

## **Matériel et Méthodes D'Analyses chimiques**

### **3.1.1 Dosage des ions**

Les dosages des ions (anions et cations) dans les milieux de culture sont effectués par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette méthode est utilisée pour quantifier le magnésium, le calcium, le nitrate et le nitrite. Le sodium, le potassium, le chlorure, le sulfate et le phosphate sont détectés mais non quantifiés.

L'appareillage utilisé est une chaîne HPLC ICS-3000 de chez DIONEX. L'HPLC ionique est équipée d'un passeur d'échantillon, d'une pompe, d'une enceinte thermostatée, d'un suppresseur et d'une détection par conductimétrie. L'HPLC est équipée d'un générateur d'éluant et d'un suppresseur électrique. L'utilisation d'un générateur d'éluant et d'un suppresseur électrique évite de préparer les diverses solutions (éluant, solution de lavage...), seule de l'eau déionisée (résistivité 18M $\Omega$ /cm) est nécessaire. Le logiciel "Chromeleon" est utilisé pour piloter l'appareillage et traiter les données.

Les échantillons à analyser sont impérativement filtrés sur un filtre PTFE avec un seuil de coupure de 0,45 $\mu$ m. Avant analyse, les échantillons sont conditionnés dans des flacons en verre munis de bouchons avec septum téflon, et conservés à 4°C. Des dilutions sont faites juste avant analyse pour se situer dans la gamme d'étalonnage des standards. Les solutions standards (pour l'établissement d'une gamme étalon) sont également conditionnées dans des flacons en verre munis de bouchons avec septum téflon, et conservés à -20°C.

NB: Pour l'analyse des cations, après la filtration, les échantillons sont acidifiés en ajoutant de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) à raison de 1% du volume d'échantillon.

#### **3.1.1.1 Dosage des cations**

Les échantillons sont analysés sur une colonne présentant des groupements fonctionnels du type acide carboxylique. La colonne est ainsi chargée négativement pour retenir spécifiquement les cations. Ceux-ci sont élués par l'acide méthane-sulfonique. Les ions sont séparés selon leur charge. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Volume d'injection	25 $\mu$ L (boucle d'injection)
- Pré Colonne DIONEX	IonPac CG12A 4 mm x 50 mm
- Colonne DIONEX	IonPac CS12A 4 mm x 250 mm
- Éluant Acide	Méthanesulfonique à 20mM
- Débit éluant	1 ml/mm
- Température colonne	25°C
- Suppresseur	CSRS-ULTRA (4mm) auto régénérant
- Courant du supprimeur	100mA
- Détecteur	Conductimètre
- Durée d'analyse	20 minutes

Les cations sont identifiés sur la base du temps de rétention, par comparaison avec des standards. Un exemple de séparation de cations est présenté dans la Figure 10.

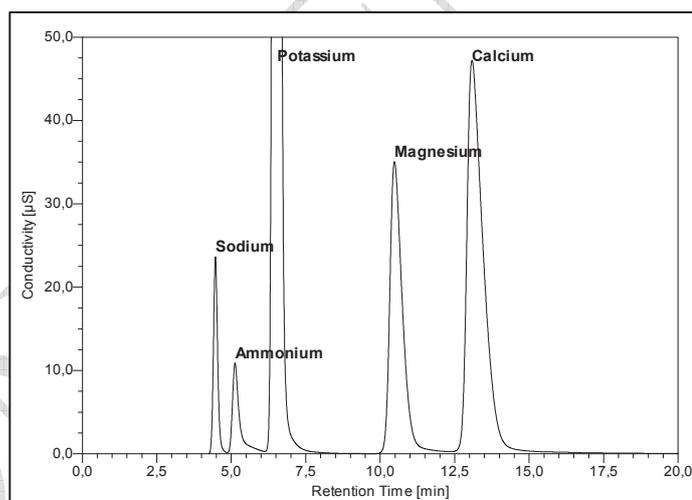


Figure 10 : Chromatogramme de séparation des cations en HPLC ionique.

La quantification est faite en standard externe. Les gammes étalons ont été établies pour le magnésium et le calcium, respectivement entre 0 et 1000 et 0 et 400  $\mu$ M. Les différents points de la gamme étalon sont préparés à partir de deux solutions mères de MgO (6,25 mM) et CaCO<sub>3</sub> (2,5 mM). Différents volumes de la solution mère sont introduits dans un milieu salin proche d'un point de vue compositionnel du milieu de culture des cyanobactéries.

Les courbes d'étalonnage sont validées pour un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) supérieur à 0,998 (Figure 11 et Figure 12).

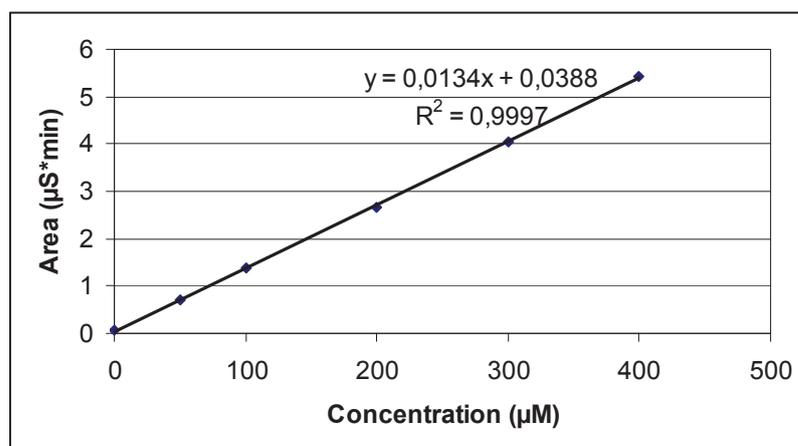


Figure 11 : Courbe d'étalonnage pour le calcium

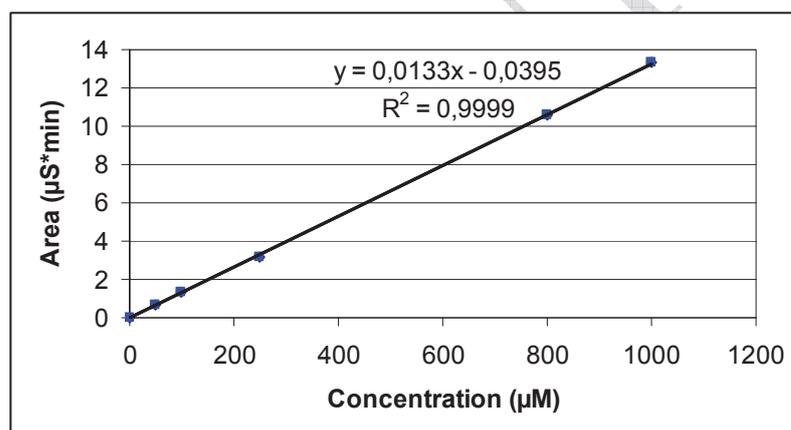


Figure 12 : Courbe d'étalonnage pour le magnésium.

### 3.1.1.2 Dosage des anions

Les échantillons sont analysés sur une colonne présentant des groupements fonctionnels "*alkyl/alkanol quaternary ammonium*". La colonne est ainsi chargée positivement pour retenir spécifiquement les anions. Ceux ci sont élués par de la potasse. Les ions sont séparés selon leur charge. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Volume d'injection	25 $\mu$ L (boucle d'injection)
- Pré Colonne DIONEX	IonPac AG9-HC, 4 mm x 50 mm
- Colonne DIONEX	IonPac AS9-HC, 4 mm x 250 mm
- Éluant	Potasse
- Gradient d'élution :	
0 - 10 minutes	Potasse à 20 mM
10 - 25 minutes	Gradient de 20 à 45mM
25 - 25,1 minutes	Gradient de 45 à 20mM
25,1 - 30 minutes	Potasse 20mM
- Débit éluant	1 ml/mm
- Température colonne	30°C
- Suppresseur	ASRS-ULTRA (4mm) auto régénérant
- Courant du supprimeur	150mA
- Détecteur	Conductimètre
- Temps d'analyse	30 minutes

Les anions sont identifiés sur la base du temps de rétention, par comparaison avec des standards. Un exemple de séparation des anions est présenté dans la Figure 13.

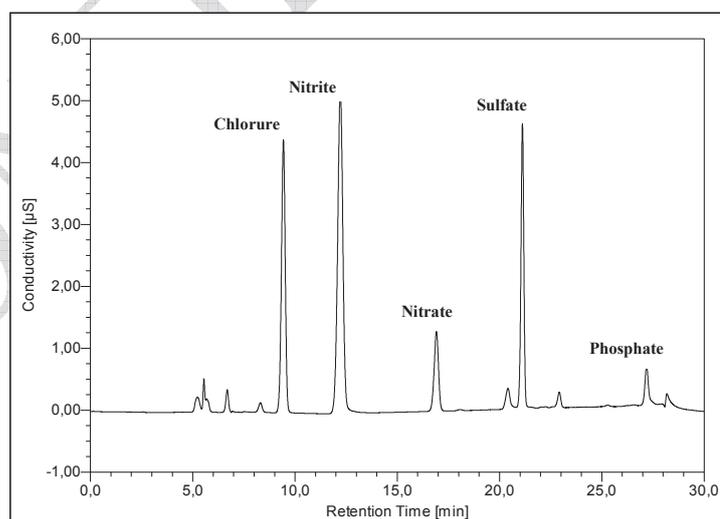


Figure 13 : Chromatogramme de séparation des anions en HPLC ionique.

La quantification est faite en standard externe. Les gammes étalons ont été établies pour le nitrate et le nitrite, entre 0 et 2,5 mM. Les différents points de la gamme étalon sont préparés à partir de  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{NaNO}_2$ . La courbe d'étalonnage du nitrate est une équation

linéaire (type  $y = ax + b$ ), celle du nitrite est polynomiale d'ordre 2 (équation du second degré). Les courbes d'étalonnage sont validées pour un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) supérieur à 0,998 (Figure 14 et Figure 15).

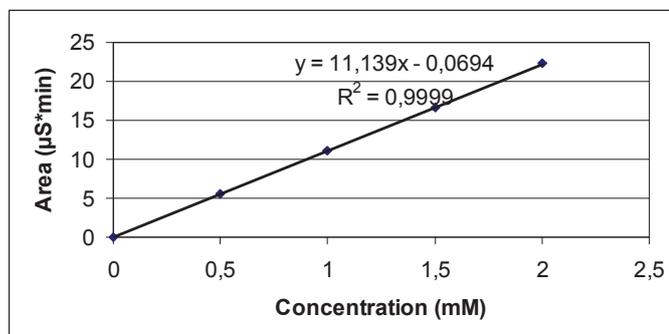


Figure 14 : Courbe d'étalonnage du nitrate

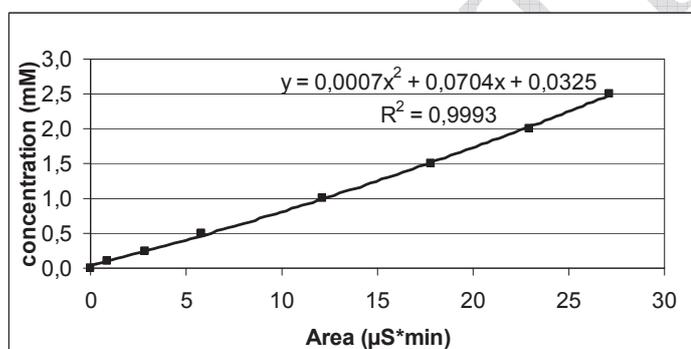


Figure 15 : Courbe d'étalonnage du nitrite

### 3.1.2 Dosage de $\text{Ca}^{2+}$ dissous dans l'eau par absorption atomique

Les analyses d'absorption atomique sont réalisées par ICP-AES. Une gamme étalon de la solution saline est faite avec différents teneurs de  $\text{Ca}^{2+}$  (0, 10, 20, 50 et 100 ppm).

Les analyses d'ICP-AES sont effectuées sur les échantillons dilués au dixième. Le milieu de culture est filtré et puis conservé à 4°C dans un tube en polypropylène de 10 ml (Ref VWR 216-0154).

### 3.1.3 Dosage du CT (carbone total), du CI (carbone inorganique) et du COD (carbone organique dissous).

Par convention le carbone sous forme organique est écrit sous le sigle COD, et le carbone minéral sous le sigle CI. La somme des deux formes représente le carbone total (CT). Le dosage des deux formes de carbone (minéral et organique) est fait sur un analyseur TOC 5050 Shimadzu. Cet analyseur permet de mettre en œuvre séparément une analyse de CT et une analyse de CI sur deux lignes d'analyse différentes. La limite de détection est de 50 ppb à 4,000 ppm pour la ligne CT et de 50 ppb à 5,000 ppm pour la ligne CI.

Chaque échantillon (standard ou essai) est analysé systématiquement sur les deux lignes d'analyses.

L'analyse du carbone total (organique et minéral) est faite sur une première ligne d'analyse (ligne CT) dans laquelle le carbone organique et minéral (éventuellement sous la forme de bicarbonate et de carbonate) est décomposé en CO<sub>2</sub> dans un tube à combustion, en présence d'un catalyseur à palladium porté à 680°C. Le volume maximal d'injection est de 100 µl.

L'analyse du carbone minéral est faite sur la seconde ligne d'analyse (ligne CI), où le carbone minéral est traité en présence d'acide ortho-phosphorique (20%), qui permet le déplacement total de ce carbone minéral de l'échantillon liquide sous la forme de CO<sub>2</sub>. Le volume maximal d'injection est de 250 µl. Pour les deux lignes d'analyse, le CO<sub>2</sub> généré (dilué dans un gaz vecteur qui est de l'air sans CO<sub>2</sub>) est mesuré par infrarouge.

Par convention le carbone organique dissous est obtenu en soustrayant la valeur de carbone minéral de la valeur du carbone total (COD = CT-CI). Les valeurs de carbone organique sont donnés en équivalent hydrogénéphthalate. Pour quantifier très correctement la réponse "carbone organique" de l'échantillon, il serait nécessaire de connaître la nature des composés organiques présents (proportion C/CONHS).

#### 3.1.3.1 Calibration de la ligne CT et CI

La ligne d'analyse CT est calibrée avec de l'hydrogénéphthalate de potassium (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>). Deux gammes de calibration sont effectuées. Les gammes de calibration sont présentées dans le Tableau 2. Les courbes de calibration sont présentées dans la Figure 16. Les standards de calibration sont préparés dans de l'eau filtrée à 0,22 µm et de résistivité de 18 Ωm.

Tableau 2 : Gamme de calibration pour la ligne d'analyse CT

Gamme de calibration	Volume d'injection μl	C introduit	
		μM	mg/L
N°1	27	1	0
		2	417
		3	833
		4	4167
		5	8333
N°2	16	1	0
		2	8333
		3	20833
		4	41667
		5	83333

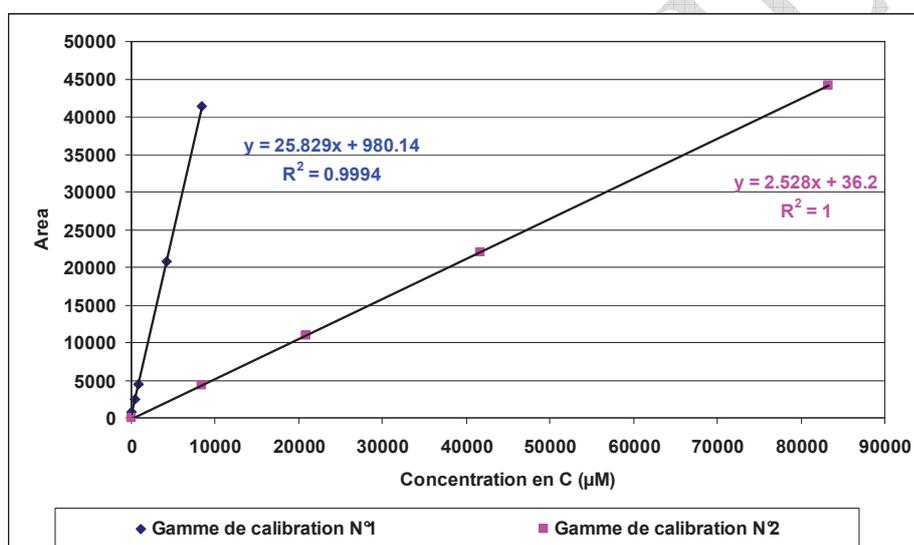


Figure 16 : Courbe de calibration pour la ligne d'analyse CT

La ligne d'analyse CI est calibrée avec des standards préparés avec du  $\text{NaHCO}_3$  et du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Les standards sont préparés à partir d'une solution mère (500 mg/l en carbone total) qui contient de 50% de carbone issu de  $\text{NaHCO}_3$  et 50% de carbone issu de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , dans de l'eau MilliQ filtrée à 0,22 μm, et de résistivité de 18 Ωm. Le carbonate de sodium est chauffé pendant 1 heure à 285 °C et refroidi dans un dessiccateur avant la fabrication de la solution mère.

Trois gammes de calibration sont effectuées. Les gammes de calibration sont présentées dans le Tableau 3. Les courbes de calibration sont présentées dans la Figure 17.

Tableau 3 : Gamme de calibration pour la ligne d'analyse CI

Gamme de calibration	Volume d'injection µl		C introduit	C introduit
			µM	mg/L
N°1	27	1	0	0
		2	417	5
		3	833	10
		4	2083	25
N°2	13	1	0	0
		2	2083	25
		3	4167	50
		4	8333	100
N°3	33	1	0	0
		2	8333	100
		3	20833	250
		4	41667	500

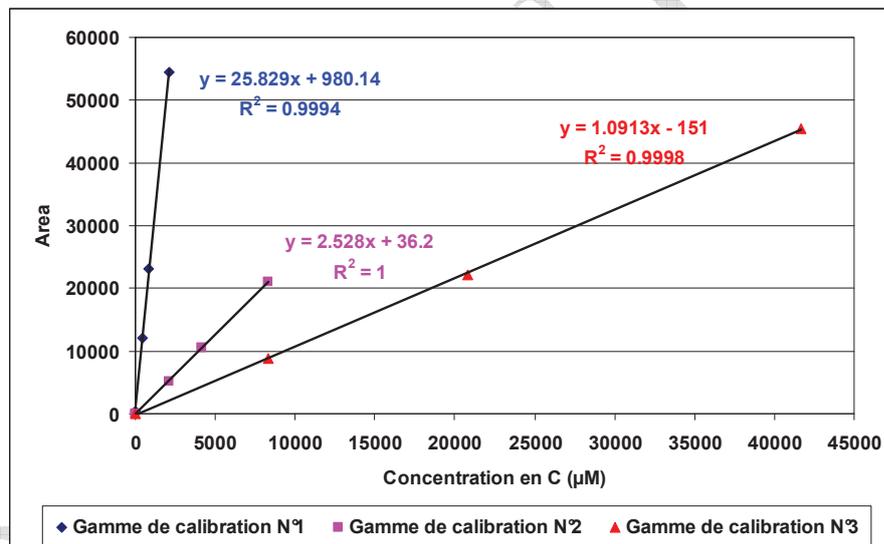


Figure 17 : Courbe de calibration pour la ligne d'analyse CI

Pour prendre en compte une interférence possible d'une charge en sel (dans les milieux de culture à analyser) on a comparé la réponse de deux gammes d'étalonnage. L'une est faite avec le milieu pour la croissance des cyanobactéries et l'autre avec l'eau MilliQ. Pour ces deux gammes d'étalonnage, l'apport du carbone minéral a été fait par du bicarbonate de sodium. La molarité varie de 0,25 mM à 8 mM. On traite les différents points de cette gamme d'étalonnage comme des échantillons à analyser.

La réponse du carbone minéral est mesurée à la fois par la ligne CI et la ligne CT. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Les réponses de carbone minéral étaient comparables par les deux lignes d'analyses CT et CI. La salinité du milieu (de l'ordre de 15g/l)

n'as pas d'incidence sur la mesure du carbone minéral. Les réponses des points de chaque gamme (dans l'eau et dans le milieu marin) sont alignées sur des droites (avec des équations de type:  $y = ax + b$ ) avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) supérieur à 0,999.

NB : Dans le cas où l'échantillon ne présente que du carbone organique dissous, on a vérifié que la réponse de la ligne d'analyse CI était nulle.

Une étude de répétabilité des réponses de la ligne d'analyse CI a été également faite en passant dix fois un même échantillon ne contenant que du carbone minéral. L'échantillon testé est préparé dans un milieu salin (cf. §3.2.2), avec une concentration en carbone minéral de 7,5 mM ( $\text{HCO}_3^-$ ) et avec une concentration de chlorure de calcium de 3,4 mM. On obtient une réponse moyenne de 7,3 mM, avec un écart-type dans l'ordre de 0,1 (1,37 % de la valeur).

Tableau 4 : Réponses des lignes CT et CI pour les échantillons ne contenant que du carbone minéral

		Carbone minéral introduit mM	Réponse ligne CT mM	Réponse ligne CI mM
Eau MilliQ + $\text{NaHCO}_3$				
	N°1	0,25	0,4	0,3
	N°2	0,50	0,6	0,6
	N°3	1,00	1,1	1,1
	N°4	1,50	1,6	1,6
	N°5	2,00	2,0	2,0
	N°6	4,00	4,0	4,0
	N°7	6,00	5,9	6,0
	N°8	8,00	8,0	8,1
Milieu marin + $\text{NaHCO}_3$				
	N°1	0,25	0,4	0,3
	N°2	0,50	0,6	0,5
	N°3	1,00	1,0	1,1
	N°4	1,50	1,5	1,6
	N°5	2,00	2,0	2,0
	N°6	4,00	4,0	4,2
	N°7	6,00	6,0	6,1
	N°8	8,00	7,8	8,1

### 3.1.3.2 Dosage du carbone minéral et organique des échantillons

L'analyse du carbone minéral et organique est faite sur les échantillons filtrés sur filtre PTFE avec un seuil de coupure de 0,45  $\mu\text{m}$  (filtre FH, Millipore). Cette filtration permet de séparer la "matière insoluble" (biomasse seule ou mélange biomasse/carbonate de calcium). Les filtrats obtenus sont conservés à +4 °C dans des tubes plastiques (ref VWR 216-0154) de 10 mL remplis totalement et fermés avec un bouchon étanche pour éviter des échanges avec

l'atmosphère. Les échantillons ne sont jamais dilués afin d'éviter une perte possible de carbone minéral par modification de pH du à la dilution entraînant un rééquilibrage des formes des espèces du système carbonate.

L'échantillon est injecté avec un passeur automatique et le calculateur de l'appareillage sélectionne une réponse optimale en variant automatiquement le volume d'injection.

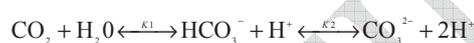
Des standards sont intercalés au cours de l'analyse des échantillons pour vérifier la calibration des deux lignes d'analyse: la ligne CT est contrôlée avec le standard CT 100 mg/L (soit 8333 $\mu$ M), la ligne CI est contrôlée avec le standard CI 50 mg/L (soit 4167  $\mu$ M).

### 3.1.4 Dosage des espèces hydroxyles, carbonate et hydrogénocarbonate dans l'eau

#### 3.1.4.1 Définition du système "carbonate"

Dans les eaux (eau douce et eau de mer), le carbone minéral existe sous trois formes inorganiques : le CO<sub>2</sub> libre (CO<sub>2</sub> aq), le bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), et le carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Une quatrième forme est la forme H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (acide carbonique) qui est négligeable du point de vue quantitatif.

L'ensemble des espèces carbonatées est représenté par l'équilibre suivant:



où K<sub>1</sub> et K<sub>2</sub> sont les deux constantes d'équilibres, souvent appelées respectivement première et seconde constantes de l'acide carbonique.

Dans les eaux de mer, la distribution des trois espèces : CO<sub>2</sub> dissous, bicarbonate et carbonate est donnée dans la

Figure 18, telle que présentée par Bjerrum (Zeebe et Wolf-Gladrow, 2001<sup>1</sup>). A la valeur de la première dissociation (pK<sub>1</sub> = 5,86, valeur pour l'eau de mer), la concentration de l'espèce CO<sub>2</sub> est égale à la concentration de l'espèce HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A la valeur de la seconde dissociation (pK<sub>2</sub> = 8,92, valeur pour l'eau de mer), la concentration de l'espèce HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est égale à la concentration de l'espèce CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. (NB: les concentrations sur l'axe des ordonnées sont données en échelle logarithmique)

---

<sup>1</sup> Zeebe Re, Wolf-Gladrow Da (2001) *CO<sub>2</sub> in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

**NB** : Les milieux naturels, type eaux douces ou eaux de mer, présentent rarement des situations de pH extrême, en particulier de pH fortement alcalin. A l'inverse dans nos cultures, des pH alcalins peuvent être obtenus. Dans ces conditions la teneur en ions hydroxyle présents est prise en compte.

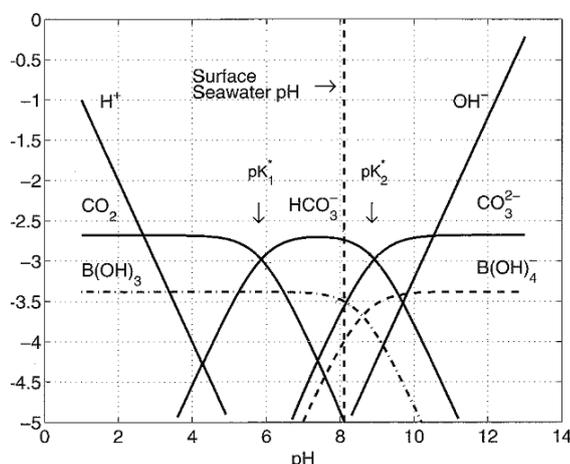


Figure 18 : Le système carbonaté dans l'eau de mer (Zeebe et Wolf-Gladrow, 2001).

### 3.1.4.2 Principe

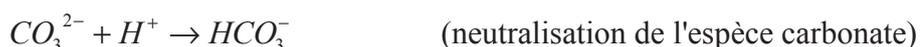
La quantification des trois espèces hydroxyle, carbonate et bicarbonate est faite par la technique de "titrimétrie". On prend en compte les espèces hydroxyle et carbonate dans des échantillons fortement alcalins. Pour des échantillons moins alcalin, on prend seulement en compte les espèces carbonate et bicarbonate.

### 3.1.4.3 Méthodologie

La titrimétrie s'effectue à l'aide d'un acide fort de normalité connue. On détermine la courbe : quantité de  $H^+$  (abscisse)/pH (en ordonnée). La Figure 19 représente un exemple de courbe de titrimétrie pour une situation où les deux espèces carbonate et bicarbonate sont présentes respectivement à  $50 \mu\text{mol}$  de  $\text{NaHCO}_3$  et  $50 \mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Le premier point d'inflexion (noté point d'inflexion 1 dans la Figure 19) correspond au virage de la phénolphthaléine ( $\text{pH} < 8,3$  incolore et  $\text{pH} > 8,3$  rose). Les protons  $H^+$  se combinent aux ions hydroxyle et aux ions carbonate. Les ions carbonate forment des ions bicarbonate. La quantité d'acide ajoutée pour atteindre le point d'inflexion 1 (exprimée en équivalent  $\mu\text{mol } H^+$ ) permet de calculer "l'alcalinité phénolphthaléine" (notée Phe Alc).





Le second point d'inflexion (noté point d'inflexion 2 dans la Figure 19) correspond au virage d'un indicateur mixte vert de bromocrésol ( $\text{pH} < 3,6/5,2$  jaune et  $\text{pH} > 3,6/5,2$  vert) - rouge de méthyle ( $\text{pH} < 4,2/6,3$  rouge et  $\text{pH} > 4,2/6,3$  jaune). Les protons  $\text{H}^+$  se combinent aux ions bicarbonate pour former du  $\text{CO}_2$ . Par convention, "l'alcalinité totale" (notée AT) représente la quantité totale d'acide ajoutée depuis le départ de la titration pour atteindre le point d'inflexion 2.

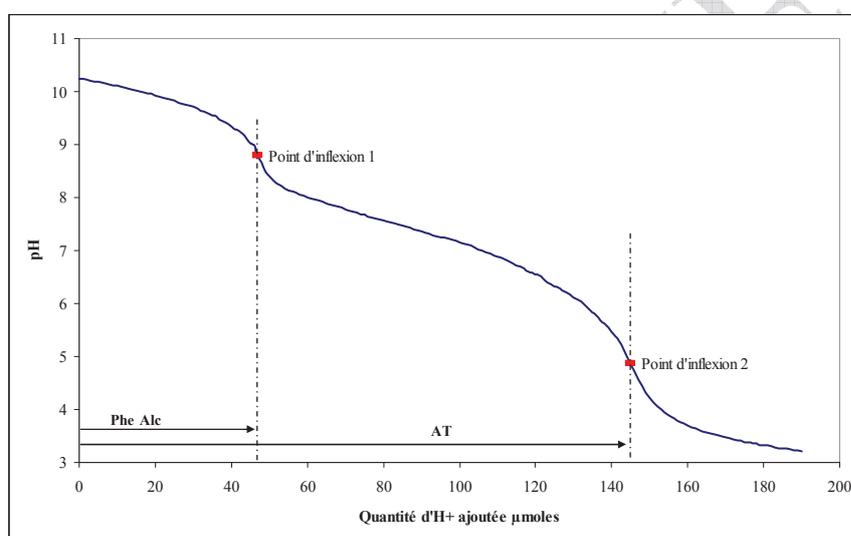
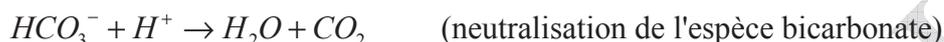


Figure 19 : Courbe de titrimétrie : 50  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NaHCO}_3$  et 50  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Les espèces hydroxyle, carbonate et bicarbonate sont déterminées à partir de ces deux alcalinités (Phe Alc et AT). On utilise les formules de calcul présentées dans le Tableau 5 tenant compte de 5 situations possibles. La situation 4 représente une situation où ne coexistent que les deux espèces carbonate et bicarbonate. Dans ces conditions  $\text{Phe Alc} < \text{AT}/2$ , quelque soit le rapport entre les deux espèces carbonate et bicarbonate.

Dans le Tableau 5, on définit l'*alcalinité carbonate* comme suit :  $2[\text{CO}_3^{2-}]$ . On définit l'*alcalinité bicarbonate* comme suit :  $[\text{HCO}_3^-]$ .

NB : Attention ces alcalinité carbonate et bicarbonate du Tableau 5 n'ont rien à voir avec la notion d'alcalinité carbonate désignée sous le sigle CA définie comme suit :  $\text{CA} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}]$ . Cette alcalinité carbonate est une grandeur mesurable qui ne dépend pas du pH. Son grand mérite est de représenter, en quelque sorte, la résistance chimique de l'eau

vis-à-vis d'une perturbation acido-basique via le maintien de la neutralité électrique de l'eau (on parle de "*pouvoir tampon*").

Tableau 5 : Différentes situations de distribution des alcalinités avec les ions carbonate, bicarbonate et OH<sup>-</sup>

Situations	Titration	Alcalinité Hydroxyle	Alcalinité Carbonate	Alcalinité Bicarbonate
1	Phe Alc = AT	= Total Alcalinité	0	0
2	Phe Alc > AT/2	= 2Phe Alc - AT	= 2(AT-Phe Alc)	0
3	Phe Alc = AT/2	0	= AT	0
4	Phe Alc < AT/2	0	= 2 Phe Alc	= AT-2Phe Alc
5	Phe Alc = 0	0	0	= AT

#### 3.1.4.4 Mode opératoire

La titration est faite avec un titrimètre automatique (Titrimo 702 SM, METHROM). Les paramètres habituels de titration sont :

- volume d'échantillon de l'ordre de 40 ml (volume mesuré)
- acide sulfurique 0,01N.

La titration automatique se fait par des ajouts fixes de 0,1 ml (ce qui correspond à 1  $\mu\text{mol H}^+$  pour une normalité de 0.01N). Les mesures sont enregistrées sur ordinateur à l'aide d'un logiciel (Tiamo, METHROM). Les données sont ensuite traitées sur Excel pour déterminer précisément les deux points d'inflexion.

Sur la courbe de titration, les points d'inflexion sont positionnés précisément pour la variation maximale de pH obtenue pour un ajout fixe de H<sup>+</sup> (de 1  $\mu\text{mol H}^+$ ). Le point final de la titration est fixé autour de pH 3.

#### 3.1.4.5 Répétabilité, limite de quantification, influence de la salinité

La répétabilité de la méthode de titrimétrie a été déterminée sur 10 titrations d'un même échantillon. La prise d'essai est de 40 ml (ce qui correspond à 50  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_3^{2-}$  et 50  $\mu\text{mol}$  d' $\text{HCO}_3^-$ ). Les valeurs moyennes obtenues sont respectivement de 50  $\mu\text{mol}$  pour le  $\text{CO}_3^{2-}$  et de 48  $\mu\text{mol}$  pour le  $\text{HCO}_3^-$ , avec des écart-types respectifs de 1 et 2  $\mu\text{mol}$ .

La limite de détection a également été évaluée. Pour cela une prise d'essai de 4 ml (échantillon avec 5  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_3^{2-}$  et 5  $\mu\text{mol}$  d' $\text{HCO}_3^-$ ) a été utilisée.

Les valeurs moyennes obtenues sont respectivement de 4,7  $\mu\text{mol}$  pour le  $\text{CO}_3^{2-}$  et de 5,2  $\mu\text{mol}$  pour le  $\text{HCO}_3^-$ , avec des écart-types respectifs de 0,3 et 0,4  $\mu\text{mol}$ .

L'influence de la salinité sur le dosage des carbonates et des bicarbonates par titrimétrie a été examinée. Deux solutions de bicarbonate à 5 mM, l'une dans de l'eau, l'autre dans du milieu salin (à 15 g/L) ont été dosées. Les courbes de titration dans la Figure 20 montrent qu'une salinité de l'ordre de 15 g/L n'a pas d'incidence sur les résultats de la titration.

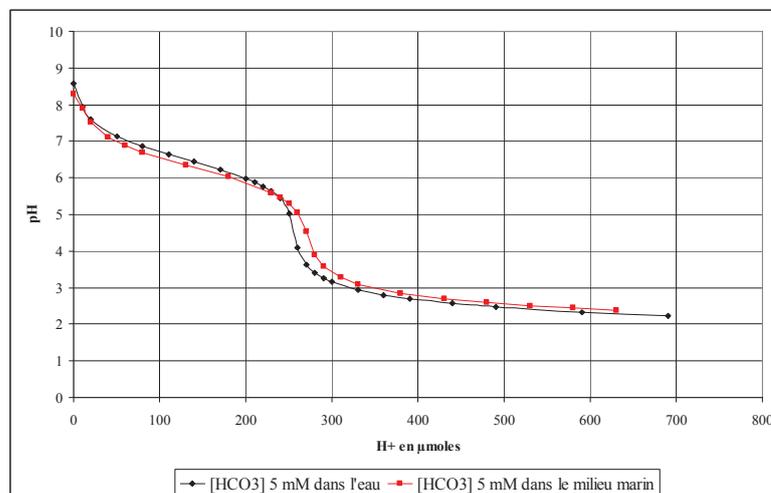


Figure 20: Influence de la salinité sur la titration des espèces carbonate et bicarbonate

### 3.1.5 Dosage du CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> gazeux par CPG

La teneur en CO<sub>2</sub> et en O<sub>2</sub> de la phase gazeuse (ciel de la fiole d'essai) est mesurée en chromatographie gazeuse (CPG) avec un chromatographe muni de deux injecteurs, et d'un four commun. La détection se fait par catharométrie. Le détecteur est unique et les deux colonnes sont raccordées par un Y au catharomètre. L'acquisition des réponses chromatographiques est faite avec un logiciel informatique Borwin (VARIAN).

#### 3.1.5.1 Analyse du CO<sub>2</sub>

Le dosage de la teneur en CO<sub>2</sub> (%v/v) dans l'échantillon gazeux se fait sur une colonne inox remplie, de 2 mm de diamètre interne et de 2m de longueur. La phase est le support Porapak Q (80/100 mesh) (fournisseur Chrompack). Le gaz vecteur est l'hélium. La pression en tête de colonne est de 25 psi, ce qui correspond à un débit de 30 ml/min en sortie de colonne. L'analyse s'effectue en isotherme. La température du four est de 100 °C. La température de l'injecteur est de 130°C. La température du détecteur (TCD) est de 130°C. La température de filament du pont de Wheatstone est de 180°C, pour un courant de filament de 180 mA. La polarité est réglée pour obtenir une réponse sous la forme d'un signal positif. Sur le CPG, la "polarité" est positionnée sur positif pour l'analyse de CO<sub>2</sub>.

Dans ces conditions d'analyses, l'azote et le CO<sub>2</sub> sont détectés. L'azote sort à environ 0,25 min et le CO<sub>2</sub> à environ 0,45 min. On observe un pic d'eau à environ 1,05 min (cf. Figure 21). Il est nécessaire de laisser sortir le pic d'eau avant une nouvelle analyse.

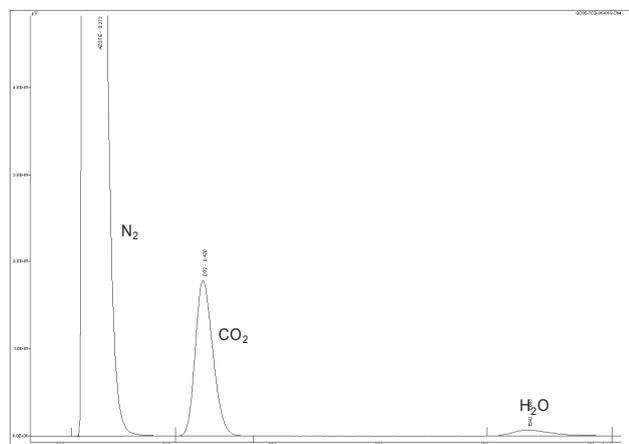


Figure 21 : Réponse catharométrique: azote, CO<sub>2</sub>, et eau.

### 3.1.5.2 Analyse de l'O<sub>2</sub>

Le dosage de la teneur en O<sub>2</sub> dans l'échantillon gazeux se fait sur une colonne inox remplie, de 2 mm de diamètre interne et de 2 m de longueur. La phase est un tamis moléculaire 13X (80/100 mesh) (fournisseur Altech). Cette phase a subi des lavages pour éliminer les fines et améliorer la réponse. Le gaz vecteur est de l'hélium. La pression en tête de colonne est de 42 psi qui correspond à un débit de 30 ml/min en sortie de colonne. L'analyse s'effectue en isotherme. La température du four est de 50°C. La température de l'injecteur est de 130°C. La température du détecteur (TCD) est de 130°C. La température de filament du pont de Wheatstone est de 180°C, avec un courant de filament de 180 mA. La polarité est réglée pour obtenir une réponse sous la forme d'un signal positif. Sur le CPG, la "polarité" est positionnée sur négatif pour l'analyse de l'O<sub>2</sub>.

Dans ces conditions d'analyses, l'oxygène et l'azote sont détectés. L'oxygène présente un temps de rétention d'environ 0,75 min et l'azote de 1,5 min (Figure 22).

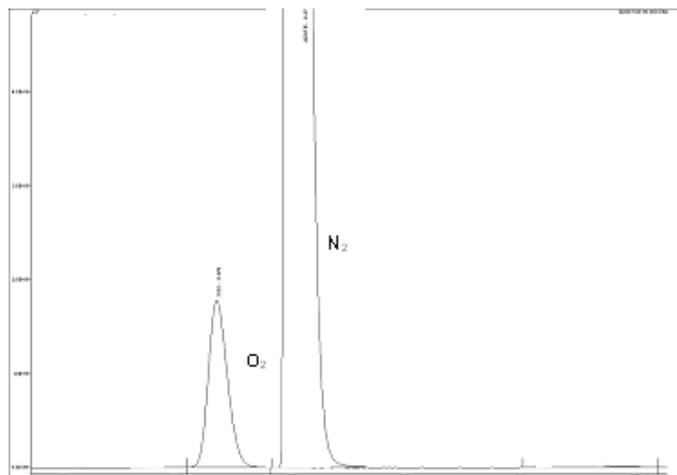


Figure 22 : Réponse catharométrique : azote et oxygène

### 3.1.5.3 Étalonnage.

Le prélèvement et l'injection du gaz étalon et/ou des phases gazeuses à analyser s'effectuent avec une seringue à gaz Hamilton de 250  $\mu\text{L}$  de capacité. La seringue étanche au gaz est munie d'un système de vanne ouverture/fermeture. Le volume de gaz injecté est de 250  $\mu\text{L}$ .

La calibration pour le  $\text{CO}_2$  est faite avec un gaz étalon certifié, du  $\text{CO}_2$  dans de l'azote (fournisseur Air Liquide). La teneur en  $\text{CO}_2$  du mélange étalon est de l'ordre de 4,8 % (v/v) dans l'azote, elle est donnée avec la précision d'une décimale. La prise d'échantillon de gaz étalon calibré se fait par l'intermédiaire d'une ampoule à gaz. L'ampoule à gaz est balayée à partir de la bouteille étalon munie d'un détendeur. La pression du gaz dans l'ampoule de prélèvement est ramenée à la pression atmosphérique. Cet équilibrage est fait en plongeant l'évent de l'ampoule à gaz dans un récipient contenant de l'eau. Les calibrations à partir des standards sont faites à la pression atmosphérique existante au moment de la calibration. Le prélèvement et l'injection du gaz étalon s'effectuent par une seringue à gaz Hamilton de 250  $\mu\text{L}$  de capacité. La seringue étanche au gaz est munie d'un système de vanne ouverture/fermeture.

Pour obtenir le zéro de la droite d'étalonnage on injecte 250  $\mu\text{L}$  d'air, ce qui correspond à 0,01  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  pur (négligeable). La réponse catharométrique en fonction de la quantité de  $\text{CO}_2$  injecté est linéaire jusqu'à 250  $\mu\text{L}$  de gaz étalon injecté avec une teneur autour de 4,8 %  $\text{CO}_2$  (v/v) dans l'azote, soit 12,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  pur. (cf. Figure 23). La droite de régression présente une valeur de  $R^2$  de 0,99 minimum.

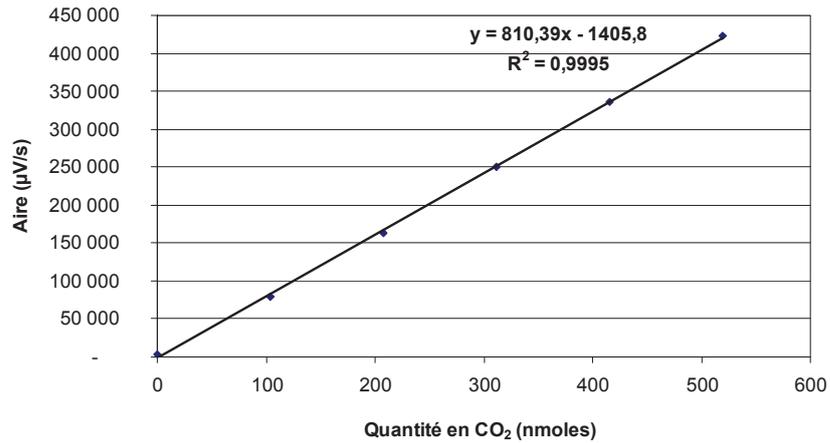


Figure 23 : Gamme étalon CO<sub>2</sub> (4,8 % v/v). Volumes injectés (50, 100, 150, 200 et 250 µL).

La calibration de la réponse catharométrique pour l'O<sub>2</sub> est faite avec de l'air (250 µL injectés). La teneur en oxygène dans l'atmosphère est prise à 20,9 % (v/v). Pour obtenir le zéro de la droite d'étalonnage, on utilise le gaz étalon CO<sub>2</sub> dans de l'azote (fournisseur Air Liquide) utilisé pour la calibration du CO<sub>2</sub>. La linéarité de la réponse catharométrique en fonction de la quantité d'O<sub>2</sub> injecté est obtenue jusqu'à 250 µL d'air injecté, soit 52,25 µl d'O<sub>2</sub> pur (cf. Figure 24). La droite de régression présente une valeur de R<sup>2</sup> de 0,99 minimum.

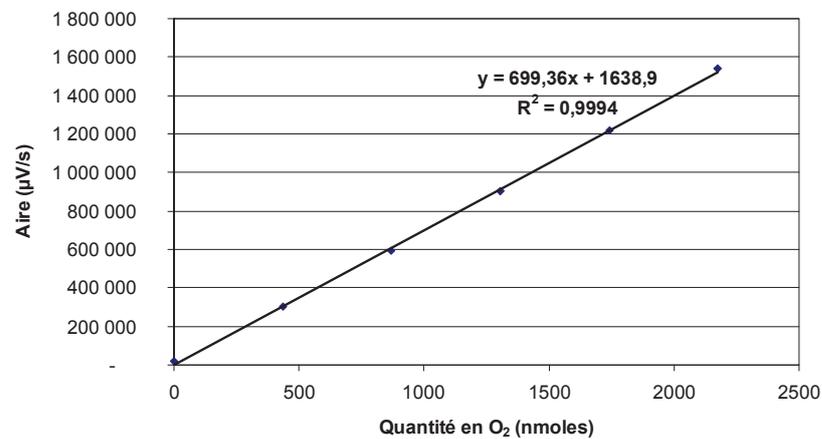


Figure 24 : Gamme étalon oxygène. Volumes d'air injectés (50, 100, 150, 200 et 250 µL).

### 3.1.6 Analyse élémentaire (CONHS) de la biomasse.

#### 3.1.6.1 Préparation de la biomasse

Les souches sont cultivées dans le milieu minéral recommandé (milieu GN modifié pour les cyanobactéries d'eau douce, milieu ASNIII pour les cyanobactéries marine). Toutefois le  $\text{CaCl}_2$  est écarté de ces milieux pour éviter une production de carbonate de calcium lors de la croissance du microorganisme. Les milieux en fin de culture sont acidifiés (HCl) progressivement jusqu'à pH 7 pour éliminer tout précipité éventuel de  $\text{CaCO}_3$ . Les cultures sont centrifugées à 10 000 tours/min pendant 60 minutes. Les culots sont ensuite lavés trois fois dans de l'eau physiologique et centrifugés à 10 000 tours/m pendant 50 minutes pour éliminer les sels du milieu de culture. Les culots sont récupérés avec de l'eau distillée et mis à sécher à l'étuve pendant 24 heures à  $100^\circ\text{C}$ .

#### 3.1.6.2 Principe de la méthode

On détermine la teneur en CONHS des culots secs de cyanobactérie selon la méthode ASTM 5991 (analyse extérieure, laboratoire SGS MULTILAB, Evry, France).

Analyse de C, N, H :

1 à 3 mg de matériau sec sont introduits dans une nacelle en argent. L'étape d'oxydation s'opère à  $1050^\circ\text{C}$  sous hélium avec un apport d'oxygène. Les composés organiques craquent en produisant du  $\text{CO}_2$ , du  $\text{NO}_x$  et de l' $\text{H}_2\text{O}$ . Le "gaz d'oxydation" est passé sur un tamis avec du cuivre à la même température, permettant une réduction du  $\text{NO}_x$  en  $\text{N}_2$ . Les différents composés issus de l'étape d'oxydation et de la réduction sur le cuivre sont ensuite séparés en CPG et dosés en catharométrie ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ) permettant d'obtenir les teneurs respectives en carbone, azote et hydrogène de l'échantillon.

Analyse de l'oxygène :

1 à 3 mg de matériau sec sont introduits dans une nacelle en argent. L'étape de combustion sans oxygène s'opère à  $1150^\circ\text{C}$  sous azote. Les composés organiques craquent en produisant du CO qui est analysé par une détection infrarouge.

Analyse du soufre :

1 à 3 mg de matériau sec sont introduits dans une nacelle en argent. L'étape de combustion s'opère à  $1150^\circ\text{C}$  sous hélium. Les composés organiques craquent en produisant du  $\text{SO}_2$  qui est analysé par une détection infrarouge.

### 3.1.7 Dosage du carbone minéral (carbonate de calcium) et organique ( $C_{\text{biomasse}}$ ) par la technique d'analyse Rock-Eval

Les cultures de cyanobactérie peuvent être mise en œuvre, avec ou sans processus associé de calcification (précipité de carbonate de calcium). A l'arrêt des cultures, la matière insoluble (biomasse seule ou biomasse +  $\text{CaCO}_3$ ) est séparée du milieu de culture par filtration. La biomasse (carbone organique) et le carbonate de calcium (carbone minéral) présent dans la matière insoluble sont dosés par la technique d'analyse Rock Eval (RE). Le Carbone Organique Total (COT) et le Carbone Minéral (MinC) sont exprimés en % de la masse d'échantillon introduite.

#### 3.1.7.1 Principe

Le Rock-Eval est un appareillage mis au point pour la mesure de la matière organique en géochimie et qui s'adresse principalement à des échantillons de roche provenant de forage. L'analyse Rock-Eval (RE) permet notamment de préciser le potentiel en huile des roches et en particulier le potentiel kérogène. Le Rock-Eval permet de doser le Carbone Organique Total (COT) et le Carbone Minéral (MinC) de l'échantillon. L'analyse de la matière organique se fait par le biais de deux cycles d'analyse, le premier, le cycle de pyrolyse, en absence d'oxygène (sous azote), et le second, le cycle d'oxydation, en présence d'oxygène. L'échantillon passe dans le four de pyrolyse, et le résiduel de l'échantillon (résiduel de pyrolyse) passe ensuite dans le second four d'oxydation. Au niveau de l'étape de pyrolyse les produits de thermodistillation et de craquage sont analysés par un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID) pour donner une réponse "HC", et par un détecteur infrarouge pour la mesure du CO et du  $\text{CO}_2$ . Au niveau de l'étape d'oxydation les produits de craquage sont analysés par un détecteur infrarouge pour la mesure du CO et du  $\text{CO}_2$ .

#### 3.1.7.2 Calibration du RE avec le standard 160000 (roche Kérogène)

La calibration des détecteurs FID et infrarouge du Rock-Eval est réalisée avec un standard de roche mère "160000". Ce standard est une roche Kérogène. Le standard "160000" est systématiquement passé dans chaque séquence d'analyse, au début et en fin de séquence. Le carbone de l'échantillon est exprimé en % p/p de l'échantillon brut.

Les signaux pris en compte dans la quantification du carbone organique (COT) du S160000

S1	mg HC/g échantillon
S2	mg HC/g échantillon
S3CO	mg CO/g échantillon
S3'CO	mg CO/g échantillon,
S3CO <sub>2</sub>	mg CO <sub>2</sub> /g échantillon
S4CO	mg CO/g échantillon
S4CO <sub>2</sub>	mg CO <sub>2</sub> /g échantillon

Signaux S1 et S2 : on utilise la valeur moyenne de 83% (% p/p) comme teneur en carbone pour les fractions "HC " qui thermodistillent en pyrolyse et qui sont détectées par FID, sur la base de mesures élémentaires de C et d'H dans ce standard S160000 (83% p/p de C dans l'HC). Cette valeur de 0,83 est une valeur moyenne basée sur des mesures issues de différentes roches (données géochimiques), représentative de la composition du kérogène (Behar et al, 2001).

Signal S3'CO : dans le cas de la présence simultanée de matière organique et de carbonate dans l'échantillon analysé au RE, la réponse du signal S3'CO doit être partagée à 50/50 entre une partie minérale et une partie organique pour la raison suivante : au cours du cycle de pyrolyse la décomposition thermique de la matière organique produit du CO et du CO<sub>2</sub>, et la matière minérale produit uniquement du CO<sub>2</sub>. Une partie du pool de CO<sub>2</sub> provenant à la fois de la matière minérale et de la matière organique réagit en présence de biomasse, (par des réactions de Woodward), pour donner du CO dans S3'CO.

- moitié de S3'CO pris en compte si il y a présence d'une réponse S5,
- totalité de S3'CO pris en compte si pas de réponse S5,

Les signaux pris en compte dans l'évaluation du carbone minéral (MinC) du S 160000

S3'CO mg CO/g échantillon,

- moitié de S3'CO pris en compte si présence d'un carbone organique
- totalité de S3'CO si pas de carbone organique

S3'CO<sub>2</sub> mg CO<sub>2</sub>/g échantillon

S5CO<sub>2</sub> mg CO<sub>2</sub>/g échantillon

Les réponses des signaux sont reprises dans les équations suivantes :  
pour la réponse du C organique :

$$TOC = PC + RC$$

PC (Carbone de pyrolyse):

$$PC = (S1 + S2) \times 0,083 + (S3CO_2 \times \frac{12}{440}) + (S3CO + \frac{1}{2} S3'CO) \times \frac{12}{280}$$

RC (Carbone organique résiduel):

$$RC = (S4CO_2 \times \frac{12}{440}) + (S4CO \times \frac{12}{280})$$

pour la réponse du C minéral :

$$MinC = PyroMinC + OxiMinC$$

PyroMinC (Carbone minéral de pyrolyse):

$$PyroMinC = (S3'CO_2 \times \frac{12}{440}) + (\frac{1}{2} S3'CO \times \frac{12}{280})$$

OxiMinC (Carbone minéral):

$$OxiMinC = S5CO_2 \times \frac{12}{440}$$

*Commentaire sur la constante 0,083 dans l'équation PC ci dessus :*

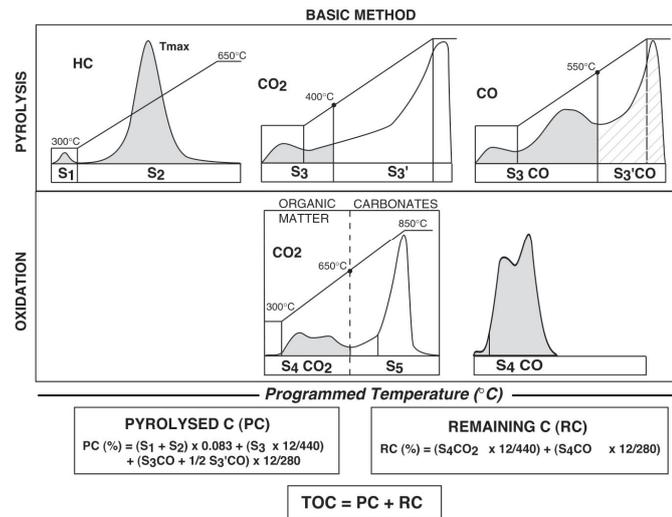
Cette valeur de 0,083 est issue de la constante 0,83 qui représente la teneur en carbone des HC issus de la thermodistillation et du craquage du kérogène dans le standard S160000 (Ces HC répondent dans les signaux S1 et S2 de FID). La modification de 0,83 à 0,083 exprime le changement d'unité dans l'expression des résultats, pour passer d'HC (en mg HC/g échantillon) à C (% p/p échantillon). Le rapport C/(C+H) des produits de thermo distillation de la biomasse de cyanobactérie est vraisemblablement un peu différent de celui du carbone organique du kérogène pris à 0,83 pour les signaux S1 et S2.

*Commentaires sur les facteurs 12 et 280, et 440 :*

Ces valeurs traduisent, de la même façon, le changement d'unité dans l'expression des résultats pour passer de CO et de CO<sub>2</sub> (en mg/g échantillon) à C (% p/p échantillon).

La Figure 25 présente un exemple des différents signaux d'un échantillon S160000 (Behar et al., 2001).

## TOC DETERMINATION



## MINERAL C DETERMINATION

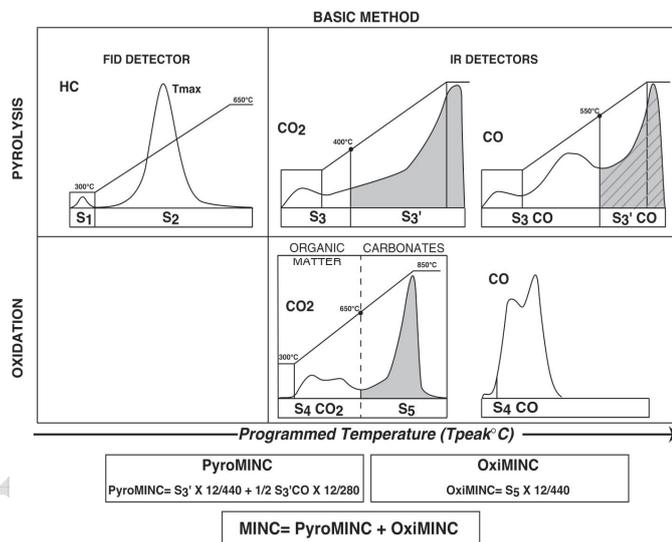


Figure 25 : Réponses en oxydation et en pyrolyse d'une roche mère avec "kérogène" : Detection d'une fraction C minéral et C organique (Behar et al., 2001).

### 3.1.7.3 Adaptation des cycles de pyrolyse et d'oxydation pour le dosage du COT et du MinC pour l'analyse de biomasse en présence ou non de carbonate de calcium

De la biomasse pure et du CaCO<sub>3</sub> pur ont été passés à l'analyse Rock-Eval. Le carbone organique issu de la biomasse réponds dans les signaux S1, S2, S3CO, S3'CO, S3CO<sub>2</sub>, S4CO et S4CO<sub>2</sub>; le carbone minéral issu du carbonate de calcium réponds dans les signaux S3'CO, S3'CO<sub>2</sub> et S5CO<sub>2</sub>.

Une adaptation des méthodes standardisées d'analyse pour les roches mères a été faite pour répondre aux problèmes spécifiques du dosage de la matière organique issue d'une biomasse du type cyanobactérie, associée ou non à du carbonate de calcium. Ces

modifications portent essentiellement sur les programmes (ou cycles) d'analyse et les profils d'intégration permettant l'identification et la quantification de la biomasse et du carbonate de calcium sans interférence si ils sont présents ensembles dans la matière insoluble analysée.

Les cycles de pyrolyse et d'oxydation utilisés sont les suivants :

Cycle de pyrolyse : sous flux d'azote

Pyrolyse			
	Température	pente	durée
isotherme	300°C		3 min
gradient	300-650°C	25°C/min	14 min
<b>isotherme</b>	<b>650°C</b>		<b>5 min</b>
<b>fin</b>	<b>650°C-</b>	<b>↔ sans chauffage</b>	<b>5 min</b>

Les signaux identifiés en pyrolyse sont les suivantes :

Pyrolyse				
S1	détection FID	isotherme	300°C	exprimé en mg HC/g d'échantillon
S2	détection FID	gradient	300-650°C	exprimé en mg HC/g d'échantillon
S3CO	détection infrarouge	gradient	300-550°C	exprimé en mg CO/g d'échantillon
S3'CO	détection infrarouge	gradient	550-650°C	exprimé en mg CO/g d'échantillon
S3CO <sub>2</sub>	détection infrarouge	gradient	300-650°C	exprimé en mg CO <sub>2</sub> /g d'échantillon
S3'CO <sub>2</sub>	détection infrarouge	isotherme	650°C	exprimé en mg CO <sub>2</sub> /g d'échantillon

Cycle d'Oxydation : sous flux d'air synthétique (N<sub>2</sub> 80%; O<sub>2</sub> 20%)

Oxydation			
	Température	pente	durée
isotherme	300°C		1 min
gradient	300-850°C	20°/min	27,5 min
<b>isotherme</b>	<b>850°C</b>		<b>10 min</b>
<b>fin</b>	<b>850°C-</b>	<b>↔ sans chauffage</b>	<b>10 min</b>

Les signaux identifiés en oxydation sont les suivants :

Oxydation			
S4CO	détection infrarouge	300-850°C	exprimé en mg C O/g d'échantillon
S4CO <sub>2</sub>	détection infrarouge	300-650°C	exprimé en mg CO <sub>2</sub> /g d'échantillon
S5CO <sub>2</sub>	détection infrarouge	650-850°C	exprimé en mg CO <sub>2</sub> /g d'échantillon

Pour déterminer les meilleurs profils d'intégration des signaux dans le cas d'un mélange de biomasse et de carbonate de calcium, des comparaisons des profils obtenus pour de la biomasse, du carbonate de calcium et des mélanges biomasse + carbonate de calcium ont été mis en œuvre. Les problèmes de séparation des signaux pour la biomasse et le carbonate de calcium concernent seulement les signaux indiquées ci dessous, pour lesquelles un réajustement manuel du curseur est nécessaire :

Cycle de pyrolyse : signaux S3CO<sub>2</sub> et S3'CO<sub>2</sub>;

Cycle d'oxydation : signaux S4CO<sub>2</sub> et S5CO<sub>2</sub>.

Les curseurs ont été positionnés à 18,33 min pour S3CO<sub>2</sub> et S3'CO<sub>2</sub> et à 19,67 min pour S4CO<sub>2</sub> et S5CO<sub>2</sub>. La Figure 26 et la Figure 27 représentent les comparaisons entre ces 4 signaux (S3CO<sub>2</sub> et S3'CO<sub>2</sub>; S4CO<sub>2</sub> et S5CO<sub>2</sub>) pour les 3 types d'essais : biomasse (2 quantités), carbonate de calcium (3 quantités) et mélange biomasse et carbonate de calcium (3 mélanges).

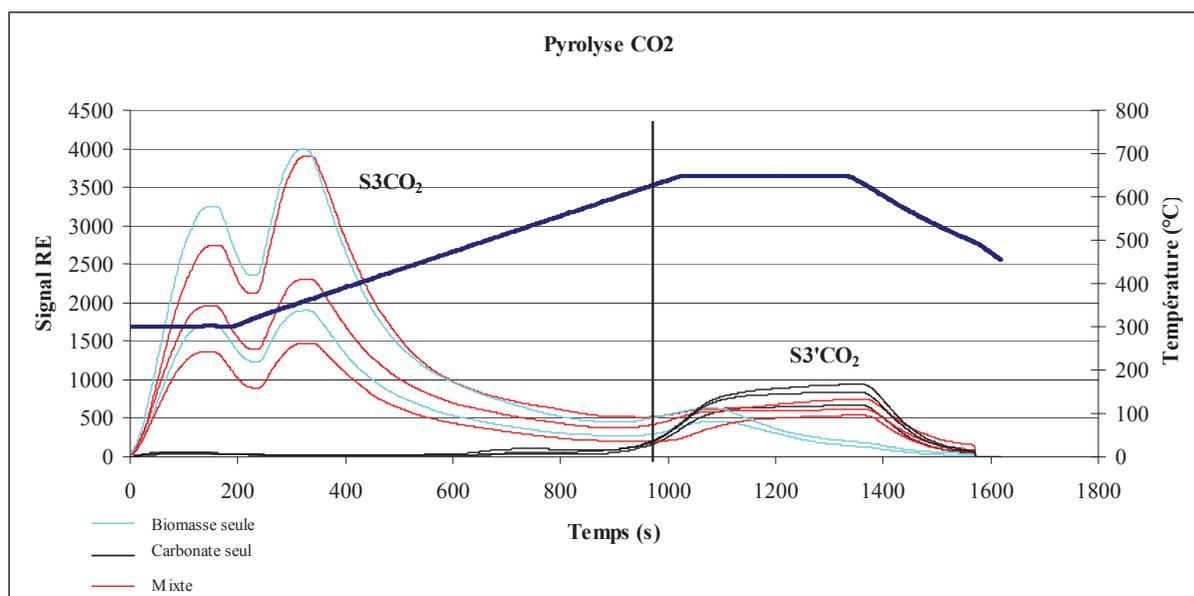


Figure 26 : Positionnement des curseurs pour les signaux S3CO<sub>2</sub> et S3'CO<sub>2</sub> (Cycle de pyrolyse)

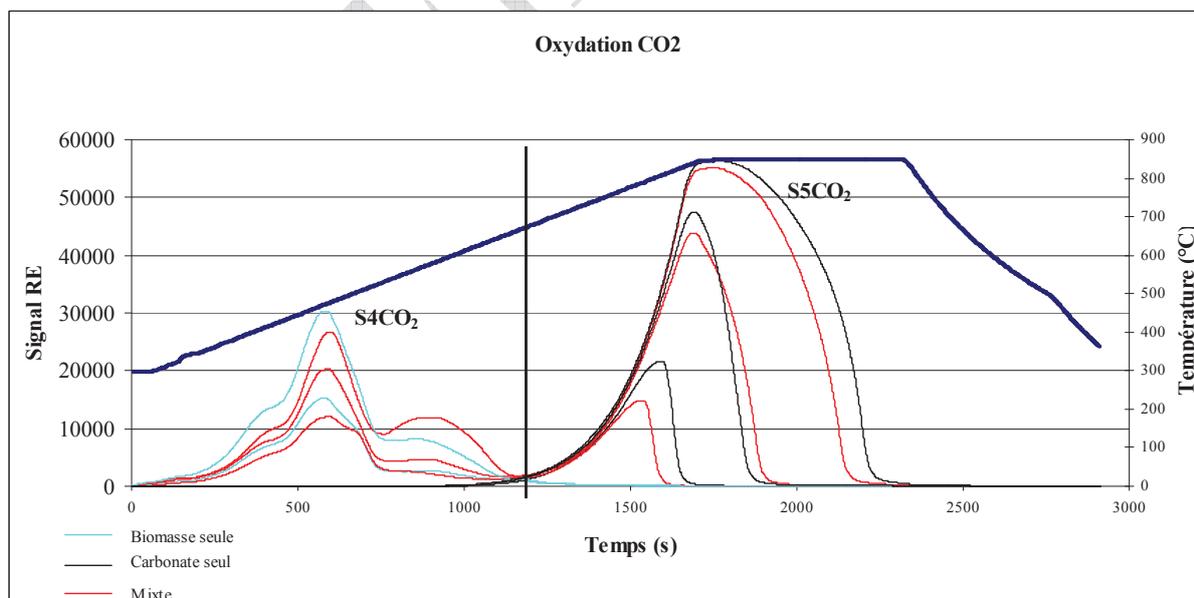


Figure 27 : Déterminations des curseurs pour les signaux S4CO<sub>2</sub> et S5CO<sub>2</sub>. (Cycle d'oxydation)

### 3.1.7.4 Réponses de la biomasse et du CaCO<sub>3</sub> à l'analyse RE

#### ➤ *Réponse de la biomasse au RE*

Une biomasse (souche PCC8806, souche marine) a été cultivée dans des conditions où la formation de carbonate de calcium est nulle. La biomasse séchée est déposée dans la nacelle d'analyse sur un lit de silice, puis recouverte à nouveau par de la silice. Il est impératif de séparer la matière insoluble (biomasse seule ou biomasse + CaCO<sub>3</sub>) filtrée du filtre (la membrane de filtration répond au RE et interfère dans l'analyse).

La Figure 28 montre la réponse de la biomasse. La quantité de biomasse mise en œuvre est de 16,2 mg. On obtient une réponse TOC de 40,62 (% poids de l'échantillon sec) et une réponse MinC nulle (% poids de l'échantillon). Le carbone présent dans la biomasse donne une réponse essentiellement dans les fractions S1+S2 de pyrolyse (44% p/p) et S4CO<sub>2</sub> d'oxydation (46% p/p). On ne détecte pas de réponse de C minéral (S3'CO, S3'CO<sub>2</sub> et S5CO<sub>2</sub>).

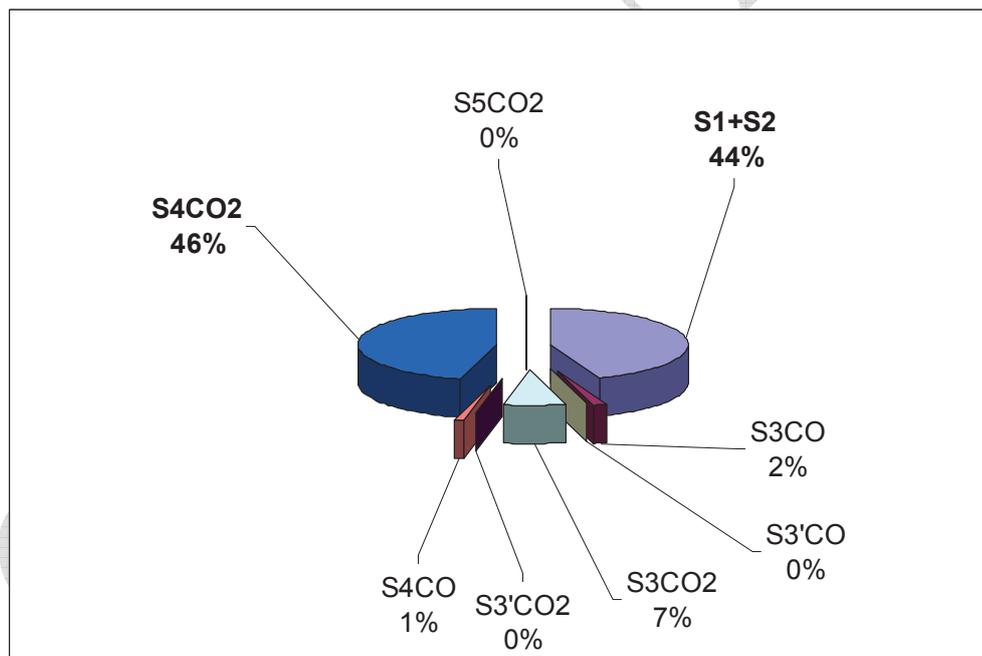


Figure 28 : Distribution du carbone organique (TOC) de la biomasse (souche PCC 8806)

#### ➤ *Réponse du carbonate de calcium au RE*

Le carbonate de calcium utilisé a une pureté de 98 % (VWR). Le carbonate de calcium est déposé dans la nacelle d'analyse sur un lit de silice, puis recouvert à nouveau par de la silice. La Figure 29 présente la réponse du carbonate de calcium. La quantité d'échantillon mise en œuvre est de 30,45 mg. On obtient une réponse TOC de 0,09 (% poids de l'échantillon) et une réponse MinC de 12,85 (% poids de l'échantillon). On peut considérer

que la réponse organique est nulle. Théoriquement la teneur en  $C_{\min}$  devrait être de 12%.(p/p). Le carbone présent dans le  $CaCO_3$  donne une réponse principalement dans la fraction  $S5CO_2$  d'oxydation (97%) et  $S3'CO_2$  de pyrolyse (3%).

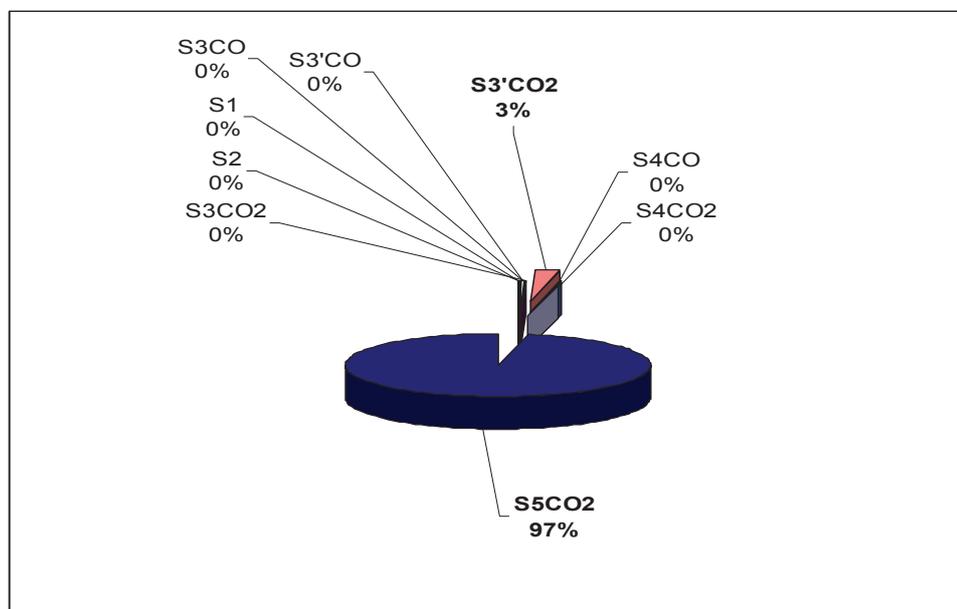


Figure 29 : Distribution du carbone minéral pour un échantillon de  $CaCO_3$  pur.

### 3.1.7.5 Étalonnage et quantification de la biomasse et du carbonate de calcium

#### ➤ *Étalonnage de la réponse de la biomasse*

On a analysé des quantités variables de biomasse (souche PCC 8806 cultivée sans charge minérale ( $CaCO_3$ )). La réponse de la biomasse est calculée en prenant en compte les fractions suivantes : S1, S2, S3CO, S3'CO, S3CO<sub>2</sub>, S4CO, et S4CO<sub>2</sub>. Les valeurs des 2 fractions S1 et de S2 sont exprimées (par le logiciel du RE) en mg HC/g d'échantillon introduit dans la nacelle. Ces valeurs sont transformées en  $\mu\text{mol}$  de carbone pour la quantité d'échantillon analysé (en mg). Le calcul fait appel à la teneur en carbone (83%) du standard S160000. De même, les valeurs des 5 fractions S3CO, S3'CO, S3CO<sub>2</sub>, S4CO, et S4CO<sub>2</sub>, qui sont exprimées en mg CO ou CO<sub>2</sub>/g d'échantillon introduit dans la nacelle (par le logiciel du RE), sont transformées en  $\mu\text{mol}$  de carbone pour la quantité d'échantillon analysé (en mg). On additionne la quantité de carbone obtenue dans ces 7 fractions (en  $\mu\text{mol}$  de carbone). On trace une relation mg de biomasse sèche déposée dans la nacelle (abscisse)/  $\mu\text{mol}$  de C (en ordonnée).

La Figure 30 et le Tableau 6 présentent les réponses au RE de la biomasse pour la souche PCC 8806.

Tableau 6 : Gamme étalon biomasse (souche PCC8806).

	Biomasse introduit mg	Carbone organique RE $\mu$ mole	Teneur en Carbone de la biomasse % (p/p)
1	4.1	149	44
2	8.2	287	42
3	12.1	417	41
4	16.2	558	41

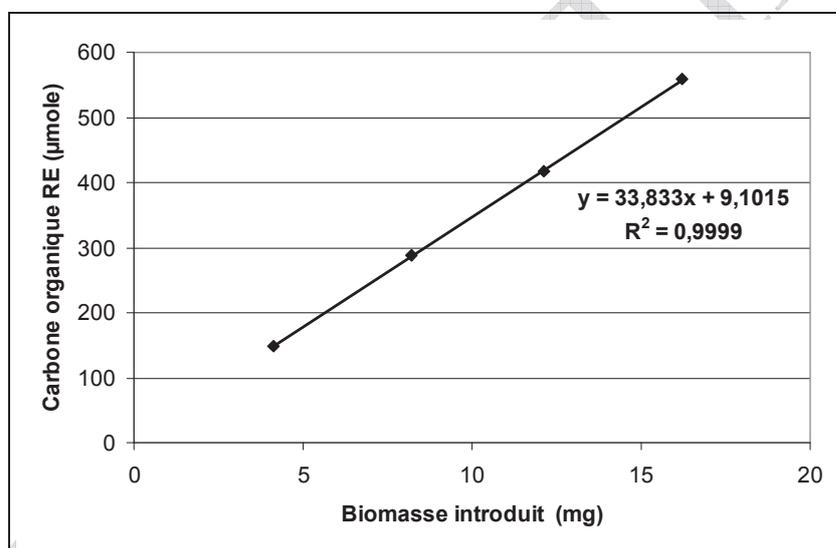


Figure 30: Gamme étalon biomasse (souche PCC8806).

➤ **Étalonnage de la réponse du carbonate de calcium**

On a analysé des quantités variables de carbonate de calcium (pureté 98%). La quantité de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est calculée en prenant en compte les fractions suivantes :  $\text{S}^3\text{CO}_2$  et  $\text{S}^5\text{CO}_2$ . Les valeurs de ces deux fractions, qui sont données en  $\text{mg CO}_2/\text{g}$  d'échantillon introduit dans la nacelle, sont ré-exprimées en  $\mu\text{mol}$  de carbone pour la quantité d'échantillon analysée (en mg). On additionne la quantité de carbone (en  $\mu\text{mol}$ ) obtenues dans ces 2 fractions. On trace une relation mg de carbonate de calcium déposé dans la nacelle (abscisse)/somme  $\mu\text{mol}$  de C (en ordonnée).

La Figure 31 et le Tableau 7 présentent les réponses au RE du carbonate de calcium.

Tableau 7 : Gamme étalon carbonate de calcium.

	CaCO <sub>3</sub> introduit mg	Carbone minéral RE μmole
1	5,2	52
2	11,1	113
3	20,7	217
4	49,5	534
5	70,9	768

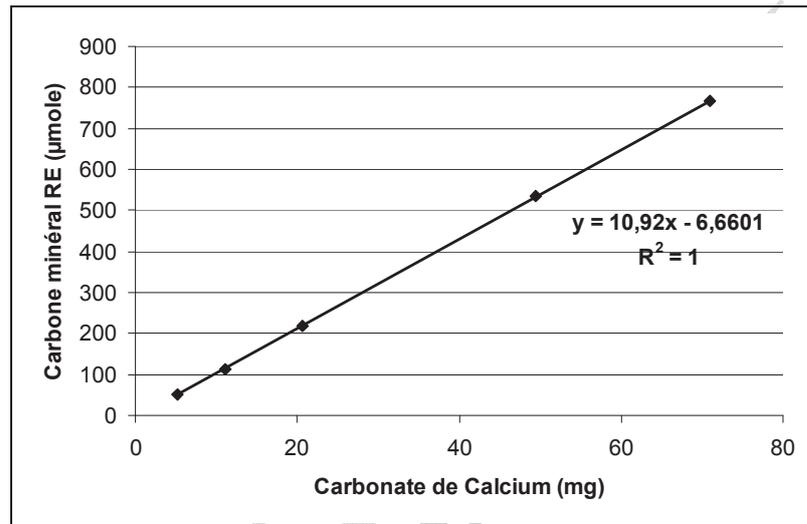


Figure 31 : Gamme étalon carbonate de calcium.

➤ **Quantification de mélanges biomasse plus carbonate de calcium**

La quantification de biomasse et de carbonate de calcium a été évaluée sur différents mélanges composés de biomasse pure et de carbonate de calcium pur. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Quantification du carbone organique et minéral pour les mélanges de biomasse et de carbonate.

	CaCO <sub>3</sub> introduit mg	Biomasse introduit mg	Carbone minéral RE μmole	Carbone organique RE μmole	CaCO <sub>3</sub> dosé mg	Biomasse dosé mg
1	7,0	7,0	72	239	7,2	6,8
2	30,2	10,2	329	347	30,8	10,0
3	59,7	15,2	651	515	60,2	15,0

### 3.1.7.6 Bilan "Masse RE"

Le bilan "Masse" RE consiste à comparer le poids sec d'échantillon introduit dans la nacelle (biomasse seule ou biomasse +  $\text{CaCO}_3$  ou  $\text{CaCO}_3$  seul), avec les poids de biomasse et de carbonate recalculés à partir des données de l'analyse RE. Le résiduel présent dans la nacelle à l'issue de l'analyse RE est pris en compte. L'analyse RE est en effet destructive, la biomasse est détruite sous forme de  $\text{CO}$ , de  $\text{CO}_2$  et d'HC. Le carbonate de calcium est détruit sous la forme de  $\text{CO}_2$ . On fait l'hypothèse par ailleurs que la décomposition du carbonate de calcium entraîne dans le résidu, à l'issue des cycles de pyrolyse + oxydation, la formation de  $\text{CaO}$  (dans la nacelle). Le résidu dans la nacelle est théoriquement composé de :

- sels (produits mal identifiés) provenant du milieu de culture
- calcium issu de la décomposition thermique du carbonate de calcium, sous forme de  $\text{CaO}$ .

On soustrait l'oxygène provenant de la décomposition du  $\text{CaCO}_3$  présent sous forme de  $\text{CaO}$  dans le résidu. Pour cela, le nombre de mole de  $\text{Ca}$  et donc de  $\text{CaO}$  est calculé sur la base du nombre de moles de calcium qui est égal au nombre de mole de carbone minéral mesuré dans la fraction minérale.

Le Tableau 9 présente des bilans "Masse" RE sur des échantillons composés à partir de biomasse, de carbonate de calcium et de mélanges de biomasse + de carbonate de calcium. Pour la biomasse, le bilan "Masse RE" s'établit entre 102 et 111%. Pour le carbonate de calcium, le bilan "Masse RE" (en prenant en compte le  $\text{CaO}$  dans la nacelle) s'établit entre 122 et 125%. Avec un mélange de biomasse et de carbonate de calcium, nous avons un bilan masse intermédiaire compris entre 114 et 119%, ce qui est donc normal, compte tenu des valeurs de "bilan Masse" RE obtenues pour la biomasse seule et le carbonate seul.

Tableau 9: Bilan Masse pour les échantillons de biomasse pure et de carbonate pur et pour des mélanges biomasse + carbonate de calcium.

	Quantité introduite CaCO3	Quantité introduite Biomasse	Quantité dans nacelle Total	CaCO3 analyse RE	Biomasse analyse RE (1)	CO3 (2)	résidu + Ca (3)	Bilan Masse (4)
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	%
CaCO3_1	4.98		4.98	4.94	0.04	3.0	3.23	125
CaCO3_2	10.82		10.82	10.78	0.06	6.5	6.83	123
CaCO3_3	20.13		20.13	19.61	0.09	11.8	12.67	122
CaCO3_4	30.45		30.45	30.24	0.08	18.1	19.19	123
CaCO3_5	50.59		50.59	50.63	0.04	30.4	31.53	122
CaCO3_6	70.04		70.04	70.30	0.06	42.2	43.27	122
CaCO3_7	90.61		90.61	90.58	0.06	54.3	56.09	122
Bio_1(8806)		4.12	4.12	0.00	4.31	0.0	0.27	111
Bio_2(8806)		8.21	8.21	0.00	8.31	0.0	0.56	108
Bio_3(8806)		12.12	12.12	0.00	12.07	0.0	0.28	102
Bio_4(8806)		16.20	16.20	0.00	16.15	0.0	1.15	107
Mix_1	6.98	6.98	13.96	6.70	6.90	4.0	4.94	114
Mix_2	30.18	10.20	40.38	30.60	10.04	18.4	19.50	119
Mix_3	59.67	15.17	74.84	60.46	14.90	36.3	37.75	119

(1) analyse RE, calibration avec biomasse

(2) Le carbonate de calcium se décompose en CO<sub>2</sub> et CO au cours de l'analyse RE. La valeur de Cmin obtenue est transformée en CO3.

(3) Le carbonate de calcium décomposé forme du CaO qui s'ajoute aux autres résidus salins. On élimine de ce résidu sec après l'analyse RE, l'oxygène combinée au calcium, sur la base d'un nombre de mole de calcium égal au nombre de mole de Cminéral obtenu.

(4) = ( biomasse + CO3 + sels+Ca)\*100/quantité introduite.

CONFIDENTIEL

## 3.2 Microbiologie

### 3.2.1 Souches utilisées

Quatre souches de cyanobactéries provenant de la collection de Pasteur (PCC) ont été utilisées pendant cette étude :

- trois souches issues d'environnement marin : deux souches de *Synechococcus* (PCC8806, PCC8807) et une souche de *Synechocystis* (PCC 7339);
- une souche d'origine d'eau douce : *Synechocystis* (PCC6808).

### 3.2.2 Milieux de culture

#### 3.2.2.1 Milieux de propagation

Deux milieux différents de culture sont utilisés selon l'origine de la souche : un milieu eau douce et un milieu marin. Ces milieux de culture sont recommandés par l'Institut Pasteur (voir information sur le site : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000m-00a/recherche/departements-scientifiques/microbiologie/unites-et-groupes/collection-des-cyanobacteries>).

Les compositions des milieux sont données dans le Tableau 10. Le pH du milieu minéral de culture est ajusté à 8,0 au départ de l'essai.

Tableau 10:Composition des milieux eau douce et marin

Milieux	Eau douce GN (BG11)	Marin ASN III
NaCl	mM	427
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	mM	9,8
KCl	mM	6,7
NaNO <sub>3</sub>	mM	17,65
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	mM	0,3
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	mM	0,25
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	mM	0,38
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	mM	0,18
acide citrique	mM	0,03
Citrate de fer et d'ammonium	mM	0,03
Dipotassium Mg EDTA	mM	0,003
Trace Metal Mix A5+Co*	mL	1
Vit B12	µg/L	20
Tampon HEPES-NaOH	mM	5

\*Trace metal mix A5+Co (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86(g/L), MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 1.81(g/L), ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.222(g/L), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.39(g/L), CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 0.079(g/L), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.049(g/L)

Pour certains essais, ces milieux de culture ont été simplifiés. L'acide citrique, le citrate double de fer et d'ammonium, ainsi que l'EDTA/2K Mg ont été supprimés. Les versions modifiées de ces milieux eau douce et marin sont présentées dans le Tableau 11. Le pH du milieu minéral de culture est toujours ajusté à pH 8,0.

Tableau 11 : Composition des milieux eau douce et marin (version simplifiée)

Milieux		Eau douce GN (BG11)	Marine ASN III
NaCl	mM		427
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	mM		9,8
KCl	mM		6,7
NaNO <sub>3</sub>	mM	17,65	8,8
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	mM	0,3	14,2
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	mM	0,25	3,4
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	mM	0,38	0,38
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	mM	0,18	0,09
FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O	mM	0,03	0,015
Trace Metal Mix A5+Co*	mL	1	1
Vit B12	µg/L	20	20
Tampon HEPES-NaOH	mM	5	5

\*Trace metal mix A5+Co (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86(g/L), MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 1.81(g/L), ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.222(g/L), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.39(g/L), CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 0.079(g/L), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.049(g/L)

### 3.2.2.2 Milieux pour la croissance

Un milieu de culture a été mis en œuvre est dénommé milieu 617 modifié (modifié de Lee *et al.*, 2006) pour les souches marines. La composition est présentée dans le Tableau 12. Le CaCl<sub>2</sub> et le NaHCO<sub>3</sub> figurent dans ce tableau comme variables. Ces concentrations relatives à ces deux éléments sont précisées lors de la mise en œuvre des essais.

Tableau 12: Composition du milieu 617 modifié.

Milieu 617 modifié		
NaCl	mM	171,00
NaNO <sub>3</sub>	mM	17,65
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	mM	0,30
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	mM	variable
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	mM	0,18
FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O	mM	0,030
NaHCO <sub>3</sub>	mM	variable
Trace Metal Mix A5+Co*	mL	1
Vit B12	µg/L	20

\*Trace metal mix A5+Co (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86(g/L), MnCl<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 1.81(g/L), ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.222(g/L), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.39(g/L), CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O 0.079(g/L), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0.049(g/L)

### 3.2.3 Mise en œuvre des cultures

Les cultures en milieu ouvert (sans limitation de la source du carbone) sont bouchées à l'aide d'un bouchon mousse qui permet les échanges gazeux avec l'atmosphère, tout en conservant la stérilité du milieu de culture. Les cultures sont réalisées dans deux types de fioles :

- fiole de pénicilline de 120 ml, avec 20 ml de volume réactionnel,
- flacon SCHOTT en verre borosilicate de 1 L ou 2 L, avec 500 ml ou 1 L de volume réactionnel.

Les cultures en milieu fermé sont bouchées à l'aide des bouchons SCHOTT munis de septum caoutchouc/téflon. Les cultures sont réalisées dans deux types de fioles :

- Pour les essais de croissance sur bicarbonate.

Flacon SCHOTT de 500 ml de capacité, munis de 2 tubulures latérales afin d'effectuer des prélèvements liquide ou gazeux. Le volume réactionnel de culture est de 200 ml,

- Pour les essais de croissance avec apport de carbone minéral sous forme de CO<sub>2</sub>.

Flacon SCHOTT de 2 L de capacité, munis de 4 ouvertures sur le bouchon afin d'effectuer des prélèvements liquide ou gazeux, pour le suivi du pH en continu et pour l'injection du CO<sub>2</sub>. Le volume réactionnel de culture est de 1500 ml.

Les cultures sont incubées dans une armoire climatique à 25°C (Snijders, ECD01E). L'éclairage est de 1,79 kLux (35,8 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Une agitation de type va et vient (60 rpm) est appliquée. Un deuxième type d'agitation par un

barreau magnétique (200 rpm) est appliquée pour certains essais. Le type d'agitation est précisé pour chaque essai.

### 3.2.4 Suivi de la croissance des cyanobactéries

#### 3.2.4.1 Dénombrement des cellules au microscope et suivi de la croissance par la mesure de l'absorbance

Le nombre de microorganismes est estimé par comptage au microscope optique (grossissement  $10\times 100$ ) sur une cellule de Malassez (volume  $1\ \mu\text{l}$ ). La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (pour la turbidité). Les mesures sont effectuées sur un spectromètre (Shimadzu, UV-1601). Une relation entre la densité optique (DO) à 600 nm et le nombre de cellules a été établie pour trois souches étudiées. Ces relations sont présentées dans les Figure 32, Figure 33 et Figure 34

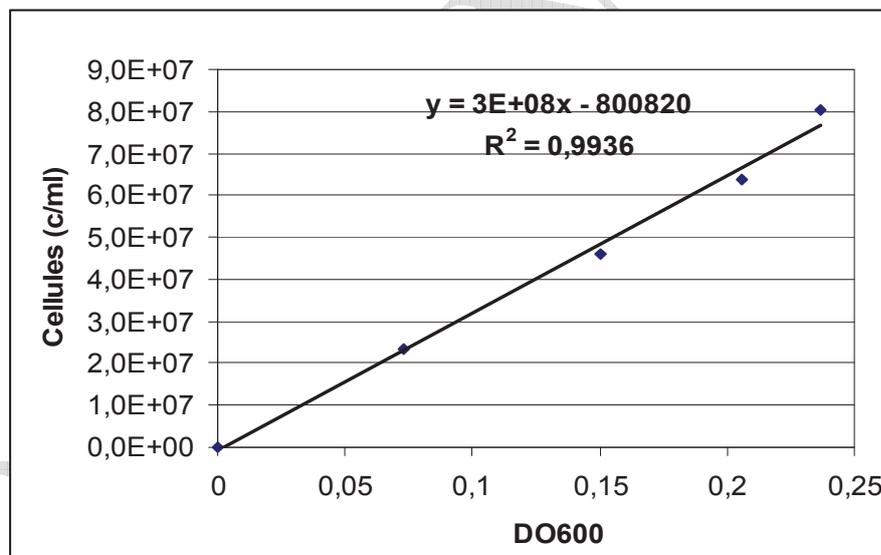


Figure 32 : Relation entre l'absorbance (600 nm) et le nombre de cellules pour la souche PCC6808

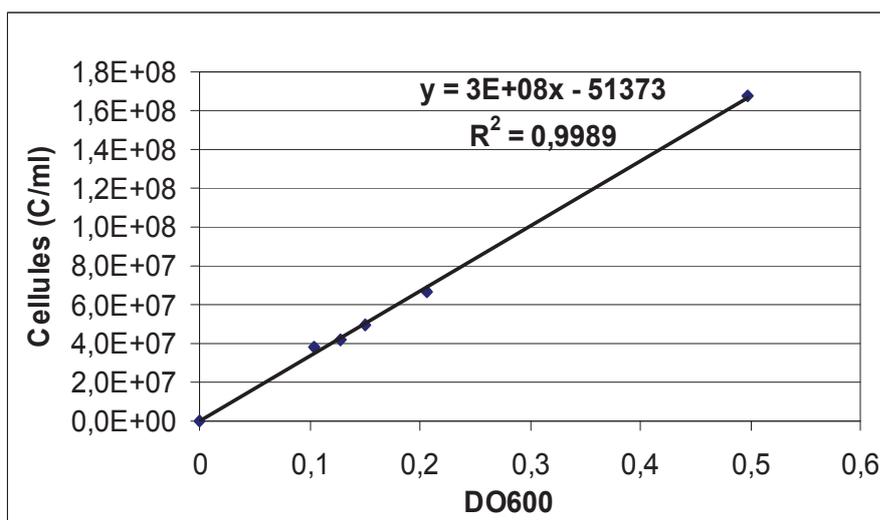


Figure 33 : Relation entre la densité optique (600 nm) et le nombre de cellules pour la souche PCC8806

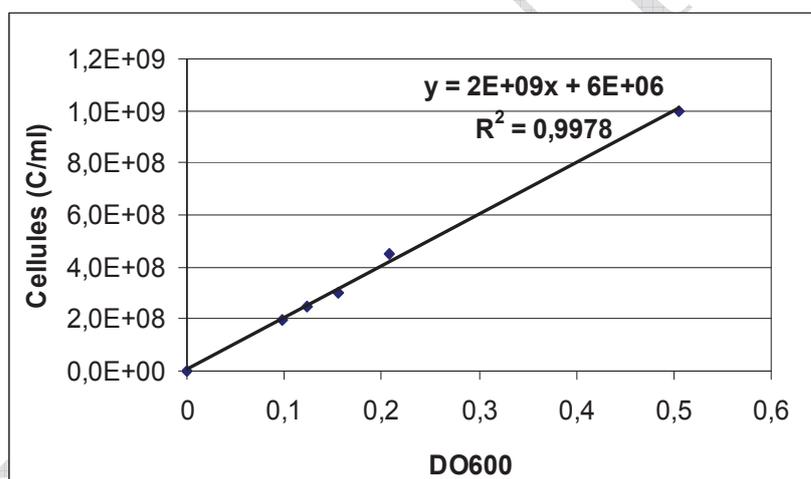


Figure 34 : Relation entre la densité optique (600 nm) et le nombre de cellules pour la souche PCC8807

### 3.2.4.2 Détermination du poids sec

La "matière insoluble" est filtrée sous vide sur un filtre PTFE 0,45 µm (référence FH, Millipore). La "matière insoluble" est séparée du filtre, l'ensemble est séché dans la même coupelle, à 100 °C pendant 24 heures. Les mesures de poids sont réalisées sur une balance (AE 260 Delta Range ; METTLER TOLEDO) avec une précision de 0,0001g.

**NB** : Le terme "matière insoluble" sous entend, dans le cas des cultures de cyanobactéries avec précipitation de carbonate de calcium, à la fois la biomasse et le carbonate de calcium récupérés ensemble à l'étape de filtration.

### 3.2.4.3 Mesure du pH

Pour les prélèvements, le pH est mesuré par un pH-mètre (SevenEasy ; METTLER TOLEDO). Pour certains essais le suivi du pH en continu est également réalisé par un pH-mètre (SevenMulti ; METTLER TOLEDO) qui permet d'enregistrer les données, à l'aide du logiciel LabX direct pH (METHROM). Les mesures sont ensuite traitées sur Excel.

## 3.3 Observation en microscope électronique à balayage

Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été réalisées au centre de microscopie de l'université de Lyon I et dans le département de géochimie de l'IFP.

### 3.3.1 Préparation avec fixation des cellules

Le protocole utilisé de "fixation" de la matière insoluble qui représente la biomasse ou/et le carbonate de calcium va essayer de conserver les structures des cellules des cyanobactéries pour que l'on puisse les observer avec le moins de dénaturation possible. La matière insoluble issue de la culture de cyanobactérie (biomasse produite et  $\text{CaCO}_3$  précipité) récupérées par filtration sur filtre PTFE est mise en suspension dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) pendant 1 heure. La solution de glutaraldéhyde à 2,5 % est préparée à partir d'une solution de glutaraldéhyde à 25 % (v/v). La dilution au 1/10 est effectuée dans un tampon phosphate pH 7,4. La suspension est ensuite lavée 2 fois avec cette solution de tampon phosphate pH 7,4. Entre chaque lavage, la suspension est centrifugée à 6000 rpm pendant 30 min. Au troisième lavage, la suspension est filtrée sur filtre PTFE (0,45 $\mu\text{m}$ ), la matière insoluble est alors séparée du filtre et séchée dans une étuve à 40°C. Après séchage et refroidissement, la fraction insoluble est broyée légèrement et déposée sur une membrane en carbone qui est ensuite métallisée avec une fine couche d'or. La membrane métallisée est montée sur un porte-objet et placée dans la chambre d'observation. Les observations sont faites en mode conventionnel (sous vide).

### 3.3.2 Préparation sans fixation des cellules

Les échantillons sont prélevés au sein du milieu de culture à différents moments de la croissance. 100 $\mu\text{l}$  de milieu de culture sont déposés sur un filtre polycarbonate (0,2  $\mu\text{m}$ ) qui est mis en contact avec un papier filtre saturé en eau MilliQ, l'ensemble est placé dans un

dessiccateur humide (c'est à dire saturé en eau MilliQ) pendant 24 heures. Cette procédure permet d'éliminer le maximum de sels provenant du milieu salin par diffusion dans le papier filtre. Ces sels en effet cristallisent lors du séchage de la préparation et interfèrent dans l'imagerie en microscopie électronique. Le filtre est ensuite récupéré et mis à sécher dans un dessiccateur à température ambiante pendant au moins 48 heures. Après séchage, le filtre est déposé sur un support qui est métallisé avec une couche d'or/platine (épaisseur de 8-15nm pour un temps de métallisation de 2 min avec un plasma à 18 mA). La membrane métallisée est montée sur un porte-objet et placée dans la chambre d'observation. Les observations sont faites en mode conventionnel (sous vide) à faible énergie (5 kV).

CONFIDENTIEL