dans le milieu de culture en modes d'autotrophie et de mixotrophie .....	144

Figure 35. Magnésium adsorbé et absorbé par la biomasse dans les deux modes de culture	145
Figure 36. Répartition du magnésium par biomasse de <i>C. vulgaris</i> en conditions de culture en mixotrophie .....	147
Figure 37. Répartition du magnésium par biomasse en conditions de culture d'autotrophie.	148
Figure 38. Cellule de Thoma.....	186
Figure 39. Principe de granulomètre laser .....	187
Figure 40. Ganulomètre laser QICPIC (SympaTEC).....	188
Figure 41. Cytomètre de flux « Guava EasyCyte ».....	189
Figure 42. Principe de fonctionnement de l'analyseur élémentaire .....	192
Figure 43. Le chromatographe Dionex contnant les temps de retention de différents anions	195

Tableau 1. Contenu en huiles de différentes microalgues (Taher et al, 2011).....	11
Tableau 2. Caractéristiques de la microalgue <i>Chlorella vulgaris</i> .....	16
Tableau 3. Données sur les paramètres de culture d'une microalgue .....	36
Tableau 4. Formes physicochimiques possibles des métaux dans le milieu aquatique .....	41
Tableau 5. Capacité de sorption des algues et conditions physico-chimiques de l'accumulation .....	44
Tableau 6. Effet du pH sur la biosorption des métaux (Cu, Ni, Cr).....	48
Tableau 7. Notations et hypothèses du modèle.....	92
Tableau 8. Les valeurs numériques du modèle exponentiel.....	103

## Résumé

Des cultures de *Chlorella vulgaris* ont été réalisées en triplicata sur de longues périodes (15-30 jours) en autotrophie et en mixotrophie afin d'étudier l'effet de  $Mg^{2+}$  sur les microalgues et déterminer sa concentration dans la biomasse au cours de la croissance. Différentes concentrations ont été testées (de 8.9 à 465  $mg\ L^{-1}$ ). Ceci a montré que le  $Mg^{2+}$  n'est pas toxique pour les algues à des concentrations élevées provoquant habituellement l'inhibition de la croissance dans le cas d'autres ions divalents (métaux lourds). Des bilans matière ont été établis et vérifiés avec une précision satisfaisante (écart moyen de 90%). La quantité de  $Mg^{2+}$  bioaccumulée augmente avec la concentration initiale de  $Mg^{2+}$  du milieu de culture. Une saturation en  $Mg^{2+}$  intracellulaire a été observée à partir d'environ 45  $mg$  de  $Mg^{2+}\ L^{-1}$ . Typiquement, la répartition entre le  $Mg^{2+}$  extracellulaire et intracellulaire est de 18% contre 51% dans le bioréacteur (5L) pour une concentration initiale de 16  $mg\ L^{-1}$ . En mixotrophie (addition de 10  $g\ L^{-1}$  de glucose), une production de biomasse significativement plus importante et plus rapide que celle en autotrophie a été observée. En revanche, la quantité de  $Mg^{2+}$  accumulée dans les cellules est plus importante en autotrophie qu'en mixotrophie. Des mesures de chlorophylle *a*, de nitrate et de glucose ont été également réalisées. Afin de comprendre la cinétique relativement complexe de bioaccumulation du  $Mg^{2+}$ , un modèle cinétique original a été élaboré couplant transfert (externe, membrane, interne) et réactions (ad/absorption) en milieu hétérogène. Le modèle a été validé expérimentalement. Il permet de rendre compte au mieux de l'ensemble des résultats obtenus.

Mots clés: *Chlorella vulgaris*, bioréacteur, magnésium ( $Mg^{2+}$ ), bioaccumulation,  $Mg^{2+}$  adsorbé,  $Mg^{2+}$  absorbé

## Abstract

*Chlorella vulgaris* cultures were grown in triplicate over 15-30 days under autotrophic or mixotrophic conditions in order to study  $Mg^{2+}$  uptake and accumulation into the biomass. The concentrations of  $Mg^{2+}$  tested were 8.9 to 465  $mg\ L^{-1}$ . The results showed that  $Mg^{2+}$  is not toxic to *C. vulgaris* even at 465  $mg\ L^{-1}$  which is not the case for other divalent ions (especially heavy metals). The mass balances for  $Mg^{2+}$  accumulation were determined for the cultures and were confirmed to an average of 90%. Beyond 46.1  $mg$  of  $Mg^{2+}\ L^{-1}$  in the culture medium, the cells became saturated at 4  $mg$  of  $Mg^{2+}$  absorbed per  $g$  of dry biomass. In the bioreactor (5L), at an initial  $Mg^{2+}$  concentration of 16  $mg\ L^{-1}$ , the cells accumulated 69% of the initial concentration, in which 18% was adsorbed and 51% absorbed. The chlorophyll *a*, nitrate and glucose concentrations were measured during the experiments. Under mixotrophic conditions (glucose 10  $g\ L^{-1}$ ), a greater and faster biomass production was obtained than under autotrophic conditions. The  $Mg^{2+}$  bioaccumulation was higher in the autotrophic rather than the mixotrophic phase. In order to understand the kinetics of  $Mg^{2+}$  uptake, an original kinetic model was developed coupling the transfer and reaction phenomena in heterogeneous media. This model was confirmed experimentally.

Key words: *Chlorella vulgaris*, bioreactor, magnesium ( $Mg^{2+}$ ), uptake, adsorbed  $Mg^{2+}$ , absorbed  $Mg^{2+}$

