

## UTILISATION DE LA MICROSCOPIE À ÉPIFLUORESCENCE POUR L'ESTIMATION DE LA BIOMASSE DANS LE CHENAL ALGAL À HAUT RENDEMENT

Dekayir S<sup>1</sup>., Cauchie H.M<sup>2</sup>., Brouers M<sup>3†</sup>., Vasel J.L<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Liège, Département des Sciences et Gestion de l'Environnement, Unité Assainissement et Environnement, 185 Avenue de Longwy, 6700 Arlon, Belgique.

<sup>2</sup> Centre de Recherche Public Gabriel-Lippmann, 41 rue du Brill, L- 4422, Belvaux, Luxembourg.

<sup>3†</sup> Université de Liège, Laboratoire de Biochimie-Photobiologie, B 22, Sart Tilman, 27 Boulevard du Rectorat, 4000 Liège, Belgium.

### Résumé

La biomasse du chenal algal à haut rendement (CAHR) est composée d'algues, de bactéries, de zooplancton et de détritus. Il est important de déterminer la contribution de chaque groupe d'organismes dans le traitement des eaux usées afin de faciliter la validation de la modélisation mathématique du CAHR et d'assurer plus efficacement son contrôle. Par ailleurs la connaissance de la contribution de chaque groupe d'organismes à la biomasse totale et le contrôle du ratio algues-bactéries devraient aider considérablement dans le développement des techniques de valorisation de la biomasse. Pour cela nous avons donc décidé de développer une méthodologie d'estimation des biomasses algales et bactériennes dans le CAHR basée sur la microscopie à épifluorescence. Nos résultats ont montré que la densité bactérienne dépasse largement celle des microalgues dans le chenal algal à haut rendement (CAHR). Le phytoplancton a été également caractérisé par la prédominance du genre *Euglena* avec une

concentration relative de 99 % durant la période d'essai, tandis que les autres genres (*Chlamydomonas*, *Chlorella* et *Scenedesmus*) étaient faiblement représentés. La technique de microscopie à épifluorescence nous a servi d'outil dans la détermination du ratio algues-bactéries, paramètre important dans la maîtrise du fonctionnement du CAHR.

**Mots clés :** Chenal algal, microscopie à épifluorescence, algues, bactéries, biovolume.

## **Introduction**

Ce travail consiste au suivi de l'évolution de la densité et des biomasses d'algues et de bactéries dans un chenal algal à haut rendement pilote en période de démarrage à l'aide de la microscopie à épifluorescence. A partir de ces mesures, sera ensuite calculé le ratio algues-bactéries. Ces mesures de biomasse nous permettront d'une part de mieux gérer les conditions d'autofloculation des microalgues pour leur récupération et d'autre part de vérifier le modèle mathématique proposé par El Ouarghi (2002). En effet, la récupération des microalgues pourrait être une option de gestion pour réduire la biomasse algale et par conséquent les taux de respiration pendant la nuit et ce, sans nuire aux capacités de traitement. En plus ces microalgues récupérées peuvent être revalorisées en produits de haute valeur ajoutée (Ravignat, 1997; Belkoura, 1994).

## **Matériel et méthodes**

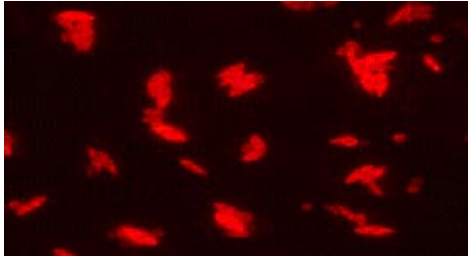
Dans cette étude, nous avons utilisé un chenal algal à haut rendement (CAHR) pilote qui a été installé à la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech (Maroc) et alimenté par des eaux usées synthétiques dépourvues de matières en suspension ce qui permet de déterminer facilement la quantité de biomasse produite par le système. En phase de démarrage, la condition testée sur le pilote est de faible charge polluante (25 gDBO/m<sup>2</sup>.j) avec un long temps de séjour (8,7 jours) et un débit journalier de 33 l/j.

Cette condition a été testée sur une période qui correspond au moins à trois fois le temps de séjour théorique, de manière à atteindre un état stationnaire. L'estimation des biomasses algales et bactériennes a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (LEICA DMR) sur des échantillons du pilote conservés dans du formol 2 %. Les suspensions algales ont été filtrées sur membranes en polycarbonate noir d'une porosité égale à 0,2 µm. Les cellules algales ont été dénombrées et mesurées sous lumière bleue sans coloration préalable grâce à leur autofluorescence (Fig.1). Pour les bactéries par contre, on a procédé au préalable à une coloration de ces dernières par un fluorochrome, le SYBR Green I, qui fluoresce en vert (Fig.2) sous excitation bleue (Noble et Fuhrman, 1998). La capture d'image a été réalisée à l'aide d'une camera (LEICA DC 500) et d'un logiciel IM 50. Les images obtenues sont transférées sur l'ordinateur pour traitement et analyse. Le logiciel Image-Pro Plus<sup>®</sup> est calibré pour convertir la taille et le volume des cellules en micromètres (Centre de Recherche Public Gabriel-Lippmann, protocole DIADECOL 010.1, 012.1, 013.1). Le biovolume bactérien est déterminé selon la formule établie par Gunnar (1985). La biomasse bactérienne est estimée à partir d'un facteur de conversion (15 fg de carbone par bactérie avec fg : femtogramme) déterminé par Caron *et al* (1995). Dans le cas des microalgues, nous avons utilisé une méthode qui consiste à assimiler leur forme à un volume de forme géométrique simple (sphère, cône, cylindre) proche (Cromar et Fallowfield, 2002). La teneur en carbone des microalgues est donnée par l'équation de Strathmann (1967) dont la formule est donnée ci-après:

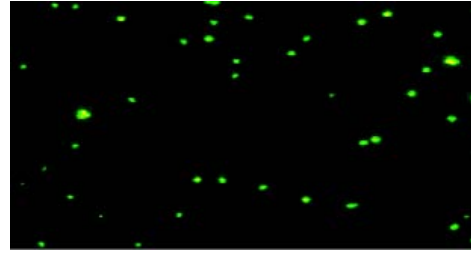
$$\text{Log } C \text{ (pg.cell}^{-1}\text{)} = -0,46 + 0,856 \times \log \text{ (cell volume (}\mu\text{m}^3 \cdot \text{cell}^{-1}\text{))}.$$

Avec C : contenu en carbone en pg/cellule

Cell volume : volume cellulaire



**Figure 1. Observation des microalgues en épifluorescence**  
(Excitation : 500-570 nm,  
émission : >590 nm)



**Figure 2. Coloration des bactéries par SYBR Green I**  
(Excitation. 500-570 nm,  
émission : >590 nm).

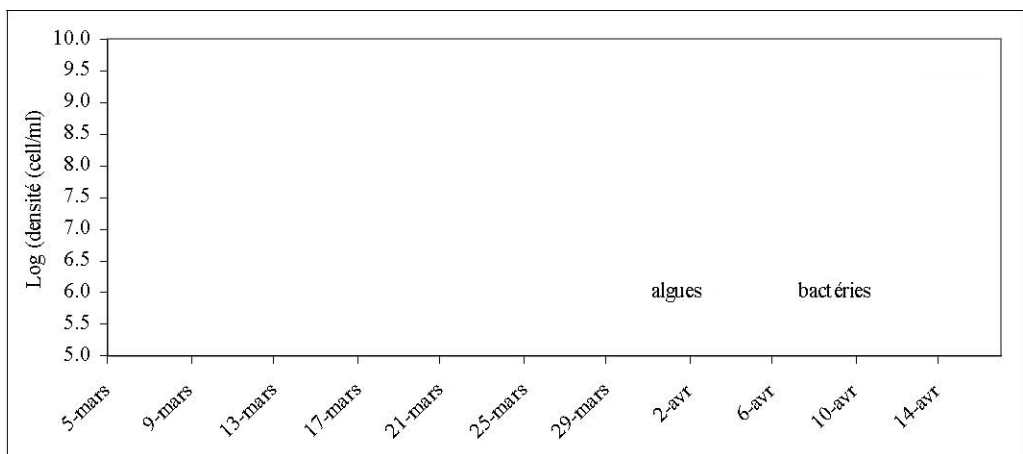
## Résultats et discussions

### • Evolution de la densité et des biomasses algale et bactérienne

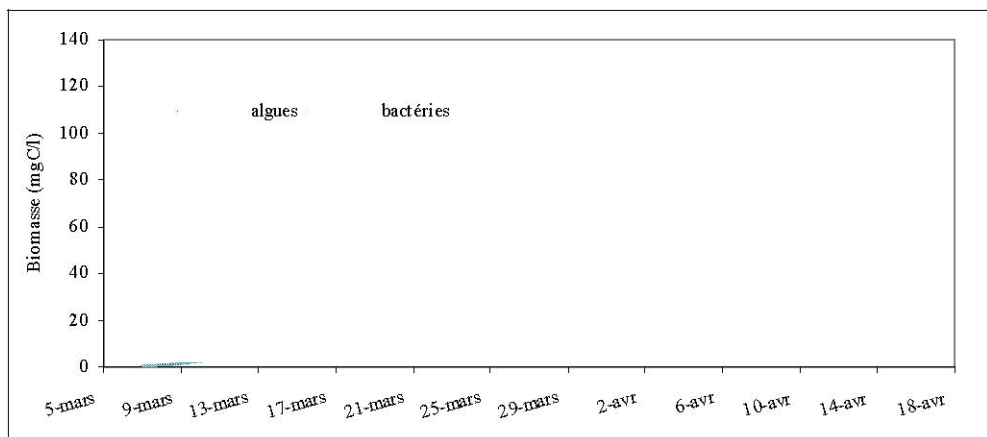
La courbe d'évolution des populations de microalgues en fonction du temps (Fig.3), montre deux phases distinctes, à savoir une première phase d'augmentation de la densité algale (du 07 au 19 Mars 2005) pendant laquelle, le nombre de microalgues croit de  $8,5 \cdot 10^5$  à  $7,6 \cdot 10^6$  cellules/ml. La seconde phase (du 19 Mars au 16 Avril 2005) montre un état stationnaire de la croissance avec une densité algale moyenne de l'ordre de  $10^7$  cellules/ml. L'évolution de la biomasse bactérienne présente aussi deux phases (Fig.3) dont la première (du 07 au 19 Mars 2005) est caractérisée par une augmentation de la densité bactérienne (de  $4,3 \cdot 10^7$  à  $1,2 \cdot 10^9$  cellules/ml). La deuxième phase (du 19 Mars au 16 Avril 2005) est caractérisée par le maintien de la densité bactérienne dans un état stationnaire avec une densité moyenne de l'ordre de  $1,4 \cdot 10^9$  cellules/ml. Le ratio entre la densité bactérienne et celle des microalgues varie entre 77 et 286 (bactéries/unité de microalgues) avec une moyenne de l'ordre de 150. Le dénombrement de la biomasse montre que les valeurs obtenues pour les bactéries dépassent largement celles des microalgues de deux à trois ordres de grandeur. Ces résultats montrent qu'un

long temps de séjour favorise la croissance de la biomasse et permet aux cellules d'atteindre une concentration élevée.

Les biomasses des bactéries et des microalgues ont été exprimées par leur contenu en carbone (Fig.4). On a observé une biomasse bactérienne stable pendant la période d'étude avec cependant des variations importantes à la fin de cette période en même temps qu'une diminution de la biomasse d'algues.

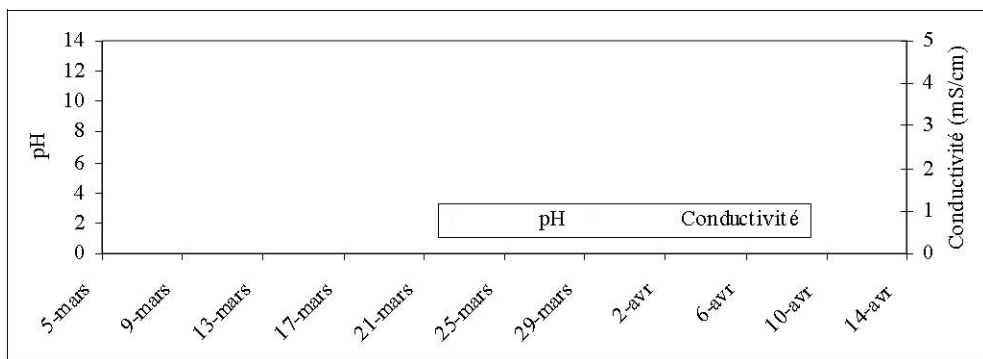


**Figure 3. Evolution de la densité algale et bactérienne**



**Figure 4. Evolution de la biomasse algale et bactérienne**

L'augmentation de la biomasse algale a engendré une élévation du pH relative à l'activité photosynthétique des microalgues. La valeur du pH enregistrée à ce stade est de 11,5 (Fig.5). A la fin de cette période d'étude (du 9 au 16 Avril), la biomasse d'algues a diminué rapidement de 127 à 42 mgC(algale)/l, en même temps qu'une diminution de la conductivité. C'est probablement des états accentués d'autofloculation. Ce phénomène est associé à l'augmentation du pH induite par l'activité photosynthétique (consommation du  $\text{CO}_2$  par les microalgues). Ces conditions alcalines, favorisent la coprécipitation de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  avec les cellules algales (Benemann *et al.*, 1980). En effet, il y a formation d'agrégats de microalgues qui décantent et cela semble être lié aux précipités chimiques contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  lorsque le pH dépasse 10. D'après Sukenik et Shelef (1984), la précipitation du phosphate de calcium est considérée comme étant le moteur de l'autofloculation.



**Figure 5. Evolution du pH et de la conductivité**

Le ratio entre les biomasses algale et bactérienne exprimé en mgC (algale)/mgC (bactérien) varie entre un minimum de 2 et un maximum de 5 avec une moyenne de l'ordre de 3. La valeur maximale du ratio a été enregistrée vers la fin de la phase de

croissance de la biomasse algale et juste avant le début du déclenchement de l'autofloculation. Donc pour le bon fonctionnement du chenal algal, le ratio algues/bactéries doit se situer autour de 3. Selon Shelef *et al* (1976), dans les conditions de bon fonctionnement du CAHR le ratio entre la biomasse algale et les matières volatiles en suspension est au tour de 2/3. Gideon *et al* (1979) ont indiqué que sous des conditions favorables de fonctionnement et de haute productivité algale, la fraction d'algues dans la biomasse totale du CAHR dépasse en contrepartie celle des bactéries d'un facteur de 3 à 5. Cromar et Fallowfield (1992) ont montré que la biomasse algale constitue en moyenne 40 % de la matière sèche totale. Dans le cadre de notre étude, la biomasse algale est de trois fois supérieur à la biomasse bactérienne. La différence avec les autres auteurs réside dans le choix de la technique d'estimation de la biomasse utilisée et des conditions opératoires.

#### • Evolution de la densité relative des microalgues

Du point de vue de l'évolution des espèces algales et de leur prédominance relative durant la période expérimentale prédéfinie, la figure 6 fournit les concentrations relatives des microalgues répertoriées dans le chenal pilote. Ainsi parmi les genres rencontrés on peut citer par ordre de tolérance à la pollution (de la plus tolérante à la moins tolérante): *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* et *Chlorella*. Le phytoplancton a été caractérisé par une population algale faiblement diversifiée avec la prédominance des euglènes, tandis que les autres genres étaient faiblement représentés. Les facteurs qui sont à l'origine de cette distribution sont la charge organique, la profondeur (15 cm), l'agitation (système d'Air-lift) et le temps de séjour dans le chenal pilote (El Ouarghi, 2002).

### **Figure 6. Evolution de la densité relative des microalgues**

#### **Conclusion**

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la microscopie à épifluorescence est applicable dans le cas de l'estimation de la biomasse du chenal algal avec l'avantage de la simplicité de la mesure et de la rapidité d'obtention des résultats par rapport aux techniques classiques de d'estimation des biomasses algales et bactériennes. Cette technique nous a permis de déterminer la contribution de chaque composante dans toute la biomasse du chenal algal, et spécifiquement les algues, les bactéries et leur ratio. Cette détermination facilitera le développement et la validation des modèles de productivité algale pour la conception et le fonctionnement du chenal algal. Ces informations sont nécessaires dans les tentatives de compréhension de la dynamique du chenal algal afin d'assurer plus efficacement son contrôle. Ajoutons aussi que la maîtrise des conditions d'autofloculation et des voies de récupération de la biomasse doit passer par la connaissance du ratio algues-bactéries.

## Références bibliographiques

- Belkoura M., 1994.** *Chlorella Sorokiniana Shihira Krauss* : Ecophysiologie, modélisation de cultures et perspectives de valorisation de la biomasse algale. Thèse d'Etat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 198 p.
- Benemann J.R., Koopman B., Weissman J.C., Eisenberg C., Goebel R., 1980.** Development of microalgae harvesting and high rate pond technologies in California. In: Algae Biomass (Shelef G, Soeder D.J., Eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 457-495.
- Caron D.A., Dam H.G., Kremer P., Lessard E.J., Madin L.P., Malone T.C., Napp J.M., Peele E.R., Roman M.R., Youngbluth M.J., 1995.** The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. Deep-Sea Research, Part I 42, pp 943-972.
- Cromar N.J., Fallowfield H.J., 2002.** Use of image analysis to determine algal and bacterial biomass in high rate algal pond following Percoll Fractionation. Water Science & Technology. 48(2), pp 53-61.
- Cromar N.J., Fallowfield H.J., 1992.** Separation of components of the biomass from high rate algal ponds using Percoll<sup>R</sup> density gradient centrifugation. Journal Applied of Phycology, 4, pp 157-163.
- El Ouarghi H., 2002.** Interaction phytoplancton qualité physico-chimique des eaux dans les lagunes naturelles et lagunes à haut rendement algal. Thèse de Doctorat, Fondation Universitaire Luxembourgeoise (FUL), Arlon, Belgique, 199 p.
- Gideon O., Shelef G., Levi A., Meydan A., Azov Y., 1979.** Algae/Bacteria Ratio in High-Rate Ponds Used for Waste Treatment. Applied and Environmental Microbiology. 38(4), pp 570-576.
- Gunnar B., 1985.** Bacterial biovolume and biomass estimations. Applied and Environmental Microbiology, 49, pp 1488-1493.
- Noble, R.T., Fuhrman J.A., 1998.** Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. Aquatic Microbial Ecology, 14, pp 113-118.

- Ravnat C., 1997.** Elaboration de la rentabilité de la récolte et de la valorisation de microalgues produites dans une unité de traitement d'eaux usées par la technique du chenal algal à haut rendement. Mémoire d'Ingénieur, Hautes études commerciales (HEC) Liège, Belgique, 122 p.
- Shelef G., Moraine R., Meydan A., Oron G., Sand-bank E., Azov Y., Levin A., Turzynski B., 1976.** Combined systems for algal wastewater treatment and reclamation and protein production. Sherman Environmental Engineering Research Center, Technion, Haifa, Israel.
- Strathmann, R.R., 1966.** Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume, *Limnology and Oceanography*, 11, pp 411–418
- Sukenik A., Shelef G., 1984.** Algal autoflocculation verification and proposed mechanism. *Biotechnology and bioengineering*, 26, pp 142-147.