

SUPERCHLORELLAS À LA RESCOUSSE

Justine Henry et Elsa Witty

Abstract

Since chemical releases, greenhouse gas and human waste have become critical environmental issues, alternatives have become necessary. To counterattack those environmental issues and the soon-to-be lack of fossil fuels, the scientific community has proposed the use of diverse biofuels. *Chlorella vulgaris* is a special type of freshwater alga known primarily for its edible, oily and medicinal properties. However, it could also be the ideal alternative in biofuel for years to come. To affirm its capacity of oil production in Chibougamau, it needs to be cultivated in an environment similar to its northerly conditions. In order to study the effects, a sample was grown in a fish tank filled with 34.2 L of freshwater and sources of nitrate, potassium and phosphorus elements. The water was approximately 20 degrees Celsius and was placed under artificial light for 16 hours per day. The extraction began with a laboratory centrifuge and the removal of excess water from the samples taken from the tank. The samples were transferred to a stove for 24 hours at 37 degrees Celsius. The exsiccated algae were placed in a beaker and treated with the chemical agents of methanol, chloroform and potassium chloride, in order to break the cellular membrane of the algae and release the oil trapped inside. The concoction was placed a second time in the centrifuge and the oil was isolated from the water, the fragments of cellular membrane and the chemical solvents. From there, the oil could be confirmed as such, but could not be quantified. The number of algae was overall too small to adjust properly to quantifiable measurements in a small laboratory.

Mots-clés: Biologie, chimie, microalgues, lipides, extraction

Introduction

Le mode de vie des humains a un impact énorme sur la santé de la planète. La pollution et les émissions de gaz à effet de serre, notamment dus à l'utilisation d'énergies fossiles, sont en grande partie responsables de ces problèmes environnementaux (Doré-Deschênes, 2009, p. 1). Dans les dernières années, des alternatives au pétrole sont mises de l'avant, comme les carburants d'origine végétale : colza, soya, tournesol (Chamoumi, 2013, p. i). Ces initiatives sont moins polluantes car elles fixent le carbone atmosphérique, mais entraînent d'autres enjeux. La culture de ces végétaux se déroule

sur un plan horizontal, l'espace alloué à ces nouvelles plantations est rapidement saturé. La diversité de la faune et flore indigènes est décimée et remplacée par des monocultures visant à combler les besoins énergétiques humains. Aussi, le coût énergétique élevé de ces plantations vient freiner la productivité globale. Les engrais, ainsi que le carburant utilisé pour les cultures engendrent de nouvelles problématiques sociales, humanitaires et environnementales, puisque la réquisition d'immenses terres arables pour la production de ces végétaux destinés à la transformation en biocarburant ne peut servir

à la culture de produits alimentaires (Abdelaziz, 2014, p.iii).

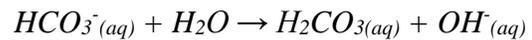
L'idée d'utiliser des microalgues comme source d'hydrocarbures d'origine végétale devient intéressante, puisque leur culture s'étale tant verticalement qu'horizontalement et que le rapport de la production en fonction du volume engendré par ces cultures est de loin supérieur à celui des plantes terrestres. Leur consommation en CO₂ représente une réduction de ce gaz polluant de 180%, soit 1,8 tonnes de CO₂ consommées par tonne de microalgues produites (Chamoumi, 2013, p. 9). Leur culture ne nécessite que de l'eau, de la lumière, du CO₂ et des nutriments pouvant être extraits de déchets organiques. Leur taux de croissance est exponentiel. Des études confirment que le rendement des algues est bel et bien supérieur à celui de toutes les autres alternatives en termes de biocarburant à l'ère moderne (Bélaïr, 2012, p. 6). En effet, selon les espèces, les microalgues contiennent des taux de lipides allant jusqu'à 80% de leur masse sèche (Gloaguen, Perrin et Scheffler, 2012). Ce taux impressionnant de lipides est dû à la présence d'oléoblastes, des organites spécialisés dans le stockage des lipides. Dans cet article, l'hypothèse émise est qu'il est possible d'extraire 14% de lipides à partir de la masse sèche des *Chlorella* cultivées (Dejoye, 2013, p. 24).

Matériel et méthodes

Afin de confirmer l'hypothèse, un protocole en trois étapes a été mis en place : la culture, la récolte et l'extraction.

Dans un premier temps, 34,2 L d'eau distillée ont été versés dans un aquarium standard. Celui-ci a été entouré de lampes à ampoule DEL blanc chaud (9W, 800 lumens). L'éclairage est programmé pour être mis en marche seize heures par jour. Les algues *Chlorella* (300 unités) sont ajoutées. Après une période d'acclimatation de vingt-quatre

heures, 50 mL d'engrais (PlantProd 18-25-17) ont été ajoutés pour fournir les nutriments nécessaires au développement des algues, soit de l'azote, du phosphore et du potassium. Des relevés de pH, de température et de niveau d'eau sont faits quotidiennement (ANNEXE I). Le pH visé pour l'accumulation maximale de lipides se situe entre 7,0 et 8,5 (Wang, 2010). Il est ajusté chaque fois qu'il se retrouve hors de ces limites. Il est abaissé avec l'ajout d'engrais ou augmenté avec l'ajout de bicarbonate de sodium (NaHCO₃), selon les réactions suivantes :



L'ajout de dioxyde de carbone (CO₂) gazeux directement permet aussi de baisser le pH par l'action de l'acide carbonique dans l'eau. L'intervalle de température optimal est entre 15 °C et 30 °C (Lemire-Lamothe, 2016, p. 10). Une pellicule de plastique a été ajoutée pour couvrir l'aquarium, dans un premier temps, afin de limiter les risques que des particules indésirables de toute nature tombent dans l'aquarium, dans un second temps, afin de concentrer la chaleur à l'intérieur de l'aquarium, la pièce étant peu chauffée (voir figure 1).

Ensuite, la récolte consiste à prendre un échantillon d'algues pour en extraire des lipides, selon la méthode de Bligh and Dyer (Dejoye, 2013, p. 72). Plusieurs instruments ont été utilisés pour transférer les algues dans un bécher: une spatule de cuisine, une grande cuillère, un racloir pour la douche et une poire à jus. La poire à jus s'est avérée la plus efficace. Plutôt que d'homogénéiser l'eau de l'aquarium, la stratégie est d'aller chercher le plus d'algues possible là où elles sont le plus concentrées, soit sur les parois de l'aquarium pour les premiers essais, puis dans le fond par la suite.

Ensuite, l'échantillon prélevé contenant des algues et de l'eau est réparti dans des tubes et placé à la centrifugeuse à 1500 tr/min pour une minute. L'eau est jetée après avoir été aspirée à l'aide de pipette Pasteur et les algues restantes sont mises à l'étuve dans des verres de montre pendant vingt-quatre heures, à 37°C.

Enfin, l'extraction vise à séparer les lipides du reste des composantes de la masse algale sèche. Il faut gratter le contenu des verres de montre et le peser, puis mettre cette masse d'algues sèches dans un bécher avec un mélange de 3 mL de méthanol et de chloroforme (2:1) pour 100 mg d'algues et agiter pendant dix minutes sur une plaque à l'aide d'un barreau magnétique. Par la suite, il faut ajouter 1 mL de chloroforme et 0,8 mL de chlorure de potassium à 0,8 % et agiter pendant encore dix minutes. Un dernier passage du mélange à la centrifugeuse à 4000 rpm pendant 5 minutes permet d'isoler la phase huileuse des autres composantes algales et des dernières traces de méthanol, chloroforme et chlorure de potassium (Dejoye, 2013, p. 72). La couche inférieure contient des lipides.

Résultats

La première partie, qui consistait à développer une population d'algues à partir d'environ 300 individus, a été concluante. L'atteinte des valeurs optimales quant au pH, à l'éclairage et à la température fait toute la différence. Comme on peut le voir sur le graphique de la figure 2, au début, le pH a chuté à 3,80 dès l'ajout de l'engrais. Il augmentait au fil des jours grâce aux réactions chimiques et biologiques normales des algues dans l'eau, mais c'est l'ajout de bicarbonate de sodium et de l'aérateur au jour 13 qui a permis de redresser la situation. Le pH est passé de 5,7 à 7,2 en 24h.

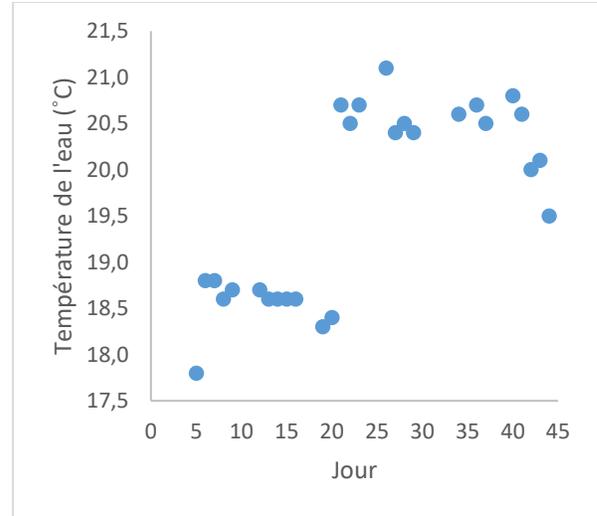


Figure 1. Graphique de la température quotidienne de l'eau.

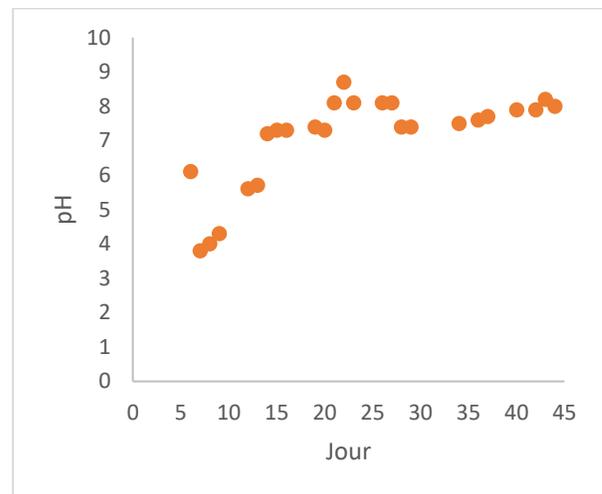


Figure 2. Graphique du pH quotidien de l'eau.

Le minuteur a permis de garder un éclairage constant qui était favorable à la croissance des Chlorellas. En ce qui concerne la température (figure 1), l'ajout de la pellicule plastique a favorisé le maintien d'une température stable dans l'intervalle souhaité. On remarque sur les figures 3 et 4 la différence de concentration des algues entre le jour 15 et le jour 20.

La technique de récolte d'algues s'est améliorée au fil des essais. La façon la plus efficace de recueillir un maximum de masse algale était d'aller aspirer directement les amas d'algues disséminés dans le fond de l'aquarium, sans agiter l'eau au préalable. La réalisation d'un second montage à partir d'une bouteille en plastique de 1 L et d'une nouvelle cohorte d'environ 300 algues n'a pas porté fruit. L'hypothèse étant que la croissance ait été inhibée par la présence de remous créés par l'aérateur qui affectaient l'intégralité de la colonne d'eau. À partir de ce constat, les résultats concernant la population dans la bouteille ont été exclus de l'expérimentation principale (ANNEXE II).



Figure 3. Population de Chlorellas, jour 15.



Figure 4. Population de Chlorellas, jour 20.

Pour séparer l'eau des algues, deux techniques ont été utilisées, la centrifugation et la filtration sous vide. La filtration a été

testée pour un des six essais mais s'est avérée peu efficace au niveau des résultats. Comme les algues étaient mises à l'étuve sur les filtres de papier, elles y adhéraient au point d'être pratiquement inexploitable pour la suite des opérations. De plus, cette technique requérait plusieurs personnes, prenait du temps et gaspillait énormément d'eau et d'algues qui persistaient à adhérer sur le papier malgré l'ajout de solvant chimique pour les déloger. La centrifugation était plus rapide et produisait de grandes quantités d'algues concentrées et faciles à détacher des verres de montre après le séchage.

Par la suite, le bris des membranes cellulaires par le traitement chimique pour libérer les gouttes de lipides a donné de bons résultats. À cette étape, il était possible de distinguer des gouttes huileuses dans le bécher. Par contre, malgré la centrifugation et la filtration du mélange en vue de retirer les particules membranaires, il a été impossible d'isoler cette couche huileuse et donc de la quantifier. Effectivement, le mélange étant malgré tout trop hétérogène, il était impossible de procéder à une pesée. Il a été possible de confirmer qu'il y avait présence de lipides par des caractéristiques physiques ainsi qu'en frottant un papier brun sur le contenant et en observant un cerne qui se formait là où le papier avait été frotté (figure 5).



Figure 5. Cernes démontrant la présence d'huiles dans les échantillons

Discussion

Les résultats obtenus ne peuvent confirmer l'hypothèse de départ, elle est donc infirmée. Effectivement, une fois l'huile extraite et les solvants évaporés, la quantité d'huile était si infime qu'elle fut impossible à quantifier au moyen des outils disponibles. Les pertes s'accumulaient d'étape en étape, que ce soit au fond des nacelles de pesée, des béchers, des éprouvettes ou bien par la séparation des lipides grâce à des pipettes pasteur suite à l'usage de la centrifugeuse. Aussi, le matériel accessible ne permettait pas un usage prolongé de la centrifugeuse, les éprouvettes en verre présentant des risques d'éclatement. De plus, la somme des déchets membranaires composant les mélanges à analyser démontrait l'échec de la deuxième centrifugation et de la filtration. Ces mélanges étant trop hétérogènes, la pesée devait être écartée. Suite au retrait du surnageant et des membranes, le bécher du premier essai ne laisse voir aucune trace de lipides une fois les solvants évaporés. Ces résultats sont écartés, et ce, en raison de la trop petite quantité d'algues disponibles pour ce test ainsi qu'en raison de la quantité de solvant qui a été doublée. Par contre, la présence de lipides est confirmée dans les échantillons des second, troisième, quatrième, cinquième et sixième essais. C'est l'apparition d'un film jaunâtre et de micelles, caractéristiques propres aux lipides, qui permettent d'affirmer que ces béchers contenaient des lipides.

Une fois le mélange reposé au bout d'une semaine, il est aussi envisageable qu'un rancissement produit par oxydation aurait conduit à une altération de la forme liquide de l'huile recueillie et les corps gras se sont accumulés en un amas solide contenant les déchets de membranes cellulaires (ANNEXE III). C'est à partir de ces amas solides qu'une qualification fut complétée afin de conclure que ces mélanges

contenaient officiellement des lipides. Les amas furent tamponnés sur des papiers à main afin de constater si les fibres du papier auront absorbé les corps gras et si ceux-ci auront formés des halos sur le papier. Au bout d'une semaine, des halos ont bel et bien été formés et la présence de corps gras s'imposait en conclusion. Si l'on compare les méthodes de recueillement utilisées lors du dépôt des amas sur le papier, on constate qu'un frottement du papier directement sur les parois du bécher permet de maximiser les résultats du test. Effectivement, en grattant le fond du bécher à l'aide d'une spatule, on recueille hypothétiquement en majorité les membranes cellulaires fragmentées et celle-ci ne contiennent pas de corps gras. En frottant le papier sur les parois internes du bécher, on augmente les chances de recueillir les lipides adhérent sur les parois. Ainsi, ce test n'est fiable que pour cette seconde méthode, les halos étant également plus abondants et prédominants.

Conclusion

En somme, il a été impossible d'extraire 14% d'huile à partir d'une masse d'algues sèches. Effectivement, les outils disponibles en laboratoire ne favorisaient pas l'extraction précise de microquantités et les nombreuses manipulations ont occasionné une perte de matière. Cependant, en prenant en considération les différents résultats et améliorations suggérées, la cible de 14% d'huile extraite semble atteignable.

Suggestions et perspectives d'avenir

Pour optimiser et accélérer la croissance des *Chlorellas*, il semble primordial de s'assurer que le pH soit maintenu dans les valeurs optimales par des substances acidifiantes (engrais CO₂ gazeux) ou alcalinisantes (bicarbonate de soude). Il est recommandé de

couvrir le bassin pour limiter la contamination de l'eau et conserver une température constante.

Pour accélérer l'étape de la centrifugation des échantillons prélevés dans l'aquarium, il est recommandé de mettre moins d'eau initialement afin d'obtenir plus rapidement une saturation de l'eau par les algues permettant de réduire le temps passé à enlever l'eau avant le séchage.

Le protocole de Bligh and Dyer donne de bons résultats pour ce qui est de briser les membranes des cellules. Par contre, pour isoler la phase huileuse, il serait préférable de mettre tous les échantillons ensemble et de procéder à une décantation plutôt qu'à une deuxième centrifugation. Les volumes seraient alors plus importants et la phase huileuse, celle du bas, serait plus facile à récupérer. Une deuxième centrifugation pourrait fonctionner, mais il faudrait que ce soit dans des tubes en plastique afin de pouvoir les faire tourner plus vite et plus longtemps sans craindre de les briser. Il est à noter que de nombreuses recherches sont en cours afin d'optimiser l'extraction des lipides afin de réduire les coûts de cette étape.

Extraire l'huile contenue naturellement dans les microalgues est une avenue révolutionnaire dans le développement d'énergies vertes. Il a déjà été démontré que la culture des algues présente de nombreux avantages en comparaison aux cultures d'autres sources de biocarburants, notamment en termes de rendement, de pollution et de coûts de production. En effet, les algues n'ont besoin que d'eau, de

lumière, de CO₂ et des nutriments pouvant être extraits de rejets industriels. Il serait intéressant de vérifier s'il est possible de produire des microalgues dans des photobioréacteurs annexés à une usine de façon à utiliser les rejets de celle-ci pour fournir aux algues les nutriments et le CO₂ dont elles ont besoin, peut-être même ici au Nord-du-Québec.

Remerciements

Nous voulons remercier notre tuteur, Martin Imbeault, pour nous avoir éclairés de ses bons conseils tout au long de l'expérimentation et au-delà. Nous levons également notre chapeau à Jessica Maltais, technicienne en laboratoire pour sa supervision et son expérience éclairante. Nous nous devons de souligner l'implication de Steve Gamache pour son apport et expertise en chimie organique tout au long du déroulement du projet jusqu'à l'identification des huiles recueillies. Nos remerciements et salutations se tournent pareillement vers Mark Curley pour son implication et ses conseils scrupuleux dans le cadre de l'écriture de l'abstract figurant dans cet article. Un grand merci à Jean-Norbert Fournier pour ses conseils dévoués sur l'usage du logiciel Excel à des fins de comptabilisation de nos résultats. Nous remercions tout également Isabelle Paquette et Judy Larouche pour leurs conseils de bonne étoile au bon moment et finalement Danielle Meilleur pour son appui et le prêt des locaux nécessaires au bon déroulement de notre expérimentation.

Références

- Abdelaziz, A. E. M. (2014). *Isolation and Identification of Native Microalgae for Biodiesel Production*. (Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise en microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec). Repéré à https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10908/Abdelaziz_Ahmed_2014_memoire.pdf
- Bélaïr, V. (2012). *Développement de nouvelles techniques d'extraction des lipides à partir de microalgues en vue de leur valorisation en biocarburant*. (Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Chimie pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.), Université Laval, Québec, Québec). Repéré à <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/24174>
- Chamoumi, M. (2013). *Optimisation de la production du biodiesel à partir d'huiles de microalgues et d'huiles usées*. (Mémoire de maîtriss, Spécialité : Environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec). Repéré à <https://savoirs.usherbrooke.ca/bitstream/handle/11143/6164/MS00301.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dejoye, C. (2013). *Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant*. (Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Université d'Avignon, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01712195/document>
- Doré-Deschênes, F. (2009). *Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable*. (Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M.Env.), Université de Sherbrooke, Longueuil, Québec). Repéré à https://www.usherbrooke.ca/environnement/fileadmin/sites/environnement/documents/Essais2009/Deschenes_F_09-07-09_.pdf
- Gloaguen, M., Perrin, P.-L., Scheffler, M. (2012). *TPE Applications des micro-algues dans les biocarburants*. Repéré à <http://tpemicroalgue.e-monsite.com/>
- Lemire-Lamothe, M. (2016). *Étude du mode trophique d'un consortium de *Chlorella* spp. cultivé dans des eaux usées industrielles à des fins énergétiques*. (Mémoire présenté à l'Université du Québec à Trois-Rivières comme exigence partielle de la maîtrise en sciences de l'environnement, Trois-Rivières, Québec). Repéré à <http://depot-e.uqtr.ca/7850/1/031261331.pdf>
- Wang, C., Li, H., Wang, Q., Wei, P. (2010) *Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry*. (College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, China). Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21090111>

ANNEXE I

TABLEAU 1. Données quotidiennes de température, de pH et de niveau d'eau dans l'aquarium.

Date	Jour	Température (±0,05°C)	pH (±0,1)	Niveau d'eau (±0,05cm)	Remarques	Volume (mL)
01-mars	1			19,00	Remplissage de l'aquarium avec de l'eau distillée	34200
02-mars	2			19,00		34200
03-mars	3				Samedi	---
04-mars	4				Dimanche	---
05-mars	5	17,80		19,00	Ajout des algues, impossible à distinguer au sein de l'aquarium	34200
06-mars	6	18,80	6,1	18,40	Ajout de plus de 50 mL d'engrais, pH enregistré de 3,8, l'eau est d'apparence bleuâtre.	33120
07-mars	7	18,80	3,8	18,10		32580
08-mars	8	18,60	4	18,00		32400
09-mars	9	18,70	4,3	17,90		32220
10-mars	10				Samedi	---
11-mars	11				Dimanche	
12-mars	12	18,70	5,6	17,40	On voit de petites colonies d'algues circulaires au fond de l'aquarium	31320
13-mars	13	18,60	5,7	17,20	Ajout de l'aérateur et du NaHCO ₃ , le pH augmente à 6,4	30960
14-mars	14	18,60	7,2	17,20	Petits amas vert fluo au fond de l'aquarium	30960
15-mars	15	18,60	7,3	17,00		30600
16-mars	16	18,60	7,3	16,90		30420
17-mars	17				Samedi	---
18-mars	18				dimanche	---
19-mars	19	18,30	7,4	16,20		29160
20-mars	20	18,40	7,3	16,00	Ajout de 4,2043g de NaHCO ₃ : quelques dépôts / ajout de la pellicule de plastique / 30s d'ajout de CO ₂ / présence de champignons dans les béchers de solutions témoins pour le pH.	28800
21-mars	21	20,70	8,1	15,90	Algues adhérent sur les vitres	28620
22-mars	22	20,50	8,7	15,90	Ajout de 10mL d'engrais: pH baisse à 7,8	28620

23-mars	23	20,70	8,1	15,90	Traces d'engrais sur la pellicule plastique	28620
24-mars	24				Samedi	---
25-mars	25				Dimanche	---
26-mars	26	21,10	8,1	15,90	Pellicule verte sur toute la surface vitrée / retrait de 40mL d'eau et d'algues pour l'expérimentation	28620
27-mars	27	20,40	8,1	15,70	Visite des pompiers le système d'éclairage a été coupé / 10s de CO2 / ajout de 20mL d'engrais	28260
28-mars	28	20,50	7,4	15,60	Retrait de 3L d'eau	28080
29-mars	29	20,40	7,4	14,00	L'eau commence à être trouble	25200
30-mars	30				Congé	---
31-mars	31				Samedi	---
01-avr	32				Dimanche	---
02-avr	33				Congé	---
03-avr	34	20,60	7,5	12,80	---	23040
04-avr	35				---	---
05-avr	36	20,70	7,6	12,50	Retrait de 200mL d'eau et d'algues pour centrifugation	22500
06-avr	37	20,50	7,7	12,40	Retrait de 1300 mL d'eau	22320
07-avr	38				Samedi	---
08-avr	39				Dimanche	---
09-avr	40	20,80	7,9		Retrait de 1 L d'eau	---
10-avr	41	20,60		11,00	Retrait de 500 mL d'eau	19800
11-avr	42	20,00	7,9	9,60	Retrait de 1,2 L d'eau	17280
12-avr	43	20,10	8,2		Ajout de 5mL d'engrais	---
13-avr	44	19,50	8,0	7,90	---	14220

ANNEXE II

Résultat de la culture de Chlorella dans une bouteille de 1L après un mois d'expérimentation :



ANNEXE III

TABLEAU 2. Masse des algues après le séchage, masse du contenu en huile et pourcentage en huile.

Essai	Masse d'algues sèches (après l'étuve) (± 0,0001 g)	Masse nette du contenu des coupelles (± 0,0002 g)	Masse du contenu de la coupelle et du filtrat (± 0,0004 g)	Pourcentage de masse sèche (± 0,5 %)
1	0,0902	0,0902	0,0121	13,4
2	0,3033	0,3033	0,1002	33,0
3*	---	0,0000	0,0098	---
4	0,3225	0,3225	0,2579	80,0
5	0,8741	0,8741	0,3289	37,6
6	0,4300	0,4300	0,0707	16,4

*L'essai 3 provenait d'une technique d'extraction par filtration. Il a été impossible de peser la masse d'algues sèches produites de cette façon.

Quatre des six résultats obtenus sont au-dessus de l'hypothèse de 14 % d'huile extraite à partir de masse d'algues sèches. Par contre, il était évident que ces résultats n'étaient pas uniquement composés de lipides, mais surtout de débris de membranes. Ces résultats sont donc inexploitable.