

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques Département de Biologie



THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Domaine : Sciences Biologiques. Filière : Biologie et Ecologie des Populations et des communautés et Environnement

Optimisation de la production de biomasse chez *Chlorella vulgaris* cultivée dans des eaux usées laitières (lactosérum des fromageries industrielles et ses dérivés) pour la production d'algo-carburant

Par Djillali GHOBRINI

Thèse soutenue le Juin 2022 devant un jury composé de :

ALI AHMED SADOUDI	Djamila	Professeur	Présidente du jury
		Département de Biologie – UMMTO, Algérie	
YAKOUB BOUGDAL	Saliha	Professeur	Directeur de thèse
		Département de Biologie – UMMTO, Algérie	
BRANYIK	Tomáš	Professeur	Co-Directeur
		Department of Biotechnology – ENSTC, Czechia	
LARDJANE AIT SLIMANE	Nadia	Maître de conferences A	Examinatrice
		Département de BMC – UMMTO, Algérie	
BOUZIDI	Mohamed Ali	Professeur	Examinateur
		Université de Sidi Bel Abbès, Algérie	
TASSALIT	Djilali	Directeur de recherches	Examinateur
		Directeur de la Valorisation, Innovation et du	
		Développement Technologique, DGRSDT,	
		Algérie	



République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques Département de Biologie



THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Domaine : Sciences Biologiques. Filière : Biologie et Ecologie des Populations et des communautés et Environnement

Optimisation de la production de biomasse chez *Chlorella vulgaris* cultivée dans des eaux usées laitières (lactosérum des fromageries industrielles et ses dérivés) pour la production d'algo-carburant

Par Djillali GHOBRINI

Thèse soutenue le Juin 2022 devant un jury composé de :

ALI AHMED SADOUDI	Djamila	Professeur	Présidente du jury
		Département de Biologie – UMMTO, Algérie	
YAKOUB BOUGDAL	Saliha	Professeur	Directeur de thèse
		Département de Biologie – UMMTO, Algérie	
BRANYIK	Tomáš	Professeur	Co-Directeur
		Department of Biotechnology – ENSTC, Czechia	
LARDJANE AIT SLIMANE	Nadia	Maître de conferences A	Examinatrice
		Département de BMC – UMMTO, Algérie	
BOUZIDI	Mohamed Ali	Professeur	Examinateur
		Université de Sidi Bel Abbès, Algérie	
TASSALIT	Djilali	Directeur de recherches	Examinateur
		Directeur de la Valorisation, Innovation et du	
		Développement Technologique, DGRSDT,	
		Algérie	

À la mémoire de l'unique....

Un gars courageux ;

Un brillant universitaire ;

Un chercheur novateur ;

Un homme gentil et réfléchi avec un optimisme à toute épreuve ;

Tu nous manques énormément !!!

A Kamal Aïboud...

Never give up

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier :

Professeur Ali Ahmed-Sadoudi Djamila du Département de Biologie – Université Mouloud Mammeri Tízi-Ouzou.

Maître de conférences LARDJANE AIT SLIMANE Nadia du Département de BMC - Université Mouloud Mammeri Tízi-Ouzou.

Professeur BOUZIDI Mohamed Alí de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès.

Directeur de Recherches TASSALIT Djilali – Directeur de la Valorisation, Innovation et du Développement Technologique, DGRSDT, Algérie.

Pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de cette thèse et d'évaluer mon travail. Je vous remercie pour le temps consacré à cette tâche. Je tiens à remercier particulièrement le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour l'aide financière fournie par l'intermédiaire du programme National Exceptionnel.

Mes remerciements vont également au directeur de recherches Djelloul Djaafar directeur de l'Unité de Recherche Appliquée en Énergies Renouvelables, au staff de l'ambassade de la République Tchèque à Alger et au staff de l'ambassade d'Algérie à Prague, particulièrement, M. Hacène Briki pour leur aide lors des échanges dans le but de faciliter l'élaboration de mon travail.

Enfin, je voudrais également remercier l'ensemble des partenaires de ce projet pour les apports tant techniques que financiers que j'ai pu avoir pour la réalisation de ce travail.



Tout d'abord, je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, le Professeur Tomas Branyik pour m'avoir accueilli chaleureusement et avec bienveillance au sein du laboratoire de Bioprocess and Modeling – ENSTC, Czechia.

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et pour m'avoir donné l'opportunité de le développer au sein de votre projet comme membre de votre équipe. Je voudrais vous exprimer ma sincère gratitude pour votre confiance et votre disponibilité. Par votre rigueur scientifique et vos conseils avisés, vous avez fait de cette expérience très enrichissante une aventure unique, dont la devise se résume « find a solution to a real economic problem ». Děkují !

Je voudrais remercier tout spécialement ma directrice de thèse, le Professeur Saliha Yakoub-Bougdal qui a toujours été présente durant cette thèse. Cela a été pour moi un honneur d'être son doctorant et très sincèrement, je n'aurais pas demandé un meilleur modèle. Son implication, son aide et son soutien permanent m'ont été décisifs. Pour tout cela, je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier très chaleureusement l'Assoc. Prof. Olga Matátková, le PhD Tomaš Humhal et le PhD Jan Strejc du Département de Biotechnologie de l'ENSTC pour leur aide et leur disponibilité au quotidien. Merci d'avoir contribué à l'accomplissement de cette aventure.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe du département des étudiants internationaux et du département de Biotechnologie de l'ENSTC, spécialement, Mlle Anna Eiflerová et M. Rudolf Jung. Leur soutien et leur sympathie m'ont été d'une grande aide.

Je tiens à présenter mes remerciements, mon respect et ma gratitude à tous les Post-Doc, doctorants et stagiaires m'ayant accompagné au cours de cette thèse. Pedro Geada, plus qu'un collègue de travail, un véritable ami, ton soutien moral et intellectuel ont été très précieux ! Matěj Patrovský, mercí pour les échanges et discussions scientifiques et surtout sportives !! Place au prochain match de basket à Družná!! Tomáš Potočár un co-équipier si discret, mais oh combien important et efficace. Guillaume Le Cloirec, Ludovica Resta, Bastien Poutout, João Augusto Pereír, Zuzana Ježková, Maya Ríva, Marín Bouchez, Kristýna Hermannová, Fernando Martín Murillo, Vuong Uyen, Anna Cadcová, Jan Chalupa, Maryna Vasylkívska, Kamíla Zitkova, Marek Drahokoupil, Zina Bríki, Bára Šenkárčínová, Eva Veiss, Saniye Akyil, Zakaria Ghobrini, Vojtěch Hanko et Michaela Poštulková,... et bien d'autres que j'oublie certainement... Un grand mercí pour ce que vous êtes, je suis très reconnaissant à chacun de vous ! Ce fut pour moi un plaisir de travailler à vos côtés pour les uns et un privilège de vous diriger pour les autres. Děkují / Mercí / Gracias / Grazie / Obrigado / Teşekkür ederim !

Mes sincères et chaleureux remerciements vont également à Benjamin Dino Alessandro Luza Melo pour tout le soutien et pour son amitié développée à la résidence Volha. Merci de te préoccuper de l'avancement de mon travail même après avoir changé de continent !

Un très grand mercí et une grande reconnaissance envers les amis et collègues, en Algérie, qui m'ont apporté leur soutien et leurs *encouragements* tout au long de ma recherche. À cette occasion, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Je n'aurais pu y parvenir sans vous.... À titre personnel et familial, j'exprime ici l'expression ma profonde affection et ma reconnaissance à mes parents, pour leur soutien constant, leurs encouragements et leur infinie patience dans mon parcours universitaire, comme dans la vie. Ce travail est l'aboutissement de tous vos efforts. Votre dévouement et vos sacrifices sont pour moi une référence. Puissiez-vous recevoir à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Par ailleurs, mes meilleures pensées vont à mes grandsparents, à qui je dois mon avenir et mes succès. À cet égard, tu as raison grand-père toi qui disais : « les études ça ne finit jamais » …. Je le confirme !!!

Par ailleurs, j'adresse des remerciements tout particulièrement à mon oncle Mohammed Salah Dahlal qui a été le principal initiateur de mon expérience dans la recherche.

Je ne pouvais finir sans témoigner toute ma gratitude à ma petite famille à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour leur confiance et pour leur soutien constant et indéfectible tout au long de cette belle aventure.

Promís les enfants, cette fois, j'arrête !!

Publications scientifiques

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont donné lieu à plusieurs publications et communications scientifiques listées ci-dessous :

Articles :

- 1. Heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using saline waste water from the demineralization of cheese whey. Djillali Ghobrini, Tomáš Potocar, Jana Smolova, Gabriela Krausova, Saliha Yakoub-Bougdal and Tomáš Brányik. 2020. Biotechnology Letters 42(2): 209–217.
- 2. Production of biodiesel from locally isolated yellow strain of Chlorella sp. using wastewater from dairy effluents as a growth medium. Djillali Ghobrini, Tomáš Brányik, Saliha Yakoub-Bougdal, Kamal Aïboud, Leila Kebbab, Djamel Daoud, Nacéra Lahouel Rachid Bouarab, Mohammed Oumsalem, and Lyes Zanoun. AIP Conference Proceedings 2190, 020097 (2019); https://doi.org/10.1063/1.5138583.
- 3. Cultivation of Chlorella vulgaris using medium from a dairy effluent. Djillali Ghobrini, Tomáš Brányik, Leila Kebbab, Bastien Poutout, Kamal Aïboud et Saliha Yakoub-Bougdal.. Publisher IEEE Xplore 02 May 2019. Published in: 2018 6th International Renewable and Sustainable Energy Conference (IRSEC) Rabat, Morocco, Morocco. https://doi10.1109/IRSEC.2018.8702962

Communications orales et par affiches :

- 1. Production of biodiesel from locally isolated yellow strain of *Chlorella sp.* using wastewater from dairy effluents as a growth medium. Djillali Ghobrini, Tomáš Brányik, Saliha Yakoub-Bougdal, Kamal Aiboud, Leila Kebbab, Djamel Daoud et Nacéra Lahouel, Rachid Bouarab, Mohammed Oumsalem and Lyes Zanoun *Tmrees, EURACA*, 04 to 06 September 2019, Athens, Greece.
- **2.** Composés biologiques actifs synthétisés par les microalgues. Djillali Ghobrini, Leïla Kebbab, Kamal Aïboud et Saliha Yakoub-Bougdal. *Journée d'étude en Biochimie*, le 29 Janvier 2019, Université de Ghardaïa, Algérie.
- **3.** Cultivation of *Chlorella vulgaris* on saline wastewater from diary industry. Djillali Ghobrini, Tomáš Brányik, Leïla Kebbab, Bastien Poutout, Kamal Aïboud et Saliha Yakoub-Bougdal. 6th International Renewable and Sustainable Energy Conference, December 5 – 8, Rabat, Morocco
- 4. Heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris on saline wastewater from diary industry. Ghobrini Djillali, Tomáš Brányik, Saliha Yakoub-Bougdal et Kamal Aïboud. BioTech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium, June 13-17, 2017Biotech, Prague, Czech Republic
- 5. Effect of red light on biomass productivity of green microalgae Chlorella sp. Strain isolated from Djurdjura national park (north Algeria). Djillali Ghobrini, Saliha Yakoub-Bougdal, Kamal Aïboud et Djamel Daoud. 2nd Symposium on Medicinal and Aromatic Plants of Mediterranean, April 22 25, 2015, Antalya, Turkey.

Table des matières

Chapitre I. Les microalgues des organismes uniques : une alternative énergétique et un	Introduction générale	01
Les microalgues des organismes uniques : une alternative énergétique et un	Chapitre I.	
	Les microalgues des organismes uniques : une alternative énergétique et un	
futur prometteur	futur prometteur	

Résumé	05
Introduction	06
1. Le phytoplancton	08
1.1- Présentation et spécificité	08
1.2- Diversité du phytoplancton	12
1.3- Habitats et aire de répartition	15
1.4- Reproduction	16
1.5- Domaines de valorisation des microalgues	16
2- Culture de microalgues pour la production de biocarburants	18
2.1- Mode de culture des microalgues	19
2.1.1 Mode de croissance autotrophe	19
2.1.2- Mode de croissance hétérotrophe	20
2.1.3- Mode de croissance mixotrophe	21
2.2- Nutriments	21
2.2.1- Soufre	21
2.2.2- Azote	22
2.2.3- Phosphore	23
2.3- Stratégies de culture des microalgues	24
3- Systèmes de culture	25
3.1- Systèmes ouverts – les bassins ouverts	25
3.2- Systèmes fermés – les Photobioréacteurs	26
3.3- Systèmes de production hybrides	28
3.4-Bioréacteurs ou fermenteurs à réservoir agité	28
3.5- Tapis d'épuration algales (TEA)	29
4- Récolte des microalgues	29
5- Bioénergie à partir de microalgues	31
5.1-Biodiesel	32
5.1.1-Biosynthèse des lipides et des TAG	32
5.1.2- Procédé d'extraction de lipides et de formation de biodiesel	34
6- Verrous technologiques des combustibles à base d'algues	35
7- Rôle des microalgue dans le traitement des eaux usée par élimination de l'excès de	
nutriments et de polluants	37
8- Utilisation des effluent laitiers et dérivés	37
8.1- Origine	37
8.2- Composition des eaux usées laitières	38
8.3- Lactosérum et ses dérivés	39
8.4- Traitement des eaux usées laitières par élimination de éléments nutritifs par des	
microalgues	40
5	

9- Conclusion	40
10- Références bibliographiques	41
Chapitre II : Culture de Chlorella vulgaris en utilisant les eaux usées salines	
provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage.	
Contexte	

Partie 1 : Culture autotrophe et mixotrophe de <i>Chlorella vulgaris</i> dans les eaux	
usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage	53
Résumé	53
1- Rappel sur le model biologique Chlorella vulgaris	55
1.1- Définition et caractéristiques	55
1.2- Classification	55
1.3- Composants biochimiques de C. vulgaris	56
1.4- Applications de <i>C. vulgaris</i>	56
1.4.1- Production de biocarburant	57
2- Introduction	58
3- Matériels et méthodes	59
3.1- Les milieux de culture	59
3.1.1- Le milieu de base (BM)	59
3.1.2- Le milieu eaux usées salines (SWW)	60
3.2- Culture de Chlorella vulgaris dans les photobioréacteurs	61
3.2.1- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines sous un régime de culture	
combiné	62
3.2.1.1- Préparation des milieux pour la culture	63
3.2.2- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines traitées par Lactobacillus	
helveticus	63
3.3- Méthodes d'analyse	64
3.3.1- Analyse Gravimétrique	65
3.3.1.1- Préparation des Eppendorf	66
3.3.1.2- Centrifugations et poids de la biomasse	66
3.3.2- Mesure des chlorophylles et de la teneur totale en caroténoïdes	67
3.3.2.1- Détermination de la chlorophylle	68
3.3.3- Détermination du nombre de cellules (chambre Bürker)	69
3.3.4- Détermination du taux de croissance et de la productivité volumétrique	
maximale de la biomasse	70
4- Résultats et discussion	71
4.1- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines sous un régime de culture	
combiné	71
4.2- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines traitées par Lactobacillus	
helveticus	75
5- Conclusion	81
6- Références bibliographiques	82

Partie 2 : Modélisation et optimisation des conditions de culture hétérotrophes	
de Chlorella vulgaris dans les eaux usées salines provenant de la déminéralisation	
du lactosérum du fromage en utilisation la méthode des surfaces de réponses	
(MSR)	39
Résumé 8	39
1- Introduction	€1
2- Matériels et méthodes) 3
2.1- Souche de <i>C. vulgaris</i> utilisée) 3
2.2- Milieux de culture utilisés) 3
2.2.1- Milieu de base pour boîte de Pétri (M boîte de Pétri)) 3
2.2.2- Milieu de base Modifié pour les précultures (MBM préculture)) 3
2.2.3- Milieu de base Modifié pour les cultures (MBM)) 4
2.2.4- Milieu de culture à base d'eaux usées salines (SWW)) 5
2.3- Culture en flacons agités) 5
2.3.1- Test d'optimisation des nutriments pour la culture de C. vulgaris sur SWW	
en condition hétérotrophe par la méthode de surface de réponse (RSM)) 5
2.3.1.1- Sélection du model (plan d'expérience)) 6
2.3.2- Exploitation des résultats du model expérimental	∂ 7
2.3.2.1-Expériences d'optimisation de la concentration et de la source d'azote	€7
2.4- Culture en Bioréacteur	€7
2.4.1- Préparation du bioréacteur	∂ 7
2.4.2- Sélection des grandeurs) 7
2.4.2.1- Rappel sur coefficient de transfert volumétrique du dioxygène K _L a	€7
2.4.2.2 Détermination du coefficient volumique de transfert d'oxygène K_La) 8
2.4.3- Conception expérimentale) 9
2.4.4- Exploitation des résultats du model expérimental	100
2.4.5- Préparation de l'inoculum et mise en culture	100
2.5- Méthodes d'analyses 1	102
2.5.1- Détermination gravimétrique de la biomasse et du taux de glucose par	
HPLC	102
2.6- Analyse des données 1	103
2.7- Analyse statistique	104
3- Résultats et discussion	104
3.1- Culture en flacons agités 1	104
3.1.1- Validation du modèle expérimental pour les facteurs chimiques par la	
méthode des réponses de surface MRS 1	104
3.1.2- Exploitation des résultats du modèle expérimental par l'étude de l'impact de	
la source et de la teneur en azote sur la cinétique de croissance de <i>C. vulgaris</i>	109
3.2- Culture en Bioréacteurs 1	114
3.2.1- Validation du modèle expérimental pour les facteurs physiques par la	
méthode des réponses de surface MRS 1	114
3.2.1.1- Méthodologie de surface de réponse en milieu défini (MBM) et les eaux	
usées salines (SWW) pour le K _L a par variation de la vitesse d'agitation et du débit	

d'air	114
<i>C. vulgaris</i> sur les eaux usées salines en bioréacteurs	118
3.2.3- Essaie de culture fed-batch de C. vulgaris sur les eaux usées salines sous	
conditions optimales	121
4- Conclusion	122
5- Références bibliographiques	123
Partie 3 : Culture Hétérotrophe de <i>Chlorella vulgaris</i> dans les eaux usées salines	100
provenant de la demineralisation du lactoserum du fromage	129
	129
1- Introduction	131
2- Materiels et méthodes	132
2.1- Microorganisme	132
2.2- Milieux de culture synthétique	132
2.3- Milieu à base d'eaux usées salines (SWW) provenant de la déminéralisation du	
lactosérum du fromage	133
2.4- Conditions de culture	134
2.4.1- Inoculum	134
2.4.2- Culture en flacons agités	134
2.4.2.1- Sélection de la source d'azote	134
2.4.2.2- Optimisation de la concentration du glucose	135
2.4.2.3- Effets de la salinité	135
2.4.3- Culture en fermenteurs	136
2.5- Analyse gravimétrique de la biomasse et du taux de glucose par HPLC	136
2.6- Paramètres de la cinétique de croissance	137
2.7- Analyses statistiques	137
3- Résultats et discussion	137
3.1- culture en flacons agités	137
3.1.1- Sélection de la source d'azote	137
3.1.2- Optimisation de la concentration du glucose	139
3.1.3- Effets de la salinité	140
3.2- Culture en fermenteurs	142
3.2.1- Culture de C. vulgaris sous un régime fed-batch	142
4- Conclusion	145
5- Références bibliographiques	146

Chapitre III : Culture de microalgues natives du type *Chlorella vulgaris* dans du lactosérum originaire des fromageries industrielles pour la production du biodiesel.

Contexte

Partie I : Production de biodiesel à partir de Chlorella sp. un mutant native de	
couleur jaune en culture sur les effluents laitiers	148

Résumé	148
1- Introduction	150
2- Matériels et méthodes	151
2.1- Prélèvement et méthode d'échantillonnage	151
2.1.1- Prélèvement des microalgues	151
2.1.2- Identification et caractérisation des espèces microalgales dans les	
échantillons prélevés	152
2.1.3- Analyse physicochimique de l'eau collectée	152
2.2- Isolement, identification et purification de la souche de <i>Chlorella sp.</i>	152
2.3- Culture de la souche localement isolée en mode hétérotrophe	153
2.3.1- Préparation de la culture mère (préculture)	153
2.3.2- Milieu de culture à base de lactosérum (effluent laitier)	154
2.3.2.1- Milieu d'effluent prétraité (PDWW)	155
2.3.2.2- Milieu d'effluent hydrolysé et prétraité (HPDWW)	155
2.3.3- Expériences de culture de microalgues	155
2.4- Détermination de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose	156
2.5- Récolte, extraction et transestérification	156
2.6- Analyse physicochimique des FAMEs	158
2.7- Analyse statistique	159
3- Résultats et discussion	159
3.1- Analyse physicochimique des eaux de prélèvements	159
3.2- Croissance des microalgues	159
3.3- Teneur totale en lipides	168
3.4- Transestérification acide de l'huile microalgale	172
3.5- Caractéristiques du biodiesel issu de l'huile microalgale	174
4- Conclusion	175
5- Références bibliographiques	176
Partie II : Effets de la composition du lactosérum du fromage sur la croissance et	
la teneur en lipides de la microalgue verte native Chlorella sp. pour la production	
de biodiesel par voie humide	183
Résumé	183
1- Introduction	185
2- Matériels et Méthodes	186
2.1- Analyses physico-chimiques des prélèvements d'eau	186
2.2- Isolement, purification et identification de la souche	186
2.3- Eaux usées du lactosérum de fromage (CWW)	187
2.4- Conditions de préculture	188
2.5- Conditions de culture	188
2.6- Analyse de la biomasse et du taux de glucose	189
2.7- Analyse gravimétrique des lipides et production de biodiesel	190
2.8- Caractérisation des propriétés physico-chimiques du biodiesel	192
2.9- Analyse statistique	192

3- Résultats et discussion	192
3.1- Cinétique de la croissance et les taux de consommation de glucose chez	
Chlorella sp	192
3.2- Teneur en lipides, productivité et rendement lipidiques	197
3.3-Biodiesel produit à partir des cultures hétérotrophes de Chlorella sp. GM2	204
3.4- Caractéristiques du biodiesel issu de l'huile microalgale traitée et non traitée	206
4- Conclusion	207
5- Références bibliographiques	208
Conclusion générale	215
Annexe	i – vii

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Aztèques récoltant des algues dans les lacs de la vallée de Mexico (a) ;	
Femmes Kanembu ramassant de la Spiruline dans les environs du Lac Tchad (b)	
(MARQUES et <i>al.</i> , 2012)	8
Figure 2 : La chaîne alimentaire marine (<u>https://www.phenomer.org</u>)	9
Figure 3 : Abondances cellulaires des trois principaux groupes de picophytoplancton	
dans les eaux de surface de l'océan Atlantique d'après LANGE et al. (2020)	10
Figure 4 : Cycle du carbone d'après CHISHOLM (2000)	11
Figure 5 : Diversité de formes de tailles et de couleurs chez le phytoplancton	11
Figure 6 : Prochloron (morphologie particulière chez les procaryotes) (ARORA &	
SAHOO, 2015)	14
Figure 7 : Origine endosymbiotique du chloroplaste et les relations évolutives entre les	
cyanobactéries/prochlorophytes et les algues eucaryotes d'après EGELAND (2016)	14
Figure 8 : Modèle représente les types de phytoplancton les plus dominants pour trois	
régions. D'après les données du Massachusetts Institute of Technology	15
Figure 9 : Exemple de multiplication végétative chez <i>Chlorella vulgaris</i>	16
Figure 10 : Applications associées aux algues pour diverses industries (KALRA et <i>al.</i> ,	
2020)	17
Figure 11 : Réaction chimique de transestérification de triglycérides (TAG) pour la	
production de biodiesel	18
Figure 12 : Le cycle de Calvin-Benson et son interaction avec les photosystèmes I et II	
selon CASTILLO et al. (2021)	19
Figure 13 : Métabolisme hétérotrophe des microalgues selon CASTILLO et <i>al.</i> (2021)	20
Figure 14 : Métabolisme des sulfates dans les cellules microalgales (GIORDANO &	
PRIORETTI, 2016)	22
Figure 15 : Schéma simplifié de l'assimilation de l'azote inorganique (NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ et	
NO ₂ ⁻) par des microalgues (LIU & HONG, 2021)	23
Figure 16 : Illustration schématique de la voie d'absorption et de transformation du	
phosphore par les microalgues (lignes bleues : conditions de phosphore suffisant ; lignes	
violettes : conditions de carence en phosphore) (SU, 2021)	24
Figure 17 : Structure des deux phases de croissance distinctes chez les microalgues	25
Figure 18 : Photographies de systèmes ouverts de culture de microalgues	26
Figure 19 : Photographies de systèmes fermés de culture de microalgues	27
Figure 20 : Configuration d'un système de production hybride adopté dans les	
expériences en plein air (DEPRA et <i>al.</i> , 2019)	28
Figure 21 : Bioréacteur industriel à cuve agitée AD Biotec. (<u>https://www.adbiotec.com</u>)	28
Figure 22 : Tapis d'épurations algales (TEA)	29
Figure 23 : Floculation et sédimentation d'une culture de microalgues avant (A) et après	
(B) (1 heure) (CHATSUNGNOEN et CHISTI, 2016)	30
Figure 24 : Les possibilités de production de bioénergie via l'utilisation d'eaux usées	
d'après BHATIA et <i>al.</i> (2021)	31

Figure 25 : Représentation schématique des voies et des localisations subcellulaires	
présumées de la synthèse lipidique et de l'accumulation de TAG d'après FANG (2014)	33
Figure 26 : Diagramme montrant l'alcoolyse enzymatique pour la génération de	
biodiesel (FAME) (ELADEL et al., 2019)	34
Figure 27 : Modèle intégré de traitement des eaux usées et les gaz de combustion	
utilisant la culture de microalgues pour une bioraffinerie à base d'algues d'après	
MOHAN et <i>al.</i> (2020)	35
Figure 28 : Bioremédiation microalgale des eaux usées et applications potentielles de	
la biomasse produite d'après AL–JABRI et <i>al.</i> (2021)	36
Figure 29 : Eaux usées générées par l'industrie laitière (photo prise à Moravia Lacto	
a.s.)	38
Figure 30 : Applications du lactosérum dans les secteurs industriels (European Whey	
Processors, 2017/18)	39
Figure 31 : Traitement des effluents laitiers par des microalgues via la technique	
d'immobilisation cellulaire : (a) en système fermé. (b) : en système d'étang ouvert. Selon	
YADAVALLI et al (2014)	40
Figure 32 : Processus d'autosporulation chez <i>Chlorella vulgaris</i>	55
Figure 33 : Processus de prétraitement de SWW et photo du milieu prêt pour être utilisé	60
Figure 34 : Culture de <i>C yulgaris</i> en photobioréacteur colonne à bulle sous éclairage	00
continu (Laboratoire Bioprocess & Modeling, Département de biotechnologie, ENSTC	
Prague)	61
Figure 35 · Schéma descriptif du système de culture en bioréacteur colonne à bulle	01
utilisé durant les cultures autotrophes de C <i>sulgaris</i> (extrait du manuel des techniques	
de culture en laboratoire Département de biotechnologie ENSTC Prague) modifié	62
Figure 36 · Souche de <i>Chlorella vulgaris</i> dans une boîte de Pétri	63
Figure 30 : Souche de Chioretta vargaris dans une bolte de l'ettri	05
helysticus	61
Figure 28 · Comparaison des procédés d'analyses gravimétrique et	04
rigure 56. Comparaison des procedes d'anaryses gravimentique et	65
Figure 20 Structure chimique de la chlanarhalle A. La chlanarhalle D. étant une	05
Figure 59 : Structure chilinque de la chiorophyne A. La chiorophyne B etant une	
(III) ADUDEN 1080)	(7
$(HUMPHREY, 1980) \dots $	0/
Figure 40 : Comptage cellulaire correct et le sens de la lecture à l'aide de la technique	70
de la chambre de comptage	/0
Figure 41 : Courbes de croissance (g/L) de C. vulgaris (CC256) sur les différentes	
combinaisons de milieux testés	71
Figure 42 : Appréciation visuelle de la croissance des cellules de microalgues dans les	
photobioréacteurs	72
Figure 43 : Courbe de croissance de C. vulgaris (CC256) dans les eaux usées salines	
traitées par Lactobacillus helveticus (CCDM 40)	75
Figure 44 : Évolution de la teneur en chlorophylle chez C. vulgaris dans les milieux	
culture	79

Figure 45 : Coloration des différents milieux testés à la fin des cultures. De gauche à	
droite : 1 ^{er} (réacteurs 1 et 2) ; 2 ^{ème} (réacteurs 3 et 4) ; 3 ^{ème} (réacteurs 5 et 6) ; 4 ^{ème}	
(réacteurs 7 et 8)	80
Figure 46 : Souche de C. vulgaris CC256 en culture sur la boîte de Pétri	93
Figure 47 : Étapes pour le transfert d'O ₂ de la bulle de gaz à la cellule. Adapté de	
RODAS-ZULUAGA et al. (2021)	98
Figure 48 : Précultures sur MBM préculture	101
Figure 49 : Culture hétérotrophe de <i>Chlorella vulgaris</i> dans un fermenteur sur SWW et MBM	101
Figure 50 : Photographie de HPLC Agilent modèle 1100 séries	103
Figure 51 : Courbe d'étalonnage du taux de glucose (g/L)	103
Figure 52 : Plan d'expérience de l'optimisation de la culture de <i>C</i> vulgaris dans les	105
SWW	104
Figure 53 : Variation de la concentration en biomasse (g/L) chez C, vulgaris en culture	101
dans SWW sous différentes combinaisons de sels	105
Figure 54 : Variation du taux du glucose pour les combinaisons de culture chez <i>C</i> .	
vulgaris	105
Figure 55 : Illustration en 3D du tracé de la surface de réponse montrant les effets de	
NaNO ₃ et KH ₂ PO ₄ sur la production de biomasse par C. vulgaris, à une concentration	
de MgSO ₄ 7H ₂ O constante	108
Figure 56 : Optimisation de l'azote pour la production de biomasse chez <i>C. vulgaris</i>	110
Figure 57 : Variation du taux du glucose lors de la croissance de <i>C. vulgaris</i> en culture	
sur SWW sous l'effet de différentes sources et concentrations en azote	112
Figure 58 : Coefficients de rendement $(Y_{X/S})$ durant la culture hétérotrophe de <i>Chlorella</i>	
vulgaris dans les SWW sous l'effet de différentes sources et concentrations d'azote en	
culture sur un agitateur-incubateur orbital (20 g /L glucose)	113
Figure 59 : Illustrations en 3D des diagrammes des surfaces de réponse montrant les	
effets des facteurs physiques (agitation et débit d'air) sur la valeur de K _L a; (A) Sur	
MBM ; (B) Sur SWW	117
Figure 60 : Cinétique de croissance de C. vulgaris en culture hétérotrophe dans un	
bioréacteur sur SWW à (400 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose)	119
Figure 61 : Cinétique de croissance de C. vulgaris en culture hétérotrophe dans un	
bioréacteur sur SWW à (700 rpm, 1.5 vvm et 20 g/L de glucose)	119
Figure 62 : Cinétique de croissance de la culture fed-batch de C. vulgaris dans un	
bioréacteur dans les SWW à (400 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose)	121
Figure 63 : Préculture sur le milieu IM	134
Figure 64 : Culture en flacons agités sous différentes sources et teneurs en azote	135
Figure 65 : Bioréacteurs (Multifors, Infors HT, Suisse) de 1,4 L	136
Figure 66 : Productivités volumétriques de la biomasse (P_{max}) et coefficients de	
rendement correspondants $(Y_{X/S})$ pendant la culture hétérotrophe de <i>Chlorella vulgaris</i>	
dans le DM avec différentes sources d'azote en culture sur un agitateur-incubateur orbital	
(10 g /L glucose)	138

Figure 67 : Productivités volumétriques de la biomasse (P_{max}) et les coefficients de	
rendement correspondants $(Y_{X/S})$ pendant la culture hétérotrophe de <i>Chlorella vulgaris</i>	
dans le milieu DM avec de la peptone de soja et de l'urée comme sources d'azote dans	
des cultures en flacons agités à différentes concentrations initiales de glucose (S_{in})	139
Figure 68 : Culture de <i>C. vulgaris</i> dans des flacons agités dans le DM additionné de	1.40
	140
Figure 69 : Culture de C. vulgaris dans des bioréacteurs sur le milieu DM et (D) PSW W	1.40
sous un régime fed-batch	142
Figure 70 : Concentration en poids sec de la biomasse (X) et en glucose (S_{GLU}) pendant	
la culture en fed-batch de <i>Chlorella vulgaris</i> en DM (a, b), PSWW (c, d) et DPSWW (e,	1.40
f) en utilisant de la peptone de soja (a, c, e) et l'uree (b, d, f) comme sources N \dots	143
Figure 71 : Situation geographique de la region d'étude et point de prelevement	151
Figure 72 : (a) Colonies vertes isolées sur le milieu solide BG11 ; (b) Colonies jaunes	1 = 0
isolées sur le milieu solide (BGTT) modifié	153
Figure 73 : Souche de <i>Chlorella sp.</i> (GM12) sur une boite de Petri	153
Figure 74 : Précultures de <i>Chlorella sp.</i> (GM12) en condition hétérotrophe	153
Figure 75 : Suivie de la cinétique de croissance de la souche native <i>Chlorella sp.</i> GM12	
au niveau des précultures sur le milieu (BG11) modifié	154
Figure 76 : Protocole d'extraction des lipides à partir de microalgues par broyage à	
billes selon ZHU et <i>al.</i> (2002) modifié	164
Figure 77 : Réfractomètre ATAGO Abbe	166
Figure 78 : Cinétique de croissance de <i>Chlorella sp.</i> (GM12) dans les différents milieux	
testés pendant la croissance hétérotrophe	160
Figure 79 : Evolution de la consommation de glucose chez <i>Chlorella sp.</i> (GM12) dans	
les différents milieux testés	162
Figure 80 : Productivité de la biomasse chez <i>Chlorella sp.</i> (GM12) dans les différents	
milieux en condition hétérotrophe	164
Figure 81 : Evolution du pH au cours de l'évolution de la biomasse chez <i>Chlorella sp</i> .	
(GM12) dans les différents milieux de culture	168
Figure 82 : Comparaison des teneurs en lipides (% de la biomasse en poids sec) et des	
productivités lipidiques chez Chlorella sp. (GM12) en fonction de la composante du	
milieu	169
Figure 83 : Hydrolyse des liaisons esters et formation des esters méthyles d'acides gras	172
Figure 84 : Purification et observation de la souche native <i>Chlorella sp.</i> GM2 (Gx40)	187
Figure 85 : Milieu CWW collecté dans une laiterie locale (a: avant ; b: après traitement)	188
Figure 86 : Préculture de la souche indigène <i>Chlorella sp.</i> GM2 (après 5 jours)	188
Figure 87 : Culture hétérotrophe de la souche native <i>Chlorella</i> GM2 sur un agitateur	100
orbital	189
Figure 88 : Courbes d'étalonnage du glucose (g/ L)	190
Figure 89 : Courbes de croissance (X) et de la concentration en glucose (S_{GLU}) pendant	
la culture de la souche sauvage <i>Chlorella sp.</i> GM2 en flacons agités dans les milieux	
MBM (A), CWW (B) et MCWW (C). Les barres d'erreur représentent un écart-type (n	
= 2)	193

Figure 90 : Productivités volumétriques de la biomasse (P _{max}) et les coefficients de	
rendement correspondants (Y _{X/S}) au cours de la culture hétérotrophe de la microalgue	
indigène Chlorella sp. GM2 dans les différents milieux testés (les barres d'erreur	
représentent un écart type de $n = 2$)	196
Figure 91 : Teneur en lipides et productivité lipidique moyenne de <i>Chlorella sp.</i> GM2	
sous différentes conditions nutritionnelles	198
Figure 92 : Séchoir solaire indirect avec chicanes	201
Figure 93 : Coefficients de rendement en lipides de Chlorella sp. GM2 cultivée à 10	
g/L de glucose au niveau des cultures batch	202
Figure 94 : Couleur des composés liposolubles des cellules microalgales purifiées (a)	
et non-purifiées (b)	203
Figure 95 : Conversion des acides gras de la souche native Chlorella sp. GM2 en	
biodiesel par transestérification acide	204
Figure 96 : Séparation du biodiesel par décantation et évaporation de la phase organique	204
Figure 97 : Propriétés physique du biodiesel utilisant un système d'extraction par co-	
solvant (a : huile de microalgue brute ; b : huile de microalgue purifiée)	206

Liste des tableaux

Tableau I : Classification du phytoplancton selon LEE (2008) et TOMITANI (2006)	13
Tableau II : Quelques espèces de microalgues et leur teneur en huile selon CHISTI	
(2007)	18
Tableau III : Consommation d'énergie et les rendements massiques les plus élevés	
possibles (% p/v) des différentes techniques de récolte d'algues selon SINGH et al.	
(2013)	30
Tableau IV : Composition typique des eaux usées laitières (SLAVOV, 2017)	38
Tableau V : Applications des métabolites dérivés de Chlorella vulgaris d'après RU et	
al. (2020)	56
Tableau VI : Variation du profil en acides gras chez Chlorella vulgaris sous des	
conditions de culture défavorables d'après RU et al. (2020)	57
Tableau VII : Composition du milieu nutritif défini (BG11)	60
Tableau VIII : Composition chimique des eaux usées salines (SWW) avant et après le	
traitement réalisé par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République Tchèque)	61
Tableau IX : Milieux de culture utilisés pour la culture de C. vulgaris dans les réacteurs	
individuels	62
Tableau X : Milieux de culture utilisés pour la croissance de C. vulgaris dans les	
réacteurs individuels	64
Tableau IX : Équations utilisées pour le calcul de la teneur en chlorophylle a et b et en	
caroténoïdes totaux	71
Tableau X : Productivité en biomasse sur les différent milieux et combinaison testés	76
Tableau XI : Équations utilisées pour le calcul de la teneur en chlorophylle a et b et en	
caroténoïdes totaux	69

Tableau XII : Effets des facteurs de dilution des effluents laitiers sur les paramètres de	
croissance de <i>Chlorella vulgaris</i> (p < 0,05)	73
Tableau XIII : Apport des bactéries lactiques sur les paramètres de croissance de	
Chlorella vulgaris ($p < 0.05$)	77
Tableau XIV : Composition du milieu de base pour boîte de Pétri (M boîte de Pétri)	93
Tableau XV : Composition du milieu pour les précultures (MBM préculture) en (mg/ L)	94
Tableau XVI : Composition du milieu défini (MBM) en (mg/L)	94
Tableau XVII : Composition chimique des eaux usées salines (SWW) avant et après le	
traitement réalisé par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République tchèque)	95
Tableau XVIII : Caractéristique principale de la conception expérimentale	96
Tableau XIX : Conception expérimentale et niveau des variables pour (RSM)	96
Tableau XX : Caractéristiques des différentes conditions de culture sous différentes	
sources et concentrations d'azote	97
Tableau XXI : Plan expérimental et niveaux des variables indépendantes pour la mesure	
du K _L a en milieu défini	100
Tableau XXII : Plan expérimental et niveaux des variables indépendantes pour la	
mesure du KLa en milieu SWW	100
Tableau XXIII : Paramètres de culture dans le milieu SWW au niveau du bioréacteur 1	
et 2	102
Tableau XXIV : Paramètres de culture dans le milieu MBM au niveau du bioréacteur 3	
et 4	102
Tableau XXV : Résultats de l'analyse de l'ANOVA du modèle quadratique de surface	
de réponse pour la production de biomasse chez C. vulgaris	106
Tableau XXVI : Suit de l'Analyse de la variance (ANOVA) du modèle expérimental	
pour la concentration en biomasse chez C. vulgaris en culture sur les combinaisons	
de SWW	107
Tableau XXVII: Effet des facteurs chimiques (N, P et Mg) sur les paramètres de	
croissance de <i>Chlorella vulgaris</i> en culture sur les eaux usées salines ($p < 0.05$)	108
Tableau XXVIII : Effet de la source et de la concentration d'azote sur les paramètres	
de croissance de Chlorella vulgaris en culture sur les eaux usées salines comparaient à	
celle des milieux témoins SWW seul et MBM ($p < 0,05$)	111
Tableau XXIX : Matrice de la conception expérimentale et résultats expérimentaux du	
K _L a en milieu MBM	114
Tableau XXX : Matrice de la conception expérimentale et résultats expérimentaux du	
K _L a en milieu SWW	115
Tableau XXXI : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle pour le K_La en milieu	
MBM	115
Tableau XXXII : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle pour le K_L a en milieu	
SWW	116
Tableau XXXIII : Composition du milieu d'inoculum (IM)	132
Tableau XXXIV : Composition du milieu défini (DM)	133
Tableau XXXV : Composition chimique du milieu SWW prétraité (en g/ kg)	133
Tableau XXXVI : Sources et teneurs en azote additionnées dans le milieu défini (DM)	135

141
155
159
164
174
187
189
205
206

AG : Acides gras AGPI : Acides gras polyinsaturés ASTM : American Society for Testing and Materials BM : Milieu de base CBB : Calvin-Benson-Bassham CCN : Noyau de condensation de nuage CGF : Facteur de croissance CWW : Lactosérum de fromage DCW : Poids sec des cellules DHA : Acide docosahexaénoïque DM : Milieu défini (variant du BG 11) DMSP : Diméthylsulfoniopropionate DNM : Milieu nutritif défini (variant du BG 11) DWW : Effluent laitier EPA : Acide eicosapentaénoïque ECV : Evaluation du cycle de vie FAMEs : Esters méthyliques d'acides gras HPDWW : Effluent laitier hydrolysé et prétraité IM : Milieu d'inoculum K_La : Coefficient volumique de transfert d'oxygène MBM : Milieu de base modifié MCWW : Lactosérum de fromage modifié PDWW : Effluent laitier prétraité PLSWW : Milieu d'eau usées saline prétraité par Lactobacillus helveticus PSWW : Eaux usées salines prétraité DPSWW : Eaux usées salines prétraité et dilué P_{max} : Productivité volumétrique maximale de la biomasse *P*_{Lipides} : Productivité lipidique RSM : Méthode des surfaces de réponses. SWW : Les eaux usées salines SWW – L : Milieu de coculture (microalgue – bactérie lactique) S_{in} : Concentration initiale de glucose S_{fin} : Concentration finale de glucose TAG : Triglycérides TEA : Tapis d'épurations algales. TN : Azote total TOC : Carbone organique total **TP** : Phosphore total TSS : Matières en suspension totale μ_{max} : Taux de croissance spécifique WW : Eaux usées X_{max} : Concentration maximale en biomasse $Y_{X/S}$: Coefficient de rendement.

Introduction générale

Le monde fait face à une crise environnementale sans précédent, dû à l'action toujours plus marquée de l'homme sur son milieu. L'industrialisation et la motorisation croissantes du monde ont entraîné une forte augmentation de la demande en carburant à base de pétrole. Ces combustibles fossiles représentent 80% de l'énergie primaire consommée dans le monde et 58% de la production consommée par le secteur des transports, principale source d'émission de gaz à effet de serre (GES) aux nombreux effets négatifs, notamment le dérèglement climatique, le recul des glaciers, l'augmentation des niveaux de la mer et la perte de la biodiversité, etc. (ESCOBAR et *al.*, 2009).

Aujourd'hui, en raison de l'accent mis sur la protection de l'environnement et le besoin urgent de développer de nouvelles alternatives énergétiques, la production de carburant d'origine naturelle parait être l'une des alternatives envisageables. À cet égard, les microalgues offrent la possibilité de produire des biocarburants dits de 3ème génération avec une empreinte carbone réduite (fixe en moyenne 1,7 kg de CO_2 par kilogramme de biomasse). En plus de l'argument de la productivité, leur avantage majeur réside dans le fait qu'il n'entre pas en concurrence avec les productions répondant aux besoins de l'alimentation humaine ou des industries de transformation (SUBHADRA et EDWARDS, 2010). Leurs rendements énergétiques à l'hectare sont plus de dix fois supérieures à ceux des meilleures cultures terrestres. Aussi, de par leur contenu lipidique (triglycérides et acides gras libres) pouvant atteindre plus de 75% du poids de leur biomasse sèche, les microalgues constituent une alternative particulièrement attractive aux biocarburants d'origine agricole et sont considérées comme des ressources renouvelables et prometteuses pour la production de biodiesel de qualité comparable au diesel conventionnel (CHISTI, 2007). À tout cela, s'ajoute leur plasticité métabolique qui constitue un enjeu pour la valorisation dans divers domaines d'application en bioénergie. Ainsi, les microalgues peuvent être utilisées pour produire une variété de biocarburants tels que : le biogaz, l'éthanol, le biodiesel et la synthèse biologique d'hydrogène et ceci, simplement, à travers la modulation de facteurs environnementaux.

Les microalgues ont une biodiversité estimée entre 200 000 et plusieurs millions d'espèces, ce qui constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie (CADORET et BERNARD, 2008). À cet égard, de vastes études sur l'identification des souches indigènes de microalgues sont réalisées à travers différents laboratoires de recherche, notamment la sélection de souches résistantes qui présentent des taux de croissance exceptionnel, des profils lipidiques adaptés à la production de biodiesel et une tolérance à un large éventail de paramètres environnementaux. Jusqu'à présent peu étudié, ces micro-organismes photosynthétiques vivent tant en milieu salin qu'en eau douce et peuvent, le cas échéant, croître dans des eaux résiduaires. De plus, les microalgues sont généralement associées à un régime de croissance phototrophe, mais bon nombre de leurs représentants sont également capables d'une croissance hétérotrophe, mixotrophe ou photohétérotrophe (CHEW et *al.*, 2018).

Actuellement, plusieurs espèces de microalgues ont été identifiées et testées comme étant de bons candidats pour la production d'algocarburants comme *Chlorella vulgaris*, Nostoc *muscorum*, *Anacystis nidulans*, *Phormidium luridum*, *Dunaliella tertiolecta* et *Chlamydomonas reinhardtii*. Toutefois, à l'heure actuelle, la production de biocarburants utilisant des organismes photosynthétiques est encore loin d'être rentable et fait face à plusieurs défis technologiques

majeurs tels que les faibles rendements, les coûts financiers très élevés de production et l'asepsie qui est une condition indispensable pour la conduite des cultures.

De nos jours, le potentiel des microalgues visant le biodiesel est bien établi. Néanmoins, il paraît clair que malgré les percées significatives dans la recherche sur les microalgues comme matière première pour le biodiesel, les coûts de production très élevés diminuent l'intérêt économique d'une production industrielle. Ce coût de production est lié, entre autres, à celui du prix du milieu de culture et aux conditions de croissance.

Pour développer une production de biocarburant algal et s'assurer de sa viabilité économique à grande échelle, il revient à travailler sur l'optimisation des souches cultivées et des procédés de culture, mais aussi des récoltes et des techniques d'extraction.

À l'instar de l'agriculture moderne, l'une des améliorations aux biotechnologies des carburants microalgales, réside dans la sélection de souches avec des teneurs particulièrement élevées en lipides. Jusqu'à présent, l'identification des microalgues ayant un potentiel pour la production de biocarburants est un problème toujours d'actualité, car il existe de nombreuses zones géographiques inexplorées et il peut s'agir d'importants réservoirs de microalgues ayant un potentiel de production de biodiesel.

Aujourd'hui, la productivité en biomasse chez les microalgues fait partie des facteurs déterminants pour atteindre une rentabilité dans la production de bioénergie, car elle représente une part importante des coûts d'exploitation. Ainsi, en fonction du produit final recherché, cette rentabilité repose directement sur le mode de culture utilisée, l'asepsie des souches, mais aussi le degré de contrôle des facteurs physiques de l'environnement. Pour cela, la culture hétérotrophe de microalgues est considérée comme avantageuse en raison des densités de cellules élevées pouvant être atteintes, des coûts en aval réduits, des taux de croissance spécifique élevés, des besoins en terrains réduits et de l'indépendance vis-à-vis du climat, etc. (BUMBAK et *al.*, 2011).

La faisabilité économique de la culture hétérotrophe de microalgues semble être clairement positive pour des produits de hautes valeurs ajoutées telles que les acides gras polyinsaturés, les pigments, les antioxydants, les polysaccharides, les aliments et l'aquaculture (MORALES-SANCHEZ et *al.*, 2017; HU et *al.*, 2018). Cependant, rendre la culture hétérotrophe économiquement viable également pour un produit de faible valeur ajoutée telle que le biodiesel, constitue un défi. Dans ces cas, il est nécessaire de trouver des sources et substrats qui répondent aux besoins nutritionnels de ces microorganismes. Par conséquent, il est avantageux d'utiliser des milieux de croissance alternatifs tels que les déchets alimentaires et agricoles, ainsi que les eaux usées comme sources d'éléments nutritifs non-conventionnels ce qui s'inscrit dans un processus écologique de développement durable (CHEW et *al.*, 2018).

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet est de développer des technologies microbiennes axées sur la conversion de sources alternatives d'énergie par la conception et le développement d'un procédé de culture microalgale basé sur le recyclage des effluents liquides laitiers, lactosérum des fromageries et ses dérivés, pour la filière biodiesel.

Le choix s'est porté sur ces eaux résiduaires, car, d'une part, elles sont industrielles (de grandes quantités sont produites quotidiennement), et peuvent le cas échéant assurer un approvisionnement constant, sans variabilité et reste sans frais. D'autre part, elles sont riches en nutriments, en particulier, les phosphates, l'ammoniac et/ou les nitrates, éléments efficacement

assimilés par les microalgues pour croître, mais qui constituent une menace sérieuse pour la qualité de l'eau et causent des dommages à la vie aquatique si elles sont déversées dans la nature sans traitement (VAN-COILLIE et *al.*, 1990). Ainsi, l'utilisation du lactosérum des fromageries et dérivés (eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum de fromage) (SWW) pour la culture de microalgues et la production de bioénergie peut avoir un avantage significatif dans l'économie potentielle pour le traitement de ces eaux usées par rapport aux méthodes de traitement conventionnelles, souvent à base de produits chimiques, mais aussi, le potentiel de jouer un rôle important, en particulier pour le développement des biocarburants algaux (YADAVALLI et *al.*, 2014).

Chlorella vulgaris est une algue d'eau douce unicellulaire idéale pour la production industrielle. Elle est souvent considérée comme un organisme-modèle. Elle est activement étudiée pour sa croissance cellulaire plus rapide (très résistante à la contamination) et sa teneur potentiellement élevée en huile, mais aussi en raison de sa haute tolérance aux polluants organiques et ses faibles exigences sur les paramètres du milieu (SHEN et *al.*, 2015 ; SAKARIKA et KORNAROS, 2017). À cet effet, *Chlorella vulgaris* apparaît comme le choix idéal de plus de sept cents espèces de microorganismes aquatiques étudiées et cela pour son application dans le traitement des déchets industriels liquides (ABDEL-RAOUF et *al.*, 2012). Par ailleurs, et dans notre contexte, elle offre un avantage certain à savoir sa capacité à croître même avec des concentrations élevées en sel dans le milieu jusqu'à une concentration en NaCl de l'ordre de 35 g.L⁻¹ (CHURCH et *al.*, 2017).

Afin de répondre à notre problématique, exposée plus haut, la solution proposée dans le présent travail serait de réduire et de manière écologique les exigences financières de production de la biomasse par la conception et le développement d'un procédé de culture de microalgues basé sur le recyclage des eaux usées laitières (lactosérum des fromageries et ses dérivés) pour le marché du biodiesel. Ainsi, *C. vulgaris* sera examinée pour sa capacité de développement dans les effluents laitiers, principalement lactosérum déminéralisé, utilisés comme une composante principale du milieu de culture et de montrer l'importance de ces effluents dans le développement de la filière du biodiesel microalgale à l'échelle industrielle.

Pour ce faire, le travail présenté dans ce manuscrit sera constitué de trois chapitres dont certains comportent plusieurs parties qui ont donné lieu à des publications et à des communications scientifiques. Par ailleurs, chaque partie est structurée comme un article scientifique selon le plan IMRAD (IMRED) et seront ordonnée ainsi :

1. Le premier chapitre présentera une étude bibliographique sur les microalgues et consiste en une mise en contexte industriel dans laquelle s'insère le présent projet afin de mettre en valeur les solutions alternatives appropriées.

2. Le deuxième chapitre concerne les méthodologies expérimentales adoptées pour la conception et le développement d'un nouveau procédé de culture afin d'optimiser la production de la biomasse microalgale et la rendre économiquement viable. Ainsi, *Chlorella vulgaris* sera examinée par sa capacité à croître sur les effluents laitiers provenant de la déminéralisation du lactosérum des fromageries (SWW) sous différents régimes de croissance. Une fois le mode de culture défini, un plan d'expérience a été dressé et l'optimisation de la composition du milieu (azote, phosphore, magnésium) ainsi que du coefficient de transfert volumétrique du dioxygène

(K_La) seront déterminés par la méthode des surfaces de réponse (RSM) et les modèles évalués statistiquement par le logiciel Design-Expert 10.

Par la suite, sur la base d'un rapport C:N dans le milieu à 8:1 défini par l'analyse élémentaire de *Chlorella vulgaris*, les effets des principaux paramètres de culture (taux de glucose, nature de la source d'azote et la salinité moyenne) sur l'efficacité du processus de croissance ont été entrepris en flacon agité au niveau du milieu défini (DM), une variante du milieu BG11 que nous avons modifié. Ces résultats ont ensuite été adoptés dans des expériences de culture dans des bioréacteurs et dans différents supports à base de lactosérum déminéralisé comme le SWW et SWW dilué (DSWW) et ont été évalués statistiquement par rapport au milieu défini (DM).

3. Le troisième chapitre comporte une étude de production de biodiesel à base d'huiles microalgales produite à faible coût dans du lactosérum originaire des fromageries industrielles locales (Ghardaïa). Les lipides sont extraits à partir de deux souches natives de type *Chlorella vulgaris*, une verte et un mutant de couleur jaune obtenu suite à la modification du milieu d'isolement, via des procédés d'extraction par voie humide et sèche, respectivement.

Enfin, les conclusions essentielles permettant de tirer un bilan global des différents travaux réalisés sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité seront dégagées.

Chapitre I

Chapitre I. Les microalgues des organismes uniques : une alternative énergétique et un futur prometteur

Résumé

Les dernières décennies ont connu un intérêt croissant pour l'utilisation des microalgues en tant que producteurs potentiels de composés bioactifs. En effet, en raison de leurs propriétés biologiques et métaboliques intéressantes et modulables, les applications biotechnologiques des microalgues ont le potentiel de produire une vaste gamme de produits, y compris pour les industries alimentaires, la nutrition animale, des produits chimiques industriels et des solutions de bioremédiation. Dans un autre registre, et dans l'optique d'atténuer la hausse du CO_2 atmosphérique, l'utilisation des microalgues en biotechnologie a constitué des cibles de choix dans le cadre de la recherche de nouvelles sources d'énergies renouvelables, durables et neutres en carbone.

Pour le moment, les coûts de production de biocarburants à base de microalgues sont encore trop importants et une optimisation économique de la production et du traitement de la biomasse algale est plus que nécessaire pour permettre le développement d'une production industrielle si l'on considère le bilan énergétique de leur fabrication telle qu'envisagée aujourd'hui. Ainsi, dans le cadre de la production de biodiesel, une combinaison entre la sélection d'espèces, les conditions de culture et de récole et les méthodes d'extraction et de transformation constituent autant de défis pour rendre cette technologie compétitive sur le marché de l'énergie.

Mots-clés : Microalgues, mode de culture, système de production, application en biotechnologie, biodiesel, traitement des eaux usées.

1- Introduction

Les sociétés actuelles dépendent d'approvisionnements abondants et constants en ressources énergétiques pour fonctionner et progresser, dans lesquelles les ressources fossiles comblent la plus grande part des besoins énergétiques mondiaux. Cependant, l'exploitation des combustibles fossiles est source de plusieurs effets négatifs notamment l'émission de divers polluants comme les gaz à effet de serre liés aux dérèglements climatiques (NIGAM et SINGH, 2010). Aujourd'hui, l'instabilité des cours pétroliers et les changements climatiques ont stimulé la production de carburant d'origine végétale à partir du maïs et du soja. Reste, que leur origine agricole a provoqué une augmentation significative du prix des produits alimentaires de base, de plus l'accroissement de la production agricole a produit, entre autres, des problèmes de déforestation, d'érosion et de surconsommation d'eau (LAM & LEE, 2012).

L'une des alternatives possibles et prometteuses à la consommation des combustibles fossiles traditionnels est la production et l'utilisation de biocarburants à partir de microalgues (WILLIAMS et LAURENS, 2010). A cet effet, l'utilisation de microalgues comme substrats pour la production de biocarburant s'est nettement développée ces dix dernières années (PRUVOST, 2020). En plus de l'argument de la productivité, leur avantage majeur réside dans le fait qu'ils n'entrent pas en concurrence avec les productions répondant aux besoins de l'alimentation humaine ou des industries de transformation (SUBHADRA et EDWARDS, 2010). De plus, faciles à cultiver, ils peuvent croitre dans différents supports : eaux douces, saumâtres ou salées (SAKARIKA et *al.*, 2020), et avec aucune limitation saisonnière notable de la culture (HO et *al.*, 2014). En outre, la composition biochimique des microalgues peut être modifiée en fonction des conditions de culture (lumière, température, source d'azote, rapport N/P, etc...) ce qui permet d'obtenir des biomasses qui présentent des caractéristiques recherchées (BELKOURA et *al.*, 1992 ; SPOLAORE et *al.*, 2006). Par ailleurs, les microalgues offrent une possibilité de traitement alternative pour l'élimination des polluants, tout en les convertissant simultanément en biomasse (HO et *al.*, 2019).

Les microalgues sont des microorganismes autotrophes très anciens. Ils sont capables de fixer efficacement l'énergie diffuse du soleil et de convertir le CO_2 en biomasse algale en présence de l'eau. Aujourd'hui, il existerait sur le globe au moins 200 000 espèces différentes, dont une cinquantaine seulement sont bien connues et une dizaine d'espèces de microalgues sont cultivées à une échelle industrielle et parmi elles, trois espèces sont prédominantes : *Arthrospira (Spirulina), Chlorella* et *Dunaliella* (CADORET et BERNARD, 2011).

Même si l'utilisation des algues a un fort historique, les premières recherches sur les microalgues ont commencé dans les années 1950 ; l'une des forces motrices a été la Seconde Guerre mondiale et la crise alimentaire qui a suivi (BOROWITZKA, 2013). Néanmoins, les premières installations industrielles ont vu le jour, bien avant, au Mexique et au Japon (SPOALORE et *al.*, 2006) principalement pour répondre à des problématiques nutritionnelles et pharmaceutiques (BECKER, 2004). Au début des années 2000, la recherche de source d'énergie renouvelable a réitéré l'intérêt des chercheurs pour les microalgues, en effet, de par leur composition biochimique, particulièrement intéressante, les microalgues peuvent être utilisées pour produire une variété de biocarburants liquides (biodiesel, éthanol), gazeux (méthane) et/ou pour la production de vecteur d'énergie comme l'hydrogène biologique (GHIRARDI et *al.*, 2000 ; SPOLAORE et *al.*, 2006 ; WEN et *al.*, 2011).

Par ailleurs, l'enrichissement en CO_2 est nécessaire pour atteindre les productivités élevées souhaitées dans le cadre de production à grande échelle (ABDELAZIZ et *al.*, 2013). A cet effet, la séquestration du CO_2 des effluents industriels gazeux peut être combinée avec la production de biomasse algale pour des biocarburants de troisième génération (CLEMENT-LAROSIERE, 2012). Dans ce contexte, la culture intensive de microalgues semble être une meilleure solution pour des combustibles alternatifs aux combustibles fossiles principalement du biodiesel produit par transestérification d'huile d'algue à base d'esters de glycérol d'acides gras (triglycérides) (CHISTI, 2007; HU et *al.*, 2008; ABDELAZIZ et *al.*, 2013). A cet effet, contrairement à d'autres cultures énergétiques, les microalgues présentent un certain nombre de propriétés telles qu'une efficacité photosynthétique élevée, un taux d'accumulation de lipides jusqu'à 70 % du poids total, la production simultanée de produits de bioraffinerie, notamment la glycérine et les engrais, qui possèdent des applications industrielles et une période de récolte très courte, en quelques jours comparativement aux plantes terrestres telles que le Jatropha qui prend 2-3 ans (KATIYAR et *al.*, 2016).

Néanmoins, une bonne maîtrise de l'outil de production doit être prise en considération pour rendre performantes les nouvelles techniques de production de biodiesel algal. A cet égard, les microalgues ont la capacité d'achever leur croissance dans des eaux usées riches en nutriments et peuvent être cultivées sur des terrains vagues pour leur croissance contrairement à d'autres cultures énergétiques (WENGUANG et *al.*, 2014). De même, le processus de fabrication de carburant algal qui se fait traditionnellement dans des systèmes ouverts, aussi appelés bassins ouverts (open ponds), peut se faire au niveau de systèmes plus élaborés appelés photobioréacteurs (systèmes fermés) (PROVOST, 2019). Le choix du système de culture est fonction du devenir de la biomasse produite. À ce jour, la technologie des photobioréacteurs offre plusieurs avantages pour la production de biocarburants. Cependant, cela conduit également à des processus plus complexes et plus coûteux, difficiles à étendre pour une production à grande échelle ce qui la rend économiquement non viable (Ho et *al.*, 2011). Dans de tels cas, le meilleur moyen est de remplacer les supports de culture conventionnels par une source de nutriments non-conventionnelle telle que les eaux usées comme celles des effluents laitiers (CHEW et *al.* 2018).

Jusqu'à présent, les réalisations commerciales de la biotechnologie des algocarburants ont été modestes. En effet, établir un processus de production de biocarburant algal à grande échelle et s'assurer de sa viabilité économique, revient à travailler sur l'optimisation des souches cultivées, mais aussi sur les procédés de culture, de récolte et de transformation (GRIFFITHS & HARRISON, 2009 ; PROVOST, 2019). Ce qui implique la participation de plusieurs disciplines travaillant en étroite interrelation allant des domaines de la biologie en passant par l'ingénierie de l'environnement et de la chimie (SOEDER, 1980 ; WEN et *al.*, 2009).

L'objectif de cet article de synthèse se focalise sur les microalgues comme source de carburant alternatif. Dans cette revue, l'accent sera mis sur les voies de production de la biomasse algale, de synthèse et d'accumulation de lipides, mais également sur les procédés de production et de récolte. Par ailleurs, le traitement par les microalgues des effluents laitiers sera abordé et les rôles que peuvent jouer ces derniers pour le développement du marché non-saturables de production de biodiesel seront rapportés.
« Vilor Alga » (traduit comme plus vil ou sans valeur que les algues) a écrit Virgil, le poète latin, 30 ans avant notre ère. Toutefois, bien avant Virgil, les civilisations anciennes étaient conscientes du rôle des algues dans la nutrition et la santé humaine. En effet, les premières utilisations documentées d'algues comme source naturelle de nourriture pour les populations indigènes datent d'environ 2700 ans (PALLELA & KIM, 2011; WANG et *al.*, 2014). Dans les pays asiatiques, leur utilisation comme aliment riche en nutriments (*Nostoc*) remonte à 1000 ans en Chine et au Japon (OLAIZOLA, 2003; LEVINE, 2018). Toutefois, c'est des deux côtés de l'Atlantique que deux civilisations ont fait des microalgues (*Spirulina*) une des bases de leur alimentation, et cela, depuis des temps anciens. Ainsi, les Kanembous autour du lac Tchad, les consommaient sous forme de gâteau désigné le Tecuitlat (BARZANTI et GUALTIERI, 2006; GANTAR & SVIRCEV, 2008; BELAY, 2013) (fig.1). Récemment, des indications historiques d'écrivant les algues comme agents pathogènes voir en relations avec les superstitions et croyances qui leur sont associées ont été rapportés (ONCEL et *al.*, 2015).



Figure 1 : Aztèques récoltant des algues dans les lacs de la vallée de Mexico (a) ; Femmes Kanembu ramassant de la Spiruline dans les environs du Lac Tchad (b) (MARQUES et *al.*, 2012).

1. Le phytoplancton

1.1- Présentation et spécificité

Le phytoplancton désigne un large éventail de microorganismes thallophytes qui ont la chlorophylle 'A' comme pigment photosynthétique principal avec absence de revêtement cellulaire stérile autour des cellules reproductrices (LEE, 2008 ; BRENNAN & OWENDE, 2010). En plus, ils se développent tout comme les plantes terrestres par assimilation (LEE, 2008. GEST, 2002 ; MARQUES et *al.*, 2012) et/ou possèdent des plastes (KEELING, 2004).

De natures unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés (simples), et dont la taille varie de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres. Le phytoplancton se définit comme étant un assemblage diversifié d'organismes photosynthétiques, qui ne sont pas nécessairement étroitement apparentés, capables de convertir facilement l'énergie solaire en énergie chimique par la fixation du carbone inorganique (CO_2 dissous noté CO_2aq) ou l'ion carbonate (HCO^{3-}) et le stocker sous forme de matière organique (sucres), réutilisable par d'autres organismes et engendre la libération de l' O_2 dans l'atmosphère (photosynthèse oxygénée) (WHO, 1999 ; SIALVE & STEYER, 2013). Grossièrement, pour chaque kg de microalgues produit de manière autotrophe, 1,8 kg de CO_2 est capturé (GOUVEIA et OLIVEIRA, 2009).

Le phytoplancton fait partie des premiers organismes vivants apparus sur notre planète (il y a plus de trois milliards d'années) (BUICK, 2008; RUSSELL & HALL, 2006). A cette occasion, le phytoplancton a drastiquement transformé l'environnement terrestre d'anoxique hostile, en ce temps, en une atmosphère oxique riche en oxygène grâce notamment à un microbe probablement un ancêtre anoxygénique des cyanobactéries (ALLEN & MARTIN, 2007).

Bien que ne représentant que 1% de la biomasse photosynthétique sur Terre, le phytoplancton joue un rôle-clé dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques principalement des niches euphotiques. De ce fait, il contribue à plus de 90% de la production primaire des milieux aquatiques (CHISHOLM, 1995; BEHRENFELD et al., 2001; GEIDER et al., 2001). Aussi, grâce à la photosynthèse, il produit plus de la moitié de l'oxygène terrestre. A cet égard, bien que le mécanisme de photosynthèse des microalgues soit similaire à celui des plantes supérieures, elles sont généralement des convertisseurs plus efficaces. A cet égard, il serait responsable de la moitié de l'activité photosynthétique mondiale (ANDERSON, 1996; LEE, 2008). Cette particularité serait le résultat de mécanismes développés par le phytoplancton pour obtenir une photosynthèse extrêmement efficace (BAILLEUL et al., 2015; FLORI et al., 2017). Chez les diatomées, l'existence de microdomaines qui séparent les deux photosystèmes (BAILLEUL et al., 2015) et la présence de processus bioénergétique résultant d'une interaction inattendue entre la photosynthèse et la respiration à rendu la photosynthèse chez cette espèce encore plus efficace (FLORI et al., 2017) 20 % de l'oxygène libérés par jours (BAILLEUL et al., 2015). De nos jours, le phytoplancton constitue la base de la chaîne alimentaire pour plus de 70 % de la biomasse mondiale (WIESSNER et al., 1995) et assure le fonctionnement des grands cycles biologiques (FALKOWSKI et al., 2004) (fig. 2).



Figure 2 : La chaîne alimentaire marine (<u>https://www.phenomer.org</u>)

Ainsi, la diversité du phytoplancton est si riche qu'il affecte les cycles marins du carbone, de l'azote et du phosphore (WEBER et DEUTSCH 2010) et est au cœur d'un large éventail de processus et de cycles biogéochimiques (RAVEN, 1998; LE QUERE et *al.*, 2005).

L'un des composants phytoplanctoniques le plus petit (< 3 μ m et/ou < 2 μ m selon les auteurs) et le plus abondant sur Terre (omniprésent dans tous les environnements océaniques, même désertiques (pauvres en nutriments), est le picophytoplancton. Avec un rapport surface/volume élevé (LONGHURST, 2007), il domine toutes les communautés phytoplanctoniques marines dans plus de la moitié de la surface océanique mondiale (SCANLAN et *al.*, 2009) (fig. 3).



Figure 3 : Abondances cellulaires des trois principaux groupes de picophytoplancton dans l'océan Atlantique d'après LANGE et *al.* (2020).

Le picophytoplancton est considéré comme l'un des acteurs clé dans le maintien des réseaux trophiques marins dans les zones océaniques oligotrophes (FLOMBAUM et *al.*, 2013). De plus, il participe activement au transfert de carbone de la surface jusqu'aux couches profondes de l'océan (WEBER et DEUTSCH, 2010; STUKEL et *al.*, 2013; GUIDI et *al.*, 2016) (fig. 4). A cet effet, il joue un rôle essentiel dans le rétrocontrôle du climat global. Plus particulièrement, il constitue la pompe biologique du phytoplancton qui participe à la régulation de la quantité de carbone dans l'atmosphère (COX et *al.*, 2000; BOPP et *al.*, 2001). Aujourd'hui, le caractère autotrophe du picophytoplancton lui permet d'assurer la fixation de plus de 10 milliards de tonnes de carbone atmosphérique par an, formant, ainsi, un puits de carbone primordial dans la séquestration du CO_2 atmosphérique (BOWLER et *al.*, 2009).

Plusieurs autres groupes ont également des impacts significatifs sur les cycles biogéochimiques tels que *Phaeocystis* qui produit du diméthylsulfure (DMS) (BELVISO et *al.*, 2004), qui est la principale espèce soufrée volatile présente dans l'eau de mer de surface (KETTLE et *al.*, 1999) (fig. 8). Ces composés jouent un rôle important dans la formation de noyau de condensation de nuage (CCN) dans la troposphère (PRUPPACHER et *al.*, 1997). Toutefois, cette pompe biologique phytoplanctonique serait très sensible au changement climatique à venir ce qui peut avoir des impacts significatifs sur la composition des communautés de phytoplancton marin et par conséquent accélèrent les changements climatiques (COX et *al.*, 2000; BOPP et *al.*, 2001; DUFRESNES et *al.*, 2002; LE QUERE et *al.*, 2006).



Figure 4 : Cycle du carbone d'après CHISHOLM (2000).

Sur un plan phénotypique, le phytoplancton présente une myriade de morphologies de comportements et de modes nutritionnels souvent en rapport avec son environnement (CHISHOLM et *al.*, 1992; LONGHURST, 2007). A cet égard, le complexe phytoplancton comprend des protistes photoautotrophes eucaryotes et des cyanobactéries procaryotes (parfois appelées algues bleu-vert), dont l'évolution est plus proche des bactéries que du reste des microalgues, mais aussi des archébactéries. Ainsi, il désigne des organismes de taille, de forme, de structure et de composition variables. Par ailleurs, les spectres de la taille peuvent même varier dans le temps et/ou dans l'espace en réponse à des conditions environnementales variables ou à une succession d'étapes du cycle de vie (NOT et *al.*, 2012). Selon CHISHOLM (1992), il est donc possible de définir plusieurs sous-ensembles du phytoplancton selon un spectre de taille discrétisé sur plus de trois ordres de grandeur, allant du, picophytoplancton (entre 0,2 et 2 μ m), nanophytoplancton (entre 0,2 mm et 2 mm) (fig. 5).



Figure 5 : Diversité de formes, de tailles et de couleurs chez le phytoplancton (<u>http://www.mon-patch-bien-etre.com/phytoplancton-marin</u>).

Les cellules individuelles de la plupart de ces espèces sont solitaires, mais de nombreuses espèces (par exemple, la plupart des espèces des genres de diatomées *Chaetoceros* et *Thalassiosira*, de dinoflagellé *Alexandrium catenella* ou l'haptophyte *Phaeocystis*) ont également la capacité de former des chaînes ou des colonies (NOT et *al.*, 2012).

Pour plus ample information à ce sujet, il existe une vaste littérature qui passe en revue l'importance, le fonctionnement et le rôle de ce groupe polyphylétique de micro-organismes photosynthétiques (par exemple, CHISHOLM, 1992; DUGDALE et WILKERSON, 1998; BOPP et *al.*, 2001; FALKOWSKI et al., 2004; ALVAIN et *al.*, 2008 ; MASSANA, 2009 SAHOO & SECKBACH, 2015).

1.2- Diversité du phytoplancton

En raison de leur immense hétérogénéité physique, chimique et biologique leur inférant des caractéristiques écologiques différentes (acquisition des nutriments, efficacité photosynthétique et vitesse de sédimentation), les espèces phytoplanctoniques sont considérées comme les organismes les plus diversifiés de la planète (CHISHOLM et *al.*, 1992). A cet effet, le phytoplancton est un groupe largement polyphylétique (SAHOO & BAWEJA, 2015). Aujourd'hui, l'organisation hiérarchique du phytoplancton pose des problèmes de classification au regard de la monophylie, notamment par les formes unicellulaires et multicellulaires « inférieures » ou moins complexes. Ainsi, il est actuellement impossible d'arriver à une classification qui regroupe sans ambiguïté les lignées monophylétiques (ADL et *al.*, 2005).

Par ailleurs, étant donné que les microalgues sont la base de recherche de nombreux domaines différents en biologie (pas seulement en systématique), de nombreuses classifications différentes sont actuellement utilisées. Ainsi, en phycologie appliquée, les cyanobactéries sont incluses dans le groupe des microalgues avec les algues microscopiques, car elles partagent un nombre important de caractéristiques (PULZ et *al.*, 2001).

Les premières classifications du phytoplancton remontent à CAROLOUS Linnaeous (Dixon 1973). Néanmoins, Harvey est considéré comme l'un des premiers algologues à avoir proposé la première classification descriptive des algues. Depuis Harvey (1836), plusieurs classifications ont été proposées sur la base d'une variété de caractères, notamment morphologiques, physiologiques, biochimiques et, plus récemment, les caractères moléculaires ont également été considérés. Toutefois, les principaux caractères largement utilisés pour la classification des algues sont :

- I. Pigments photosynthétiques : Chlorophylles, Caroténoïdes (Carotènes et Xanthophylles), Phycobilines ;
- II. Nature biochimique de la réserve alimentaire ;
- III. Composition de la paroi cellulaire ;
- IV. Flagelles.

Une des classifications des plus fines et des plus simples est celle proposée par LEE en (2008). LEE a classé les algues en deux groupes Prokaryota et Eukaryota qui ont ensuite été divisés en divisions. Prokaryota n'a qu'une seule division Cyanophyta, tandis que Eukaryota a été divisé en plus sur la base de la nature de la membrane chloroplastique (tab. I). Ce qui a

donné résultats à une classification plus élaborée avec des groupes nécessairement plus homogènes.

	Groups	Divisions	Nom commun	Class
Prokaryota	Ι	(i) Cyanophyta	Algues bleu-vert	Cyanophyceae
		Prochlorophyta	Prochloron	
Eukaryota	II. Chloroplaste	(b) Glaucophyta*		
	entouré de deux	(c) Rhodophyta	Algues rouges	
	membranes de	(d) Chlorophyta	Algues vertes	
	l'enveloppe			
	chloroplastique.			
	III. Chloroplaste	(a) Euglenophyta		
	entouré d'une	(b) (Euglenoids)		
	membrane de	(c) Dinophyta		
	l'enveloppe du	(d) (Dinoflagellates)		
	réticulum			
	endoplasmique			
	chloroplastique			
	IV. Chloroplaste	(a) Cryptophyta		
	entouré de deux	(Cryptophytes)		
	membranes de	(b) Prymnesiophyta		Prymnesiophyceae
	l'enveloppe du	(haptophytes)		
	réticulum	(c) Heterokontophyta	Algues dorées	Chrysophyceae
	endoplasmique	(heterokonts)		Synurophyceae
	chloroplastique			Dictyophyceae
				Pelagophyceae
			Diatomées	Bacillariophyceae
				Raphidophyceae
			Algues jaune-	Xanthophyceae
			vert	
				Eustigmatophyceae
			Algues brunes	Phaeophyceae

Tableau I: Classification du phytoplancton selon LEE (2008) et TOMITANI (2006).

Pour résumé, le terme phytoplancton correspond donc au groupement fonctionnel d'organismes unicellulaires (procaryotes et eucaryotes) qui ont la capacité d'effectuer la photosynthèse oxygénée. Les procaryotes phytoplanctoniques marins appartiennent tous au phylum Cyanobactéries du domaine des Bactéries. En revanche, le phytoplancton eucaryote, est taxonomiquement très diversifié, ayant des représentants dans toutes les lignées de l'arbre de vie eucaryote sauf une (NOT et *al.*, 2012)

L'histoire évolutive précoce du phytoplancton eucaryote (et plus généralement de tous les eucaryotes porteurs de plastes) a été façonnée par une série d'événements endosymbiotiques, impliquant l'engloutissement d'une cyanobactérie auquel cas une *Prochloron* (fig. 6) par un eucaryote (ARCHIBALD 2009; KEELING, 2010) et/ou l'engloutissement d'un eucaryote photosynthétique par un autre eucaryote (ARCHIBALD, 2012).



Figure 6 : *Prochloron* (morphologie particulière chez les procaryotes) (ARORA & SAHOO 2015). (a) Micrographie optique de cellules Prochloron. (b) Micrographie électronique à transmission des cellules de Prochloron.

Ces événements endosymbiotiques se sont accompagnés de transferts massifs de gènes des génomes des endosymbiotes vers le génome de l'hôte, dont des traces peuvent être détectées chez les producteurs primaires eucaryotes modernes (fig. 7) (TOMITANI, 2006).



Figure 7 : Origine endosymbiotique du chloroplaste et les relations évolutives entre les cyanobactéries/prochlorophytes et les algues eucaryotes d'après EGELAND (2016). a=Endosymbiose primaire, b=Endosymbiose secondaire et c= Endosymbiose tertiaire.

Historiquement, la diversité du phytoplancton eucaryote a été évaluée par comparaison des caractéristiques morphologiques observées au microscope (NOT et *al.*, 2012). Sur la base de ces observations, moins de 5000 espèces ont été décrites (SIMON et *al.* 2009), mais il est généralement admis que ce nombre sous-estime largement l'étendue réelle de la diversité phytoplanctonique de 200 000 à 1 million (NORTON et *al.*, 1996; GUIRY, 2012). Au cours de la dernière décennie, l'évaluation de la diversité environnementale à l'aide d'approches moléculaires a mis en évidence une diversité massive non décrite (MASSANA & PEDROS-ALIO, 2008). Certaines de ces lignées environnementales sont si éloignées de tous les autres groupes qu'elles peuvent représenter de nouveaux phylums, un exemple étant le picobiliphyte (NOT et *al.*, 2007).

De toute évidence, il est très difficile de fournir une définition précise et complète des microalgues puisqu'ils ne sont pas monophylétiques et sont à chevales sur quatre règnes : les bactéries, les plantes, les chromistes et les protozoaires (BOROWITZKA, 2016). Aujourd'hui, la définition alternative simple et pratique pour les microalgues est suggérée par ENTWHISTLE et HUISMAN (1998) et qui est celle de la phycologie appliquée. A cet effet, les microalgues peuvent être unicellulaires, colonies et/ou filamenteuses.

1.3- Habitats et aire de répartition

D'une grande simplicité d'organisation, ces microorganismes ubiquitaires ont mis en place des stratégies différentes leur permettant de s'adapter à des environnements distincts (RICHMOND, 2004). Ainsi, les espèces se retrouvent largement dispersées et disséminées dans presque tous les biotopes aquatiques et terrestres (RAVEN & FALOKWSKI, 1999) particulièrement dans les zones de latitude comprises entre 40° et 60° (LÉVY et BOPP, 2007) (fig. 8).



Figure 8 : Modèle représentant les types de phytoplancton les plus dominants et de grande importance en matière de cycles biogéochimiques (<u>https://www.science.org/</u>).

En outre, ils peuvent croître à la fois en liberté et en association symbiotique ou en tant que parasite à la surface (épiphyte) ou à l'intérieur (endophyte) d'autres organismes, où parfois, ils causent de graves dommages (SAHOO & BAWEJA, 2015).

De nos jours, on sait que les espèces phytoplanctoniques colonisent aussi bien les milieux marins (mers et océans), saumâtres et d'eaux douces (lacs, rivières, fleuves), et sont retrouvés à la surface de différents types de sol (TOMASELLI, 2004; KATARZYNA et *al.*, 2015). De plus, ils peuvent s'établir dans n'importe quel habitat allant même jusqu'à pousser dans les associations de lichens sur les roches nues (LEE, 2008). Toutefois, les mécanismes derrière la large dispersion du phytoplancton ne sont pas tout à fait clairs (COLEMAN, 1996). Cependant, on sait que les petites cellules sont particulièrement bien adaptées aux eaux stables et oligotrophes (pauvres en nutriments), tandis que les cellules plus grandes fonctionnent généralement mieux dans les milieux mixtes et eutrophes (riches en nutriments) (FINKEL et *al.*, 2010, MARANÇON et *al.*, 2001).

Par ailleurs, la répartition de toutes les espèces ne dépend pas seulement de la disponibilité d'habitats appropriés. Ainsi, les espèces peuvent être retrouvées vivant dans des environnements inhospitaliers tels que les déserts et sous les glaciers aux pôles de la Terre (SIALVE & STEYER, 2008). En outre, certaines espèces ont la capacité de s'adapter à des conditions de variations de température, de lumière, de pH, de salinité et d'humidité défavorables, ainsi qu'à des besoins réduits en nutriments, ce qui leur confère la possibilité de croître dans des conditions difficiles et sous des environnements extrêmes comme les marais salants, les sources hydrothermales, dans les environnements acides, ou sous des conditions de très faible luminosité (RAVEN & FALOKWSKI, 1999; GUEDES et *al.*, 2014; NG et *al.*, 2015). A cet égard, les espèces phytoplanctoniques peuvent être d'occurrence universelle (SAHOO & BAWEJA, 2015).

1.4- Reproduction

La prolifération des microalgues s'effectue principalement par reproduction asexuée ou par multiplication végétative : une cellule-mère se divise alors en deux cellules filles génétiquement identiques (fig. 9). Cependant, comme la majorité des eucaryotes, les microalgues peuvent aussi se multiplier par reproduction sexuée. Cette phase du cycle de vie, est généralement déclenchée par des conditions environnementales particulières souvent multifactorielles. La nature de ce stimulus, peu ou pas connu, représente souvent un obstacle aux études du cycle cellulaire de certaines espèces (COLEMAN & PRÖSCHOLD, 2005).



Figure 9 : Exemple de multiplication végétative chez Chlorella vulgaris.

1.5- Domaines de valorisation des microalgues

En raison de la grande diversité taxonomique des microalgues et de leur vaste distribution environnementale, ces micro-organismes photosynthétiques ont de nombreuses applications dans des domaines diversifiés (BRENNAN et OWENDE 2010; KHAN et *al.*, 2018).

Après récolte et séchage de la biomasse et selon la composition chimique des microalgues, la biomasse peut avoir plusieurs applications. A cet égard, selon CHEW et al. (2017) différentes fractions de métabolites primaire et secondaire microalgales sont valorisables dans plusieurs domaines industriels distincts. Ainsi, la biomasse algale est utilisée comme matière première pour les productions agroalimentaires, l'alimentation humaine et animale, car elles sont une source importante de vitamines naturelles, de minéraux et d'acides gras. Ils peuvent aussi être utilisés en aquaculture avec leur teneur importante en stérols pour le bon développement des stades larvaires de bivalves par exemple (CARDOZO et al., 2007). Comme biofertilisants pour ajuster la composition minérale des sols déminéralisés, améliorer la fertilité des sols, stimuler la croissance des plantes et augmenter les rendements (SULEIMAN et al., 2020). Aussi, pour la production de produits cosmétiques, de médicaments et d'aliments fonctionnels grâce notamment aux composés, tels que les pigments, les antioxydants, les β-carotènes, les protéines, les vitamines, les acides gras polyinsaturés comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et les polysaccharides comme le β -glucane qui peuvent présenter des activités anti-âge, hydratantes, et/ ou encore pour le soin des cheveux (SPOLAORE et al., 2006). D'autres espèces possèdent des composés avec des propriétés intéressantes comme par immunostimulantes, exemple des activités antitumorales. ou encore contre l'hypercholestérolémie (SKULBERG, 2000; CARDOZO et al., 2007; AMARO et al., 2011). Enfin, les acides gras produits par les microalgues peuvent être utilisés pour la production de biodiesel et la biomasse résiduelle peut être fermentée pour produire de l'éthanol ou du méthane et des engrais (JOHN et al., 2011; PARMAR et al., 2011). En outre, d'autres études ont analysé la possibilité de produire de l'énergie sous forme d'Hydrogène directement par les cellules (SIALVE et al., 2009) (fig. 10).



Figure 10 : Applications associées aux algues pour diverses industries (KALRA et al., 2020).

Le rendement de production d'acides gras à l'hectare pour la production de biodiesel peut être 30 fois supérieur chez les algues relativement aux plantes supérieures oléagineuses (CADORET & BERNARD, 2008) (2 200 gal.ha⁻¹.an⁻¹). Néanmoins, le coût du biodiesel reste

le principal obstacle pour les applications commerciales à grande échelle, essentiellement en raison du coût élevé des huiles algales (LANG et al., 2001). Il existe quatre principales façons de fabriquer du biodiesel. La méthode la plus courante est la transestérification, car le biodiesel issu de la transestérification peut être utilisé directement ou en mélange avec du carburant diesel dans un moteur (ZHANG et *al.*, 2003). Ainsi, la production de biodiesel est obtenue à partir de l'huile de microalgues par le processus d'estérification lipide-alcool afin de produire des esters d'alkyle avec un sous-produit le glycérol (fig. 11).



Figure 11 : Réaction chimique de transestérification de (TAG) pour la production de biodiesel.

2- Culture de microalgues pour la production de biocarburants

Selon KUMAR et *al.* (2015) le succès de la production de biocarburants à partir d'algues dépend de nombreux facteurs. Parmi lesquels la sélection d'une souche d'algue appropriée est particulièrement importante. Cette dernière doit avoir dans la mesure du possible : (*i*) une productivité lipidique élevée, (*ii*) être robuste et capable de survivre aux stress quotidiens, (*iii*) être capable de surpasser la croissance des espèces sauvages dans les systèmes de production ouvert, (*iv*) avoir une capacité d'absorption de CO_2 élevée, (*v*) avoir des besoins limités en nutriments, (*vi*) soit tolérantes à une large gamme de températures, (*vii*) fournissent de précieux coproduits, (*viii*) avoir un cycle de productivité rapide, (*ix*) avoir une efficacité photosynthétique élevée et (*x*) avoir des caractéristiques d'auto-floculation. Toutefois et jusqu'à présent, aucune souche microalgale connue n'est capable de répondre à toutes ces exigences. En général, les principales caractéristiques pour choisir le type de microalgues sont les paramètres de croissance et de production de lipides (RAVANIPOUR et *al.*, 2021) (tab. II).

Espèces de microalgues	Teneur en huile (% poids sec)
Botryococcus braunii	25-75
Chlorella sp.	28-32
Crypthecodinium cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16-37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25-33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20-35
Nannochloropsis sp.	31-68
Neochloris oleoabundans.	35-54
Nitzschia sp	45-47
Phaeodactylum tricornutum	20-30
Schizochytrium sp.	50-77
Tetraselmis sueica	15-23

Tableau II : Quelque	s espèces de 1	microalgues et	leur teneur ei	n huile selon	CHISTI ((2007)
----------------------	----------------	----------------	----------------	---------------	----------	--------

Les espèces ayant une productivité et/ou une accumulation de lipides plus élevées sont vitales pour une production de biocarburants, car les coûts liés aux infrastructures, aux nutriments et aux besoins en eau restent pratiquement les mêmes dans des conditions identiques. Ainsi, la sélection d'espèces appropriées diminue les besoins énergétiques par unité de biocarburant produite. Par conséquent, le choix doit être basée sur la composition de la biomasse sous un mode de croissance donné (auto-/hétéro-/mixotrophe), la disponibilité des nutriments (avec/sans stress N), le système de culture (étangs ouverts/fermés) et le produit voulu

2.1- Mode de culture des microalgues

Les microalgues sont capables de croître et être actives dans l'un des trois états métaboliques suivants : autotrophe, hétérotrophe et mixotrophe (YANG et *al.*, 2000).

2.1.1 Mode de croissance autotrophe

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques qui photo-synthétisent des glucides en fixant le CO_2 en présence de lumière (KIM et *al.*, 2013). Par conséquent, les microalgues sont cultivées dans des environnements éclairés naturels ou artificiels pour métaboliser de l'énergie de manière autotrophe (MOROWVAT & GHASEMI, 2019). En autotrophie, la fraction d'énergie lumineuse est capturée puis transmise à l'aide des photosystèmes I (PSI) et II (PSII), générant un pouvoir réducteur (NADPH) et de l'ATP via la photophosphorylation. D'autre part, le CO_2 , en tant que source de carbone, est fixé et transformé en glucides par une série de réactions biochimiques d'oxydoréduction lors du cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (réaction sombre) et est réalisé par la RuBisCO (fig. 12).



Figure 12 : Le cycle de Calvin-Benson et son interaction avec les photosystèmes I et II selon CASTILLO et *al.* (2021).

Dans ce mode de culture, les microalgues sont cultivées dans des installations spéciales appelées photobioréacteurs (PBR) ou dans des étangs ouverts en plein air. Dans ces derniers,

les cultures sont exposées au soleil et se caractérisent par leur fonctionnement plus facile et moins coûteux que celui des grands photobioréacteurs fermés (SUH & LEE, 2003). Néanmoins, l'utilisation du rayonnement solaire est économiquement supérieure à l'éclairage artificiel, mais la variabilité spatiale et temporelle de la quantité d'ensoleillement est problématique et influence fortement sur la photosynthèse et de ce fait sur les rendements bio-massique.

2.1.2- Mode de croissance hétérotrophe

Un certain nombre de microalgues est capable de croître de manière hétérotrophe sur des substrats organiques et ne dépend donc pas de la lumière du soleil pour se développer (KUMAR et al., 2015). Dans ces conditions, un carbone sous une certaine forme est nécessaire pour fournir l'énergie indispensable à la croissance cellulaire. Les microalgues hétérotrophes tirent leur énergie de substrats organiques souvent fournis sous forme d'acétate ou de glucose (VAZHAPILLY & CHEN, 1998). D'autres sources de carbone comprennent des glucides tels que le fructose, le saccharose, le lactose et l'amidon peuvent être utilisés par des microalgues pour croître (KUMAR et al., 2015). Cependant, le rapport C/N est un facteur d'influence qui affecte la teneur en lipides cellulaires, car il contrôle le basculement entre les synthèses de lipides et de protéines au niveau cellulaire (GORDILLO et al., 1998). Ainsi, le déficit en azote (rapport C/N élevé) dans les milieux de culture déclenche l'accumulation de lipides (PAL et al., 2011). Le métabolisme à base de carbone organique implique des voies similaires à celles trouvées dans les bactéries qui débute par l'absorption de la source de carbone organique. Chez certaines espèces, telles que Chlorella, il existe un système de symport transmembranaire hexose/H+ inductible responsable de la captation du glucose (MORALES-SANCHEZ et *al.*, 2013) (fig. 13).



Figure 13 : Métabolisme hétérotrophe des microalgues selon CASTILLO et *al.* (2021). Les lignes bleues représentent la glycolyse, la voie PP, le cycle TCA et les réactions de dérivation du glyoxylate, les lignes vert foncé représentent les réactions gluconéogéniques, les lignes orange les réactions impliquées dans la biosynthèse des lipides. Liste des métabolites et leurs abréviations : Glucose (Glc) ; Glycérol (Gly); Glucose 6-Phosphate (G6P); Glucose 1-Phosphate (G1P); Sédoheptulose 7-Phosphate (S7P); le ribose 5-phosphate (R5P); Ribulose 5-Phosphate (Ru5P); Ribulose 1,5-Biphosphate (Ru1,5P); Glycérate 2-Phosphate (Gly2P) Glycérate 3-Phosphate (Gly3P); Glycérate 1,3-Biphosphate (3pgPI); Glycéraldéhyde 3-Phosphate (G3P); Fructose 1,6-Biphosphate (F1,6P); Fructose 6 -Phosphate (F6P); Erythrose 4-Phosphate (E4P); Xylulose 5-Phosphate (Xu5P); GP (Glycérone Phosphate); Phosphoénolpyruvate (PEP); Pyruvate (Pyr); Acétyl CoA (AcCoA); CIT (citrate); TIC (Isocitrate); α -cétoglutarate (α KG); Succinyl CoA (SucCoA); succinate (SUC); Fumarate (FUM); Malate (MAL); D-glycérate (GlyT); D-glycéraldéhyde (GALD); Triacylglycérol (TAG); Chrysolaminarine (Chrys).

Le mode de culture hétérotrophe permet l'utilisation de bioréacteurs conventionnels (c'est-àdire des bioréacteurs à cuve agitée) dont l'exploitation et la maintenance à grande échelle sont simples, réduisant ainsi les coûts d'exploitation (MORALES-SANCHEZ et *al.*, 2013).

En règle générale, un organisme utilisé pour la production hétérotrophe doit posséder les caractéristiques suivantes : (*i*) la capacité de se diviser et de métaboliser dans l'obscurité, (*ii*) la capacité de se développer sur des milieux peu coûteux, (*iii*) une phase de latence courte ou nulle lorsqu'il est inoculé à concentration optimale et (*iv*) la capacité de tolérer les contraintes hydrodynamiques dans les fermenteurs et les équipements périphériques associés.

2.1.3- Mode de croissance mixotrophe

Les microalgues mixotrophes se développent simultanément de manière autotrophe et hétérotrophe (KIM et al., 2013) c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de photosynthétiser et d'acquérir des nutriments organiques exogènes de manière hétérotrophe (LEE, 2001). On y distingue, ainsi, deux types de cultures : les cultures photohétérotrophes et mixotrophes. Les deux sont basées sur l'utilisation de sources de carbone organique en présence de lumière (ZHAN et al., 2017; SMITH et al., 2020). Ces types de cultures permettent la croissance et le développement d'espèces microalgales incapables de croître en hétérotrophie stricte (expl. P. tricornutum) (CERON-GARCIA et al., 2005). Ainsi, en présence de lumière, ils peuvent augmenter l'assimilation des sources organiques. A cet effet, dans la culture photohétérotrophe, la lumière est utilisée comme source d'énergie et les composés organiques sont métabolisés, comme dans la croissance hétérotrophe, sans fixation de CO₂ (CERON-GARCIA et al., 2005; PIASECKA et al., 2020). En revanche, la mixotrophie se caractérise par une fixation du carbone permettant l'assimilation simultanée du CO2 et du carbone organique (YEH & CHANG, 2012; PIASECKA et al., 2020). Ainsi, l'impact de la perte de biomasse est réduit pendant la respiration (phase sombre) et diminue la quantité de substances organiques utilisées pendant la croissance (BRENNAN et OWENDA, 2010).

2.2- Nutriments

En plus du soufre, l'azote et le phosphore sont deux éléments essentiels à la croissance des algues en quantité relativement importante pour la production de biocarburant à partir de microalgues. Or, les microalgues produisent du biocarburant suite à une carence de ces éléments (DAS et *al.*, 2019). Toutefois, l'efficacité de l'absorption des nutriments et de leur contenu dans les algues peut varier en fonction des conditions de croissance, du temps d'exposition, de l'espèce et du pourcentage de glucides, de protéines et de lipides dans la biomasse récoltée (BARSANTI et GUALTIERI, 2006).

2.2.1- Soufre

Le soufre est l'un des principaux composants des cellules microalgales, avec un quota cellulaire généralement très similaire à celui du phosphore (HO et *al.*, 2003). L'importance du Soufre n'est pas simplement quantitative, mais également associé à sa présence dans de nombreux composés structurels et fonctionnels essentiels tels que les acides aminés (cystéine et méthionine), les thiols non protéiques (glutathion), les sulfo-lipides, les vitamines et les constituants de la paroi cellulaire (TAKAHASHI et *al.*, 2011).

En outre, le soufre est également un constituant du Diméthylsulfoniopropionate (DMSP), qui chez certaines espèces peut représenter la très grande partie du soufre cellulaire. Ce zwitterion assure diverses fonctions physiologiques et joue notamment le rôle d'osmolyte. De même, il semble avoir un rôle important dans le contrôle du climat (CHARLSON et *al.*, 1987; GIORDANO et *al.*, 2008). Les microalgues acquièrent du soufre sous forme de sulfate (SO_4^{-2}), la forme la plus abondante de soufre inorganique dans la nature. Alors qu'il est assimilé dans la matière organique sous forme de sulfure (S⁻²) (fig. 14) (GIORDANO & PRIORETTI, 2016). L'assimilation a lieu principalement dans le chloroplaste et seule *Euglena gracilis* réduit le sulfate dans la mitochondrie (BRUNOLD et SCHIFF, 1976).



Figure 14 : Métabolisme des sulfates dans les cellules microalgales (GIORDANO & PRIORETTI, 2016).

2.2.2- Azote

L'azote est un élément nutritif essentiel pour la croissance des microalgues, il participe à la synthèse de peptides, protéines, chlorophylle, enzymes, acide ribonucléique (ARN), acide désoxyribonucléique (ADN), adénosine diphosphate (ADP), adénosine triphosphate (ATP) et d'autres substances dans les cellules de microalgues (JUNEJA et *al.*, 2013). Pour la plupart des espèces d'algues, la privation d'azote peut favoriser l'accumulation de lipides ou de glucides dans les microalgues et inhiber la synthèse des protéines (DAS et *al.*, 2019). Au contraire, l'azote abondant dans le milieu de culture peut favoriser la synthèse des protéines (OBEID et *al.*, 2019). Il est rapporté que les microalgues peuvent assimiler l'azote ammoniacal (NH₄⁺), le nitrate (NO₃⁻), le nitrite (NO₂⁻) et l'azote organique simple tel que l'urée et les acides aminés présent mêmes dans les eaux usées pour synthétiser des protéines, des acides nucléiques et des phospholipides (BARSANTI et GUALTIERI, 2006). Le mécanisme entre la croissance des

algues et l'absorption d'azote est très compliqué, ce qui est généralement étroitement lié à la forme d'existence de la source d'azote (ARUMUGAM et *al.*, 2013). L'énergie nécessaire à l'assimilation du NH_4^+ étant moindre, la source d'azote préférentiellement utilisée par les microalgues est le NH_4^+ (NAGARAJAN et *al.*, 2020). Une cellule de microalgues idéale peut absorber et assimiler une série de substrats azotés dans la cellule pour la croissance. Une voie simplifiée d'assimilation de l'azote inorganique est résumée dans la figure 15 (LIU & HONG, 2021).



Figure 15 : Schéma simplifié de l'assimilation de l'azote inorganique (NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^-) par des microalgues (LIU & HONG, 2021)

2.2.3- Phosphore

Dans le processus du métabolisme des microalgues, le phosphore est un autre macronutriment essentiel, car il est indispensable à la synthèse des acides nucléiques, de l'ATP, des phospholipides et des protéines (JUNEJA et *al.*, 2013). Une carence en phosphore réduira la division cellulaire et affectera les processus biologiques tels que la synthèse des protéines, la transcription et le cycle du carbone. Le phosphate inorganique (comme PO_4^{-3} , HPO_4^{-2} et $H_2PO_4^{-3}$) est la forme de phosphore la plus assimilée par les microalgues (SU, 2021).

En cas d'insuffisance de phosphate inorganique, les cellules de microalgues peuvent minéraliser le phosphate organique en orthophosphate pour une meilleure assimilation (MARKOU et *al.*, 2014). Par contre, en cas d'excès de phosphate, les cellules des microalgues peuvent les utiliser et en même temps, les transformer en granules de polyphosphate, qui sont stockés dans les cellules pour continuer à maintenir la viabilité des microalgues en l'absence de phosphate (WHITTON et *al.*, 2015) (fig. 16).



Figure 16 : Illustration schématique de la voie d'absorption et de transformation du phosphore par les microalgues (lignes bleues : conditions de phosphore suffisant ; lignes violettes : conditions de carence en phosphore) (SU, 2021).

2.3- Stratégies de culture des microalgues

Les algues peuvent se développer dans divers environnements aquatiques tant qu'il y a des quantités adéquates de carbone (organique ou inorganique), N (urée, ammonium ou nitrate) et P ainsi que d'autres oligo-éléments présents. Il existe de nombreux efforts qui visent à améliorer l'efficacité des procédés de culture de microalgues. Ces derniers peuvent être divisés en deux grandes catégories. La première catégorie se concentre sur l'augmentation de la productivité lipidique des microalgues grâce à divers efforts, telle que l'optimisation des bioréacteurs (SINGH & SHARMA, 2012). L'autre catégorie a pour objectif principal d'améliorer les rendements en biomasse et en lipides en appliquant une stratégie de culture appropriée (JOHNSON et *al.*, 2018).

La productivité en lipides dépend à la fois de la productivité de la biomasse et de la teneur en lipides. Cependant, étant donné que les deux phases donnent des compromis différents entre la productivité de la biomasse et la teneur en lipides (LI et *al.*, 2008), les stratégies d'exploitation suggérées jusqu'à présent tentent d'accentuer l'une ou les deux. Ainsi, les stratégies de culture affectent de manière significative l'efficacité de la production de biomasse/lipides et sont classées en cinq catégories principales : stratégies de culture batch, fed-batch, continues, semicontinues et en deux étapes (RYU et *al.*, 2019) continue et batch (C&B) (SUNG et *al.*, 2017), batch et batch (B&B) (HO et *al.*, 2010) et ou bien continue et continue (C&C) (ZHU, 2015). Les stratégies de culture Fed-batch et continue ne supportent pas une productivité lipidique élevée en raison d'un manque de conditions stressantes tout au long de la procédure de culture (HO et *al.*, 2010). Pendant ce temps, les stratégies en deux étapes et les stratégies semicontinues améliorent l'accumulation de lipides en concomitance avec la production de biomasse (NARALA et *al.*, 2016).

Par ailleurs, en culture les microalgues ont deux phases de croissance distinctes ; une phase exponentielle dans laquelle la cellule prolifère dans des conditions suffisantes en nutriments et une phase stationnaire dans laquelle la cellule accumule principalement des lipides (fig. 17).



Figure 17 : Structure des deux phases de croissance distinctes chez les microalgues.

3- Systèmes de culture

En tenant compte des facteurs de croissance et des conditions de culture, plusieurs paramètres peuvent s'avérer limitants pour le développement de ces microorganismes : des facteurs abiotiques tels que la lumière, la source de carbone, les nutriments minéraux, la température, la salinité, le pH, la teneur en O_2 ; et des facteurs biotiques tels que des pathogènes (bactéries, champignons, virus), des compétiteurs pour les ressources (algues exogènes) ou des prédateurs (hydres, copépodes). Pour ces derniers, le problème est en grande partie résolu pour des algues croissant en milieu extrêmophile, comme les eaux hypersalées (telle que *Dunaliella salina*) ou hyper alcalines (telle que la spiruline) qui limitent la croissance des prédateurs et des microorganismes concurrents. (MORITA et *al.*, 2000; LEE, 2001; SHEN et *al.*, 2009). Pour les autres, les systèmes de production peuvent jouer un rôle majeur et ces derniers sont regroupés sous deux familles.

3.1- Systèmes ouverts - les bassins ouverts

La culture en bassin ouvert représente une grande partie de la production mondiale de microalgues. Il existe différentes formes de systèmes ouverts, les trois principaux designs des bassins en opération et sont à échelle relativement large :

- Les bassins en boucle fermée (raceways) où le milieu de culture est mis en mouvement par des pales en rotation ;
- Les bassins circulaires où l'agitation est assurée par un bras rotatif ;
- Les bassins inclinés où le flux est assuré par la gravité et un système de pompe (design plus rare).

La profondeur est généralement comprise entre 15 et 40 cm, le mixage et la circulation de l'eau permettent de garder les cellules en suspension. Ce type de culture présente l'avantage de pouvoir être installé sur de très grandes surfaces avec des coûts relativement faibles. Leur construction et leur entretien est facile. Cependant, ces systèmes par leur caractère ouvert, risquent la contamination, soit par des espèces qui trouvent là, les conditions idéales pour se

développer et supplanter l'espèce cultivée, soit par des « prédateurs » qui consomment l'espèce en développement. En outre, la productivité peut être affectée par des pertes d'eau due à l'évaporation du milieu (fig. 18).



Figure 18 : Photographies de systèmes ouverts de culture de microalgues. A= Open pond en Australie chez Western Technologies, B= Raceway de la société Microbio Inc. en Californie culture de *Arthrospira platensis*.

3.2- Systèmes fermés – les Photobioréacteurs

Un photobioréacteur peut être décrit comme un système clos et éclairé. C'est un récipient de culture destiné à la production contrôlée de la biomasse. Un Photobioréacteur se réfère à des systèmes qui sont fermés à l'environnement et par conséquent n'ayant aucun échange direct de gaz et de contaminants avec le milieu.

Selon UGWU et *al.*, (2008) les photobioréacteurs, malgré leurs coûts, ont plusieurs grands avantages par rapport aux systèmes de cultures ouverts (les bassins, ...etc.), ainsi :

- Les photobioréacteurs minimisent les risques de contaminations par des microorganismes indésirables et permettent la culture axénique d'algues des monocultures ;
- Les photobioréacteurs offrent un meilleur rendement de la biomasse, une meilleure qualité des produits et la possibilité pour la conception technique flexible ;
- Les photobioréacteurs offrent un meilleur contrôle des conditions telles que le pH, la température, la concentration en lumière, etc. ;
- > Les photobioréacteurs permettent une perte minimale de CO_2 ;
- Les photobioréacteurs empêchent l'évaporation de l'eau ;
- > Les photobioréacteurs permettent la production de produits biopharmaceutiques complexes
- Les photobioréacteurs permettent la croissance dans les modes photoautotrophes, hétérotrophes ou mixotrophes.

Cependant, ils sont limités au niveau de l'implantation et des coûts pour une installation à grande échelle ainsi qu'au niveau de la disponibilité de la lumière notamment par la formation de biofilm sur les parois du photobioréacteur (BOROWITZKA et *al.*, 1999).

Les photobioréacteurs peuvent fonctionner en mode continu ou par mode batch. L'utilisation en mode continu présente plusieurs avantages par rapport au fonctionnement par mode batch lesquels sont :

Un plus haut degré de contrôle ;

- > Les taux de croissance pouvant être ajustés et maintenus pendant de longues périodes ;
- ➤ La concentration de la biomasse peut être contrôlée en faisant varier le taux de dilution ;
- > Les résultats sont plus fiables et plus facilement reproductibles.

Cependant, il existe des inconvénients qui peuvent rendre le mode continu inadapté pour certains types de bio-réaction. Par exemple, un défi réside dans le contrôle de la production de certains produits non liés à la croissance des algues.

Trois types de photobioréacteurs existent et leur principe repose sur une optimisation de la disponibilité lumineuse, les propriétés de la culture et le type de mise en circulation utilisé. Abordons en premier la géométrie du photobioréacteur, car c'est de ce critère que dépend principalement la problématique de l'accès à la lumière. Les photobioréacteurs sont également caractérisés par une grande diversité de configurations au point de vue géométrique. On peut cependant distinguer trois grandes familles (fig. 19) :

- Les photobioréacteurs plats ;
- Les photobioréacteurs tubulaires ;
- Les photobioréacteurs à colonne verticale.



Figure 19 : Photographies – systèmes fermés de culture de microalgues. A= Photobioréacteur plat du laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues de l'Ifremer, , B= Photobioréacteur tubulaire d'un volume de 1000L en Australie. C= Photobioréacteurs de l'Algaeparc aux Pays Bas.

3.3- Systèmes de production hybrides

Les systèmes de production hybrides combinent des stades de croissance distincts dans des photobioréacteurs et dans des étangs ouverts. La première étape de croissance est généralement dans un photobioréacteur où des conditions soigneusement contrôlées permettent une croissance optimale et ceci est suivi par la culture dans des systèmes ouverts dans lesquels les algues peuvent être soumises à un stress azoté pour une meilleure accumulation de lipides ou un stress de soufre pour produire de l'hydrogène (H₂). RODOLFIE et *al.* (2008) ont décrit un système de production hybride dans lequel la culture était réalisée dans des photobioréacteurs suivis d'étangs ouverts. 22 % de la culture était dédiée à un photobioréacteur dans des conditions suffisantes en N et 78 % dédiées à un bassin ouvert dans des conditions insuffisantes en N. Ils ont estimé la production lipidique équivalente à 90 kg ha⁻¹ jour⁻¹ (10 et 80 kg ha⁻¹ jour⁻¹ dans la première et la deuxième étape, respectivement) (fig. 20).



Figure 20 : Configuration d'un système de production hybride adopté dans les expériences en plein air (DEPRA et *al.*, 2019).

3.4- Bioréacteurs ou fermenteurs à réservoir agité

Les bioréacteurs à cuve agitée où les fermenteurs conviennent à la culture d'algues hétérotrophes (fig. 21).



Figure 21 : Bioréacteur industriel à cuve agitée AD Biotec. (https://www.adbiotec.com)

<u>Chapitre I</u>

Dans ce type de système, les possibilités de mise à l'échelle sont beaucoup plus simples que pour les photobioréacteurs, car la croissance est indépendante de la lumière, ce qui permet un rapport surface/volume du réacteur plus petit. Des densités cellulaires élevées sont réalisables, car ces systèmes permettent un degré élevé de contrôle de la croissance et par conséquent des coûts de récolte inférieurs. Le coût d'installation est comparativement plus faible, mais la production initiale est énergivore en sources de carbone organique (CHRISTI et *al.*, 2007). Par ailleurs, l'apport en O_2 reste la plus grande contrainte opérationnelle (CORMAN, 1957; ZEIGLER et *al.*, 1980; BARTOW, 1999).

3.5- Tapis d'épurations algales (TEA)

Le tapis d'épurations algales (TEA) consiste en une communauté d'algues poussant attachée sur un tapis (gazon) dans un bassin peu profond à travers un chenal dans lequel l'eau est constamment pompée (fig. 22). Dans ce système, l'eau est pompée sur un circuit fermé pour y-faire pousser des algues et pour traiter les eaux usées en absorbant des composés organiques et inorganiques et libèrent de l'oxygène par photosynthèse (ADEY et *al.*, 2011). Les nutriments retirés des eaux usées restent à l'intérieur de la biomasse algale qui peut être facilement récoltés. Ce système peut être utilisé pour la récupération des ressources à partir de variétés d'eaux usées provenant des exploitations agricoles, des eaux usées tertiaires, de l'aquaculture et des cours d'eau. Il peut être effectué en mode continu sans qu'il soit nécessaire d'éliminer la biomasse pendant la production (CHIA et *al.*, 2018; SIVILLE et BOEING, 2020).



Figure 22 : Tapis d'épurations algales (TEA).

4- Récolte des microalgues

Une étape critique dans la production de microalgues est représentée par la phase de récolte des cellules dont les rendements et les coûts variés sont dépendants des espèces et des systèmes proposés (CHATSUNGNOEN et CHISTI, 2016). Le terme récolte fait référence à la concentration d'une suspension de culture de microalgues diluée dans une pâte composée de 5 % à 25 %, voire plus, du total des solides en suspension (TSS). Cette concentration influence considérablement les processus de traitement et d'extraction (SINGH et *al.*, 2013).

De nos jours, plusieurs techniques existent pour la récupération de la biomasse microalgales et qui reposent sur différents principes telles que la centrifugation, la floculation, la sédimentation, la microfiltration, la flottation à l'air dissous (DAF) (MOLINA GRIMA et *al.*, 2004) et même la bio-floculation (CHEN et *al.*, 2018). La centrifugation serait maintenant la technique la plus utilisée (RICHMOND, 2008). Toutefois, étant donné qu'elle est très dispendieuse et énergivore, nous pouvons la privilégier uniquement pour les produits à haute valeur. Puisque le biodiesel est un produit de faible valeur, la centrifugation entraînerait une augmentation de 30 % environ du coût total de ce biocarburant (PIENKOS et DARZINS, 2009) (tab. III).

Processus de récolte	Rendement le plus élevé (% de solides)	Consommation d'énergie (kW-hm ⁻³)	Références
Centrifugation	22.0	8.00	GIRMA et <i>al</i> . (2003)
Sédimentation par gravité	1.5	0.1	SHELEF et <i>al.</i> (1984)
Filtration (naturel)	6.0	0.4	SEMERJIAN et al. (2003)
Filtration (sous pression)	27.0	0.88	SEMERJIAN et al. (2003)
Filtration à flux tangentiel	8.9	2.06	DANQUAH et <i>al</i> . (2009)
Filtration sous vide	18	5.9	GIRMA et <i>al</i> . (2003)
Electro-coagulation	-	1.5	BEKTAS et <i>al</i> . (2004)
Electro-flottation	5.0	5.0	AZARIAN et <i>al.</i> (2007)
Electro-floculation	_	0.331	EDZWALD (1995)

Tableau III : Consommation d'énergie et les rendements massiques les plus élevés possibles (% p/v) des différentes techniques de récolte d'algues selon SINGH et *al*. (2013).

La floculation est une des techniques largement étudiées pour son réel potentiel d'application (BRANYIKOVA et *al.*, 2018). Basée sur le caractère colloïdal des microalgues en suspension, cette technique mise sur l'interaction électrique répulsive entre les cellules d'algues et l'interaction de celles-ci avec l'eau environnante. A cet effet, les cellules d'algues sont généralement caractérisées comme des surfaces chargées négativement où l'intensité de la charge est fonction de l'espèce, de la force ionique et du pH du milieu de culture (TAYLOR et *al.*, 1998) (fig. 23).



Figure 23 : Floculation et sédimentation d'une culture de microalgues avant (A) et après (B) (1 heure) (CHATSUNGNOEN et CHISTI, 2016).

La technologie de récolte de la biomasse algale en est encore à ses balbutiements et des essais sur des combinaisons appropriées de ces méthodes sont actuellement en cours (WILLIAMS et LAURENS, 2010).

5- Bioénergie à partir de microalgues

Les microalgues sont composées de trois composantes principales : les protéines, les glucides et les huiles (lipides). Le composant huileux des microalgues serait la base de toute future industrie pétrolière à base d'algues (fig. 24).



Figure 24 : Les possibilités de production de bioénergie via l'utilisation d'eaux usées, d'après BHATIA et *al.* (2021).

Selon FANG (2014) par rapport à d'autres matières premières de biocarburants, les microalgues sont un choix privilégié pour de nombreuses raisons :

- 1. Ils poussent extrêmement vite et produisent rapidement un rendement élevé en biomasse ;
- 2. Les carburants microalgales ne présentent aucun problème de sécurité alimentaire ;
- 3. Les biocarburants générés à partir de microalgues sont renouvelables et peuvent réduire le carbone atmosphérique [la production de 100 tonnes de biomasse algale équivaut à éliminer environ 183 tonnes de dioxyde de carbone de l'atmosphère (CHISTI, 2008)] ;
- 4. L'élevage de microalgues ne nécessite pas de terres arables et peut utiliser les gaz de combustion industriels comme source de carbone ;
- 5. Les microalgues oléagineuses sélectionnées ne nécessitent pas d'eau douce et peuvent se développer dans l'eau de mer, l'eau saumâtre ou les eaux usées ;

6. Les carburants biodiesels dérivés des microalgues peuvent être intégrés dans les infrastructures de transport actuelles.

5.1- Biodiesel

Le biodiesel est généralement défini comme étant des esters monoalkyliques d'acides gras à longue chaîne, dérivés de la transestérification de matières premières renouvelables (MEHER et *al.*, 2006). L'idée d'utiliser des carburants de transport provenant de sources renouvelables est venue des réflexions de Rudolph Diesel (PATIL et *al.*, 2008). L'inventeur a fait tourner le 1^{er} moteur de type diesel exposé par Otto (une société automobile française) durant l'exposition universelle de 1900 et a utilisé de l'huile d'arachide et cela a fonctionné (KNOTHE, 2005).

Aujourd'hui, les lipides de microalgues ont également été évalués comme une source de biocarburant prometteuse et durable. Ainsi, parmi les différentes catégories de carburants dérivés des microalgues, le biodiesel reçoit le plus d'attention car il partage des caractéristiques chimiques similaires à celles du diesel conventionnel (CHISTI, 2007; SHEEHAN et al., 1998). Cependant, le biodiesel à base de microalgues est loin d'être commercialement faisable, car il n'est pas économiquement pratique à l'heure actuelle. D'un point de vue biologique, une des solutions évidentes est d'augmenter la teneur en huile. En effet, la plupart des espèces de microalgues n'accumulent pas de grandes quantités de lipides pendant une période de croissance normale. Les cellules commencent à accumuler des quantités importantes de lipides de stockage après avoir rencontré des conditions de stress telles qu'une privation de lumière et de nutriments (facteur limitant la croissance) ce qui a pour effet un ralentissement de la prolifération cellulaire et se traduit par une production en biomasse limitée et une augmentation de la productivité globale des lipides (HU et al., 2008). Ainsi, la prolifération des algues est entravée mais l'assimilation du carbone par la cellule n'est pas affectée et il est converti en lipides triacylglycérols (TAG), mieux adaptés pour la transestérification. Les lipides peuvent être transformés en biodiesel et en diesel « vert » par transestérification et hydrotraitement, respectivement (GONG et JIANG, 2011).

De nos jours, les efforts consentis pour le développement dans la production de biodiesel microalgale ont suivi deux voies distinctes (WANG et *al.*, 2014) :

- 1. Le criblage de souches appropriées avec des propriétés de production d'huile élevées en considérant la nutrition comme un élément clé ;
- 2. Le criblage du métabolisme de synthèse des lipides des microalgues pour l'amélioration des souches.

5.1.1- Biosynthèse des lipides et des TAG

Comme chez les plantes supérieures, les lipides produits par les microalgues comprennent généralement les lipides neutres, les lipides polaires, les esters de cire, les stérols et les hydrocarbures, ainsi que les dérivés phényles tels que les tocophérols, les caroténoïdes, les terpènes, les quinines et les dérivés pyrroles tels que les chlorophylles (SHARMA et *al.*, 2012).

Toutefois, malgré l'intérêt et l'enthousiasme continus suscités par le potentiel d'huile microalgales pour le biodiesel, les mécanismes biologiques se connectant à la biosynthèse des lipides et des TAG restent peu connus. Aujourd'hui avec l'arrivée de nouvelles techniques d'analyse et de dépistage, plusieurs mécanismes de synthèses sont mis en évidences. Ainsi, la voie de biosynthèse de TAG consiste en trois étapes (HUANG et *al.*, 2010) : (*i*) Conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, (*ii*) Allongement et la désaturation de la chaîne carbonée des acides gras et (*iii*) Biosynthèse du TAG (fig. 25).



Figure 25 : Représentation schématique des voies et des localisations subcellulaires présumées de la synthèse lipidique et de l'accumulation de TAG d'après FANG (2014).

Les lipides produits par les microalgues peuvent être regroupés en deux catégories, lipides de stockage (lipides non polaires) et lipides structurels (lipides polaires) (MOLINA et *al.*, 2003).

• Les lipides structurels

Ils ont généralement une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI). Ils représentent une source importante de nutriments essentiels pour les animaux aquatiques et les humains. Avec les stérols, ce sont des composants structurels importants des membranes cellulaires qui agissent comme une barrière perméable et sélective pour les cellules et les organites. De même ils peuvent agir comme intermédiaires clés (ou précurseurs) dans les voies de signalisation cellulaire et jouer un rôle dans la réponse aux changements de l'environnement.

• Les lipides de stockage

Ils se présentent principalement sous la forme d'esters de triacylglycérol (TAG) constitués d'acide gras (AG) majoritairement saturés et de certains AG insaturés (sources d'acides gras spécifiques) qui peuvent être facilement convertis en biodiesel. Les microalgues stockent les TAG en tant que réserve d'énergie carbonée au sein de cellules qui ne peuvent plus se diviser (MENG et *al.*, 2009). Les lipides neutres sont concentrés dans une structure spécialisée appelée gouttelettes lipidiques ou corps lipidiques globulaires et entourés d'une membrane lipidique monocouche (GOODSON et *al.*, 2011; MOELLERING et BENNING, 2010).

5.1.2- Procédé d'extraction de lipides et de formation de biodiesel

L'extraction des lipides est un processus de base pour générer du biodiesel à partir de la biomasse microalgale. Diverses méthodes ont été établies pour l'extraction des lipides des microalgues : (1) mécanique (par exemple, pressurage, battage de billes ou homogénéisation à haute pression) et (2) chimique (par exemple., solvant, enzyme [lipases], fluide supercritique ou liquides ioniques). Les extractions à base de solvants sont courantes et sont généralement couplées à des méthodes de rupture des cellules telles que les microondes, les ultrasons, et les extractions par fluide sous pression (GRIMI et *al.*, 2014). Par ailleurs, pour une meilleurs extraction le processus doit être rapide, efficace, sans altération des lipides et facilement extensible (MEDINA et *al.*, 1998; PARK et *al.*, 2015).

Après l'extraction, les lipides doivent être convertis en esters méthyliques d'acides gras (FAME) par hydrolyse et/ou transestérification en utilisant un alcool comme accepteur d'acyle et à l'aide de catalyseurs chimiques ou enzymatiques (MITTELBACH, 1996; KHAN et *al.* 2009; TAKISAWA et *al.*, 2013) (fig. 26). L'extraction au Soxhlet à l'hexane et la méthode d'extraction BLIGHT & DYER utilisant un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) sont les techniques les plus utilisées pour l'extraction des lipides microalgales (LEE et *al.* 2010).



Figure 26 : Diagramme montrant l'alcoolyse enzymatique pour la génération de biodiesel *(FAME)* (ELADEL et *al.*, 2019).

Ainsi, la transestérification consiste en un certain nombre de réactions réversibles consécutives (FREEDMAN et *al.*, 1986). Les triglycérides (ou triacylglycérols : TAG) réagissent généralement avec du méthanol et sont convertis progressivement en diglycérides, monoglycérides et enfin glycérol, comme indiqué dans les équations suivantes :

```
TAG + M\acute{e}thanol \leftrightarrow Diglyc\acute{e}ride + FAME
Diglyceride + Methanol \leftrightarrow Monoglyceride + FAME
Monoglyceride + Methanol \leftrightarrow Glycerol + FAME
```

À partir de 1 mole de TAG de départ, 1 mole d'ester méthylique d'acide gras (FAME) est libérée à chaque fois. Par ailleurs, la transestérification et la qualité du biodiesel sont plus élevées avec les acides gras saturés ou monoinsaturés qu'avec les acides gras polyinsaturés (STANSELL et *al.*, 2012). Les acides gras les plus courants produits par les algues sont les acides oléiques (18:109), linoléiques (18:206) et palmitiques (16:0) (HEMPEL et *al.*, 2012).

6- Verrous technologiques des combustibles à base d'algues

De grandes barrières techniques à la production de biocarburants à base d'algues l'empêchent de devenir économiquement viable. En effet, le prix du baril de carburant à base d'algues est estimé entre 300 à 2 600 \$ US contre 40 à 80 \$ pour le pétrole brut (ALABI et *al.* 2009). A cela s'ajoute les règles de l'offre et la demande qui vont influer considérablement sur son prix et affecter également la faisabilité économique de ce type de production (XU et *al.*, 2006). A cet égard, une réduction significative du coût des biocarburants à base d'algues ne sera atteinte que si toutes les étapes du processus de production, de la production de biomasse algale à la conversion de la biomasse en carburant, soit entièrement intégrées et optimisées (BOROWITZKA, 2013) (fig. 27).



Figure 27 : Modèle intégré de traitement des eaux usées et les gaz de combustion utilisant la culture de microalgues pour une bioraffinerie à base d'algues d'après MOHAN et *al.* (2020).

A cet effet, le bio-raffinage de la biomasse des microalgues dans une boucle circulaire afin de maximiser la récupération des ressources est considéré comme l'une des options durables pour une viabilité économique et environnementale (MOHAN et *al.*, 2020).

Selon BOROWITZKA (2013) les principaux procédés qui peuvent entraîner la rentabilité économique des biocarburants à base d'algues sont :

➢ La coproduction d'algues avec d'autres produits à valeur ajoutée utilisant l'aquaponie par exemple, en particulier lorsqu'il existe un écart important entre le coût de production et le coût du produit sur le marché ;

➢ Utilisation de chaque ingrédient de la biomasse brute (GEORGIANNA et MAYFIELD, 2012; SHEEHAN et *al.*, 1998). Ainsi, il est suggéré de produire également une gamme de coproduits et de sous-produits à partir de la biomasse algale plutôt que d'extraire les lipides

seulement. En effet, bon nombre de ces produits ont une valeur marchande plus élevée que les huiles d'algues elles-mêmes (BOROWITZKA, 2013). La majorité des carburants dérivés des microalgues se sont concentrés sur les huiles de stockage (37,9 % de l'énergie et 27,4 % du carbone initial fixé) (LARDON et *al.*, 2009). Le carbone restant est composé d'abondantes protéines et glucides. Par conséquent, le recyclage de ces éléments nutritifs peut aider à augmenter les marges (LARDON et *al.*, 2009). En outre, la fermentation des déchets d'algues par digestion anaérobie pour la production de méthane peut soutenir le processus de production de microalgues (RAS et *al.*, 2011; ZAMALLOA et *al.*, 2012) ;

Enfin, pour améliorer la faisabilité économique de la production de biodiesel à grande échelle à partir de microalgues, la production de microalgues combinée à l'élimination et l'atténuation du CO_2 dans les émissions industrielles de gaz (CUELLAR–BERMUDEZ et *al.*, 2015) et pour le traitement des eaux usées par l'élimination de l'excès de nutriments dans les eaux usées (ÁLVAREZ–DIAZ et *al.*, 2017) en utilisant des monocultures ou des consortiums de microalgues voire de bactérie – microalgue sont considérées comme des stratégies les plus prometteuses (OLGUIN, 2012) (fig. 28).



Figure 28 : Bioremédiation microalgale des eaux usées et applications potentielles de la biomasse produite d'après AL–JABRI et *al.* (2021).

7- Rôle des microalgues dans le traitement des eaux usées par élimination de l'excès de nutriments et de polluants

L'objectif principal du traitement des eaux usées est d'éliminer l'excès de nutriments et de polluants des eaux usées avant leur rejet dans l'environnement. Une teneur élevée en nutriments pourrait conduire à l'eutrophisation des eaux douces et des habitats marins locaux, tandis que la libération de polluants pourrait entraîner de graves effets sur la santé humaine et animale en raison d'une éventuelle bioaccumulation via la chaîne alimentaire (NAGARAJAN et *al.*, 2020). Le traitement de différents types d'eaux usées par des méthodes physico-chimiques ou biologiques (non microalgales) peut souvent être inefficace et/ou énergivore (AL-JABRI et *al.*, 2021). Les eaux usées sont généralement contaminées par de l'azote, le phosphore, les oligo-éléments et d'autres matières organiques, nutriments dont les microalgues ont besoin pour leur croissance cellulaire. Un exemple de mécanismes d'élimination de nutriments (N, P) est donné par les équations (1 - 4) (ZHU, 2015).

$$NH_{4}^{+} + 2O_{2} + 2HCO_{3}^{-} \rightarrow NO_{3}^{-} + 3H_{2}O + 2CO_{2}$$
(1)

$$5C + 4NO_{3}^{-} + 2H_{2}O \rightarrow CO_{2} + 4HCO_{3}^{-} + 2N_{2}$$
(2)

$$4NH_{4}^{+} + 8O_{2} + 5C + 4HCO_{3}^{-} \rightarrow 2N_{2} + 10H_{2}O + 9CO_{2}$$
(3)

$$10Ca^{2+} + 6PO_{4}^{-} + 2OH^{-} \rightarrow Ca_{10} (PO_{4})_{6} x (OH)_{2\downarrow}$$
(4).

La culture de microalgues dans divers flux d'eaux usées a été discutée par différents groupes scientifiques au cours des dernières décennies, en raison de la croissance dynamique des microalgues dans des cours d'eau hautement pollués par la matière organique, les minéraux et même les métaux lourds et des composés nocifs (CHEAH et *al.*, 2016; MATAMOROS et *al.*, 2015; GONÇALVES et *al.*, 2017; SHAO et *al.*, 2018; AL–JABRI et *al.*, 2021). Ainsi, la bioremédiation par des microalgues pourrait être intégrée aux méthodes de traitement existantes ou adoptée comme méthode biologique unique pour traiter efficacement les eaux usées. Cependant, chaque espèce microalgale pourrait avoir une tolérance différente lorsqu'on parle de culture dans les flux d'eaux usées (KOMOLAFE et *al.*, 2014; MOLINUEVO–SALCES et *al.*, 2019). Actuellement, on estime que l'utilisation des eaux usées dans la production de biodiesel d'algues pourrait réduire les coûts de production à 1,5 \$.kg⁻¹ (ACIEN et *al.*, 2012). Les souches de microalgues les plus couramment utilisées dans le traitement des eaux usées sont *Chlorella* et *Scenedesmus* (GARCIA et *al.*, 2000; WILEY et *al.*, 2009).

Nous nous intéressons à l'application des microalgues dans le traitement des eaux usées des effluents laitiers et leur potentiel d'élimination des nutriments polluants pour améliorer le potentiel de production de matières premières pour le biodiesel.

8- Utilisation des effluents laitiers et dérivés

8.1- Origine

Les problèmes environnementaux sont généralement le fait de la pollution de l'eau, de l'air et du sol, du bruit mais aussi des déchets générés principalement par différents types d'industries. Dans la filière laitière, l'origine des problèmes environnementaux et sanitaires se situe principalement au niveau de la pollution de l'eau (MOLETTA & TORRIJOS, 1999; CORCORAN et *al.*, 2010). L'industrie laitière consiste à transformer le lait cru en produits et

elle exige une grande consommation d'eau et en rejette autant (MARCHADIER, 1985; MOLETTA et TORRIJOS, 1999). Alors que les méthodes de traitement conventionnelles ne sont pas efficaces lorsque de grandes quantités de protéines et de lipides sont présentes. Des problèmes, tels qu'un pH alcalin, une coloration foncée et des niveaux élevés de demande biologique en oxygène (DBO) et de demande chimique en oxygène (DCO) sont posés (DROGUI et *al.*, 2008), avec parfois des ratios de carbone, d'azote et de phosphore déséquilibrés, qui peuvent nuire à la qualité de l'eau et à la vie aquatique (KOLEV SLAVOV, 2017) (fig. 29).



Figure 29 : Eaux usées générées par l'industrie laitière (photo prise à Moravia Lacto a.s.).

8.2- Composition des eaux usées laitières

Il existe peu d'informations sur la composition des effluents laitiers à l'échelle industrielle (BRITZ et *al.*, 2006). En règle générale, la composition des effluents varie en fonction des procédés utilisés et donc des produits fabriqués, mais aussi de la manière dont se fait la récupération. Plus important, les effluents de la transformation du lait (provenant du lait, du fromage, du yaourt et d'autres produits) ont une température élevée et de grandes variations de pH. Ils sont connus pour contenir une charge organique élevée, acides gras, huiles, de la graisse, avec la présence de minéraux, sucres, amidon, et des nutriments tels que les phosphates, l'ammoniac et/ou les nitrates, ce qui nécessite des traitements physico-chimiques coûteux pour les éliminer (SLAVOV, 2017). Les informations sur les caractéristiques générales des eaux usées laitières sont présentées dans le tableau IV.

Paramètres	Concentrations
	Effluents laitiers
DCO (mg $O_2 L^{-1}$)	500 - 10.400
TOC (mg C L^{-1})	1400 - 1500
$TN (mg N L^{-1})$	10-660
TP (mg P L^{-1})	0-600
PO_4^{-3} (mg P- PO_4^{-3} L ⁻¹)	10 - 326
TSS (mg L^{-1})	60 - 5400
рН	4 – 11
Couleur	Blanc ; jaune verdâtre (lactosérum)

Tableau IV : Composition typique des eaux usées laitières (SLAVOV, 2017).

TN : azote total ; TP : phosphore total ; TSS : matières en suspension totale ; TOC : carbone organique total.

8.3- Lactosérum et ses dérivés

Le lactosérum est le liquide restant après la fabrication du fromage ou l'élimination de la graisse et de la caséine du lait et constitue une grave menace environnementale (DRAGONE et *al.*, 2009). En effet, un des principaux composants du lactosérum est le lactose disaccharidique, qui peut éventuellement produire du glucose et du galactose, conduisant à des valeurs de DBO et de DCO comprises entre 30.000 et 50.000 mg.L⁻¹ et 60.000 – 80.000 mg.L⁻¹, respectivement. Cet effluent contient également des protéines et des lipides ainsi que des vitamines et minéraux hydrosolubles (SISO, 1996). Il est de couleur vert jaunâtre alors que les eaux usées laitières sont de couleur blanche et ont une odeur désagréable et un caractère trouble (CARVALHO et *al.*, 2013 ; PRAZERES et *al.*, 2012).

Actuellement des solutions sont offertes au lactosérum pour une meilleure valorisation de cette matière au niveau industriel (fig. 30).



Figure 30: Applications du lactosérum dans les secteurs industriels (European Whey Processors, 2017/18).

Cependant, l'utilisation du lactosérum est limitée par la teneur élevée en minéraux (8 - 10% w/v) (DIBLIKOVA et *al.* 2013). Ainsi, cette substance nécessite souvent un prétraitement pour réduire ses niveaux de salinité (European Whey Processors, 2017/18).

A cet effet, l'une des méthodes privilégiées par les industriels est celle de la déminéralisation (dessalement) par électrolyse (GERNAGON et *al.*, 2011). La durée du processus dépend de la quantité de sels à éliminer et donne pour résultat résiduaire des eaux usées salines qui représentent un problème environnemental important (DIBLIKOVA et *al.*, 2013), avec un pH aux alentours de 4,0 et une conductivité molaire des ions H⁺ qui est presque cinq fois supérieure à la conductivité des autres cations remplacés (BAZINET et *al.*, 2000).

8.4- Traitement des effluents laitières par élimination de éléments nutritifs par des microalgues

Aujourd'hui, le traitement des eaux usées avec un fort rapport azote/carbone organique (C/N) est un défi. En effet, le recours à certaines souches de bactéries peut constituer un frein pour améliorer l'efficacité d'élimination de l'azote et d'autres nutriments. Par contre, les microalgues pourraient utiliser le carbone organique, l'azote et d'autres nutriments pour augmenter leur nombre de cellules tout en traitant ces effluents. Selon le type de souche microalgales, la teneur en azote cellulaire des microalgues peut aller de 3 à 10 % (ADAMAKIS et *al.*, 2018). A cet effet, une variété de forme d'azote inorganique (par exemple, ammonium, nitrate, nitrite, azote atmosphérique) et organique (par exemple, urée, glycine, etc.) pourraient être assimilées par des souches de microalgues/cyanobactéries, bien que l'efficacité varie selon les souches et les conditions de croissance.

Le rôle des microalgues pour éliminer certains minéraux nocifs dans l'environnement comme (P) et (N) a été mis en évidence dans plusieurs études. Ainsi, dans une étude un effluent laitier a été traité avec succès par *Chlorella pyrenoidosa* et *Euglena* gracilis immobilisés dans des systèmes ouverts ou fermés (YADAVALLI et *al.*, 2014) (fig. 31).



Figure 31 : Traitement des effluents laitiers par des microalgues via la technique d'immobilisation cellulaire ; (a) en système fermé, (b) : en système d'étang ouvert. Selon YADAVALLI et *al.* (2014).

Les résultats montrent que l'azote sous forme $(NH_4^+ - N)$ a été complètement éliminé par *Chlorella*, tandis qu'une réduction de 96 % a été observée pour *Euglena*. De plus, une élimination de 98 % de $(PO_4^{-4} - P)$ a été obtenue avec les deux espèces, quels que soient les modes de culture. La DBO et la DCO ont également diminué de manière significative (80-96 %). En outre, le procédé a permis une nette amélioration de la production de la biomasse et de l'utilisation des glucides, soulignant ainsi, la présence de nutriments bénéfiques pour la croissance dans le lactosérum du fromage. A cet égard, ce principal sous-produit de l'industrie laitière pourrait être considéré comme une alternative envisageable pour réduire considérablement les coûts de production de la biomasse des microalgales un des freins majeurs dans le développement des biocarburants à base d'algues.

9. Conclusion

Les microalgues ont une énorme biodiversité et elles peuvent être une source de composés bioactifs (protéines, lipides, pigments et vitamines) avec de nombreuses activités biologiques (antioxydant, antibactérien, antiviral et anti-inflammatoire). Sur les 50000 espèces existantes, seules quelques milliers sont aujourd'hui conservées dans des collections et étudiées pour leur contenu biochimique, alors que seules quelques espèces sont cultivées en quantités industrielles.

L'intérêt pour les microalgues a augmenté en raison du besoin d'approvisionnement alimentaire, de ressources énergétiques renouvelables et respectueuses de l'environnement. Cependant, à ce jour, la viabilité économique n'a pas été atteinte. De plus, la durabilité des ressources, en termes d'utilisation des terres, de l'eau, des nutriments et de l'énergie, doit être méticuleusement quantifiée pour chaque type de système de production afin que la matière première soit considérée comme véritablement « durable ». En ce sens, avec les processus de production de biocarburants à grande échelle, le lien eau-énergie-nutriments fait l'objet d'une réflexion et d'un débat importants.

Pour le succès de tout biocarburant durable, il y a trois considérations principales : la faisabilité technique, la viabilité économique, et la durabilité des ressources. Le biocarburant à base d'algues est techniquement faisable et la production de biocarburant à partir de microalgues à des échelles industrielles à faible coût peut faciliter leur utilisation. En outre, la biomasse résiduelle pourrait être utilisée pour d'autres applications (dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques).

Aujourd'hui, les bénéfices d'une démarche écoresponsable sont au premier plan des sujets de développement durable. Les eaux usées sont une source secondaire abondante pour des ressources limitées comme le phosphore et l'azote. De même, l'élimination des nutriments des eaux usées est cruciale du point de vue de la bioéconomie circulaire. Par conséquent, l'utilisation des microalgues pour l'élimination des nutriments des eaux usées sert le double objectif de biorestauration de ces eaux, en s'attaquant aux problèmes écologiques tels que l'eutrophisation, et la production de biomasse algale pour la filière de biodiesel. Dans une telle perspective, les microalgues peuvent ainsi recouvrir le coût des nutriments pour la production de biomasse, la gestion des déchets de manière lucrative et la préservation des ressources en eau douce.

Dans l'ensemble, la production de biodiesel reposant sur des microalgues, restent toujours associées à des productions à petite échelle voire de laboratoire. En effet, il existe encore de nombreux incertitudes et défis à relever avant d'avoir des applications à grande échelle. Par ailleurs, il existe un vaste espace pour la recherche afin de répondre à des questions comme de savoir si les polluants contenus dans les eaux usées sont sans danger lors de l'utilisation des ressources de la biomasse algales.

10- Références bibliographiques

➢ ABDELAZIZ A. E. M., LEITE G. B. & HALLENBECK P. C., 2013. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels, *Environmental Technology*, 34 (14):1807 − 1836.

ABREU A. P., FERNANDES B., VICENTE A. A., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour. Technol.* 118: 61 – 66. <u>https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.055</u> ACIEN F. G., FERNANDEZ J. M., MAGAN J. J. & MOLINA E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.*, 30: 1344 – 53.

➢ ADAMAKIS I. D., LAZARIDIS P. A., TERZOPOULOU E., TOROFIAS S., VALARI M., KALAITZI P., ROUSONIKOLOS V., GKOUTZIKOSTAS D., ZOUBOULIS A., ZALIDIS G., 2018. Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25 : 23018 – 23032.

➤ ADEY W., KANGAS P. & MULBRY W., 2011. Algal turf scrubbing: cleaning surface waters with solar energy while producing a biofuel. *BioScience* 61: 434 – 441. <u>https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.6.5</u>

➢ ALABI A.O., TAMPIER M. & BIBEAU E., 2009. Microalgae technologies and processes for biofuels/bioenergy production in British Columbia. BC Innovation Council, Vancouver

ALLEN J. F., & MARTIN W., 2007. Evolutionary biology Out of thin air. *Nature*, 445, 610 – 612.

➢ ALVAIN S., MOULIN C., DANDONNEAU Y., & LOISEL H., 2008. Seasonal distribution and succession of dominant phytoplankton groups in the global ocean: A satellite view. *Global Biogeochemical Cycles* 22:GB3001.

ÁLVAREZ-DÍAZ P. D., RUIZ J., ARBIB Z., BARRAGÁN J., GARRIDO-PÉREZ
 M. C. & PERALES J. A., 2017. Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. *Algal Research*, 24: 477–485. doi:10.1016/j.algal.2017.02.006

➤ AMATO A., KOOISTRA W. H. C. F., GHIRON J. H. L., MANN D. G., PROSCHOLD T., & MONTRESOR M., 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193 – 207.

▶ ARCHIBALD J. M., 2009. The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol*, (19): 81 – 88.

➤ ARCHIBALD J., 2012. The evolution of algae by secondary and tertiary endosymbiosis. Advances in Botanical Research, 64: 87 – 118.

ARORA M. & SAHOO D., 2015. green algae. In D. Sahoo, J. BAWEJA SECKBACH (eds.), The Algae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 26, <u>https://DOI:10.1007/978-94-017-7321-8_4.</u>

ARUMUGAM M., AGARWAL A., ARYA M. C. & AHMED Z., 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresour*. *Technol.*, 131: 246 – 249. <u>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.159</u>

> BAILLEUL B., BERNE N., MURIK O., PETROUTSOS D., PRIHODA J., TANAKA A., VILLANOVA V., BLIGNY R., FLORI S., FALCONET D., KRIEGER-LISZKAY A., SANTABARBARA S., RAPPAPORT F., JOLIOT P., TIRICHINE L., FALKOWSKI P.

G., CARDOL P., BOWLER C. & FINAZZI G., 2015. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO2 assimilation in diatoms", *Nature*, DOI:10.1038/nature14599

▶ **BALDAUF S. L., 2008.** An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution*, 46 (3): 263 – 273.

BAWEJA P. & SAHOO D., 2015. Classification of Algae. *In* **D. SAHOO, J. BAWEJA SECKBACH (eds.)**, The Algae World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology 26, DOI 10.1007/978-94-017-7321-8_2

BECKER E.W., 1994. Microalgae biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 293 p.

BENVENUTI G., BOSMA R., LAMERS P., BARBOSA M. J. & WIJFFELS R. H., 2016. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. J. Appl. Phycol., 28, 3167 – 3177.

BRENNAN L. & OWENDE P., 2010. Biofuels from microalgae e a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.*, 14: 557 – 577.

➢ BRITZ J.T., VAN SCH ALWYK C. & HUNG Y.T., 2006. Treatment of dairy processing wastewaters. *In*: WANG L.K., HUNG Y.T., LO H.H., YAPIJAKIS C., editors. Waste treatment in the food processing industry. Boca Raton, FL, USA: *CRC Press.*, pp.1 − 25.

BOPP, L., MONFRAY P., AUMONT O., DUFRESNE J. L., TREUT H. L., MADEC G., TERRAY L., & ORR J. C., 2001. Potential impact of climate change on marine export production, *Global Biogeochem. Cycles*, 15(1):

BOROWITZKA M. A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, 313 – 321.

BOROWITZKA M.A., 2016. Systematics, Taxonomy and Species Names: Do They Matter? *In* **BOROWITZKA M. A., BEARDALL J. & RAVENET J. A.,** (eds.). The Physiology of Microalgae, Systematics and Taxonomy, Springer International Publishing Switzerland, Chap. I, 655 – 681. DOI: 10.1007/978-3-319-24945-2_24.

BUICK R., 2008. When did oxygenic photosynthesis evolve? Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 363: 2731 – 2743.

CADIER M., 2016. Diversité des communautés phytoplanctoniques en relation avec les facteurs environnementaux en mer d'Iroise : approche par la modélisation 3D Institut Universitaire européen de la Mer - Laboratoire des Sciences de l'environnement marin UMR 6539, Université de Bretagne occidentale, 367p.

CARVALHO F., PRAZERES A.R., RIVAS J., 2013. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci. Tot. Env.*, 445-446: 385 – 96.

CASTILLO T., RAMOS D., GARCÍA-BELTRAN T., BRITO-BAZAN M., & GALINDO E., 2021. Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce highvalue metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 176: 108183.

CERON-GARCIA M.C., SANCHEZ-MIRON A., FERNANDEZ-SEVILLA J.M., MOLINA-GRIMA E., GARCIA-CAMACHO F., 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition, *Process Biochem*. 40: 297 – 305.

CHARLSON R. J., LOVELOCK J. E., ANDREAE M. O., WARREN S. G., 1987.
Oceanic phytoplankton, atmospheric sulfur, cloud albedo and climate. *Nature*, 326: 655 – 661.

CHEN J., LENG L., YE C., LU Q., ADDY M., WANG J., LIU J., CHEN P., RUAN
 R. & ZHOU W. A., 2018. Comparative study between fungal pellet-and spore-assisted

microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. Bioresour. Technol., 259, 181–190
CHEN F., ZHANG Y. & GUO S., 1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnol. Lett.*, 18(5): 603 – 608.

CHINNASAMY S., BHATNAGAR A., HUNT R.W. & DAS K. C., 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. Bioresource Technology 101(9): 3097–3105. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.026

CHISHOLM S. W., 1992. Phytoplankton Size Primary Productivity and Biogeochemical Cycles" in the Sea. *Springer*, 296 p.

CHISHOLM, S. W., 2000. Oceanography: Stirring Times in the Southern Ocean. *Nature*, 407: 685 – 687.

> CHISHOLM S. W., OLSON R. J., ZETTLER E. R., GOERICKE R., WATERBURY

J. B. & WELSCHMEYER N. A., 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334 : 340 – 343.

> CHISTI Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294 – 306.

COLIC M., 2007. Special treatment: special treatment: the food manufacturing wastewater challenge. Clean Water Technology. https://www.manufacturing.net/article/2007/02/special-treatmentfood-manufacturing-wastewater-challenge. Accessed 3 Oct 2018

CORCORAN E., NELLEMAN C. & BAKER E., 2010. Sick water ? : the central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assessment. UNEP/UNHABITAT

COX, P. M., BETTS R. A., JONES C. D., SPALL S. A., & TOTTERDELL I. J., 2000. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model, *Nature*, 408.

CUELLAR-BERMUDEZ S. P., GARCIA-PEREZ J. S., RITTMANN B. E. & PARRA-SALDIVAR R., 2015. Photosynthetic bioenergy utilizing *CO*₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Journal of Cleaner Production*, 98: 53–65.

DAS A., SAHOO R.K., & SUBUDHI E., 2019. Algal Biofuel: Still Not a Common Man's Fuel? In SUKLA L. B. et al. (eds.), The Role of Microalgae in Wastewater Treatment, chapiter 4, 57 – 64. <u>https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2_4</u>

DE CLERCK O., BOGARET K., & LELIAERT F., 2012. Diversity and evolution of algae: Primary endosymbiosis. *Advances in Botanical Research.* 64: 55 – 86.

➢ DENG X., FEI X. & LI Y., 2011. The effects of Nutritional Restriction on Neutral Lipid Accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. African Journal of Microbiology Research 5(3): 260 − 270.

DIBLIKOVA L., CURDA L. & KINCL J., 2013. The effect of dry matter and salt addition on cheese whey demineralization. *Int. Dairy J.*, 31: 29 – 33.

DROGUI P., ASSELIN M. & BRAR S.K., 2008. Electrochemical removal of pollutants from agroindustry wastewaters. *Sep. Purif. Technol.* 61: 301 – 310. https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2007.10.013

DUGDALE R. C. & WILKERSON F. P., 1998. Silicate Regulation of New Production in the Equatorial Pacific Upwelling. *Nature*, 391: 270 – 273.

> DUFRESNES J. L., FRIEDLINGSTEIN P., BERTHELOT M., BOPP L., CIAIS P., FAIRHEAD L., LE TREUT H. & MONFRAY P., 2002. On the magnitude of positive feedback between future climate change and the carbon cycle. *Geophys. Res. Lett.*, 29(10), 1405, doi:10.1029/2001GL013777.

EGELAND E. S., 2016. Carotenoids. In BOROWITZKA M. A., BEARDALL J. & RAVENET J. A., (eds.). The Physiology of Microalgae, Secondary Metabolites, Springer International Publishing, Switzerland, Chap. III, 507 – 563. DOI: 10.1007/978-3-319-24945-2_20.

ENTWHISTLE T. J. & HUISMAN J. M., 1998. Algal systematics in Australia. Aust. Syst. Bot., 11: 203 – 214.

European Whey Processors Association. Economic report 2017/18. http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/Facts_and_Figures/EDA_ Economic_Report_2017.pdf. Accessed 14 Sept 2019.

FERNANDES B. D., MOTA A., TEIXEIRA J. A., VICENTE A. A., 2015. Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: approaches, applications and future trends. *Biotechnol. Adv.*, 33: 1228 – 1245.

FLOMBAUM P. & OTHERS., 2013. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110: 9824–9829. doi:10.1073/pnas.1307701110.

GARCIA J., MUJERIEGO R. & HERNANDEZ-MARINE M., 2000. High-rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. J. Appl. Phycol., 12: 331 – 339.

GERNIGON G., SCHUCK P., JEANTET R. & BURLING H., 2011. Encyclopedia of dairy sciences, 2nd edn. Elsevier, London

➢ GIORDANO M., NORICI A. & RATTI S., 2008. Role of sulfur for algae: acquisition, metabolism, ecology and evolution. *In*: HELL R., DAHL C., KNAFF D. & LEUSTEK T., (eds). Sulphur metabolism in phototrophic organisms. *Springer*, Dordrecht, pp 397 − 415.

➢ GIMPEL J. A., HENRÍQUEZ V. & MAYFIELD S. P., 2015. Metabolic Engineering of Eukaryotic Microalgae: Potential and Challenges Come with Great Diversity. *Front Microbiol.*, 6 : 13 − 76. <u>http://dx.doi10.3389/fmicb.2015.01376</u>

➢ GHIRARDI M.L., ZHANG L., LEE J.W., 2000. Microalgae: a green source of renewable H₂, *Trends Biotechnol.*, 18(12): 506 – 511.

GOUVEIA L. & OLIVEIRA C., 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269 – 274.

➢ GRIMI N., DUBOIS A., MARCHAL L., JUBEAU S., LEBOVKA N. I. & VOROBIEV E., 2014. Selective extraction from microalgae Nannochloropsis sp. using different methods of cell disruption. Bioresource Technology, 153: 254 − 259.

GUIDI L., & OTHERS., 2016. Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature*, 532: 465 – 470. doi:10.1038/nature16942.

➢ GUIRY M. D., 2012. How many species of algae are there? J. Phycol., 48: 1057 − 1063. http://dx.doi10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x.

GUIRY M.D. & GUIRY G. M., 2015. Algae Base. World-wide electronic publication. National University of Ireland. <u>http://www.algaebase.org</u>.

▶ HEMPEL N., PETRICK I. & BEHRENDT F., 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. J. Appl. Phycol., 24: 1407 – 1418.

> HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant J.*, 54 : 621 - 639.

➢ HO S.-H., CHEN W.-M. & CHANG J.-S., 2010. Scenedesmus obliquus CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. Bioresour. Technol. 101, 8725 – 8730.

➢ HO S-H., YE X., HASUNUMA T., CHANG J-S. & KONDO A., 2014. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae—a critical review. *Biotechnol. Adv.*, 32: 1448 − 1459.

 HO T. Y., QUIGG A., FINKEL Z. V., MILLIGAN A. J., WYMAN K., FALKOWSKI
 P. G., MOREL F. M. M., 2003. The elemental composition of some marine phytoplankton. J Phycol., 39: 1145 – 1159.

HEIMANN K. & HUERLIMANN R., 2015. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. *In* Handbook of Marine Microalgae (3): 25 -41. <u>http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00003-0</u>.

JOHNSON T. J., KATUWAL S., ANDERSON G. A., GU L., ZHOU R., GIBBONS
 W. R., 2018. Photobioreactor cultivation strategies for microalgae and cyanobacteria.
 Biotechnol. Prog., 34 (4): 811 – 27.

JOHNSON Z. I. & LIN Y., 2009. Prochlorococcus: Approved for export. PNAS. 106 (26): 10400 – 10401; <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0905187106</u>

➢ JUNEJA A, CEBALLOS R. & MURTHY G., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. Energies, 6(9): 4607 − 38. https://doi.org/10.3390/en6094607

➢ KALRA R., GAUR S. & GOEL M., 2020. Microalgae bioremediation: A perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production. Journal of Water Process Engineering, <u>https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101794</u>.

KEELING P. J., 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 365:729 – 748.

KHAN S., RASHMI M. H., PRASAD S. & BANERJEE U., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13(9): 2361 – 2372.

▶ **KIM S., PARK J., CHO Y-B. & HWANG S-J., 2013**. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour. Technol.*, 144: 8 – 13.

LAM M. K. & LEE K. T., 2012. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol. Adv.*, 30: 673 – 690.

LANG X., DALAI A. K., BAKHSHI N. N., REANEY M. J. & HERTZ P. B., 2001.
Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour. Technol.*, 80:
53 – 62.

LANGE P.K., WERDELL P. J., ERICKSON Z. K., DALL'OLMO R., BREWIN R.
 J. W., ZUBKOV M. V., TARRAN G. A., BOUMAN H. A., SLADE W. H., CRAIG S. E.,
 POULTON N. J., BRACHER A., LOMAS M. W. & CETINIĆ I., 2020. Radiometric

approach for the detection of picophytoplankton assemblages across oceanic fronts. *Optics Express*, 28(18): 25682 – 25705.

LEE J., YOO C., JUN S., AHN C. & OH H., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.*, 101(1): 575 – 577.

▶ LEE Y.K., 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.*, 13(4): 307 – 315.

➢ LE QUÉRÉ C., PRENTICE I. C. & RIVKIN R. B., 2006. Modeling interactions between marine ecosystems and climate. *Eos. Trans. AGU*, 87(42): 452 doi:10.1029/2006EO420005.

➢ LE QUÉRÉ, C., & OTHERS., 2005. Ecosystem dynamics based on plankton functional types for global ocean biogeochemistry models. *Glob. Chang. Biol.*, 11: 2016 − 2040. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.1004.x.

LÉVY M. & BOPP L., 2007. Turbulences dans l'océan. *La recherche*, 414 : 36 – 38.

LI Y., HORSMAN M., WANG B., WU N. & LAN C. Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 629–636.

LIU X-Y. & HONG Y., 2021. Microalgae-Based Wastewater Treatment and Recovery with Biomass and Value-Added Products: a Brief Review. Springer Nature, Switzerland AG 2021

➢ LONGHURST A., 2007. Ecological Geography of the Sea, 2nd ed., Academic Press, San Diego, Calif.

MEHER L. C., VIDYA-SAGAR D. & NAIK S. N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. *Renew. Sustain. Energ. Rev.*, 10: 248 – 268.

➢ MARCHADIER P., 1985. L'eau et le lait : économie, prévention et dépollution. *Revue de l'Agence de bassin Adour Garonne*. 30 : 17 − 20.

➤ MARKOU G., VANDAMME D. & MUYLAERT K., 2014. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Res.*, 65: 186 – 202. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025.

➢ MARTINI F. A., RUBERT A., DE SOUZA M. P., KIST L. T., HOELTZ M., BENITEZ L. B., RIZZETTI T. M., GRESSLER P.D., SCHNEIDER R., 2019. Periphytic biomass composition and exploitation from algae turf scrubber system. SN Appl. Sci. 1, 765. https://doi.org/10.1007/s42452-019-0802-z.

➤ MATA T. M., MARTINS A. A. & CAETANO N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14: 217 – 32. <u>https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020</u>.

➤ MASSANA R. & PEDROS-ALIO C., 2008. Unveiling new microbial eukaryotes in the surface ocean. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 213 – 218.

MASSANA R., 2009. Protists, Picoeukaryotes. *Elsevier*, 674 – 688.

➤ MATA T. M. & MARTINS A. A., 2010. Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14: 217 – 32. <u>https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020</u> MATAMOROS V., GUTIERREZ R., FERRER I., GARCIA J. & BAYONA J. M., 2015. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: a pilot-scale study. J. Hazard. Mater., 288: 34 – 42.

MITTELBACH M., 1996. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel. *Bioresour. Technol.*, 56(1): 7 – 11.

> MOHAMMAD MIRZAIE M. A., KALBASI M., MOUSAVI S.M. & GHOBADIAN

B., 2016. Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 46: 150 – 6.

MOLINA G.E., BELARBI E.H., ACIEN FERNANDEZ F.G, ROBLES MEDINA A. & CHRISTI Y., 2003. Recovery of Microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances* 20: 491 – 515.

➢ MOLINA G. E., GARCIA CAMACHO F., SANCHEZ PEREZ J.A., FERNANDEZ SEVILLA J.M., ANCIEN FERNANDEZ F.G. & CONTRERAS GOMEZ A., 2004. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 61(2): 167–173.

▶ **MOPPER K., KIEBER D. J., 2002.** Photochemistry and the Cycling of Carbon, Sulfur, Nitrogen and Phosphorus. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, 9 : 455 – 507.

➢ MOROWVAT M.H. & GHASEMI Y., 2019. Maximizing biomass and lipid production in heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*: techno-economic assessment. *Recent Pat Food*, *Nutr. Agric.*, 10: 115 − 123.

MORALES-SANCHEZ D., TINOCO-VALENCIA R., KYNDT J., & MARTINEZ A., 2013. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source, *Biotechnol. Biofuels.*, 6(1): 100. <u>https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-100</u>

MUTANDA T., RAMESH D., KARTHIKEYAN S., KUMARI S., ANANDRAJ A. & BUX F., 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 102: 57–70

➢ NAGARAJAN D., LEE D. J., CHEN C. Y., CHANG J. S., 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: a circular bioeconomy perspective. *Bioresour. Technol.*, 302:122817. <u>https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122817</u>.

NARALA R. R., GARG S., SHARMA K. K., THOMAS-HALL S. R., DEME M. & LI Y. & <u>SCHENK</u> P. M., 2016. Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Front. Energy Res.*, 4: 29

NORTON T. A., MELKONIAN M. & ANDERSEN R. A., 1996. Algal biodiversity. Phycologia 35 308–326. http://dx.doi10.2216/i0031-8884-35-4-308.1

➢ NOT F., VALENTIN K., ROMARI K., LOVEJOY C., MASSANA R., TÖBE K., 2007. Picobiliphytes: A marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. *Science*, 315: 252 − 254.

➢ NOT F., SIANO R., KOOISTRA W., SIMON N., VAULOT D., PROBERT I., 2012. Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton. *Advances in Botanical Research*. *Elsevier*, 1 − 53.

➢ NIGAM P.S., SINGH A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress in Energy and Combustion Science, 37: 52 − 68. ➢ OBEID F., CHU VAN T., BROWN R. & RAINEY T., 2019. Nitrogen and sulphur in algal biocrude: a review of the HTL process, upgrading, engine performance and emissions. Energ Convers Manage, 181: 105 – 19. <u>https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.11.054</u>.

➢ OLAIZOLA M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering 20: 459 − 466.

OLGUIN E. J., 2003. Phyco-remediation: key issues for cost-effective. *Biotechnol. Adv.*, 22: 81 – 91.

> PARK J. Y., PARK M. S., LEE Y. C. & YANG J. W., 2015. Review Advances in Direct Transesterification of Algal Oils from Wet Biomass, *Bioresource Technology*, 184: 267 – 275.

PANDEYA., LARROCHE C., DUSSAP C. G., GNANSOUNOU E., KHANAL S.K.,
 & RICKE S., 2012. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition), *Elsevier*, pp: 629 – 659.

> **PIASECKA A., NAWROCKA A., WIACEK D. & KRZEMINSKA I., 2020.** Agroindustrial by-product in photoheterotrophic and mixotrophic culture of *Tetradesmus obliquus*: production of ω 3 and ω 6 essential fatty acids with biotechnological importance. *Sci. Rep.*, 10: 6411, <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-63184-4</u>.

> PIENKOS P. T. & DARZINS A., 2009. The promise and challenges of microalgalderived biofuels. *Biofuels*, *Bioprod. Bioref.*, 3: 431 – 440. DOI: 10.1002/bbb

▶ **PRAZERES A.R., CARVALHO F., RIVAS J., 2012.** Cheese whey management: a review. *J. Envir. Man.*, 110: 48 – 68.

> PRUVOST J., 2019. Cultivation of algae in photobioreactors for biodiesel production.

PRUPPACHER H. R. et KLETT J. D., 1997. Microphysics of clouds and precipitation, *Dodrecht, Springer, 2^e éds.*, 954 p.

➢ PIGANEAU G., EYRE-WALKER A., GRIMSLEY N., & MOREAU H., 2011. How and Why DNA barcodes underestimate the diversity of microbial eukaryotes. *PLoS ONE*, 6: 316 − 342.

▶ PULZ O., SCHEIBENBOGEN K., & GROß W., 2001. Biotechnology with cyanobacteria and microalgae, *In*: REHM H. J. & REED G. (Eds.), *Biotechnology Set, second* ed., *Wiley-VCH Verlag GmbH*, *Weinheim, Germany, pp*: 105 – 136.

➢ RAJANEESH K.M., NAIK R.K., ROY R. & D'COSTA P. M., 2020. Cyanobacteria in tropical and subtropical marine environments: bloom formation and ecological role. *Advances in Cyanobacterial Biology*, 3: 35 − 46.

RAVANIPOUR M., HAMIDI A. & MAHVI A.H., 2021. Microalgae biodiesel: A systematic review in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 150 (2021) 111-426

RAVEN J. A., 1998. The twelfth Tansley lecture. Small is beautiful: The picophytoplankton. *Funct. Ecol.*, 12: 503 – 513. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00233.x.

RODOLFI L., ZITTELLI G.C., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N. & BONINI G., 2008. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102 (1): 100 – 112.

RICHMOND A., 2008. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley & Sons, 592 p.

RUSSELL M. J., & HALL A. J., 2006. The onset and early evolution of life. *In* KESLER
 S. E., & OHMOTO H., (EDS.), Evolution of early earth's atmosphere, hydrosphere and

biosphered Constraintsfrom or depositis. Boulder, Colorado: Geological Society of America, pp. 1 - 32.

➢ RYU K. H., KIM B. & LEE J. H., 2019. A model-based optimization of microalgal cultivation strategies for lipid production under photoautotrophic condition. *Comput. Chem.* Eng., 121: 57 − 66.

SALAMA E.-S., KURADE M. B., ABOU-SHANAB R. A., EL-DALATONY M. M., YANG I.-S., MIN B. & JEON B.-H., 2017. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79: 1189 – 1211.

SARMIENTO J. L., SLATER R., BARBER R., BOPP L., DONEY S.C., HIRTS A. C., KLEYPAS J. & STOUFFER R., 2004. Response of ocean ecosystems to climate warming, *Global Biogeochem. Cycles*, 18, GB3003, <u>https://doi:10.1029/2003GB002134</u>

SCANLAN D. J., & OTHERS., 2009. Ecological genomics of marine Picocyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73: 249 – 299. <u>https://doi:10.1128/MMBR.00035-08</u>

SEXTON J. P. & LOMAS M. W., 2018. Microalgal Systematics. *In* Microalgae in Health and Disease Prevention, 4: 73 – 107. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00004-9</u>

SHARMA K.K., SCHUHMANN H. & SCHENK P., 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*, 5: 1532 – 1553. <u>https://doi:10.3390/en5051532</u>

SHAO W., EBAID R., ABOMOHRA A. & SHAHEN M., 2018. Enhancement of Spirulina biomass production and cadmium biosorption using combined static magnetic field. *Bioresour. Technol.*, 6 (265): 163 – 169.

SIVILLE B., BOEING W. J., 2020. Optimization of algal turf scrubber (ATS) technology through targeted harvest rate. *Bioresour. Technol. Rep.* 9: 100 – 360. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100360.

SISO M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour*. *Technol.*, 57: 1 – 11. <u>https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3</u>

SINGH M., SHUKLA R. & DAS K. C., 2013. Harvesting of Microalgal Biomass. *In* **BUX F., 2013.** Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products. Taylor and Francis Group Editors Chap. 6: 77 - 87.

SINGH R. N., SHARMA S., 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production–A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 16: 2347 – 53.

SIMON N., CRAS A.-L., FOULON E., & LEMEE R., 2009. Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes rendus de l'académie des sciences biologies*, 332 : 159 – 170.

SMITH J.K., HUGHES A.D., MCEVOY L., DAY J.G., 2020. Tailoring of the biochemical profiles of microalgae by employing mixotrophic cultivation, *Bioresour. Technol. Rep.* 9 (2020), 100321, <u>https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100321</u>.

STANSELL G. R., GRAY V. M., SYM S. D., 2012. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *J. Appl. Phycol.*, 24: 791 – 801.

STUKEL M. R., DÉCIMA M., SELPH K. E., TANIGUCHI D. A. A., & LANDRY M.
 R., 2013. The role of *Synechococcus* in vertical flux in the Costa Rica upwelling dome. *Prog. Oceanogr.*, 113: 49–59. doi:10.1016/j.pocean.2013.04.003.

SPOLAORE P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN E. & ISAMBERT A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101 (2): 87 – 96.

SU Y. 2021. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. Sci Total Environ.,762. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590</u>.

SUH I.S. & LEE C-G., 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnol Bioproc. Eng.*, 8: 313.

SUNG M.-G., LEE B., KIM C. W., NAM K. & CHANG Y. K., 2017. Enhancement of lipid productivity by adopting multi-stage continuous cultivation strategy in Nannochloropsis gaditana. Bioresour. Technol. 229, 20–25

SULEIMAN A. K. A., LOURENÇO K. S., CLARK C., LUZ R. L., DA SILVA G. H. R. & VET L. E. M., 2020. From toilet to agriculture: fertilization with microalgal biomass from wastewater impacts the soil and rhizo-sphere active microbiomes, greenhouse gas emissions and plant growth. *Resour. Conserv. Recycl.*, 161. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.104924

TABATABAEI M., TOHIDFAR M., JOUZANI G. S., SAFARNEJAD M. & PAZOUKI M., 2011. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: future of bioenergy in Iran. *Renew. Sustain. Energy. Rev.*, 15: 1918 – 1927.

TAKAHASHI H., KOPRIVA S., GIORDANO M., SAITO K. & HELL R., 2011. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 62: 157 – 184.

TAYLOR R., & FLETCHER R. L., 1998. Cryopreservation of eukaryotic algae—A review of methodologies. J. Appl. Phycol., 10: 481–501.

TIKHOMIROVA T. S., TARASKEVICH M. S. & PONOMARENKO O. V., 2018. The role of laboratory-scale bioreactors at the semi-continuous and continuous microbiological and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102: 7293 – 7308.

TOMITANI A., 2006. Origin and early evolution of chloroplasts. *Paleontological Research*, 10(4):283 – 297. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.2517/prpsj.10.283</u>

TOMASELLI L., 2004. The microalgal cell, in: A. Richmond (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. *Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK*, pp: 1 – 19.

➤ UGWU C. U., AOYAGI H. et UCHIYAMA H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. Bioresource and Technology, Vol. 99: 4021 – 4028.

➢ VENTURA J.-R. S., YANG B., LEE Y.-W., LEE K. & JAHNG D., 2013. Life cycle analyses of CO₂, energy, and cost for four different routes of microalgal bioenergy conversion. *Bioresource technology*, 137: 302–310.

WEBER T., and DEUTSCH C., 2010. Ocean nutrient ratios governed by plankton biogeography. Nature 467: 550–554. doi:10.1038/nature09403.

WENGUANG Z., MIN P.C., MIN X., MA J., WANG R., GRIFFITH F., HUSSAIN P., PENG Q., XIE Y., LI J., SHI J., MENG R. R., 2014. *Renew Sustain Energy Rev.*, 36: 256 – 269.

➢ WHITTON R., OMETTO F., PIDOU M., JARVIS P. VILLA R., 2015. Jefferson B. Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment. Environ *Technol. Rev.*, 4(1): 133 – 48. https://doi.org/10.1080/ 21622515.2015.1105308.

WILEY P. E., BRENNEMAN K. J., JACOBSON A. E., 2009. Improved algal harvesting using suspended air flotation. *Water Environ. Res.*, 81: 702 – 708.

XU H., MIAO X. & WU Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella photothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.*, 126: 499 – 507.

➢ YADAVALLI R., RAO C.S., RAO R.S. & POTUMARTHI R., 2014. Dairy effluent treatment and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* and *Euglena gracilis*: study on open and closed systems. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 9: 368 – 373. <u>https://doi.org/10.1002/apj.1805</u>

➤ YANG C., HUA Q. & SHIMIZU K., 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.*, 6: 87 – 102.

➤ YEH K.-L. & CHANG J.-S., 2012. Effects of cultivations conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Bioresour. Technol.*, 105: 120 – 127. https://doi.org/10.1016/j. biortech.2011.11.103.

ZHAN J., RONG J. & WANG Q., 2017. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect, *Int. J. Hydrog. Energy.*, 42 (12): 8505 – 8517.

ZHU L., 2015. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. Biofuels, Bioprod. Biorefining., 9: 801 – 814.

ZINGONE A., FORLANI G., PERCOPO I., & MONTRESOR M., 2011. Morphological characterization of *Phaeocystis antarctica* (Prymnesiophyceae). *Phycologia*, 50 (6): 650 – 660.

Chapitre II

Chapitre II : Culture de *Chlorella vulgaris* en utilisant les eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage.

Contexte

L'intérêt pour les microalgues s'est accru ces dernières années en raison de leur capacité à produire une gamme étendue de composés présentant un intérêt industriel. Ainsi, dans des conditions spécifiques et idéales, elles sont capables d'accumuler une forte proportion de lipides (jusqu'à 70% pour certaines espèces). Cependant, pour la majorité des produits (à l'exception des produits de grande valeur) le coût de la culture, de la récolte et de séparation des molécules d'intérêts, restent très élevés en diminuant l'intérêt économique d'une production industrielle.

Les microalgues ont de nombreuses applications comme la bioremédiation des eaux usées qui pourraient avoir un effet positif sur la durabilité de l'environnement et aussi pour la production de biodiesel. Parmi les critères importants requis pour que les microalgues soient des producteurs potentiels de biodiesel figurent la productivité des lipides, leur composition et la productivité de la biomasse. Ainsi, une densité cellulaire élevée et une bonne productivité de la biomasse sont nécessaires pour maximiser la production de produits, minimiser l'espace de culture et réduire le coût du traitement en aval.

A cet égard, de nombreux chercheurs tentent de trouver d'autres solutions qui proposeraient à produire des microalgues à moindre coût, comme changer les procédés et/ou trouver d'autres supports de culture.

Une solution apportée dans ce travail sera l'utilisation des eaux usées salines (SWW), une eau résiduaire concentrée en sels de l'industrie fromagère qui n'est actuellement pas recyclée. Ce produit est issu de nombreuses technologies (l'électrodialyse, la filtration ou l'échange d'ions) qui ont pour objectif de désaliniser le lactosérum du fromage pour être utilisé dans l'alimentation, ceci a pour conséquence la production de déchet liquide, appelé eaux usées salines (SWW), contenant une grande concentration de sels. Ainsi, les SWW représentent un déchet de l'industrie laitière qui peut être obtenu gratuitement alors que leur élimination conformément à la réglementation entraînera des coûts importants. Par ailleurs, avec une composition en sels qui semble convenir à la production de microalgues, une productivité élevée à l'intérieur des SWW pourrait être une solution économique durable pour la production d'huiles végétales à faible coût pour le marché du biodiesel tout en ayant un impact environnemental positif par le recyclage de ce déchet.

Dans ce chapitre, *Chlorella vulgaris* a été examinée pour sa capacité à se développer dans les eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum des fromageries industrielles utilisées comme base de milieu de culture, dans des conditions autotrophes,

mixotrophes et hétérotrophes. Tout l'intérêt sera de mieux comprendre comment utiliser le milieu SWW mais aussi d'évaluer le comportement d'une microalgue d'ordinaire d'eau douce sur des eaux résiduaires très chargées en sels, une salinité de (8 - 10% p/v). Les résultats ont été évalués par comparaison avec des cultures dans des milieux nutritifs conventionnels et modifiés.

Mots-clés : Traitement des eaux usées, SWW, organisme model, biomasse, productivité, plan d'expérience, méthode de surface de réponse, coefficient de transfert d'oxygène (K_La), HPLC, culture en batch, fed-batch.

Chapitre II.

Partie 1: Culture autotrophe et mixotrophe de *Chlorella vulgaris* dans les eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage.

^{1.} Djillali Ghobrini, Zuzana Jezkova, Saliha Yakoub-Bougdal and Tomáš Brányik.

1. Autotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using saline waste water from the demineralization of cheese whey.

Biotechnologie Agronomie, Société et Environnement (soumis)

Résumé

La biotechnologie des microalgues a acquis une importance considérable au cours des dernières décennies. Les applications vont de la simple production de biomasse pour l'alimentation humaine et animale à des produits de haute valeur ajoutée voir des applications dans le domaine de l'environnement. Cependant, les applications pratiques des microalgues ont été limitées par les coûts élevés associés aux nutriments, aux systèmes de culture et à la récolte des cellules d'algues après culture. La culture de microalgues pour les biocarburants et le traitement des eaux usées a été largement étudiée pour surmonter ces limitations.

La présente étude s'est concentrée sur la production économique de la biomasse microalgale sur des effluents laitiers provenant de la déminéralisation du lactosérum de l'industrie fromagère (SWW) qui peuvent être obtenus sans frais excepté leur transport. A cet effet, *Chlorella vulgaris* (CCALA 256) a été examinée, d'une part, pour sa capacité à se développer, en culture photoautotrophe dans des photobioréacteurs colonne à bulle, sur les eaux usées salines (SWW) non dilués et dilués par le milieu de base (BM) à des ratios (BM:SWW) (2:1) et (1:2). De l'autre, pour son développement en culture mixotrophe dans un photobioréacteur colonne à bulle : *i*) sur SWW prétraité par *L. helveticus* (PLSWW) et *ii*) sur SWW en coculture avec une bactérie lactique (*C. vulgaris – L. helveticus*) (SWW–L). Pour les deux modes de culture, les résultats ont été évalués en comparaison avec les cultures sur le milieu de base BG11 (BM).

Les expériences ont montré que la productivité volumétrique de divers traitements de dilution était remarquablement supérieure à celle des témoins ($P_{(2:1)} = 0,665 \pm 0,111$, $P_{(1:2)} = 0,578 \pm 0,007$, $P_{(sww)} = 0,562 \pm 0,011$ et $P_{(BM)} = 0,519 \pm 0,003$ g/ L. jours). A cet égard, SWW peut être considéré comme un milieu alternatif pour la culture photoautotrophe de *C. vulgaris*. Par ailleurs, s'agissant de culture sous influence de bactéries lactiques, la culture sur le milieu

(PLSWW) a montré une réactivité des réponses très courtes en culture. En outre, la culture sur le milieu (SWW–L) a démontré que le consortium *Chlorella vulgaris – Lactobacillus helveticus* pouvait améliorer le taux de croissance spécifique et les productivités volumétriques grâce à l'échange de carbone organique. De plus, l'analyse des résultats de la croissance a révélé une relation symbiotique entre microalgue – bactérie lactique en condition mixotrophe.

Mots-clés : Eaux usées salines, *Chlorella vulgaris*, dilution, prétraitement, coculture microalgues – bactéries lactiques, biomasse, productivité, photobioréacteur.

Abréviation

CGF : Facteur de croissance DCW : Poids sec des cellules MBM : Milieu de base modifié (variant du BG 11) PLSWW : Milieu d'eau usées saline prétraité par *Lactobacillus helveticus* PSWW : Eaux usées salines prétraité DPSWW : Eaux usées salines prétraité et dilué P_{max} : Productivité volumétrique maximale de la biomasse SWW : Les eaux usées salines SWW - L : Milieu de coculture (microalgue – bactérie lactique) μ_{max} : Taux de croissance spécifique X_{max} : Concentration maximale en biomasse

1- Rappel sur le modèle biologique de Chlorella vulgaris

1.1- Définition et caractéristiques

C. vulgaris Beyerinck est une microalgue verte décrite en 1890 par le microbiologiste néerlandais Martinus Willem Beijerinck à partir de la première culture pure d'une microalgue eucaryote. Elle est largement distribuée dans les environnements d'eau douce, marins et terrestre et possède une capacité photosynthétique élevée avec une aptitude à croitre rapidement si les conditions sont optimales dans des systèmes autotrophes, mixotrophes et hétérotrophes (TOMASELLI, 2004). Toutes ses caractéristiques en ont fait l'une des premières microalgues envisagées pour des cultures à grande échelle à des fins commerciales (BOROWITZKA, 2018).

C. vulgaris a un diamètre de 2 à 10 μ m, une forme sphérique, subsphérique ou ellipsoïde et sans flagelles (CHAMPENOIS et *al.*, 2015; GARCIA, 2012). Elle apparaît sous forme de cellules individuelles, mais parfois, elle est capable de former des colonies jusqu'à 64 cellules maximum (RU et *al.*, 2020). Elle possède un seul chloroplaste en forme de coupe avec ou sans la présence de pyrénoïde (stockant les grains d'amidon) et possède de nombreux éléments structuraux similaires aux plantes (YAMAMOTO et *al.*, 2005). Par ailleurs, elle capte le CO_2 de l'atmosphère avec une efficacité 10 à 50 fois supérieure à celle des plantes terrestres (LI et *al.*, 2008).

En tant que microalgue non mobile, *C. vulgaris* se reproduit par voie asexuée (production d'autospores) (SAFI et *al.*, 2014), par division de la cellule-mère en 2 à 32 autospores ou cellules filles. La paroi cellulaire mère éclate lors de la maturation des autospores et les débris de la cellule-mère deviennent de la nourriture pour les cellules filles dans le processus connu sous le nom d'autosporulation (YAMAMOTO et *al.*, 2014) (fig.32).



Figure 32 : Processus d'autosporulation chez Chlorella vulgaris

1.2- Classification

Les microalgues sont un groupe diversifié d'organismes autotrophes unicellulaires qui sont principalement photosynthétiques. *Chlorella vulgaris* est l'une des microalgues eucaryotes verte les plus remarquables. Selon les classifications les plus récentes, cette espèce se rattache au domaine : Eukaryota, règne : Protista, sous règne : Viridiplantae, division : Chlorophyta, sous-division : Chlorophytina, classe : Trebouxiophyceae, ordre : Chlorellale, famille : Chlorellaceae, Genre : *Chlorella*, Espèce : *Chlorella vulgaris* (Beijerinck et *al.*, 1980) (CAVALIER-SMITH, 2008 et 2010).

1.3- Composants biochimiques de C. vulgaris

Les microalgues sont principalement constituées de protéines, de lipides, de glucides, de pigments, de minéraux et de vitamines (MARUYAMA et *al.*, 1997; SAFI et *al.*, 2014; SPOLAORE et *al.*, 2006). Ces composants peuvent être classés en métabolites primaire et secondaire. Les métabolites primaires sont généralement essentiels à la croissance et aux principaux processus métaboliques, tels que la photosynthèse et la respiration, tandis que les métabolites secondaires sont des molécules dérivées des métabolites primaires lorsque les organismes sont exposés à certains stimuli environnementaux indésirables (GUEDES et *al.*, 2011). La composition varie selon, les espèces et les environnements de culture telles que l'intensité lumineuse, la température, le pH, la salinité et les nutriments (SHARMA et *al.*, 2012; VITOVA et *al.*, 2015).

1.4- Applications de C. vulgaris

L'immense champ d'application de *Chlorella vulgaris* a été révélé dans de nombreuses études. Le tableau V résume les différentes applications des composants biochimiques dérivés de *C. vulgaris*.

Tableau	V :	Applications	des	métabolites	dérivés	de	Chlorella	vulgaris	d'après	RU	et	al.
(2020).												

Catégorie	Composants	Application	Références
Lipides	Triglycérides,	Biodiesel, alimentation	YEH & CHANG, 2011; MALIWAT et
	phospholipides,	animale, antibiotiques	al., 2016; AHMAD et al., 2018.
	glycolipides,		
Protéines	Acides aminés	Complément alimentaire,	LIU & CHEN, 2014; SHAABAN,
		alimentation animale, produits	2001; FAHEED & ABDEL FATTAH,
		pharmaceutiques, bio-engrais,	2008; GOUVÉIA et <i>al.</i> , 2006.
		aliments additifs, émulsifiant	
Glucides	Amidon, cellulose,	Additifs alimentaires,	LORDON et al., 2011 ; SPOLAORE
	les β-1-3-glucanes,	pharmaceutiques, aliments	et <i>al.,</i> 2006 ; TABARSA et <i>al.,</i>
	polysaccharides sulfonés	pour l'aquaculture	2015 ; MOHAMMED, 2008
Pigments	β-carotène, astaxanthine,	Produits pharmaceutiques,	CHACON-LEE & GONZALEZ-
	cantaxanthine, lutéine,	nutraceutiques, alimentaires	MARIÑO, 2010 ; CHA et <i>al.</i> , 2010 ;
	chlorophylle	suppléments, teinture et	GUPTA et <i>al.,</i> 2007
		peinture, cosmétiques, aliments	
		pour l'aquaculture	
Vitamines et	Microéléments,	Antioxydants, aides au	MARUYAMA et al., 1997; YUSOF et
minéraux	macroéléments,	métabolisme	al., 2011
	vitamines A, B, C, E		

....

1 . . .

1.4.1- Production de biocarburant

• . •

C. vulgaris peut stocker de précieuses quantités de lipides, en particulier certains profils d'acides gras appropriés pour produire du biodiesel (CONVERTI et al., 2009; ZHENG et al., 2011). Selon KNOTHE (2008) et HU et al. (2008), les deux principaux acides gras présents dans le biodiesel dérivé de microalgues sont des composés en C16 et C18 contenant de l'acide palmitique (C16:0), de l'acide stéarique (C18:0), de l'acide oléique (C18:1) et des acides linoléniques (C18 : 2). Le tableau VI montre le profil des acides gras de C. vulgaris, présentant une teneur en lipides \geq 40 % lorsque les cultures cellulaires étaient cultivées sous des conditions de croissance défavorables. • 1

Tableau VI : Variation du profil en acides gras chez Chlorella vulgaris sous des	conditions de
culture défavorables d'après RU et al. (2020).	

1

11

(%) en acides gras	C. vulgaris [a]	C. vulgaris ^[b]	C. vulgaris ^[c]
Acide palmitique (C16:0)	13.9	13.09	2.16
Acide palmitoléique (C16:1)	5.7	0.57	0.28
Acide stéarique (C18:0)	3.1	3.03	1.96
Acide oléique (C18:1n9c)	2.2	11.29	0.48
Acide linoléique (C18:2n6c)	25.3	9.36	3.31
Acide linolénique (C18:3n3)	24.2	3.08	0.97

C* 1

^[a]: % de la teneur en acides gras (MARUYAMA et *al.*, 1997)

^[b]: Teneur en acides gras (% poids/poids sec de biomasse) en milieu de base, mixotrophe (YEH & CHANG, 2012) ^[c]: Teneur en acides gras (% poids/poids sec de la biomasse) dans le milieu de base, photohétérotrophe (YEH & CHANG, 2012).

2-Introduction

Les algues vertes unicellulaires sont un groupe de microorganismes capables de photosynthèse. La photosynthèse est un processus dans lequel le dioxyde de carbone (la forme de carbone la plus oxydée) est réduit en substances organiques de complexité variable par une suite séquentielle de réactions. Les produits de la photosynthèse les plus intéressants et les plus attractifs du point de vue biotechnologique sont les polysaccharides, les acides gras insaturés, les phytohormones, les vitamines et les pigments (BRANYIKOVA et *al.*, 2011).

De nos jours, les microalgues sont considérées comme une ressource énergétique durable et prometteuse, en raison de leur capacité à accumuler de grandes quantités de lipides adaptés à la production de biodiesel qui présente les même caractéristiques qu'un carburant pétrolier (CHISTI, 2007; KLASS, 2004). Toutefois et à l'heure actuelle les productions biotechnologiques utilisant des organismes photosynthétiques sont encore loin d'être rentables et font face à plusieurs défis technologiques majeurs tels que les faibles rendements, les coûts élevés de production, sans ignorer le processus de récolte, un défi majeur dans la transformation en aval des microalgues (WEN et *al.*, 2011). En effet, pour la plupart des produits (hors produits à haute valeur ajoutée) le coût de la culture phototrophe et la séparation des molécules d'intérêts à partir de microalgues restent trop élevés pour assurer la rentabilité des procédés (ABREU et *al.*, 2012).

Dans cette partie de travail, l'algue d'eau douce unicellulaire *Chlorella vulgaris* sera évaluée pour sa capacité à croître dans des eaux industrielles résiduaires. *Chlorella vulgaris* est une microalgue riche en chlorophylle et en facteur de croissance (CGF) tel que les protéines, glucides, vitamines, minéraux, acides gras insaturés et fibres. En outre, elle présente des effets détoxifiants importants sur le corps humain, une capacité à nettoyer le tube digestif et à améliorer la fonction intestinale, elle permet aussi, de réduire les taux de cholestérol sanguin et hépatique et de stimuler le système immunitaire (RU et *al.*, 2020). Son avantage par rapport aux autres algues est principalement le taux de croissance élevé et leur facilité de culture (FENG et *al.*, 2014).

Le processus intensif de culture de microalgues est généralement très exigeant sur le plan économique. Une manière de réduire le coût de culture de ces microorganismes consiste à utiliser des milieux alternatifs, de préférence certains déchets liquides de l'industrie alimentaire (MONFET & UNC, 2017; STEPHENS et *al.*, 2010; MENETREZ, 2012). Un des déchets générés par l'industrie laitière dans la production de fromage est le lactosérum. Aujourd'hui, le lactosérum est utilisé comme aliment ou comme compléments alimentaires. En raison de sa faible teneur en protéines et des fortes quantités de sels qu'il contient, le produit brut, ne peut être utilisé dans l'industrie alimentaire (HUMHAL et *al.*, 2017). En utilisant certaines techniques membranaires (osmose inverse, électrodialyse, etc.), un certain nombre de substances peuvent être séparées du lactosérum, qui peut ensuite être utilisé ou transformé en produits utiles dans les industries de production pharmaceutique ou alimentaire (GERNIGON et *al.*, 2011). Ainsi, au cours du traitement du lactosérum par électrodialyse que se forme le lactosérum à teneur réduite en sel mais donne naissance au même temps à un effluent liquide avec des teneurs très élevées en sels (8 – 10% p/v) pour lequel il n'existe actuellement pas d'utilisation (DIBLIKOVA et *al.*, 2013). En outre, le volume croissant de production de lactosérum déminéralisé représente un réel problème pour l'élimination des eaux usées des procédés salins (GERNIGON et *al.*, 2011).

Des études antérieures ont indiqué une possible culture de microalgues et une production de lipides sur les eaux usées laitières et autres (WANG et *al.*, 2010; CHOI et *al.*, 2018). Cependant, diverses microalgues ont souffert de l'inhibition de la croissance en condition photoautotrophe sur les eaux usées laitières en raison de leurs niveaux élevés de turbidité (CHOKSHI et *al.*, 2016; CHOI et *al.*, 2018). Ainsi, certaines microalgues ont montré une croissance et une utilisation accrue des nutriments sur des eaux usées laitières fortement diluées (un facteur de dilution de 10 à 20) (WANG et *al.*, 2010; DING et *al.*, 2015).

Par ailleurs, les microalgues se développent fréquemment dans l'environnement naturel en association avec des bactéries (HAN et *al.*, 2016). En général, les bactéries favorisent la croissance des microalgues en réduisant la concentration d'oxygène dissous et en consommant les matières organiques excrétées par les algues (MOUGET et *al.*, 1995), tout en sécrétant de la biotine, de l'amine, du cobalt et de la thiamine (CROFT et *al.*, 2005). À leur tour, les microalgues remboursent les bactéries en oxygène et en composés extracellulaires. Une telle réciprocité implique que la croissance des microalgues peut être améliorée par des bactéries spécifiques (DE-BASHAN et *al.*, 2002). Une telle relation synergique va aider à établir un mode de coculture microalgue-bactérie efficace pour améliore à la fois la culture algale et bactérienne (HAN et *al.*, 2016).

Cette étude a pour objective d'examiner la faisabilité de l'utilisation de la solution de sel résiduaire formée par déminéralisation du lactosérum (SWW) comme composante de base pour la culture de *C. vulgaris* sous un régime batch dans un photobioréacteur colonne à bulles. Les essais vont être considérés en utilisant différentes variantes du milieu SWW et seront évalués, principalement, par la comparaison des rendements en biomasse algale de chaque culture avec ceux réalisés sur le milieu de base défini BG11 (BM). A cet effet, deux types d'approches ont été testées :

Culture dans les eaux usées salines sous un régime de culture combiné basé sur le principe de dilution : la culture de *Chlorella vulgaris* dans les photobioréacteurs a été évaluée dans le milieu BM, dans le milieu SWW et des mélanges contenant différents rapports de (BM:SWW) (2:1 et 1:2).

Culture dans les eaux usées salines traitées par Lactobacillus helveticus : la culture de C. vulgaris dans les photobioréacteurs a été évaluée pour sa capacité de croître dans les milieux SWW en coculture avec Lactobacillus helveticus souche CCDM 40 (8/2004) et dans le milieu (SWW) prétraité (PLSWW) au préalable avec L. helveticus.

3- Matériels et méthodes

3.1- Milieux de culture

3.1.1- Milieu de base (BM)

La microalgue d'eau douce *Chlorella vulgaris* souche *CCALA* 256 a été cultivée dans un milieu défini (BM) standard (suffisant en azote) qui correspond à la composition du BG11. La composition chimique du BM est résumée dans le tableau VII. Pour la préparation du BM, tous les composants à l'exclusion de l'urée ont été dilués dans de l'eau distillée et autoclavés pendant

15	minutes	à	120 °C.	Après	refroidissement	, de	l'urée	а	été	ajoutée	et	le	pН	ajusté	à 7	7 a	vec
Na	OH 1M.																

Compositions	Concentration (mg/ L eau distillée)
(NH ₂) CO - urée	1100
KH_2PO_4	238
MgSO ₄ , 7H ₂ O	204
$C_{10}H_{12}O_8N_2NaFe$	40
$CaCl_2$	88
H ₃ BO ₃	0.832
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.946
$MnCl_2$, $4H_2O$	3.294
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0.616
$ZnSO_4$, $7H_2O$	2.678
(NH4)6M07O24	0.172
(NH ₄)VO ₃	0.0014

Tableau VII : Composition du milieu nutritif défini (BG11)

3.1.2- Milieu d'eaux usées salines (SWW)

Les eaux usées salines SWW ont été collectées au niveau d'une laiterie locale (Moravia Lacto a. s. ; République tchèque) où ils ont été produits après le dessalement du lactosérum du fromage par électrodialyse (EWDU 6xEDR-II / 250-0.8, MEGA a.s., République Tchèque). Le milieu de culture SWW a été obtenu selon une technique classique de traitement des eaux usées, qui est dédiée à l'élimination entre autres des protéines du lactosérum. Un prétraitement comme exposé dans la figure 40 a été adopté, incluant un changement de pH (pH 4,3 à pH 7) en utilisant du NaOH 5 M et en chauffant à 80 °C pendant 10 minutes sur un agitateur magnétique à 450 rpm. Ceci a entraîné la précipitation de particules solides. A la fin, comme le milieu contenait beaucoup de particules insolubles, une centrifugation est réalisée à 12000 rpm pendant 10 minutes pour séparer les particules (sédiment) du milieu (surnageant) (HUMHAL et *al.*, 2017) (fig. 33).



Figure 33 : Processus de prétraitement de SWW et photo du milieu prêt pour être utilisé

Les analyses du SWW ont été réalisées par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République Tchèque) et sa composition chimique est résumée dans le tableau II. La composition chimique du milieu SWW est résumée dans le tableau VIII. Les analyses de la composition du milieu SWW ont été réalisées par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu; République Tchèque).

Tableau VIII : Composition chimique des eaux usées salines (SWW) avant et après le traitement réalisé par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République Tchèque).

	Avant	Арі	rès
Composantes du milieu	g.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	%
Cendre	11.3	10.05	88.9
Lactose	3	0.005	0.2
Cl	2.67	1.53	57.3
Р	0.64	0.048	7.5
SO 4 ⁻²	0.38	?	?
Ca+2	0.79	0.0429	5.4
Mg^{+2}	0.15	0.0746	49.7
К	3.32	4.28	128.9
Na	3.32	1.25	37.7
NO-3	1.8	1.94	107.8

3.2- Culture de Chlorella vulgaris dans les photobioréacteurs

Toutes les cultures autotrophes et mixotrophe de *Chlorella vulgaris* ont été réalisées en mode batch dans des cylindres en verre de 500 ml placés dans un bain-marie à 30 °C (fig. 34). Les photobioréacteurs contenaient 300 ml de milieu de culture, inoculés avec 30 ml de la préculture (10% v/v) préparées à partir de boîtes de Pétri (voire section 3.2.1.1).



Figure 34 : Culture de *C. vulgaris* en photobioréacteur colonne à bulle sous éclairage continu (Laboratoire Bioprocess & Modeling, Département de biotechnologie, ENSTC, Prague)

La culture a été éclairée par une lumière artificielle en continu (100 μ E/m. s) fournie par des lampes fluorescentes (capteur PAR QSL-2101, Instruments biosphériques Inc., USA) et situées à environ 10 cm des cultures en photobioréacteurs. Les populations cellulaires ont été aérées en utilisant de l'air enrichi avec 2% (v/v) de *CO*₂ avec un débit total de 250 ml/ min pendant toute la durée de la culture (HUMHAL et *al.*, 2017) (fig. 35).



Figure 35 : Schéma descriptif du système de culture en bioréacteur colonne à bulle utilisé durant les cultures autotrophes de *C. vulgaris* (Extrait du manuel des techniques de cultures en laboratoire –ENSTC, Prague) modifié.

3.2.1- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines sous un régime de culture combiné

Nous avons évalué la croissance de *C. vulgaris* dans différentes dilutions du milieu SWW en raison de leurs niveaux élevés de turbidité et les résultats ont été évalués par rapport au milieu de base BM qui correspond à la composition du BG11 (tab. VII).

Ainsi, pour ce travail, nous avons utilisé le milieu SWW seul et des mélanges de ce dernier contenant différents rapports de BM:SWW (2:1, 1:2) pour évaluer la possibilité d'une culture autotrophique d'une microalgue verte d'eau douce sur des effluents salins des industries fromagères. L'étude menée jusqu'à la phase stationnaire a été réalisée en parallèle avec la culture classique de *C. vulgaris* sur le milieu de base BM. Par ailleurs, pour chaque test, deux répétitions ont été conduites simultanément (tab IX).

Tableau IX : Milieux de culture utilisés pour la culture de *C. vulgaris* dans les réacteurs individuels

Essais	1	2	3	4	5	6	7	8
Milieu	BM	BM	SWW	SWW	BM:SWW	BM:SWW	BM:SWW	BM:SWW
					(2:1)	(2:1)	(1:2)	(1:2)

3.2.1.1- Préparation des milieux pour la culture

Les milieux ont été préparés en mélangeant tous les composants en fonction des indications du tableau IX. En fonction du test, les composantes ont été disposées dans une fiole jaugée de 1 litre et complétées à valeur désirée avec de l'eau distillée. Après homogénéisation du mélange, le pH du milieu a été ajusté entre 6,5 - 7,2 avec du KOH 1M

Tous les milieux ont été stérilisés avec les six dispositifs cylindriques en verre vides des réacteurs. La stérilisation a été réalisée dans un autoclave (model Auro) à pression élevée (3 – 4 bars) à 121 °C pendant 15 min. Une fois les milieux refroidis à température ambiante, ils ont été versés dans les cylindres en verre stériles (300 ml de milieu par cylindre) au niveau de la hotte à flux laminaire et inoculés avec 30 ml d'inoculum pris des précultures préparées, au préalable, à partir de boîtes de Pétri (fig. 36) et cultivées pendant 14 jours sur des éléments du milieu BG11. Les milieux des précultures ont été préparés avec les mêmes conditions de pH et d'asepsie. Les cultures dans les photobioréacteurs sont soumises à un éclairement lumineux continu de 100 μ E/ m.s et aérées en utilisant de l'air enrichi avec 2% (v/v) de *CO*₂.



Figure 36 : Souche de Chlorella vulgaris dans une boîte de Pétri

3.2.2- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines traitées par Lactobacillus helveticus

Trois types de milieux ont été utilisés pour cultiver la souche *CC256* de *C. vulgaris*. Les cultures dans les différents types de milieux ont été conduites avec deux répétitions réalisées en parallèle (tab. X) et les résultats ont été évalués par rapport au milieu de base BM. À cet effet, la culture autotrophe en photobioréacteurs de *C. vulgaris* a été évaluée pour sa capacité à se développer dans du lactosérum déminéralisé suivant les conditions décrites ci-dessous :

> Dans les deux premiers cylindres en verre, *C. vulgaris* sera mise en culture sur le milieu de base (BM), inoculé par la préculture à hauteur de 10 % (v/v);

➤ Dans le troisième et quatrième réacteurs, *C. vulgaris* sera en coculture dans du lactosérum déminéralisé avec *Lactobacillus helveticus* souche CCDM 40 (SWW – L) ; le rapport de l'inoculum microalgues – bactéries a été fixé à (7.5:1) (v/v);

➤ Dans le cinquième et sixième réacteurs, *C. vulgaris* sera cultivée dans du lactosérum déminéralisé prétraité au préalable par *Lactobacillus helveticus* (PLSWW), le but étant d'éliminer et/ou de réduire au minimum les sources de carbone et d'énergie qui peuvent constituer une source de contamination en culture.

Pour la préparation du PLSWW, des photobioréacteurs contenant chacun 300 ml de milieu de culture (SWW) ont été inoculés à hauteur de 1.3 % (v/v) d'une préculture de *L. helveticus*. La préculture a été réactivée dans des flacons de 50 ml contenant un bouillon MRS (deMan, Rogosa, Sharpe) suite à une incubation de 3 jours à 40°C sous une atmosphère enrichie en CO_2 (~3 %), dans une chambre d'incubation microbiologique (RUSKINN concept 400) (fig. 37). Après 15 jours de culture dans le milieu SWW, la solution cellulaire de *Lactobacillus helveticus* a été centrifugée à 12000 rpm pendant 15 minutes pour séparer les microorganismes en suspension (sédiment) du milieu (surnageant) qui sera conservé dans un congélateur avant d'être utilisé comme support de culture de *C. vulgaris* sous la dénomination de (PLSWW).



Figure 37 : Incubateur microbiologique utilisé pour la réactivation de Lactobacillus helveticus

➤ Dans les deux derniers réacteurs (7 et 8), le milieu avait été constitué de lactosérum déminéralisé dans lequel seule *Lactobacillus* était en culture. Les réacteurs ont été inoculés à hauteur de 1.3 % (v/v). Ils vont servir de témoin (blanc) pour surveiller la croissance des bactéries au niveau des réacteurs 5 et 6, et cela, pour une meilleure appréciation de la croissance de *C. vulgaris* dans ces derniers.

Tableau X : Milieux de culture utilisés pour la croissance de *C. vulgaris* dans les réacteurs individuels

Essais	1	2	3	4	5	6	7	8
Milieu	BM	BM	SWW-L	SWW-L	PLSWW	PLSWW	BLANC	BLANC

3.3- Méthodes d'analyse

Pour les objectifs de notre étude, des échantillons sont prélevés régulièrement au niveau des cultures batch afin d'être analysés. A cet effet, un volume, de 10 ml au début de l'expérience puis de 6 ml en phase finale, ont été prélevés quotidiennement des réacteurs dans des conditions aseptiques. Afin de suivre le comportement de la souche *C. vulgaris* au niveau de chaque milieu, la concentration de la biomasse a été déterminée par gravimétrie, la chlorophylle (A et B) et les caroténoïdes ont été évalués par spectrophotométrie et pour rapporter le nombre de cellules par millilitre de culture, les cellules ont été comptées en utilisant une chambre Bürker.

Sur la base des données obtenues, des courbes de croissance et des graphiques de la dépendance de la teneur en chlorophylle et du nombre de cellules dans un millilitre de culture en fonction du temps ont été créés.

3.3.1- Analyse Gravimétrique

Il existe différentes méthodes connues pour suivre les variations quantitatives de la biomasse chez une culture donnée. La plus utilisée avec beaucoup d'espèces est la spectrophotométrie. Toutefois, cette méthode n'est pas précise avec les algues, car il est difficile de faire une corrélation entre l'absorbance et la biomasse. En effet, nous observons au niveau de la figure 38 que la détermination de la biomasse, via les deux méthodes, présente des différences très significatives (p(0,001) < 0,05) pour la concentration en biomasse chez *C. vulgaris* en culture sur le même milieu de base BM. Une différence qui peut nous induire en erreur surtout dans le cadre de cultures hétérotrophes et/ou sur des effluents laitiers (annexe 1).



Figure 38 : Comparaison des procédés d'analyses gravimétrique et spectrophotométrique pour *C. vulgaris* en culture hétérotrophe dans des flacons agités.

En effet, cette difficulté est due au fait qu'une cellule-mère d'algues peut donner 2, 4 voire 8 cellules filles et cela peut varier au cours de la culture. Ainsi, un suivi quantitatif de la biomasse représente l'une des étapes critiques de la faisabilité des procédés de culture microalgale (rentabilité économique l'exige).

A cet effet, l'un des moyens les plus directs pour déterminer la production de biomasse est l'analyse gravimétrique. Cette technique permet une quantification simple et peu coûteuse de la biomasse. Elle reste facile d'utilisation, rentable et l'équipement requis à cet effet n'est pas très coûteux, principalement une centrifugeuse, une étuve et une balance analytique. De plus, ce procédé convient parfaitement à la séparation de particules de petite taille (3 à 30 μ m) et à faible concentration en biomasse dans le milieu de culture (0,02 à 0,05 %) (MOLINA et *al.*, 2003). Lors de la centrifugation, la gravité est remplacée par une force beaucoup plus grande et presque tous les types de microalgues peuvent être séparés de manière fiable et rapide et sans difficulté (MILLEDGE et HEAVEN, 2013). Ainsi, la récupération des cellules dépend des

caractéristiques de décantation de ces derniers, du temps de séjour de la suspension dans la centrifugeuse et de la profondeur de la chambre de décantation. Par ailleurs, avec des rendements de récolte de plus de 95%, cette méthode est souvent utilisée pour déterminer la production de biomasse et pour suivre la croissance des cultures cellulaires (BRENNAN et OWENDE, 2010).

Au cours de notre étude, la valeur de la concentration en biomasse dans la suspension cellulaire a été obtenue par détermination gravimétrique. Les échantillons ont été prélevés dans des conditions aseptiques à des moments différents et analysés comme il est indiqué ci-dessous afin de caractériser la croissance de la biomasse.

3.3.1.1- Préparation des Eppendorf

Selon BECKER (1994) les répliques sont fortement recommandées dans ce type d'analyse. Ainsi, pour avoir une référence sur le poids de la biomasse, trois mesures doivent être prises pour l'étude de la croissance, cela nous permettra de vérifier les corrélations entre les différents résultats pour faire une moyenne et éliminer certaines mesures si celles-ci sont aberrantes. Pour avoir des résultats précis, les Eppendorf utilisés pour le test gravimétrique doivent effectuer un passage de 12 - 24 heures dans une étuve (Memmert) à 105 °C pour éliminer toute l'humidité (avoir un poids constant). A la sortie, les Eppendorf sont placés dans un dessiccateur et laissés refroidir (≈ 10 min). Pour les pesées, nous utilisons une balance analytique de précision (modèle Kern ABJ-NM 0,0001g). Enfin, les Eppendorf sont numérotés et prêts à être utilisés.

3.3.1.2- Centrifugations et poids de la biomasse

Sous une hotte à flux laminaire et à partir des différentes cultures batch un échantillon de 10 ml de la suspension cellulaire est prélevé avec une pipette graduée motorisée automatique. Il faut veiller à ce que la culture soit bien mélangée avant de prélever les échantillons. A partir des échantillons, 6 ml de suspension cellulaire sont versés dans trois (03) Eppendorf pré-pesés de 2 ml. La suspension a d'abord été homogénéisée sur un vortex puis centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 min sur une centrifugeuse Hettich micro 120.

Pour minimiser les erreurs d'analyse, les cellules d'algues (culot) doivent être lavées avec un tampon ou de l'eau distillée pour éliminer les sels et d'autres contaminants. Ainsi, les culots cellulaires, obtenus après la première centrifugation, ont ensuite été lavés une fois avec de l'eau distillée avant d'être centrifugés. A cet effet, le surnageant a été retiré et les cellules ont été remises en suspension avec 1 ml d'eau distillée, lavées par homogénéisation approfondie sur un vortex, avant d'effectuer un cycle de centrifugation supplémentaire sous les mêmes conditions à savoir 14 000 g pendant 10 min. A la fin, le surnagent est séparé du culot qui est déposé dans une étuve de laboratoire type Memmert à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant pour la détermination du poids sec des cellules (DCW). Les Eppendorf avec de la biomasse pure séchés, sont pesés de la même manière que pour la préparation des Eppendorf avant utilisation, c'est-à-dire pesés sur une balance analytique à quatre décimales.

La valeur de concentration finale en biomasse a été déterminée en enlevant le poids des Eppendorf après séchage des échantillons. Les valeurs de la biomasse obtenues ont été utilisées pour la réalisation des graphiques montrant l'évolution de la croissance de *C. vulgaris* sur les différents milieux de culture.

Le poids de la biomasse et la concentration à l'intérieur de la culture sont donnés avec la formule ci-dessous :

 $m_{biomasse} = m_{Eppendorf final} - m_{Eppendorf initial}$

 $[Biomasse] = m_{biomasse} \times 500.$

m _{biomass}, m _{Eppendorf final} and m _{Eppendorf initial} en (g). Ainsi, la concentration est obtenue en g/L et représente la moyenne calculée entre les concentrations des trois 03 répliques Eppendorf pour chaque échantillonnage. Par ailleurs, les valeurs aberrantes seront exclues lors du traitement des données.

3.3.2- Mesure des chlorophylles et de la teneur totale en caroténoïdes

Selon GITELSON et *al.* (2000) la quantification de la chlorophylle est plus facile que la biomasse algale elle-même. A cet effet, elle peut être utilisée comme méthode indirecte de quantification de la biomasse. La chlorophylle (A) (fig. 39) est généralement le paramètre utilisé comme indicateur trophique, principalement parce que la relation entre la teneur de ce pigment et la quantité de biomasse algale est assez directe. Toutefois, la source du matériel biologique détermine souvent le choix de la meilleure méthode d'évaluation de la biomasse. En effet, en plus de l'influence de la constitution de la paroi cellulaire dans l'estimation de la chlorophylle, la variabilité de la teneur en chlorophylle A dans chaque espèce (de 0,1 à 9,7% du poids sec cellulaire), la modification des pigments lors du processus d'extraction, ainsi que l'influence de pigments autres que la chlorophylle, peuvent compliquer sa détermination et conduire à des erreurs d'estimation.



Figure 39 : Structure chimique de la chlorophylle A. La chlorophylle B étant une variante où le groupe méthyle en position 3 est remplacé par un groupe formyle (HUMPHREY, 1980)

Il existe plusieurs méthodes disponibles pour quantifier les chlorophylles, rendant le choix aléatoire ou difficile à justifier. Les étapes communes à tous les protocoles, basés sur la spectrophotométrie, sont les suivantes :

- Séparation des cellules de microalgues du surnageant ;
- Extraction de pigments avec un solvant organique ;
- Détermination spectrophotométrique de la concentration de chlorophylle dans l'extrait.

Pour les trois étapes précitées, nous pouvons voir que les solvants jouent un rôle important. Au-delà de la capacité de dissolution vis-à-vis des composés à extraire, le solvant joue également un rôle important dans la lyse cellulaire. De plus, des solvants plus agressifs peuvent augmenter le rendement d'extraction dans les cellules à parois solides. Par ailleurs, le temps de contact entre les composés cellulaires à extraire et le solvant peuvent être déterminants pour la quantité de produits extraits. Ainsi, lorsque le pouvoir de lyse cellulaire du solvant n'est pas trop élevé, ce qui peut être intentionnel pour éviter d'endommager les composés à extraire, une période d'extraction plus longue peut augmenter le rendement de ce procédé (HENRIQUES et *al.*, 2007).

3.3.2.1- Détermination de la chlorophylle

Les chlorophylles et les caroténoïdes de *C. vulgaris* ont été extraites avec du méthanol et ont été dosées par spectrophotométrie tel que décrit par WELLBURN (1994). Pour la fiabilité des résultats sur le dosage de la chlorophylle, trois déterminations parallèles ont été effectuées et les étapes du dosage sont décrites ci-dessous :

En premier lieu et en fonction de la concentration de la biomasse dans les cultures, la quantité requise d'échantillon a été pipetée. Les échantillons collectés ont été dilués dans une fiole jaugée de 25 mL avec de l'eau distillée.

Ensuite, (03) trois tubes en plastique de 15 ml ont été pipetés avec 5 mL du mélange cellulaire et sont placés dans une centrifugeuse Hettich à 6000 rpm pendant 10 minutes. Immédiatement après la centrifugation, le surnageant a été enlevé et 1 ml de méthanol avec 2 ml de microbilles en céramique sont additionnés.

Les mélanges obtenus ont été progressivement vortexés sur un agitateur à vortex (Genius 3) pendant 90 secondes, où les cellules ont été détruites à l'aide de microbilles en céramique. Ensuite, 4 ml de méthanol a été ajouté aux tubes et le mélange a été secoué quelques secondes à l'aide d'un agitateur à vortex, afin d'assurer le brassage de la solution cellulaire, puis les tubes ont été placés dans un bain-marie, à l'obscurité et chauffés à 55 °C pendant 40 minutes.

Après ce temps, les tubes ont été placés dans une centrifugeuse Hettich pendant 5 minutes à 6000 rpm. Le surnageant a été filtré à travers un filtre en nylon de 0,22 µm et transféré dans une cuvette en quartz pour analyse au spectrophotomètre.

Un spectrophotomètre (Spekol 1300) a été utilisé pour mesurer l'absorbance à trois longueurs d'onde différentes : 470 nm, 653 nm et 666 nm avec de l'eau distillée utilisée comme un blanc lors des lectures spectrophotométriques.

La détermination de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes totaux ont été réalisées en entrant les valeurs d'absorbance dans les équations fournies par WELLBURN (1994) données cidessous (tab. XI). **Tableau XI :** Équations utilisées pour le calcul de la teneur en chlorophylle a et b et en caroténoïdes totaux.

Chlorophylle A :	Chlorophylle B :					
$c_A[\mu g/ml] = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653}$	$c_B [\mu g/ml] = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666}$					
$c_{A}[\mathbf{mg/g}] = \frac{c_{A}[\mathbf{\mu g/ml}] \cdot \frac{V_{fiole}[\mathbf{ml}]}{V_{m\acute{e}thanol}[\mathbf{ml}]}}{c_{biomasa}[\mathbf{g/l}] \cdot \frac{V_{Echantillon}[\mathbf{ml}]}{V_{fiole}[\mathbf{ml}]}}$	$c_B [\mathrm{mg/g}] = \frac{c_B[\mu \mathrm{g/ml}] \cdot \frac{V_{fiole}[\mathrm{ml}]}{V_{\mathrm{m\acute{e}thanol}}[\mathrm{ml}]}}{c_{biomasse}[\mathrm{g/l}] \cdot \frac{V_{Echantiollon}[\mathrm{ml}]}{V_{fiole}[\mathrm{ml}]}}$					
Totale carotinoïde : $c_{X+C} [\mu g/ml] = \frac{(1000 \cdot A_{470} - 2,86 \cdot c_A - 129, 2 \cdot c_B)}{221}$						
$c_{X+C} [\text{mg/g}] = \frac{c_{X+C} [\mu\text{g/ml}] \cdot \frac{V_{fiole}[\text{ml}]}{V_{m\acute{e}thanol}[\text{ml}]}}{c_{biomasse}[\text{g/l}] \cdot \frac{V_{Echantillon}[\text{ml}]}{V_{fiole}[\text{ml}]}}$						

3.3.3- Détermination du nombre de cellules (chambre Bürker)

Le comptage des cellules de *Chlorella* a été effectué par la technique de la chambre de comptage en utilisant un hématimètre cellule de Neubauer amélioré avec les dimensions suivantes : plus grand carré de 1 mm², carré de groupe de 0,04 mm² et plus petit carré : 0,0025 mm². Le principe de base de la technique repose sur un évier dont la zone est marquée d'une grille au milieu d'une lame microscopique. Une goutte de la culture cellulaire est placée dans l'évier et la grille permet de compter manuellement le nombre de cellules dans une certaine zone simplement en regardant à travers le microscope. La profondeur du puits est préétablie, ainsi le volume de la culture compté peut-être calculé avec la concentration des cellules. Pour s'assurer que les cellules qui sont sur le long des lignes de limite ne sont pas comptées deux fois ou ne sont pas manquées pendant le comptage, certaines précautions doivent être prises (fig. 40). Le décompte doit commencer dans le coin supérieur gauche et suivre une direction bien précise.

Ainsi et pour une bonne évaluation du comptage microscopique des cellules, une homogénéisation complète de l'échantillon était nécessaire avant chaque mesure ou dilution, et cela, par l'utilisation d'un agitateur à vortex.

Une goutte de l'échantillon dilué a été pipetée dans le centre de la chambre Bürker et immédiatement recouverte d'une lamelle. Le comptage cellulaire a été effectué dans 10 champs d'une chambre Bürker sous un microscope avec un grossissement de (x 40). S'il y avait plus de 10 cellules dans chaque champ, une dilution décimale devait être effectuée (1 ml d'échantillon + 9 ml d'eau distillée).



Partie du comptage de cellules

Figure 40 : Comptage cellulaire correct et le sens de la lecture à l'aide de la technique de la chambre de comptage

Après le comptage et à partir du nombre moyen de cellules (moyenne arithmétique de 10 champs), de la dilution utilisée et des paramètres de la chambre, le nombre de cellules pour 1 ml de suspension a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

Formule de calcul du nombre de cellules par ml de suspension :

$$\frac{Nombre \ de \ cellules \cdot 10^{6}}{Surface \ (mm^{2}) \cdot hauteur \ (mm) \cdot dilution} = \frac{Nombre \ de \ cellules}{mL \ de \ suspension}$$

Chambre : surface $1/25 \text{ mm}^2$, hauteur 0,1 mm, volume : 0,04 mm³, soit $4/10^6 \text{ ml}$

Ainsi la formule devient :

concentration initiale
$$\left[\frac{b}{ml}\right] = \frac{nombre\ moyen\ de\ cellules \cdot 10^6 \cdot X}{4}$$

X = 1 si le nombre de cellules du mélange de base était de 1 à 10

X = 10 si l'échantillon a été dilué 10 fois

X = 100 si l'échantillon a été dilué 100 fois

X = 1000 si l'échantillon a été dilué 1000 fois

3.3.4- Détermination du taux de croissance et de la productivité volumétrique maximale de la biomasse

Les paramètres utilisés pour caractériser les cultures en photobioréacteurs de Chlorella vulgaris sont donnés par le taux de croissance spécifique (μ_{max}) et la productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{max}) . Ils sont calculés en utilisant les équations (1) et (2), suivantes :

$$(\mu_{max}) [Jours^{-1}] = \frac{\ln \left[\frac{c_2}{c_1}\right]}{t_2 - t_1} \tag{1}$$

$$(P_{max}) [g/L \cdot J] = \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1}$$
(2)

Où c_1 et c_2 font référence à la concentration en biomasse [g/L] mesurée par gravimétrie en rapport avec le temps au début t_1 et à la fin t_2 , de la phase de croissance exponentielle.

4- Résultats et discussion

4.1- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines sous un régime de culture combiné

Le suivi de la cinétique de croissance de *C. vulgaris* dans les différents milieux a été réalisée deux fois afin de montrer la reproductibilité de la culture. Ainsi, les variations de la concentration en biomasse algale obtenues sur les photobioréacteurs sont prises deux à deux dans les mêmes conditions, les prélèvements ont été effectués sur une période de 14 jours (fig. 41).



Figure 41 : Courbes de croissance (g/L) de *C. vulgaris* (*CC256*) sur les différentes combinaisons de milieux testés.

La concentration en biomasse à différents moments a été calculée en connaissant le volume échantillonné (2 mL) et le poids final après analyse gravimétrique. Chaque point représente la valeur de concentration moyenne de trois répétitions pour le point d'échantillonnage. Par ailleurs, visuellement, la croissance des cellules de microalgues peut être appréciée comme un changement de couleur dans le milieu de culture passant d'un vert moins intense à des tonalités vertes plus foncées qui indiquent une concentration cellulaire plus élevée (fig. 42).



Figure 42 : Appréciation visuelle de la croissance des cellules de microalgues dans les photobioréacteurs.

D'après la figure 41, la croissance de *C. vulgaris* sur toutes les cultures est linéaire dans le temps et aucune phase de latence n'a été observée, cela traduit une préculture cellulaire inoculée dans sa phase de croissance exponentielle, c'est ce qui explique cette adaptation rapide en culture. Ainsi, au début de la culture, la croissance cellulaire semble être exponentielle pendant les 90 premières heures en raison de la concentration plus faible en cellule dans le milieu qui permet la pleine pénétration de la lumière à l'intérieur du photobioréacteur. Néanmoins, après cette première période, il y a une atténuation de la pénétration de la lumière à l'intérieur du tube de verre causée par une concentration cellulaire plus élevée, cette dernière inhibe le passage de la lumière jusqu'à la zone centrale du photobioréacteur. Les cultures ont mis environ deux semaines pour atteindre la phase stationnaire de croissance, atteignant une concentration en biomasse maximale moyenne d'environ $X_{max} = 8.2 \text{ g} / \text{L}.$

En examinant les données obtenues, on peut voir que les réacteurs contenant les eaux usées salines (SWW) renfermaient une concentration en biomasse plus élevée que ceux contenant uniquement du BM. En d'autres termes, la concentration finale la plus élevée a été obtenue dans la condition BM(1): SWW(2) qui était en moyenne de (8.1665 \pm 0.008) g/ L, vient ensuite la concentration obtenue en condition de culture sur le SWW seul avec une moyenne de (7.908 \pm 0.022) g/ L. Elle est suivie par la valeur de (7.767 \pm 0.0168) g/ L obtenue pour la condition DM(2):WSM(1) en R1. Par conséquents, tous les résultats en présence du milieu SWW sont supérieurs à la valeur finale de la concentration moyenne en biomasse (7.28 \pm 0.05) g/ L obtenue pour les cultures contenant uniquement du BM.

Ainsi, il y avait des croissances importantes de *C. vulgaris* sur les milieux à base d'effluent laitier non dilué et dilué, cela en raison des nutriments contenus dans les eaux usées laitières qui pourraient être d'excellentes sources pour la culture de *C. vulgaris*. Des études antérieures ont indiqué une éventuelle culture de microalgues et une production de lipides sur les eaux usées laitières (ABREU et *al.*, 2012; WANG et al., 2018). Ainsi, les quantités d'azote, de phosphore et de matières organiques (c. phosphate total, 35-400 mg/L ; DCO, 1000-5000 mg/L)

présentes dans ce type d'effluent pourrait faciliter la croissance des algues (GONÇALVES et al., 2017). De même, les oligoéléments dans l'effluent laitier influenceraient de manière significative la production de biomasse algale, car ils jouent un rôle important dans plusieurs systèmes enzymatiques du métabolisme des microalgues, notamment la photosynthèse, la respiration, la production d'adénosine-triphosphate (ATP) et la synthèse des pigments (FRANKLIN et al., 2002; BOHUTSKYI et al., 2014). En outre, la faible turbidité de milieu SWW, suite au prétraitement, a réduit l'incidence que peut avoir la turbidité de milieu sur l'inhibition de la photosynthèse et la croissance des algues. En effet, diverses microalgues ont souffert de l'inhibition de la croissance photoautotrophe sur les eaux usées laitières en raison de leurs niveaux élevés de turbidité (HENA et al., 2015; CHOKSHI et al., 2016; CHOI et al., 2018). Selon CHOI et al., (2018) l'utilisation des eaux usées des effluents laitiers en conditions de culture photoautotrophe implique des dilutions pour réduire la turbidité. A cet égard, ils rapportent des taux de croissance spécifique (μ_{max}) plus élevés 0.261 et 0.253 Jours⁻¹, avec des dilutions de l'ordre de (x5 et x10), respectivement. En ce sens, nos résultats rejoignent ceux de CHOI et al., (2018) sur l'utilité d'utilisée une dilution des effluents laitiers pour la culture autotrophe de microalgues. A cet égard, le taux de croissance spécifique le plus important a été enregistré sur la combinaison du milieu BM(2):SWW(1) qui correspond à une dilution du milieu SWW au (2/3) avec un taux de ($\mu_{max} = 0.525 \pm 0.00003 J^{-1}$) qui dépassait celui obtenu sur le milieu BG-11 utilisé comme milieu témoin pour la croissance photoautotrophe et qui était le plus translucide (tab. XII). Par ailleurs, *Chlorella vulgaris* a montré le taux de croissance spécifique le plus faible ($\mu_{max} = 0,4002 \pm 0,011$) sur l'effluent laitier non dilué (SWW seul) pour lequel correspond, aussi, la densité cellulaire la plus faible.

Chlorella vulgaris	Facteur de	P(max) (g/ L. jours)	$\mu_{max} (Jours^{-1})$	Nombre de cellules	
	dilution			(cells/mL)	
BM	-	0,519 ± 0,003	0,452 ± 0,018	1,12E+10	
SWW	-	0,562 ± 0,011	0,4002 ± 0,0113	6,00E+08	
BM(2):SWW(1)	2/3	0,665 ± 0,111	0,525 ± 0.00003	9,60E+09	
BM(1):SWW(2)	1/3	0,578 ± 0,007	0,339 ± 0,025	1,04E+09	

Tableau XII : Effets des facteurs de dilution des effluents laitiers sur les paramètres de croissance de *Chlorella vulgaris* (p < 0.05)

Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle, la croissance des cultures de microalgues qui reposent sur des conditions photoautotrophes doit être réalisée sur des eaux usées fortement diluées (y compris les effluents laitiers) pour éviter l'inhibition de la croissance photoautotrophe sous une turbidité élevée des effluents (WANG et *al.*, 2010; NAM et *al.*, 2017; CHOI et *al.*, 2018). Ainsi, la croissance cellulaire la plus élevée de *Chlorella vulgaris* sur les eaux usées laitières diluées (2/3) peut principalement être due à sa croissance sous une turbidité moins élevée tandis que le faible taux de croissance de *C. vulgaris*, enregistré sur le milieu SWW, était le fait de l'inhibition par la turbidité élevée des effluents laitiers entraînerait une modification des processus de culture des algues avec une augmentation des coûts globaux de traitement cela est dû, entre autres, à l'augmentant du volume des eaux usées traité, à la

consommation d'eau douce, à l'énergie et les matériaux/produits chimiques utilisés et à la taille des réacteurs (CHOI et *al.*, 2018).

La technique de comptage cellulaire a également été effectuée comme le montre le tableau XII. Bien que les photobioréacteurs contenant du SWW aient obtenu des concentrations finales de biomasse plus élevées que les cultures en milieu BM. L'analyse du nombre de cellules a révélé un comportement opposé. En effet, les photobioréacteurs avec SWW n'ont pas connu d'augmentation remarquable du nombre de cellules de Chlorella, celles-ci étant 4 fois inférieures à celles obtenues sur le milieu BM. Ainsi, les cellules de Chlorella n'ont pas connu d'augmentation remarquable en matière de nombre lorsqu'elles se développaient en milieu SWW. L'analyse microscopique a permis de mettre en lumière ce qui suit : lorsque les cellules microalgales étaient en culture sur le milieu BM, C. vulgaris pouvait terminer son cycle cellulaire avec succès. Cependant, lorsque les cellules microalgales étaient placées en culture sur le milieu SWW, C. vulgaris n'était pas aussi efficace. Toutefois, en regardant la taille et la forme des cellules en milieu SWW au microscope, on a pu s'apercevoir que même si C. vulgaris augmente remarquablement en matière de nombre de cellule, il existe une réelle augmentation de la taille des cellules, de C. vulgaris, par rapport à la taille et à la forme des cellules en milieu BM ce qui explique les concentrations élevées de la biomasse obtenues sur les milieux contenants SWW.

Ces mêmes observations ont été rapportées par CHOI et *al.* (2018) qui dénotent une densité cellulaire 1 fois plus faible par rapport à la densité cellulaire rapportée sur le milieu BG11, chez *Chlorella vulgaris*, cultivée dans des effluents laitiers dilués (x 2). De même, une dilution de l'ordre de (x 5) faisait rechuter la densité cellulaire de 10 fois chez *Chlorella vulgaris*. En outre, à un certain seuil, l'augmentation du taux de dilution influée négativement sur la concentration en biomasse en raison du manque de nutriments disponibles dans l'effluent. Néanmoins, cette dernière restait supérieure aux valeurs obtenues sur le milieu BG 11.

La productivité volumétrique moyenne de la biomasse (P_{max}) [g/L · J] a été calculée à la fin de la phase stationnaire en utilisant les valeurs de la biomasse maximales. Comme prévu, la productivité volumétrique de C. vulgaris présente une relation opposée avec les faibles dilutions du SWW. Ainsi, une dilution du SWW au (2/3) a permis l'obtention d'un P_{max} de 0,665 ± 0,111 g/L · J, la dilution au (1/3) a permis l'obtention d'un $P_{max} = 0.578 \pm 0.007$ g/L · J, alors que la culture sans dilution a donné un P_{max} de 0,562 ± 0,011 g/L · J. Toutefois, il faut souligner que dans le cas du photobioréacteur 3 [condition DM(2) :WSM(1)] la productivité volumétrique était de $(P_{max} = 0.7768 \text{ g/L} \cdot \text{J})$ pour une concentration maximale de $(X_{max} = 8.983 \text{ g/L})$. Ces données ne correspondaient pas seulement aux cellules de C. vulgaris mais à plusieurs contaminants d'origine biologique (bactéries et protozoaires) survenus à environ 212 heures de culture. Ces résultats sont confirmés par un examen microscopique. Selon plusieurs études, les effluents laitiers sont riches en diverses substances organiques et les cultures d'algues utilisant ces effluents dans diverses conditions, en particulier, autotrophes souffrent généralement des problèmes de contamination et de compétition des cultures avec d'autres micro-organismes, et entraînent l'instabilité de la culture (LEE, 2001; CHEN et al., 2015; LAM et al., 2017). A cet effet, la culture de microalgues sur ces eaux résiduaires nécessite une stérilisation des milieux pour éliminer les bactéries et les protozoaires. Selon PEREZ-GARCIA et al. (2011) pour prévenir la contamination bactérienne qui pourrait affecter les performances de croissance,

plusieurs méthodes existent, mais elles restent coûteuses et complexes à mettre en place surtout dans le cadre de la culture à grande échelle. Toutefois, la méthode de stérilisation par le biais de l'hypochlorite de sodium (NaClO) à la concentration de 30 ppm a permis une asepsie totale des eaux usées laitières et une productivité en biomasse chez *Chlorella vulgaris* atteignant 0.450 g/ L après 4 jours de culture autotrophe (QI et *al.*, 2014).

Dans cette étude, *C. vulgaris* a montré sa croissance substantielle sur les eaux usées laitières non diluées $0,562 \pm 0,011 \text{ g/L} \cdot \text{J}$ par rapport au témoin (BG-11) $0,519 \pm 0,003 \text{ g/L} \cdot \text{J}$. Ces mêmes observations ont été rapportées par d'autres études, notamment par JOHNSON & WEN (2010) en utilisant une membrane à biofilm d'algues où les résultats de la productivité chez *Chlorella sp.* varient entre $[0.58 \pm 0.04 - 2.57 \pm 0.03]$ en fonction de la nature de la membrane. Dans le même sens, GAO et *al.* (2015) ont obtenu une productivité en biomasse chez *Chlorella vulgaris*, sur les effluents secondaires, égale à 1.728 g/L · J. De même, l'ajout de sources de carbone organique externes a permis des cultures productives sur des effluents laitiers non dilués (UMMALYMA & SUKUMARAN, 2014).

4.2- Culture de C. vulgaris dans les eaux usées salines traitées par Lactobacillus helveticus

La microalgue *C. vulgaris* a été cultivée et sa croissance a été suivie dans un milieu défini (BM), mais aussi dans les milieux à base de lactosérum déminéralisé « traité » et « non traité » par une souche de lactobacille (bactérie lactique). Les courbes de croissance des réacteurs individuels ont été construites à partir des données mesurées (fig. 43).



Figure 43 : Courbes de croissance de *C. vulgaris* (CC256) dans les eaux usées salines traitées par *Lactobacillus helveticus* (CCDM 40) comparées aux témoins.

Pour éliminer les erreurs de mesure possibles, la culture a été réalisée en deux répétitions parallèles pour chaque type de milieu. L'échantillonnage des réacteurs individuels a été effectué

pendant 14 jours, au cours desquels la concentration de la biomasse, la concentration de la chlorophylle produite et le nombre de cellules dans un certain volume de l'échantillon, ont été mesurés successivement.

D'après le graphique, les courbes semblent commencer à partir du point 0, car la concentration enregistrée à l'inoculation était très faible. Pour tous les types de milieux, une tendance similaire de la courbe de croissance a été observée dans les deux déterminations parallèles et la forme de ces courbes correspondait à peu près à la forme attendue, dans laquelle les phases individuelles de croissance phycologique sont reconnaissables. Sauf pour le milieu SWW – Lactobacillus (le milieu de la coculture) où nous avons assisté à deux croissances successives.

Dans la présente étude, l'effet positif des bactéries lactiques sélectionnées sur la croissance des microalgues a été observé, indiquant que le mode de prétraitement bactérien de l'effluent avant la culture microalgale et de la coculture des microalgues-bactéries dans le milieu contenant une substance organique était faisable et très efficace. Ainsi, la concentration maximale en biomasse a atteint ($X_{max} = 6,058 \pm 0,0075$ g/ L) et ($X_{max} = 6,03 \pm 0,058$ g/ L), respectivement sur PLSWW et SWW – Lactobacillus. Cependant, les résultats en matière de concentration en biomasse montrent que le milieu de base BM présente la plus forte concentration ($X_{max} = 7,892 \pm 0,025$ g/ L). Nos résultats corroborent les observations faites par YEE et *al.*, (2021) chez *Chlorella vulgaris* qui pousse mieux en coculture avec *B. infantis* qu'en conditions axéniques. En effet, sous l'effet de l'action de *B. infantis* en coculture avec plusieurs souches de microalgues avec un ratio (algue – bactérie) (9:1) (v/v), les cultures ont induit des concentrations en biomasse chez les différentes souches, notamment, chez *Chlorella vulgaris* qui était 20.32 % supérieur à la concentration en biomasse de *C. vulgaris* a augmenté régulièrement jusqu'à la fin de la culture dans les procédés auxiniques et de cocultures.

De plus, les résultats de la présente étude ont indiqué que les bactéries lactiques peuvent favoriser considérablement la productivité et la croissance spécifique de C. vulgaris sur les effluents laitiers (tab. XIII). En effet, après seulement 3 jours de culture, les taux de croissance spécifique les plus élevés ont été enregistrés sur le milieu SWW – L et qui était d'environ 3 fois supérieur à ceux obtenus sur le milieu témoin BM, respectivement, ($\mu_{max} = 1,425 \pm 0,152 J^{-1}$) et ($\mu_{max} = 0.542 \pm 0.021 J^{-1}$). De même s'agissant de la productivité volumétrique, nous avons obtenu un P_{max} (0,999 ± 0,024 g/L·J) supérieur par rapport au milieu témoin BM (P_{max} = $0,519 \pm 0,003$ g/L · J). Néanmoins, au-delà les valeurs du μ_{max} et de P_{max} ont commencé à décliner pour atteindre ($\mu_{max} = 0.433 \pm 0.04 J^{-1}$) et ($P_{max} = 0.537 \pm 0.003 \text{ g/L} \cdot \text{J}$) à la fin de la culture. Ces mêmes observations ont été rapportées par YEE et al. (2021) chez Chlorella vulgaris en coculture photoautotrophe sur un milieu synthétique avec des bactéries floculantes (B. infantis un bio-floculant) à savoir une augmentation de μ_{max} et de P_{max} durant les 3 premiers jours de culture qui ont été suivis par un déclin de μ_{max} et de P_{max} par rapport au milieu axénique, après la deuxième croissance. A l'inverse, sur le milieu PLSWW un μ_{max} supérieur d'environ 2 fois et un P_{max} supérieure d'environ 37 % à ceux du milieu témoin (BM) ont été atteints à la fin de la phase exponentielle (après 4 jours) ($\mu_{max} = 0.933 \pm 0.023 J^{-1}$) et (P_{max} $= 1.099 \pm 0.025 \text{ g/L} \cdot \text{J}$).
Chlorella vulgaris	P(max) (g/ L. jours)	$\mu_{max} (Jours^{-1})$	Nombre de cellules (cells/mL)
BM	0,697 ± 0,007	0,542 ± 0,021	9,75E+08
SWW – Lactobacillus	0,999 ± 0,024	1,425 ± 0,152	2,50E+08
PLSWW	1,099 ± 0,025	0,933 ± 0,023	6,88E+08

Tableau XIII : Apport des bactéries lactiques sur les paramètres de croissance de *Chlorella* vulgaris (p < 0.05)

Par contre, s'agissant du nombre de cellules (cells/ ml), le même constat que celui sur les cultures photoautotrophes sur les effluents dilués est observé. A savoir un nombre de cellules par millilitre de milieu inférieur sur les milieux à base d'effluents laitiers par rapport au témoin BM. Les observations au microscope de la taille et de la forme des cellules confirment l'analogie avec les observations rapportées précédemment soulignant une réelle augmentation de la taille des cellules de *C. vulgaris*. A cet égard, nous supposons que cette magnification serait due à l'utilisation par *C. vulgaris* à du carbone organique.

Dans cette étude, la culture de *C. vulgaris* sur les deux conditions à base d'effluents laitiers a montré une augmentation notable de la croissance du jour 1 au jour 3 et où 4 ($p \le 0, 05$), par rapport à la condition axénique, ce qui laisse supposer une utilisation de carbone organique qui était présent dans les milieux PLSWW et SWW – L mis à disposition des microalgues par *L. helveticus*.

Dans le premier cas (PLSWW), *C. vulgaris* a atteint sa phase stationnaire après 4 jours de culture. A cet effet, nous supposons un développement en condition mixotrophe profitant ainsi du mono-sucre présent dans le milieu à la suite du prétraitement du milieu SWW avec la bactérie *L. helveticus*. En effet, il est admis que l'assimilation des disaccharides, en particulier du lactose, par *Chlorella* a déjà été signalée comme étant négligeable (RODRIGUEZ, 1966; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Néanmoins, *C. vulgaris* peut utiliser le glucose et le galactose en culture avec une prédilection sélective pour le glucose par rapport au galactose en condition hétérotrophe (ESPINOSA-GONZALEZ et *al.*, 2014) et mixotrophe (ABREU et *al.*, 2012). Par ailleurs, selon ESPINOSA-GONZALEZ et *al.* (2014) le glucose peut être considéré comme la meilleure source de carbone organique pour la croissance de *Chlorella vulgaris*.

Dans notre étude, SWW a été prétraité avec *L. helveticus* une souche largement adaptée à la niche de l'environnement laitier, ce sont des cellules bacilliformes qui convertissent le lactose et d'autres sucres en acide lactique en tant que produit métabolique majeur final (SLATTERY et *al.*, 2010). A cet égard, cette espèce est connue pour sa prédilection sélective au galactose (HICKEY et *al.*, 1986). Dans une étude, la souche *L. helveticus* en présence du lactose, a mobilisé la fraction galactose du lactose, tandis que d'autres souches telles que *L. bulgaricus* et *L. lactis* ont libéré du galactose dans le milieu de croissance. Par conséquent, nous supposons que la souche lactique a mis à la disposition de *C. vulgaris* du glucose auquel s'ajoutent les sucres simples issus de la dégradation du lactose suite au prétraitement physique du SWW (généralement 2 g/ L de glucose) ce qui a permis une croissance soutenue et rapide de la microalgue verte sur le milieu PLSWW.

Dans le second cas, sur les deux systèmes de coculture d'algues sur les effluents laitiers, nous constatons que le cycle de croissance de *C. vulgaris*, dans la condition (SWW – L), affichait deux cycles successifs espacés par une phase de culture stationnaire. Ainsi, il fallait à *Chlorella*

un temps pour disposer d'une autre quantité optimale de sucre monomère pour croître à nouveau et que la relation s'installe. Sur ce principe, une interaction biologique s'est produite modifiant le comportement métabolique des microalgues et bactéries lactiques pour répondre aux besoins les unes et des autres pour la régulation des mécanismes nutritifs, surtout sur un milieu nutritif adapté à la culture de microalgue et qui reste un milieu spécifique pour la bactérie lactique. Ainsi, nous supposons que la Chlorella en coculture avec L. helveticus présentait une relation du type symbiotique. A cet effet, nous avons remarqué que le cycle de Chlorella vulgaris été synchronisé avec celui de la bactérie. Ainsi, la bactérie lactique a atteint sa croissance stationnaire entre le $6^{\text{ème}} \sim 7^{\text{ème}}$ jour puis demeure stable entre le $8^{\text{ème}} \sim 9^{\text{ème}}$ jour et décline à partir du 10^{ème} jour (résultats non présentés). De la même façon, la croissance de C. vulgaris paraît calquer sur ce modèle et l'espèce microalgale termine sa croissance et rentre dans sa phase stationnaire peu de temps après celle de la bactérie lactique. Selon HAN et al. (2016), en coculture, les bactéries bénéficient de l'oxygène et des substances extracellulaires générées par les microalgues tout en mettant à disposition des microalgues une source de carbone, vitamines et autres substances nécessaires à une croissance optimale. Par ailleurs, de multiples relations existent entre les bactéries et les microalgues qui peuvent être mutuellement bénéfiques, symbiotiques ou parasitaires (RAMANAN et al., 2016; CHO et al., 2015). Ainsi, les microalgues sont abondantes dans le milieu naturel et coexistent avec un large éventail de microorganismes (FUENTES et al., 2016; BERTHOLD et al., 2019). De plus, les relations symbiotiques entre les algues et les micro-organismes jouent un rôle important dans les écosystèmes naturels (SILVA-BENAVIDES & TORZILLO, 2012).

Les suppositions émisses sont confirmées par l'analyse de l'évolution de la teneur en chlorophylle au niveau des différents milieux testés (fig. 44) et de la coloration de ces derniers. A cet effet, nous avons noté une diminution de la concentration de colorant chlorophyllien avec le temps, probablement due à une limitation de la pénétration de la lumière et/ ou à l'utilisation même de la lumière (changement du mode de nutrition) (fig. 45).

Dans la plupart des systèmes de monoculture d'algues, l'accumulation de la chlorophylle se produit dans des conditions photoautotrophes optimales. Néanmoins, ces conditions résultent des différents facteurs environnementaux qui induisent une teneur réduite en chlorophylle pouvant aller jusqu'à l'inhibition de la productivité de la biomasse. Ainsi, sur le milieu BM, le pic de la chlorophylle coïncidait avec la période de croissance logarithmique et ne coïncidait pas avec la concentration de biomasse la plus élevée ce qui rejoint les observations de HALFHIDE et *al.* (2014). En effet, la diminution des teneurs en Chlorophylle a et b juste après le pic peut être due à la turbidité du milieu sur-foncée par la concentration cellulaire dans les réacteurs (5 cm \emptyset) qui empêchent ainsi le passage de la lumière jusqu'au centre.

Par ailleurs, au cours du développement des microalgues cultivées sur les milieux à base d'effluents laitiers, la teneur en chlorophylle prend une tendance décroissante caractéristique de croissance en mode mixotrophe voire hétérotrophe. Nous suggérons que le développement de l'appareil photosynthétique chez *Chlorella* peut être perturbé par la présence de substrats organiques (YANG et *al.*, 2000), entraînant une diminution de la production de pigments photosynthétiques par rapport à celle obtenue en mode photoautotrophe.



Figure 44 : Évolution de la teneur en chlorophylle chez C. vulgaris dans les milieux de culture

A cet effet, les teneurs les plus élevées en chlorophylle ont été obtenues dans la culture photoautotrophe par rapport aux cultures que nous supposons mixotrophes ce qui confirme nos suppositions et rejoint les observations de YANG et *al.* (2000), par ailleurs. En outre, l'amélioration de la biosynthèse de la chlorophylle par des souches photoautotrophes de *Chlorella vulgaris* par rapport à celle résultant de cellules mixotrophes a déjà été rapportée par plusieurs auteurs (IP et *al.*, 2004; KONG et *al.*, 2011; ABREU et *al.* 2012). En revanche, YAN et *al.* (2016) ont rapporté qu'une faible teneur en chlorophylle dans les cellules mixotrophes diminue la dépendance à la lumière. Par conséquent, une quantité réduite de chlorophylle dans les microalgues peut atténuer la photoinhibition





Parmi les différents modes nutritionnels testés, la teneur en caroténoïdes la plus élevée (0,85 mg/g) a été trouvée dans la culture photoautotrophe. Cette valeur a chuté à 0,22 mg/g et 0,11 mg/g lorsque les cellules ont été cultivées dans le milieu PLSWW et SWW – L, respectivement. Ces résultats sont cohérents avec ceux de LIU et *al*. (2009) et de ABREU et *al*. (2012) chez *Chlorella vulgaris* qui ont trouvé une quantité inférieure de caroténoïdes dans les cellules mixotrophes par rapport aux cellules cultivées en culture photoautotrophe.

Considérant que nos cultures sur les effluents laitiers se sont conduites en mixotrophie. La comparaison de nos résultats à ceux de culture mixotrophe sur des effluents laitiers fait ressortir ce qui suit :

Dans cette étude, la croissance mixotrophe de *C. vulgaris* dans du sucre-monomère a permis l'obtention d'une productivité et d'un taux de croissance spécifique plus élevés que ceux obtenus dans des conditions photoautotrophes ce qui rejoint les résultats de plusieurs recherches notamment ABREU et *al.* (2012) μ_{max} (0.43 ± 0.00 J⁻¹) et P_{max} (0.75 ± 0.01 g/L·J). A cet égard, la culture de cellules mixotrophes utilisant à la fois la lumière et une source de carbone organique a été considérée comme le processus le plus efficace pour la production de biomasse microalgale (LEE et *al.*, 1996). En outre, lorsque l'énergie utilisée pour la fixation du *CO*₂ est diminuée dans les cultures mixotrophes, la majeure partie de l'énergie est utilisée pour l'assimilation du carbone. Ainsi, la quantité d'énergie dissipée étant minime, la mixotrophie offre une efficience énergétique supérieure aux autres modes de culture (LALUCAT et *al.*, 1984). Par ailleurs, il convient de mentionner que le substrat organique a joué un rôle important dans l'accumulation accrue de biomasse chez *C. vulgaris* lors de la culture des microalgues en condition mixotrophe. L'effet stimulant de la solution à base d'effluent laitier (PLSWW et SWW – L) sur la production de biomasse par rapport au milieu BM est probablement lié, entre autres, à la présence de certains nutriments dans la composition du milieu SWW, tel que le phosphore et le calcium présents dans ce type de lactosérum (acide) (MAVROPOULOU et KOSIKOWSKI, 1973). En effet, le phosphore est un macronutriment qui joue une fonction vitale dans les processus métaboliques cellulaires en formant de nombreux composants structurels et fonctionnels nécessaires à la croissance et au développement des microalgues (RICHMOND, 2004). Il convient de préciser que la teneur en minéraux du lactosérum dépend des techniques de traitement utilisées pour éliminer la caséine du lait liquide. Par conséquent, une concentration de biomasse microalgale moins élevée que celle trouvée dans notre étude a été obtenue en utilisant une solution la poudre de lactosérum du fromage (CW) acide en raison des concentrations plus élevées de calcium et de phosphore présents dans ce type d'effluent (MAVROPOULOU & KOSIKOWSKI, 1973).

5- Conclusion

Chlorella vulgaris est un microorganisme photosynthétique unicellulaire qui utilise l'énergie lumineuse et le dioxyde de carbone, avec une efficacité photosynthétique supérieure à celle des plantes pour la production de biomasse. Cette espèce peut être destinée pour différentes applications, telles que la production de biocarburants et la purification des eaux usées dans des conditions autotrophes ou mixotrophes. A cet effet, la culture de *C. vulgaris* dans les eaux usées aide à éliminer efficacement l'azote, le phosphore et d'autres composés avec à la clé une production de biomasse algale plus élevée et la réduction des coûts de production du diesel algal de 20 à 30 %.

La présente étude examine la faisabilité de l'utilisation des eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage comme source de nutriments pour la culture et l'amélioration de la production de biomasse algale pour la filière biodiesel. Cela par le traitement de ces eaux usées salines via une microalgue verte *Chlorella vulgaris* en condition de laboratoire.

A cet effet, *Chlorelle vulgaris* a été cultivée sur les eaux usées salines en condition autotrophe en utilisant le principe de dilution. Les SWW ont été dilués avec le milieu synthétique (BG-11) (BM) à des ratios (BM:SWW) (2:1) et (1:2). Les expériences ont montré que la productivité volumétrique de divers traitements de dilution était remarquablement supérieure à celle des milieux témoins MB et SWW seul, respectivement, ($P_{(2:1)} = 0,665 \pm 0,111$, $P_{(1:2)} = 0,578 \pm$ 0,007, $P_{(sww)} = 0,562 \pm 0,011$ et $P_{(BM)} = 0,519 \pm 0,003$ g/ L. jours). A cet égard, SWW peut être considéré comme un milieu alternatif pour la culture photoautotrophe de *C. vulgaris*. Par ailleurs, il a été rapporté des croissances proportionnellement plus faibles de *C. vulgaris* sur l'effluent laitier non dilué par rapport aux milieux SWW dilué, probablement en raison de la forte turbidité inhibant la photosynthèse et par conséquent la croissance des algues. En outre, avec ces eaux usées riches en source de carbone, les cultures ont conduit à des contaminations. Ainsi, des protozoaires ont été détectés dans des cultures à base de SWW ayant entraîné l'instabilité de la culture. Aujourd'hui, l'une des stratégies de production efficaces de la biomasse algale permettant à la fois une croissance cellulaire rapide et une accumulation de lipides lors du développement des microalgues, est la coculture de microalgues avec des bactéries.

Au cours de cette étude, des expériences avec une stratégie de culture mixotrophe de Chlorella vulgaris ont été menées sur les SWW prétraités par une bactérie lactique (PLSWW) et sur les SWW en coculture avec une bactérie lactique (C. vulgaris – L. helveticus) (SWW–L). La culture sur le milieu (PLSWW) a montré une réactivité des réponses très courtes en culture (phase stationnaire atteinte en 4 jours) et une productivité volumétrique de $P_{\text{max}} = 1.099 \pm 0.025$ g/L. jours. En outre, l'analyse des résultats de la croissance sur le milieu (SWW-L) a révélé une relation symbiotique entre microalgue - bactérie lactique en condition mixotrophe. Ainsi, la culture sur le milieu (SWW-L) a démontré que le consortium Chlorella vulgaris -Lactobacillus helveticus pouvait améliorer le taux de croissance spécifique et les productivités volumétriques grâce à l'échange de carbone organique par rapport au milieu BM. Malgré cela, le nombre de cellules par millilitre de milieu était 04 fois inférieur sur les milieux à base d'effluents laitiers par rapport au témoin BM. Cependant, en regardant la taille et la forme des cellules en milieu SWW au microscope, on a pu s'apercevoir qu'il existe une réelle augmentation de la taille des cellules, de C. vulgaris, par rapport à la taille et à la forme des cellules en milieu BM ce qui explique les concentrations élevées de la biomasse obtenues avec les milieux contenant SWW.

Par rapport aux cultures photoautotrophes, les microalgues en conditions mixotrophes se sont développées plus rapidement, fournissant des productivités plus élevées de biomasse en raison des effets stimulants résultant des nutriments mis à disposition des microalgues par la bactérie lactique. A cet effet, la culture mixotrophe de *C. vulgaris* au niveau des SWW à l'aide de bactéries lactiques peut être considérée comme une stratégie réalisable pour réduire les coûts de production de la biomasse microalgale et le traitement des SWW dans les industries laitières.

Toutefois, différents facteurs tels que la source de carbone, le rapport carbone/azote, le niveau du pH initial, la salinité et la vitesse de rotation peuvent influer sur la croissance cellulaire et l'accumulation de lipides. De même, l'utilisation de culture hétérotrophe dans des bioréacteurs fermés pourrait être une meilleure option. Par conséquent, tous ces paramètres doivent être étudiés en profondeur pour obtenir l'interprétation la plus juste de la production de biomasse de microalgues qui semble avoir un avenir prometteur dans le monde entier.

6- Références bibliographiques

ABREU A. P., FERNANDES B., VICENTE A. A., TEIXEIRA J. & DRAGONE J., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. Bioresource Technology, 118: 61 – 66.

➢ BECKER E. W., 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press., Cambridge, 293 p.

BERTHOLD D. E., SHETTY K. G., JAYACHANDRAN K., LAUGHINGHOUSE H. D. I. V. & GANTAR M., 2019. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture. *Biomass and Bioenergy*, 122: 280 – 289. BRÁNYIKOVÁ I., MARŠÁLKOVÁ B., DOUCHA J., BRÁNYIK T., BIŠOVÁ K., ZACHLEDER V., VÍTOVÁ M., 2011. Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4): 766 – 776.

BRENNAN L. & OWENDE P., 2010. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14 (2): 557 – 577.

➢ BOHUTSKYI P., LIU K., KESSLER B. A., KULA T., HONG Y., BOUWER E. J., BETENBAUGH M. J. & ALLNUTT F. T., 2014. Mineral and non-carbon nutrient utilization and recovery during sequential phototrophic-heterotrophic growth of lipid-rich algae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 5261 − 5273.

➢ BOROWITZKA M. A., 2018. Biology of Microalgae. In LEVINME I. A. & FLEURENCE J., 2018. Microalgae in Health and Disease Prevention. (Eds.) Academic Press, USA, pp: 23 − 72.

CAVALIER-SMITH T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.*, 73: 203 – 266.

CAVALIER-SMITH T., 2010. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett.*, 6: 342 – 345

➤ CHAMPENOIS J., MARFAING H. & PIERRE R., 2015. Review of the taxanomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 27 : 1845 – 1851.

➢ CHEN G., ZHAO L. & QI Y., 2015. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, 137: 282 − 291.

▶ CHISTI Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25(3): 294 – 306.

CHO D.-H., RAMANAN R., HEO J., LEE J., KIM B.-H., OH H.-M. & KIM H.-S., 2015. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, 175(7): 578 – 585. DOI 10.1016/j.biortech.2014.10.159.

➤ CHOI Y. K., JANG H. M. & KAN E., 2018. Microalgal biomass and lipid production on dairy effluent using a novel microalga, *Chlorella sp.* isolated from dairy wastewater. *Biotechnol Bioproc.*, E (23): 333 – 340. <u>https://doi.org/10.1007/s12257-018-0094-y</u>

CHOKSHI K., PANCHA I., GHOSH A. & MISHRA S., 2016. Microalgal biomass generation by phycoremediation of dairy industry wastewater: an integrated approach towards sustainable biofuel production. *Bioresour. Technol.* 221: 455 – 460.

CONVERTI A, CASAZZA A. A., ORTIZ E. Y., PEREGO P. & DEL BORGHI M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing, 48: 1146 – 1151.

CROFT M. T., LAWRENCE A. D., RAUX-DEERY E., WARREN M. J., SMITH A. G., 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438: 90 –93.

DE-BASHAN L. E., BASHAN Y., MORENO M., LEBSKY V. K., BUSTILLOS J. J., 2002. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, 48: 514 – 521.

➢ DIBLÍKOVÁ L., ČURDA L. & KINČL J., 2013. The effect of dry matter and salt addition on cheese whey demineralisation. *International Dairy Journal*, 31: 29 − 33.

DING J., ZHAO F., CAO Y., XING L., LIU W., MEI S. & LI S., 2015. Cultivation of microalgae in dairy farm wastewater without sterilization. *Int. J. Phytoremediation*. 17: 222 – 227.

▶ ESPINOSA-GONZALEZ I., PARASHAR A. & BRESSLER D. C., 2014. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology*, 155: 170 – 176.

➢ FENG X., WALKER T. H., BRIDGES W. C., THORNTON C. & GOPALAKRISHNAN K., 2014. Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. *Bioresource Technology.*, 166: 17 − 23.

➢ FRANKLIN N. M., STAUBER J. L., LIM R. P., & PETOCZ P., 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 2412 – 2422.

FUENTES J. L., GARBAYO I., CUWERESMA M., MONTERO Z., DEL-VALLE M. G. & VILCHEZ C., 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, 14(5): 100 DOI 10.3390/md14050100

➢ GAO F., YANG Z. H., LI C., ZENG G.-M., MA D.-H. & ZHOU L., 2015. A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent. *Bioresource Technology*, 179: 8 − 12.

➢ GITELSON A., GRITS Y., ETZION D., NING Z. & RICHMOND A., 2000. Optical properties of *Nannochloropsis sp.* and their application to remote estimation of cell mass. *Biotechnol. Bioeng.*, 69(5): 516 − 525.

➢ GONÇALVES A. L., PIRES J. C. & SIMÕES M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.*, 24: 403 − 415.

➤ GARCIA L. C., 2012. The promises of *Chlorella vulgaris* as the best alternative for biodiesel: A review. *Journal of Nature Studies*, 11: 103 – 123.

GERNIGON G., SCHUCK P., JEANTET R., BURLING H., 2011. Encyclopedia of dairy sciences. 2nd editions, *Elsevier Applied Science*, London

GUEDES A. C., AMARO H. M. & MALCATA F. X., 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9: 625 – 644.

➢ HALFHIDE T., ÅKERSTRØM A., LEKANG O. I., GISLERØD H. R., ERGAS S. J., 2014. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. *Algal Res.*, 6: 152–159. <u>https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.009</u>.

▶ HAN J., ZHANG L., WANG S., YANG G., ZHAO L. & PAN K., 2016. Co-culturing bacteria and microalgae in organic carbon containing medium. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 23(1):8. DOI 10.1186/s40709-016-0047-6.

▶ HENA S., FATIHAH N., TABASSUM S. & ISMAIL N., 2015. Three stage cultivation process of facultative strain of *Chlorella sorokiniana* for treating dairy farm effluent and lipid enhancement. *Water Res.*, 80: 346 – 356.

➢ HENRIQUES M., SILVA A. & ROCHA J., 2007. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Méndez-Vilas (Ed.), pp: 586 – 593.

HICKEY M. W., HILLIER A. J. & JAGO G. R., 1986. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol., 51(4): 825 – 831. doi:10.1128/aem.51.4.825-831.1986

➢ HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., & DARZINS A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54: 621 – 639.

▶ HUMHAL T., KASTANEK P., JEZKOVÁ Z., CADKOVÁ A., KOHOUTKOVÁ J., BRANYIK T., 2017. Use of saline waste water from cheese whey demineralization for cultivation of lipid rich biomass of *Schizochytrium limacinum* PA-968 and *Japonochytrium marinum* AN-4. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 40: 395 – 402.

▶ **HUMPHREY A. M., 1981.** Chlorophyll. *Food Chemistry*, 5 (1): 57 – 67.

➢ IP P.-F., WONG K.-H. & CHEN F., 2004. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga Chlorella zofingiensis in mixotrophic culture. *Process Biochem.*, 39(11): 1761 – 1766.

➤ JOHNSON M. B. & WEN Z., 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 525 – 534.

➢ KLASS D. L., 2004. Biomass for renewable energy and fuels. *In* CLEVEL C. J., 2004. Encyclopedia of energy, Vol. 1, eds Elsevier, Inc., Amsterdam, pp: 193 − 212.

≻ KONG W., SONG H., CAO Y., YANG H., HUA S. & XIA, C., 2011. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (55): 11620 – 11630.

KNOTHE G., 2008. "Designer" biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy and Fuels*, 22: 1358 – 1364.

► LALUCAT J., IMPERIAL J. & PARÉS R., 1984. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella sp.* VJ79. *Biotechnol. Bioeng.*, 26 (7): 677 – 681.

➤ LAM M. K., YUSOFF M. I., UEMURA Y., LIM J. W., KHOO C. G., LEE K. T., ONG H. C., 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, 103: 197 – 207.

LEE Y.-K., DING S.-Y., HOE C.-H. & LOW C.-S., 1996. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 8 (2): 163 – 169.

▶ LEE Y.-K., 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.*, 13: 307 – 315.

LI Y., HORSMAN M., WU N., LAN C. Q. & DUBOIS-CALERO N., 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24 : 815 – 820.

➢ LIU X., DUAN S., LI A., XU N., CAI Z. & HU Z., 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. J. Appl. Phycol., 21 (2), 239 − 246.

➤ MENETREZ M. Y., 2012. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. Environ. Sci. Technol. 46, 7073–7085

➢ MARUYAMA I., NAKAO T., SHIGENO I., ANDO Y. & HIRAYAMA K., 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer. *Brachionus*. *Hydrobiologia*, 358: 133 − 138.

➤ MAVROPOULOU I. P., & KOSIKOWSKI F. V., 1973. Composition, solubility, and stability of whey powders. *J. Dairy Sci.*, 56(9): 1128 – 1134.

➤ MILLEDGE J. &HEAVEN S., 2013. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 12 (2) : 165 – 178.

➢ MOLINA GRIMA E., BELARBI E. H., ACIÉN FERNÁNDEZ F. G., ROBLES MEDINA A., CHISTI Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol. Adv.*, 20 (7−8), 491 – 515.

➤ MONFET E., UNC A., 2017. Defining wastewaters used for cultivation of algae, *Algal Res.*, 24: 520 – 526. <u>https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.008</u>.

➢ MOUGET J-L., DAKHAMA A., LAVOIE M. C., DE LA NOÜE J., 1995. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? FEMS *Microbiol Ecol.*, 18: 35 − 43.

▶ NAM K., LEE H., HEO S.-W., CHANG Y. K. & HAN J.-I., 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* with swine wastewater and potential for algal biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*, 29: 1171 – 1178.

PEREZ-GARCIA O, ESCALANTE F. M. E., DE-BASHAN L. E. & BASHAN Y.,
 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water Res., 45: 11 – 36.

➢ RAMANAN R., KIM B. H., CHO D. H., OH H. M. & KIM H. S., 2016. Algae– bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology* Advances, 34(1):14 − 29. DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003

RICHMOND A., 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. (First ed.) *Blackwell Science*, Oxford.

RODRIGUEZ M., 1966. Utilization of sugars by *Chlorella* under various conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 43: 139.

SAFI C., ZEBIB B., MERAH O. & PONTALIER P., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35: 265 – 278.

SHARMA R., SINGH G. P. & SHARMA V. K., 2012. Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of Chlorella vulgaris. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3: 1-6.

SILVA-BENAVIDES A. M. & TORZILLO G., 2012. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(2): 267–276. DOI 10.1007/s10811-011-9675-2.

SLATTERY L., CALLAGHAN J. O., FITZGERALD G. F., BERESFORD T. & ROSS R. P., 2010. Invited review: Lactobacillus helveticus—A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93(10): 4435 – 4454.

STANIER R., KUNISAWA R., MANDEL M. & COHEN-BAZIRE G., 1971. BG11 (blue green medium). Cult. Collect. *Algae Protozoa*, 11, 559001.

STEPHENS E., ROSS I. L., MUSSGNUG J. H., WAGNER L. D., BOROWITZKA M. A., POSTEN C. & HANKAMER B., 2010. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Sci.*, 15: 554 – 564.

SPOLAORE P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN E. & ISAMBERT A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 87 – 96.

➤ **TOMASELLI L., 2004.** The microalgal cell. *In* **RICHMOND A., 2004.** Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. (Eds.) *Blackwell Science Ltd.*, Oxford, UK.

➢ UMMALYMA S. B. & SUKUMARAN R. K., 2014. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresour. Technol.*, 165: 295 – 301.

➢ VITOVA M., BISOVA K., KAWANO S., & ZACHLEDER V., 2015. Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33: 1204 − 1218.

➤ WANG L., LI Y., CHEN P., MIN M., CHEN Y., ZHU J. & RUAN R. R., 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp. Bioresour. Technol.*, 101: 2623 – 2628.

➢ WEN Z., LIU J. & CHEN F., 2011. Biofuel from Microalgae. In Moo-Young, M. 2011. Comprehensive Biotechnology. (Ed.) *Pergamon Press*, Second Edition, Oxford, Chap. III, pp: 127 − 133.

WELLBURN, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenpoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144: 307 - 313.

➢ YEE C. S., OKOMODA V. T., HASHIM F., WAIHO K., SHEIKH ABDULLAH S. R., ALAMANJO C., ABU HASAN H., MUZALINA MUSTAFA E. & KASAN N. A., 2021. Marine microalgae co-cultured with floc-forming bacterium: Insight into growth and lipid productivity. *PeerJ.*, 9:e11217. DOI 10.7717/peerj.11217

> YAN N., FAN C., CHEN Y. & HU Z., 2016. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. Int. J. Mol. Sci., 17(6): 962 – 986.

➢ YEH K. L. & CHANG J. S., 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105: 120 − 127.

➤ YANG C., HUA Q. & SHIMIZU K., 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng.* J., 6(2): 87 – 102.

➤ YAMAMOTO M., FUJISHITA M. & HIRATA A., 2014. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117: 257 – 264.

➤ YAMAMOTO M., KURIHARA I. & KAWANO S., 2005. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 221 : 766 – 775.

➤ **ZHENG H., YIN J., GAO Z., HUANG H., JI X. & DOU C., 2011.** Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis and microwaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164 : 1215 – 1224.

Chapitre II.

Partie 2 : Modélisation et optimisation des conditions de culture hétérotrophes de *Chlorella vulgaris* dans les eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage par la méthode de surface de réponse (MSR)

^{1.} Djillali Ghobrini, Tomáš Brányik, Saliha Yakoub-Bougdal, Leila Kebbab, Bastien Poutout et Kamal Aïboud.

1. Cultivation of Chlorella vulgaris using medium from a dairy effluent. Publisher IEEE Xplore 02 May 2019. Published in: 2018 6th International Renewable and Sustainable Energy Conference (IRSEC) Rabat, Morocco, Morocco. (Papier conférence) <u>https://doi10.1109/IRSEC.2018.8702962</u>

Résumé

Une alternative appropriée pour remplacer les combustibles fossiles est la production de biodiesel à partir de microalgues. Ces derniers, constituent l'une des biomasses nonalimentaires et renouvelables des plus prometteuses. En effet, les microalgues ont le potentiel de produire des lipides avec une productivité élevée, par exemple deux à trois fois supérieures à celle des plantes. Le but de cette étude sera de développer des processus durables qui augmenteront la productivité, de maximiser l'efficacité de production et de réduire les coûts de la biomasse algale. À cet effet, *Chlorella vulgaris* a été évaluée pour sa capacité à se développer dans les eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage utilisé comme support de culture (SWW). L'optimisation des facteurs chimiques et physiques sur la production de biomasse chez *C. vulgaris* dans les SWW a été déterminée par la méthode des surfaces de réponses (RSM) et évaluée statistiquement par le logiciel Design-Expert, respectivement, en flacons agités et en bioréacteurs.

Les résultats obtenus montrent que le milieu SWW peut être considéré comme une alternative au milieu commercial pour la culture de microalgues d'eau douce.

Mots-clés : *Chlorella vulgaris*, eaux usées salines, développement durable, plan d'expérience, culture en batch, flacons agités, bioréacteur.

Abréviations :

IM : Milieu d'inoculum.

KLa : Coefficient volumique de transfert d'oxygène.

MBM : Milieu de base modifié.

 P_{max} : Productivité volumétrique maximale de la biomasse.

RSM : Méthode des surfaces de réponses.

SWW : Les eaux usées salines.

 μ_{max} : Taux de croissance spécifique.

 X_{max} : Concentration maximale en biomasse.

 $Y_{X/S}$: Coefficient de rendement.

YE : Extrait de levure.

1- Introduction

Au cours de ces dernières années, l'intérêt pour les microalgues a augmenté en raison de ses divers avantages tels que leur capacité à produire des composés biologiques d'intérêt industriel (YAN & ZHENG, 2013, WU & MIAO, 2014). Ainsi, les microalgues sont capables d'accumuler de grandes quantités de lipides, dans des conditions environnementales défavorables, (CHISTI, 2007; CHEN et al., 2011), ce qui convient à la production de biodiesel par transestérification (RODOLFI et al., 2009). De plus, le coût de production raisonnablement bas et la rapidité de la récolte font de l'exploitation des microalgues une option économiquement compétitive (FENG et al., 2011). Cependant, une concentration élevée de lipides est généralement inversement corrélée à la productivité de la biomasse et, par conséquent, à la productivité des lipides (HANNON et al., 2010; MANDAL et al., 2020). Ainsi, l'optimisation des conditions appropriées pour produire à la fois une augmentation des lipides et de la biomasse peut être difficile, car les conditions de culture requises pour une productivité plus élevée des deux résultats sont contradictoires (HU et al., 2008; MARKOU & NERANTZIS, 2013). Toutefois, si le taux de croissance élevé et la teneur en lipides sont combinés, les microalgues deviendraient une matière première prometteuse pour la production de biocarburants, en particulier pour le biodiesel (CHEN et al., 2011). Par rapport aux cultures de biocarburants à base de plantes, les microalgues peuvent également s'adapter à une plus grande variété de source d'eau (douce, saumâtre, saline et eaux usées) (RAWAT et al., 2011; DAROCH et al., 2013; KOTHARI et al., 2013); et potentiellement recycler d'autres flux de déchets liquides riches en nutriments ce qui fait d'eux un parfait agent de bioremédiation (CHINNASAMY et al., 2010a). Par ailleurs, l'application d'eau non-potable contribue à réduire l'empreinte hydrique de la production de biocarburants à base de microalgues (CHEN et al., 2011). Le problème le plus fréquent de la culture industrielle des algues reste dans les coûts de production et de récolte. Par conséquent, l'expérimentation et la recherche dans le domaine de la biotechnologie se concentrent sur l'augmentation de la productivité en trouvant de nouveaux moyens de production, mais aussi sur la création d'une production écologique dans un processus de développement durable. Pour une production économique de biomasse algale, les conditions de croissance telles que la lumière (intensité et durée), la source de carbone organique (pour le métabolisme hétérotrophe), le type de support, les apports en nutriments (N et P) doivent être optimisés dans les réacteurs algaux (FRIED et al., 2003; XIN et al., 2010; LAI et al., 2011).

Actuellement, l'industrie laitière représente une activité de grande importance dans l'économie mondiale. Par conséquent, le traitement des eaux usées de l'industrie laitière est de la plus haute importance (DE OLIVEIRA NUNES et *al.*, 2021). Même après un traitement primaire et secondaire, les eaux usées peuvent contenir une quantité importante de nutriments inorganiques, tel que le nitrate et le phosphate, qui permettent l'eutrophisation des masses d'eau (KOTHARI et *al.*, 2013). Ainsi, le traitement par déminéralisation du lactosérum du fromage pour un usage alimentaire produit des eaux usées avec une teneur importante en sels qui complique leur traitement avant rejet selon les législations en vigueur (GERNIGON et *al.*, 2011). Néanmoins, ces eaux usées peuvent être considérées comme un milieu de croissance potentiel et durable pour la production de biomasse algale (HUMHAL et *al.*, 2017). L'utilisation de microalgues dans le traitement et le recyclage des eaux usées a suscité beaucoup d'intérêt en raison de la production de biomasse à moindre coût et sans apport supplémentaire de nutriments

(KOTHARI et al., 2012). À cet effet, l'utilisation de microalgues photohétérotrophes dans le traitement biologique des eaux usées représente un double enjeu dans l'exploitation des microalgues vertes. D'un côté, pour l'élimination des polluants organiques et inorganiques dissous. De l'autre, pour la production de bioressources durables à la fabrication de biocarburants (GULDHE et al., 2017; VO HOANG NHAT et al., 2018; LI et al., 2019). Toutefois, l'influence des différentes teneurs en éléments nutritifs dans les milieux (eaux usées) sur la croissance des algues nécessite des études élaborées (SUTHAR et al., 2015). De même, pour une mise à l'échelle de bioréacteur, un KLa constant permet d'améliorer la productivité des microalgues (GARCIA-OCHOA & GOMEZ, 2009). En effet, malgré la capacité prometteuse des microalgues à éliminer les nutriments des eaux usées et à générer une biomasse de haute qualité, les variations des concentrations de nutriments et un KLa fluctuant pourraient entraver la mise en œuvre du traitement tertiaire des microalgues dans les systèmes de culture (CHAMBERLIN et al., 2018; RODAS-ZULUAGA et al., 2021). Aujourd'hui, pour coupler efficacement le traitement des eaux usées laitières et la production de biodiesel, la sélection des espèces de microalgues appropriées est un point essentiel de sorte que les espèces sélectionnées ne doivent pas seulement bien pousser dans l'effluent, mais également éliminent efficacement les nutriments inorganiques et accumulent une teneur élevée en lipides dans les cellules (XIN et al., 2010). À cet égard, l'une des algues les plus intéressantes est Chlorella vulgaris qui est considérée comme une référence grâce à : i) sa croissance rapide, ii) son potentiel lipidique élevé, iii) sa robustesse, iv) ses applications dans le traitement d'eaux usées en raison de sa grande tolérance aux composés organiques solubles (CHINNASAMY, et al., 2010b; DE-BASHANA et al., 2012) et même pour sa capacité à croître sous des concentrations élevées en sel dans le milieu (CHURCH et al., 2017). Par ailleurs, cette espèce est habilitée à croître sous un régime de croissance hétérotrophe pour la production de métabolites, ce mode est économiquement utile, compte tenu des simplifications significatives des procédés de culture et des coûts de production de la biomasse et de la productivité de l'huile microalgale (MIAO et WU, 2006). La croissance hétérotrophe consomme des sources de carbone simples, bon marché et disponibles (glucose, acétate, glycérol) qui sont couramment utilisés par les industries de fermentation à d'autres fins (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Afin de mieux appréhender nos objectifs lors de l'application d'eaux usées laitières (SWW) comme milieu de croissance des microalgues en conditions hétérotrophes, il est important d'optimiser les paramètres de culture, notamment les facteurs nutritionnels (chimiques) et environnementaux (physiques) pour assurer la disponibilité des principaux nutriments et de moduler les facteurs environnementaux. À cet égard, les méthodes statistiques sont considérées comme une approche efficace et puissante pour le dépistage rapide des facteurs clés à partir d'un système multivariable afin d'optimiser les conditions de culture et environnementaux. Dans ce contexte, la méthodologie des surfaces de réponse a été utilisée, d'une part, pour optimiser de la composante nutritionnelle (facteurs chimiques) du milieu SWW pour la croissance de *C. vulgaris* en flacons agités. De l'autre, pour l'optimisation de l'impact de la vitesse d'agitation et du débit d'air sur le coefficient de transfert volumétrique du dioxygène (K_La) (facteur physique) pour la culture de microalgue dans les effluents laitiers en bioréacteurs. Enfin, les résultats des tests d'optimisation sont considérés pour des cultures batch et fed-batch en bioréacteur pour évaluer la cinétique de croissance de *C. vulgaris* sur les SWW en condition hétérotrophe. Les

résultats seront comparés avec des cultures sur le milieu nutritif (MBM) une variante du milieu BG11 dans les mêmes conditions.

2- Matériels et méthodes

2.1- Souche de C. vulgaris utilisée

Pour cette expérience, nous avons utilisé *Chlorella vulgaris* CCALA 256 de couleur verte Beijerick qui provient de la collection des organismes autotrophes (CCALA) à Trebon[°], République tchèque (fig. 46).



Figure 46 : Souche de C. vulgaris CC256 en culture dans la boîte de Pétri

2.2- Milieux de culture utilisés

2.2.1- Milieu de base pour boîte de Pétri (M boîte de Pétri)

Nous utilisons des boîtes de Pétri pour maintenir les souches en vie sur de longues périodes et les repiquages sont effectués toutes les deux semaines pour avoir les souches pures et éventuellement les plus réactives. Le milieu de base utilisé pour la conservation des cultures est le milieu BG11 auquel nous avons porté quelques modifications, comme ajout d'une source de carbone et la modification des concentrations de certains sels tels que (N, P et Mg) (tab. XIV). Le milieu est solidifié par de l'agar à 15 g/ L et le pH est ajusté à 6.8 avec du NaOH (1M) avant autoclavage 15 minutes à 120 °C.

Compositions	Concentration (mg/ L eau distillée)
Glucose	5000
NaNO ₃	7000
KH ₂ PO ₄	1000
MgSO ₄ , 7H ₂ O	500
$C_{10}H_{12}O_8N_2NaFe$	40
CaCl ₂	88
H ₃ BO ₃	0.832
$CuSO_4$, $5H_2O$	0.946
$MnCl_2$, $4H_2O$	3.294
$CoSO_4$, $7H_2O$	0.616
$ZnSO_4$, $7H_2O$	2.678
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.172
(NH ₄)VO ₃	0.0014

Tableau XIV : Composition du milieu de base pour boîte de Pétri (M boîte de Pétri).

2.2.2- Milieu de base Modifié pour les précultures (MBM préculture)

Avant toute culture, il est nécessaire d'inoculer une préculture afin que la souche puisse s'adapter aux conditions de la culture spécialement quand il s'agit dans notre cas de concentrations élevées en sels. La composition de ce support a été préparée suite à la modification du milieu de base BG11 (tab. XV).

Composition	Concentration (mg/ L eau distillée)
Glucose	20000
NaNO ₃	8000
KH ₂ PO ₄	1400
MgSO ₄ , 7H ₂ O	500
$C_{10}H_{12}O_8N_2NaFe$	40
CaCl ₂	88
H ₃ BO ₃	0.832
CuSO4, 5H2O	0.95
MnCl ₂ , 4H ₂ O	3.3
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0.616
ZnSO4, 7H2O	2.7
(NH4)6M07O24	0.17
(NH ₄)VO ₃	0.014

Tableau XV : Cor	nposition du	milieu pou	r les	précultures ((MBM	préculture)	en	(mg/	′L).	•
------------------	--------------	------------	-------	---------------	------	-------------	----	------	------	---

Le glucose a été additionné à une concentration de 20 g/L. Une fois le milieu préparé, le pH est ajusté à 6.8 et la stérilisation s'est faite à l'autoclave durant 15 minutes à 120 °C. L'inoculum de Chlorella vulgaris, pour les expériences de culture, a été cultivée pendant 5 jours dans des flacons d'Erlenmeyer de 500 ml avec 250 ml de milieu dans un agitateur incubateur orbital (150 rpm et 30 °C) et à l'obscurité. Cette suspension cellulaire a ensuite été utilisée pour inoculer le milieu MBM à 10 % (v/v) du volume total. Par ailleurs, le milieu de précultures permet de s'assurer sur l'absence de contamination et d'éliminer et ou réduire la phase de latence chez les microalgues sur le support de culture sensu stricto. À noter que les cultures ont été réalisées en trois répétition. Le troisième flacon servira à déterminer la phase stationnaire de la préculture par gravimétrie (Chap. III, Part. 1) et ainsi de déterminer à quel moment précis la souche sera prête à être inoculée, dans notre cas, il oscille aux alentours de 96 h.

2.2.3- Milieu de base Modifié pour les cultures (MBM)

Le milieu utilisé pour l'étude de la cinétique de croissance de la souche microalgale C. vulgaris a été initié sur une variante de la composition du milieu de base BG11 (tab. XVI).)

Composition	Concentration (mg. L ⁻¹ eau distillée)
NaNO ₃	12000
KH ₂ PO ₄	4000
MgSO ₄ , 7H ₂ O	3300
CaCl ₂	0.054
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.097
H ₃ BO ₃	0.022
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.0062
$MnCl_{2}, 4H_{2}O$	0.01
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0.007
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2.7
$(NH_4)_6MO_7O_{24}$	0.0035

Tableau XVI	Compo	osition du	milieu	défini	(MBM)

La modification a porté sur la concentration de certains sels majeurs tels que : l'azote, le phosphore et le magnésium, mais aussi la composition des microéléments qui ont été réduits au strict nécessaire. Dans ce milieu prédéfini, nous avons ajouté du glucose à une concentration de 20 g/ L, le pH est ajusté à 6.8 avant autoclavage (15 min à 120 °C).

2.2.4- Milieu de culture à base d'eaux usées salines (SWW)

Les eaux usées salines (SWW) de l'industrie laitière, après traitement secondaire, ont été obtenues auprès d'une entreprise de laiterie locale (Moravia Lacto a. s.) située dans la ville de Prague (République tchèque). Au laboratoire, ces eaux usées ont été prétraitées en ajoutant du NaOH 5M jusqu'à pH 7 (cf. chap. III part. I), autoclavées (120 °C pendant 20 min). Ces eaux ont été maintenues à température ambiante du laboratoire avant leur utilisation. Les analyses de SWW ont été réalisées par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République tchèque) et sa composition chimique est résumée dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Composition chimique des eaux usées salines (SWW) avant et après le traitement réalisé par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République tchèque).

	Avant	Std. deviation	Après	Std. deviation
Composantes du milieu	g.kg-1	g.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹
Matière sèche	16.8	0.01	17.10	1.20
Cendre	10.67	0.63	10.59	0.54
NKjeldah	0.299	0.09	0.340	0.00
Lactose	5.00	2.00	2.003	1.10
Cl	2.810	0.14	2.05	0.52
Р	0.720	0.08	0.162	0.11
SO4 ⁻²	0.503	0.12	0.507	0.00
Ca+2	0.784	0.01	0.138	0.10
Mg+3	0.153	0.01	0.093	0.02
К	3.450	0.13	3.845	0.44
Na	2.230	1.09	1.625	0.38
NO ⁻³	1.034	0.78	1.099	0.84

Protéine (1.99 ± 0.18) ; NH₄ (0.12 ± 0.07) et la conductivité $(1635 \pm 120 \text{ ms/m})$.

2.3- Culture en flacons agités

2.3.1- Test d'optimisation des nutriments pour la culture de *C. vulgaris* sur SWW en condition hétérotrophe par la méthode de surface de réponse (RSM)

La méthodologie des surfaces de réponse est un ensemble de techniques statistiques et mathématiques pour la conception d'expérimentation, la construction de modèles, l'évaluation des effets des facteurs et la recherche de conditions optimales.

Pour optimiser l'utilisation du SWW comme source de nutriments pour la culture hétérotrophe de *C. vulgaris*, un plan expérimental à (3) trois facteurs et à (3) trois niveaux a été établi. Ainsi, l'effet de trois différents sels (NaNO₃, KH₂PO₄ et MgSO₄.7H₂O), sur la croissance des microalgues dans cet effluent, ont été étudiés. À cet effet, la méthode des surfaces de réponses (RSM) a été utilisée et les variables ont été optimisées à l'aide d'un petit (design) plan composite central (CCD). Les données expérimentales ont été évaluées statistiquement en utilisant ANOVA (logiciel Design-Expert, version 9.0.4.1, Stat-Ease Inc., MN, USA) et la signification du modèle a été évaluée en utilisant la valeur F de Fisher. Les cultures ont été menées dans des flacons agités, la souche de *C. vulgaris* a été étudiée pour sa capacité à croître dans SWW comme composant de base suivant le modèle expérimental (tab XVIII). Les cultures

sont effectuées dans des flacons de 250 ml avec 125 ml de milieu, le volume de l'inoculum est de 10 % (v/v) du volume final de la culture. Les milieux sont stérilisés dans un autoclave type AURO et le pH est ajusté à 6.8 après autoclavage.

Tableau XVIII : Caractéristiques principales de la conception expérimentale

Design Summary	-								
Study Type	Respo Surfa	onse ace	Runs	16					
Initiation Design	Cent compo	ral osite	Blocks	No Blocks					
Design Model	Quad	ratic							
Factor	Name	Unit	Туре	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
А	N	g/L	Numeric	0.000	7.00	-1.000	1.000	3.500	2.767
В	Р	g/L	Numeric	0.000	1.00	-1.000	1.000	0.500	0.395
С	Mg	g/L	Numeric	0.000	0.50	-1.000	1.000	0.250	0.198

2.3.1.1- Sélection du modèle (plan d'expérience)

Les trois sels expérimentés, NaNO₃, KH₂PO₄ et MgSO₄.7H₂O, ont été testés pour trois conditions différentes : la plus élevée, la plus faible et la moyenne, respectivement, codée +1, -1 et 0. La conception est caractérisée comme décrite dans les tableaux XIX. Le nombre d'essais est de 16 comprenant (2) deux essais identiques qui serviront à tester la bonne reproductibilité de l'expérience. Ces (2) deux points sont centraux ce qui signifie qu'ils sont codés avec 0 pour les trois concentrations de sels testées (essais 9 et 15). L'expérience a été réalisée en double et la valeur moyenne a été prise comme réponse. À la fin du test, les facteurs significatifs au niveau de 95 % (P < 0,05) ont été considérés comme ayant un effet significatif sur la production de biomasse et seront utilisés pour une optimisation supplémentaire.

Std	Run	Block	Factor 1 A :	Factor 2 B : P	Factor 3 C : Mg
			N (g/L)	(g/L)	(g/L)
4	1	Block 1	7.00	1.00	0.00
14	2	Block 1	3.50	0.50	0.50
2	3	Block 1	7.00	0.00	0.00
3	4	Block 1	0.00	1.00	0.00
13	5	Block 1	3.50	0.50	0.00
6	6	Block 1	7.00	0.00	0.50
8	7	Block 1	7.00	1.00	0.50
7	8	Block 1	0.00	1.00	0.50
16	9	Block 1	3.50	0.50	0.25
5	10	Block 1	0.00	0.00	0.50
12	11	Block 1	3.50	1.00	0.25
1	12	Block 1	0.00	0.00	0.00
9	13	Block 1	0.00	0.50	0.25
11	14	Block 1	3.50	0.00	0.25
15	15	Block 1	3.50	0.50	0.25
10	16	Block 1	7.00	0.50	0.25

Tableau XIX : Conception expérimentale et niveau des variables pour (RSM)

2.3.2- Exploitation des résultats du modèle expérimental

2.3.2.1- Expériences d'optimisation de la concentration et de la source d'azote

Pour confirmer la qualité du modèle à prédire la production maximale de biomasse, des expériences supplémentaires utilisant ces conditions de culture optimisées ont été réalisées. Selon les résultats du plan d'expérience, les effets de l'optimisation de la concentration et de la source d'azote sur le taux de croissance spécifique et sur la productivité volumétrique chez *C. vulgaris* en culture hétérotrophe sur SWW ont été testés et comparés au milieu témoin MBM. Les milieux ont été préparés en utilisant des niveaux faibles et élevés de source d'azote organique simple [(NH₂) CO – urée] et/ou complexe [(YE – extrait de levure)] (tab. XX).

Tableau XX : Caractéristiques des différentes conditions de culture sous différentes sources et concentrations d'azote

Tests	Supplémenté
MBM	- Glucose (20 g/L)
SWW	- Glucose (20g/L)
SWW	- Glucose (20 g/L)
	- Urée (1.5 ; 3 ; 9 ; 15 et 24 g/L)
	- Extrait de levure (YE) (1.6 ; 3.2 ; 6.4 ; 10 et 14 g/L)

À noter que l'urée (thermolabile) est additionnée séparément au milieu SWW après autoclavage, filtrée à travers un microfiltre en nylon avec une maille de 0,22 μ m pour éviter la réaction de Maillard entre l'azote et le carbone.

2.4- Culture en bioréacteur

2.4.1- Préparation du bioréacteur

La fermentation est effectuée dans des bioréacteurs de 1,4 L (Multifors, Infors HT, Suisse). Le bioréacteur présente un ensemble de moteurs ; *i*) agitation à deux (02) turbines de type Rushton avec 6 pales de diamètre de 38 mm et *ii*) d'aération appropriée, mais aussi d'un biocontrôleur. Les bioréacteurs ont été assemblés selon les instructions du mode d'emploi. Après avoir déposé le milieu de culture dedans, ces derniers ont été stérilisés dans un autoclave modèle AURO à 120 °C pendant 15 min. Avant l'autoclavage, il est nécessaire de préparer des flacons spécifiques pour des solutions d'ajustement et d'étalonnage du capteur pH, pour la base du NaOH (1M) et pour l'acide du HCl (1M). Une fois le réacteur assemblé, les paramètres de culture seront définis et le logiciel de surveillance peut être lancé. Par ailleurs, selon les exigences des cultures, un agent démoussant (Antifoam SE-15 – Sigma Aldrich) est utilisé pour le contrôle de la mousse dans les réacteurs à environ 1 pour 100 ppm et la pompe pour l'alimentation en agent démoussant a été calibrée.

2.4.2- Sélection des grandeurs

2.4.2.1- Rappel du coefficient de transfert volumétrique du dioxygène KLa

L'intensification de la croissance des microalgues est parfois un processus coûteux qui doit être effectué de manière stratégique pour maintenir les rendements à l'échelle du laboratoire (RODAS-ZULUAGA et *al.*, 2021). Ces stratégies de mise à l'échelle sont difficiles à mettre en œuvre en raison des contraintes liées à l'optimisation comme la géométrie de la structure, les facteurs environnementaux, la nature et l'intensité du mélange et le débit d'alimentation en gaz du réacteur (GARCIA-OCHOA & GOMEZ, 2009). Le coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_{La}) est le paramètre le plus couramment utilisé pour évaluer les performances des bioréacteurs et améliorer la productivité des microalgues (BOROWITZKA & VONSHAK, 2017; INOSTROZA et *al.*, 2021). Généralement, le k_{La} est le paramètre de mise à l'échelle utilisé dans les systèmes de culture hétérotrophes (c'est-à-dire les bactéries et les levures) (GARCIA-OCHOA & GOMEZ, 2009). Ce paramètre détermine le taux de transfert de l'O₂ de la phase gazeuse vers la phase liquide (fig. 47). L'O₂ étant le principal élément de la fermentation des microalgues, car il est nécessaire de fournir de l'air au réacteur, le transfert de l'O₂ est déterminant pour leur croissance et pour la production ultérieure de métabolites de haute valeur (GARCIA-OCHOA & GOMEZ, 2009). Pour plus ample informations sur le taux de transfert d'oxygène dans les processus microbiens, veuillez-vous référer aux travaux de GARCIA-OCHOA & GOMEZ (2009).



Figure 47 : Étapes pour le transfert d'O₂ de la bulle de gaz à la cellule. Adapté de RODAS-ZULUAGA et *al.* (2021). (1) transfert de l'intérieur de la bulle vers l'interface gaz-liquide. (2) mouvement à travers l'interface gaz-liquide. (3) diffusion à travers un film relativement stagnant entourant la bulle. (4) écoulement à travers le liquide homogénéisé. (5) diffusion à travers le film relativement épais entourant la microalgue. (6) transport dans la microalgue. (7) transport à travers le cytoplasme jusqu'au site de la réaction.

2.4.2.2- Détermination du coefficient volumique de transfert d'oxygène KLa

Globalement, dans le bioréacteur, du dioxygène est transféré grâce au système d'aération (bullage) pour être consommé par la biomasse. S'agissant de réacteurs à agitation mécanique, la distribution de l'oxygène est généralement assurée par un anneau d'aération situé sous l'agitateur. Les bulles d'air émergeant de l'anneau d'aération, ils sont ensuite dispersés dans le milieu avec l'agitateur rotatif, augmentant ainsi l'interface liquide-gaz. En général, la diffusion de l'oxygène de la bulle dans le liquide, est considérée comme la plus lente de toutes et détermine le cours temporel de toute la transition. Par conséquence, le transfert d'oxygène à travers l'interface gaz-liquide (2) (cf. figure 47) reliant le flux de matière au gradient de concentration est défini par la loi de FICK et est donnée par les équations suivantes (1) et (2).

$$\left(\frac{dC}{dt}\right) = K_{L}a \cdot (c^{*} - C_{02})$$
(1)
$$\frac{ln (C^{*} - C_{02})}{C^{*}} = -K_{L}a \cdot (t)$$
(2)

L'équation représente le changement de la concentration en oxygène au fil du temps, le K_La (h⁻¹) est le coefficient de transfert volumétrique du dioxygène ; K_L (mh⁻¹) est le coefficient de transfert oxygène-gaz total par rapport au film liquide et a (m⁻¹) l'interface gaz/liquide spécifique (zone de transfert) ; C * (mol/L) représente la concentration en oxygène à l'équilibre au niveau de l'interface gaz/liquide (valeur maximale de la saturation en oxygène) et C_{02} est la concentration spécifique d'oxygène dissous dans le liquide (mol/L) (valeur réelle).

Pour connaître l'impact de l'agitation sur la croissance de *C. vulgaris* sous un K_La constant, il était important d'étudier l'effet de la vitesse de rotation des turbines (rpm – rotation par minute) et de l'intensité d'aération de la cuve (vvm – volume par volume de milieu par minute) sur le K_La. Ainsi, après préparation du réacteur, le coefficient volumique de transfert d'oxygène (k_La) est déterminé selon la méthode « *gas out-gas in* » au niveau des deux milieux MBM et SWW. À cet effet, le capteur de *l'O₂* dans les cuves a été calibré. De même, de l'azote est ajouté à l'intérieur du contenu du réacteur pour éliminer toute trace $d'O_2$ à l'intérieur des milieux MBM et SWW. Après saturation du réacteur en azote et diminution de la concentration en oxygène à zéro, l'aération a été démarrée et la valeur de saturation en oxygène a ensuite été enregistrée à cinq secondes d'intervalle. Cette détermination a été répétée 11 fois pour les paramètres énumérés dans les tableaux de la conception expérimentale pour les deux milieux. Les résultats du K_La sont obtenus par le coefficient linéaire de la courbe, équation (3) (cf. l'exemple de calcul en annexe 2).

$$\frac{\ln (C^* - C_{O2})}{C^*} = f(t)$$
 (3)

2.4.3- Conception expérimentale

L'impact de la vitesse de rotation des turbines (RPM – rotation par minute) et de l'intensité d'aération de la cuve (VVM – volume par volume de milieu par minute) sur le K_La ont été optimisés par la méthode de surface de réponse (RSM). Deux différents plans d'expériences à deux facteurs 2³ (en milieu défini MBM et en SWW) sur la variation de la vitesse d'agitation et du débit d'oxygène ont été dressés et les variables ont été optimisées à l'aide de trois points centraux (CCD) pour vérifier la stabilité des résultats. De même, à partir des données mesurées, le polynôme de calcul de la valeur du K_La, valable pour les cultures, a été additionné et évalué par le programme Design-Expert selon l'équation (4) :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \qquad (4)$$

Où Y est la réponse prédite, x_i et x_i sont les facteurs indépendants, β_0 est l'ordonnée à l'origine, β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique et β_{ij} est le coefficient d'interaction.

Les données expérimentales ont été évaluées statistiquement en utilisant ANOVA (logiciel Design-Expert, version 9.0.4.1, Stat-Ease Inc., MN, USA) et la signification du modèle a été évaluée en utilisant la valeur F de Fisher. Les paramètres de grandeurs appropriés proposés par le programme design-expert dans le milieu salin résiduaire SWW et le milieu défini MBM sont donnés par le tableau XXI et XXII.

Mesure	Factor 1 A : vitesse d'agitation	Factor 2 B : débit d'oxygène
	RPM (min ⁻¹)	VVM (L. L/ min)
1	900	1,5
2	841	1,9
3	841	1,1
4	700	1,5
5	700	1,5
6	700	2,0
7	700	1,5
8	700	1
9	559	1,9
10	559	1,1
11	500	1.5

Tableau XXI : Plan expérimental et niveaux des variables indépendantes pour la mesure du K_La en milieu défini (MBM)

Tableau XXII : Plan expérimental et niveaux des variables indépendantes pour la mesure du K_La en milieu SWW.

Mesure	Factor 1	Factor 2
	A : vitesse d'agitation	B : débit d'oxygène
	RPM (min ⁻¹)	VVM (L. L/ min)
1	800	1,5
2	727	1,9
3	727	1,1
4	550	1,5
5	550	1,5
6	550	2
7	550	1,5
8	500	1,5
9	373	1,9
10	373	1,1
11	300	1,5

À la fin de la mesure du K_La , le réacteur est stérilisé, allumé, les paramètres de culture sont réglés (cf. section suivante) et le logiciel de numérisation est allumé puis le réacteur est ensemencé.

2.4.4- Exploitation des résultats du modèle expérimental

Conformément aux résultats du K_La, l'impact du débit d'air n'était pas représentatif par rapport aux vitesses d'agitation. A cet effet, deux variables pour la vitesse d'agitation et une seule pour l'aération ont été sélectionnées pour suivre la cinétique de croissance en batch de *C*. *vulgaris* sur les deux milieux (MBM et SWW) en culture dans un bioréacteur.

2.4.5- Préparation de l'inoculum et mise en culture

Sur la base des résultats du test d'optimisation des nutriments du milieu SWW (section 3.3.2.1) et du test d'optimisation de la vitesse de rotation des turbines et de l'intensité d'aération de la cuve, la cinétique de croissance de *Chlorella vulgaris* à échelle fermenteur a été mise en place sur le milieu SWW et les résultats ont été comparés au milieu de base synthétique MBM.

Ainsi, la souche de *C. vulgaris* a été maintenue réactive dans des boîtes de Pétri sur le milieu (M _{boîte de Pétri}) (tab. XIV). Les précultures ont été menées sur le milieu de base modifié pour les précultures (MBM _{préculture}) (tab. XV) (fig. 48). La préculture a été préparée, à partir de boîtes de Pétri, sur 4 flacons d'Erlenmeyer remplis avec 300 ml de milieu sous des conditions d'asepsie, avec un pH de 6.8 et incubés dans un agitateur incubateur orbital à 30 °C et 150 rpm pendant 120 heures.



Figure 48 : Précultures sur MBM préculture

L'inoculum a été transféré de manière aseptique depuis les précultures en Erlenmeyer vers un flacon (bouteille) d'inoculation stérile. Pour chaque fermenteur, un flacon d'inoculum a été connecté, ainsi, l'inoculum a été pompé dans le réacteur en début de culture. Le volume de travail est de 700 mL (670 ml de milieu et 30 ml d'inoculum). Les cultures sont conduites à 30 °C avec un pH ajusté et maintenu à 6.8. Un dispositif de prélèvement d'échantillons est raccordé aseptiquement aux fermenteurs et comme pour les cultures en flacons agités, environ 7 ml de milieu est pipeté à chaque prélèvement, d'abord en début de culture à (t = 0 s) puis toutes les 120 minutes. Le volume de travail est de 700 mL (670 ml de milieu et 30 ml d'inoculum) (fig. 49).



Figure 49 : Culture hétérotrophe de Chlorella vulgaris dans un fermenteur sur SWW et MBM.

Un régime batch a été testé pour la culture hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* CC256 dans le milieu MBM (réacteur 1 et 2) et SWW (réacteur 3 et 4). Les expériences en fermenteur ont été réalisées dans des cultures parallèles (tab XXIII et tab. XXIV). À noter que le volume de l'inoculum doit être pris en compte pour atteindre la concentration de glucose requise. Immédiatement après l'inoculation, un échantillon (7 ml) est prélevé de manière aseptique à l'aide du dispositif de prélèvement après la mise en culture, puis traité. Ensuite, les échantillons sont prélevés toutes les 120 minutes.

Tableau XXIII : Paramètres de culture dans le milieu SWW au niveau du bioréacteur 1 et 2.

Paramètre	Valeur (réacteur 1)	Valeur (réacteur 2)
Température de culture	30 °C	30 °C
L'intensité du mélange	400 rpm	700 rpm
Aération	1,5 vvm	1,5 vvm
рН	6,8	6,8
	(maintenu avec H ₂ SO ₄ 1M, NaOH 1M)	(maintenu avec H ₂ SO ₄ 1M, NaOH 1M)

Paramètre	Valeur (réacteur 3)	Valeur (réacteur 4)
Température de culture	30 °C	30 °C
L'intensité du mélange	400 rpm	700 rpm
Aération	1,5 vvm	1,5 vvm
рН	6,8	6,8
	(maintenu avec H ₂ SO ₄ 1M, NaOH 1M)	(maintenu avec H ₂ SO ₄ 1M, NaOH 1M)

Tableau XXIV : Paramètres de culture dans le milieu MBM au niveau du bioréacteur 3 et 4.

De plus, un régime fed-batch a été testé pour la culture hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* dans le milieu SWW pour la meilleure condition (400 rpm et 1,5 vvm). Ainsi, du glucose (20 g/L) est ajouté au réacteur et la croissance de la biomasse sans renouvellement de la composante minérale et la consommation du glucose est examinée. À noter que les expériences ont été réalisées dans des cultures parallèles en deux répétitions.

2.5- Méthodes d'analyse

2.5.1- Détermination gravimétrique de la biomasse et du taux de glucose par HPLC

Afin de déterminer l'évolution de la courbe de croissance des suspensions cellulaires algales en culture sur les flacons agités et en bioréacteur, des prélèvements réguliers sont effectués quotidiennement dans les différents milieux utilisés et les courbes sont tracées sur la base d'une analyse gravimétrique telle que décrite précédemment (chap. II part. 1). Ainsi, des échantillons de la suspension cellulaire ont été centrifugés dans des tubes Eppendorf (2 mL), séchés et prépesés, à 10 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est versé dans des tubes Eppendorf numérotés et laissés congeler à -20 ° C, avant leur utilisation pour l'analyse HPLC. Les culots cellulaires ont ensuite été lavés deux fois avec 1 mL d'eau distillée centrifugés puis le culot est séché à 105 °C pendant 24 h avant de mesurer le poids des cellules sèches, exprimée en (g/ L) et est calculée à partir de la différence entre le tube vide et le tube avec la biomasse.

Pour l'analyse des variations des teneurs en glucose, le surnageant a été filtré à travers un filtre en nylon de 0,22 μ m. Les concentrations de glucose ont été déterminées par HPLC (PDA Agilent 1100, Agilent Technologies, USA) avec un détecteur d'indice de réfraction (fig. 50). Une colonne Watrex polymère IEX H (8 μ m, 250 x 8 mm) a été utilisée avec 9 mM d'acide H₂SO₄ dans de l'eau dégazée et désionisée comme phase mobile. Le volume d'injection était de

10 μ L et le débit est de 0,5 mL min⁻¹, pression maximale 80 bars, température 60 °C et détection par réfractométrie.



Figure 50 : HPLC Agilent modèle 1100 séries

Les valeurs de réponse du détecteur ont été ajustées sur les lignes d'étalonnage obtenues par mesure de solutions standard de glucose dans de l'eau déminéralisée (fig. 51).



Figure 51 : Courbe d'étalonnage du taux de glucose (g/L).

2.6- Analyse des données

Afin de comparer la cinétique de croissance de *Chlorella vulgaris* CC256 en culture sur des flacons agités et en bioréacteur sur SWW et MBM, plusieurs paramètres sont pris en considération telles que le taux de croissance spécifique des microalgues (μ_{max}), le coefficient de rendement total ($Y_{X/S}$) et la productivité de la biomasse (P_{max}).

Ils sont calculés en utilisant les équations (1), (2) et (3) suivantes :

$$(\mu_{max}) [Jours^{-1}] = \frac{\ln \left|\frac{c_2}{c_1}\right|}{t_2 - t_1}$$
(1)
$$(P_{max}) [g/L \cdot J] = \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1}$$
(2)

Où c_1 et c_2 font référence à la concentration en biomasse [g/L] mesurée par gravimétrie en rapport avec le temps (jour) au début t_1 et à la fin t_2 , de la phase de croissance exponentielle. Tandis que $Y_{X/S}$ a été calculé ainsi :

$$(Y_{X/S}) = \frac{X_{max} - X_{in}}{S_{in} - S_{fin}}$$
(3)

 X_{max} est la concentration de biomasse maximale (g/L), X_{in} est la concentration de biomasse initiale (g/L), S_{in} est la concentration de glucose initiale (g/L), S_{fin} est la concentration de glucose à X_{max} (g/L).

2.7- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2019. Les données expérimentales ont été évaluées statistiquement à l'aide de l'analyse de la variance (ANOVA) et toutes les affirmations de signification étaient basées sur une probabilité de p < 0.05.

3- Résultats et discussion

3.1- Culture en flacons agités

3.1.1- Validation du modèle expérimental pour les facteurs chimiques par la méthode des réponses de surface MRS

L'étude de l'optimisation de la culture de *C. vulgaris* au niveau des SWW (fig. 52), par l'ajout de nutriments (N, P et Mg), montre pour les 16 combinaisons réalisées simultanément que la courbe de croissance pour tous les essais présente une forme typique retrouvée dans la littérature théorique sur la croissance des micro-organismes. Ainsi, nous pouvons observer une croissance linéaire pendant la majeure partie de la culture (jusqu'à 80 heures) avant une stabilisation entre 80 à 100 heures (fig. 53).







Figure 53 : Variation de la concentration en biomasse (g/L) chez *C. vulgaris* en culture dans SWW sous différentes combinaisons de sels (cf. tab. XIX).

De plus, les variations de la teneur en glucose ont suivi les résultats de la cinétique de croissance (fig. 54). À cet effet, il reste moins de 5 g/L de glucose dans toutes les cultures. Aucun problème de contaminations n'a été rapporté durant la croissance de *C. vulgaris*.



Figure 54 : Variation du taux du glucose pour les combinaisons de culture chez *C. vulgaris* (cf. tab. XIX).

Ainsi, les résultats de la cinétique de croissance dans l'effluent secondaire laitier ont indiqué presque les mêmes taux de croissance des microalgues dans la fraction résiduaire laitière tout au long de la période de culture. Les concentrations de biomasse les plus élevées des 16 combinaisons différentes ont été atteintes pendant la phase stationnaire. La quantité de biomasse varie de 9 g/ L (par exemple pour la combinaison 12, 13 ...) à environ 7 à 8 g/ L (par exemple pour combinaison 7, 14 ...).

Ainsi, les conditions de nutrition ont joué un rôle important dans la production de biomasse. À cet effet, l'importance relative des trois nutriments, NaNO₃ (A–N), KH₂PO₄ (B–P) et MgSO₄7H₂O (C–Mg), a été étudiée par la méthode de surface de réponse (MSR). Comme on le voit dans le tableau XXII, l'effet principal de chaque variable sur la production de biomasse a été estimé comme la différence entre les deux moyennes de mesure effectuée au niveau haut (+1) et au niveau bas (– 1) de ce facteur.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour tester la signification de l'ajustement de l'équation polynomiale du second ordre pour les données expérimentales (tab. XXV). La valeur F du modèle de 14.68 implique que le modèle est significatif. Les valeurs de "Prob> F " (0.0003 < 0,05) indiquent que les termes du modèle sont significatifs. Dans ce cas, N–A, a montré un effet positif pour la production de biomasse (p = 0.0001 < 0,05). Alors que le P–B et le Mg–C n'ont eu aucun effet (p = 0.5516 < 0,05) et (p = 0.4345 < 0,05), respectivement. Selon LI et *al.* (2007), les valeurs de p > 0,10 indiquent que les termes du modèle ne sont pas significatifs. Par contre, plus les valeurs de p sont petites, plus la signification de la variable correspondante est grande. Par ailleurs, si la valeur de p était très faible (P < 0,0001) cela renseignerait sur la signification du modèle. À cet égard, pour ce modèle, le facteur significatif influant sur la réponse est le facteur A (p-value <0,0001), ou l'azote. Il semble que les deux autres facteurs (phosphore et magnésium) n'aient pas d'impact sur la réponse. L'absence d'ajustement n'est pas significative par rapport à l'erreur pure.

Response	Concentration C. vulgaris CC256					
	ANOVA for Response Surface Linear Model					
Analysis of variance table [partial sum of squares – Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	2.04	3	0.68	14.68	0.0003	significant
A-N	1.99	1	1.99	43.02	< 0.0001	
B-P	0.017	1	0.017	0.38	0.5516	
C-Mg	0.030	1	0.030	0.65	0.4345	
Residual	0.56	12	0.046			
Lack of Fit	t 0.56	11	0.050			
Pure Erro	r 0.000	1	0.000			
Cor Total	2.59	15				

Tableau XXV : Résultats de l'analyse de l'ANOVA du modèle quadratique de surface de réponse pour la production de biomasse chez *C. vulgaris*.

Par ailleurs, le coefficient de variation (CV %) indique le degré de précision avec lequel les traitements sont comparés (tab. XXVI). Un CV inférieur signifie une plus grande fiabilité de

Press

l'expérience. La valeur inférieure du CV (3.08 %) a démontré que les expériences réalisées étaient très fiables. L'ajustement du modèle a été vérifié par le coefficient de détermination R^2 , qui a été calculé à 0.7859 indiquant que 78,59 % de la variabilité de la réponse pouvait être expliquée par le modèle. Cela indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites et implique que le modèle mathématique est fiable pour la production de biomasse dans la présente étude. Selon HANRAHAN et *al.* (2007) si la qualité d'ajustement exprimée par un modèle ($R^2 > 0.7$), le modèle était considéré comme adapté et adéquat en production biologique.

En ajoutant des facteurs au modèle, la valeur ajustée de $R^2 (Adj - R^2)$ n'a pas augmenté par rapport au R^2 ce qui indique que le modèle ne comprend pas de termes non-significatifs (KARAVELI & DENIZ, 2020). Dans cette étude, la valeur ajustée de $R^2 (Adj - R^2)$ était de 0.7324, ce qui a éliminé les termes non-significatifs du modèle (KARAVELI & DENIZ, 2020). A cet effet, le coefficient ajusté de $R^2 (Adj - R^2)$ a montré que la significativité du modèle était élevée (MYERS et *al.*, 2016).

la concentration en biomasse chez C. vulgaris en culture sur les combinaisons de SWW				
Std. Dev	0.22	R-Squared	0.7859	
Mean	6.98	Adj R-Squared	0.7324	
C.V. %	3.08	Pred R-Squared	0.6731	

Adeq Precision

10.094

0.85

Tableau XXVI : Suit de l'Analyse de la variance (ANOVA) du modèle expérimental pour la concentration en biomasse chez *C. vulgaris* en culture sur les combinaisons de SWW

La valeur de précision adéquate (Adeq Precision) mesure le niveau de bruit des signaux. Il existe des circonstances dans lesquelles une valeur de précision adéquate supérieure à 4 est souhaitable et cette étude a déterminé qu'un modèle peut être utilisé pour naviguer dans l'espace de conception avec un Adeq Precision de l'ordre de 10.094. Dans cette étude, la valeur de prédiction du coefficient de détermination (Pred.– R^2) est de (0.6731 > 0), ce qui signifie que le modèle est un meilleur prédicteur de réponse que la moyenne globale (KARAVELI & DENIZ, 2020). Selon le modèle, les réponses prédites et réalisées étaient proches les unes des autres et appropriées aux plages, ce qui a montré que le modèle était validé (GUO et *al.*, 2012).

Le tracé en 3D de la surface de réponse (MSR) décrit par le modèle de régression a été réalisé pour élucider les effets individuels et mutuels des variables expérimentales sur la réponse. Le tracé, représenté sur la figure 55, décrit les interactions entre deux variables en maintenant l'autre variable MgSO₄ 7H₂O constante (à un niveau zéro) pour la production de biomasse (pour les autres réponses (MSR) avec Mg MgSO₄ 7H₂O constante, cf. annexe 3). Ainsi, les conditions de nutrition ont joué un rôle important dans la production de biomasse. Selon LI et *al.* (2007) à partir du tracé 3D de la surface de réponse, les valeurs optimales des variables indépendantes peuvent être observées et l'interaction entre chaque paire de variables indépendantes peut être facilement interprétée. Dans cette étude, les valeurs optimales des teneurs en NaNO₃ ont été obtenues loin de leurs points centraux (niveau 0). Ainsi, la valeur optimisée de la teneur en NaNO₃ était de 7 g/ L, ce qui dévie de la valeur centrale du NaNO₃ (3.5 g/ L). Même si les essais ont confirmé que la croissance de *C. vulgaris* n'était pas limitée par une teneur en NaNO₃ plus élevée (7 g/ L), cela indique également les propriétés prometteuses de la culture hétérotrophe de *C. vulgaris* sur les eaux usées salines (SWW) mais l'augmentation de la biomasse n'était pas significative (fig. 54). Selon ARUMUGAM et *al.* (2013) un apport

nutritionnel en azote même faible dans le milieu de croissance a une influence significative sur la productivité.



Figure 55 : Illustration en 3D du tracé de la surface de réponse montrant les effets de NaNO₃ et KH_2PO_4 sur la production de biomasse par *C. vulgaris*, à une concentration de MgSO₄ 7H₂O constante.

De plus, les résultats de la présente détermination expérimentale ont indiqué que l'absence (- 1) NaNO₃ et son addition à de faibles concentrations (0) induisaient les plus forts taux de croissance spécifique et de productivité volumétrique (tab. XXVII). Par conséquent, une teneur élevée en NaNO₃ n'a pas amélioré davantage dans la présente expérience la concentration en biomasse compte tenu de la faible productivité et des taux de croissance spécifique.

Essais	<i>P</i> _(max) (g/ L. h)	μ_{max} (Jours ⁻¹)
1	0,0976 ± 0,00885	$0,720 \pm 0,0074$
2	0,098 ± 0,0083	$0,721 \pm 0.007$
3	0,093 ± 0,0068	0,708 ± 0,0055
4	0,091 ± 0,0027	$0,701 \pm 0,0021$
5	0,0994 ± 0,0094	0,747 ± 0,0086
6	0,0944 ± 0,0074	0,711 ± 0,0060
7	0,0929 ± 0,0079	0,706 ± 0,0063
8	0,1013 ± 0,006	0,731 ± 0,0052
9	0,096 ± 0,005	0,717 ± 0,0043
10	0,1067 ± 0,0083	0,745 ± 0,0076
11	0,0961 ± 0,0073	0,716 ± 0,006
12	0,1071 ± 0,0079	0,746 ± 0,0072
13	0,101 ± 0,0052	0,730 ± 0,0045
14	0,091 ± 0,0042	0,701 ± 0,0033
15	$0,102 \pm 0,007$	0,733 ± 0,0061
16	0,0993 ± 0,012	0,725 ± 0,0102

Tableau XXVII : Effet des facteurs chimiques (N, P et Mg) sur les paramètres de croissance de *Chlorella vulgaris* en culture sur les eaux usées salines (p < 0.05).

Ainsi, les productivités et les taux de croissance spécifique les plus élevés sont ceux enregistrés pour les combinaisons (12, 10, 15, 13, 8 et 5) qui correspondent à des concentrations de NaNO₃ dans le milieu SWW de l'ordre de (0, 0, 3.5, 0, 0, 3.5 g/ L), respectivement.

L'effluent laitier utilisé dans cette étude contenait une concentration élevée de nutriments et de matières organiques. Il comprenait de l'azote total de 1.8 g/L, du phosphate total de 0.64 g/L. Le rapport N:P pour la croissance active des algues est de 6, (8:1) à (10:1) (KARAPINAR-KAPDAN & ASLAN, 2008; WANG et al., 2010), le rapport N:P dans l'effluent pour cette étude s'est avéré peut-être un peu déséquilibré pour la croissance active des microalgues, ce qui explique l'importance de l'ajout d'azote dans le milieu. L'effluent laitier comprenait également divers métaux et oligoéléments à des concentrations plus élevées (K, Ca, Mg et Na, du Cl, SO₄) sont essentiels à la croissance des microalgues. Ces éléments ont pour rôle de faciliter la croissance des algues et la production de lipides (BOHUTSKYI et al., 2014; YANG et al., 2015). En effet, les micronutriments jouent un rôle important dans plusieurs systèmes enzymatiques du métabolisme des microalgues, notamment la photosynthèse, la respiration, la production d'adénosine triphosphate (ATP) et la synthèse des pigments (FRANKLIN et al., 2002). Ainsi, BOHUTSKYI et al. (2014) ont rapporté que la microalgue (Auxenochlorella protothecoides) utilisait activement les métaux du milieu comme le Ca, Mg et Zn au cours de sa croissance hétérotrophe, indiquant que ces métaux influenceraient de manière significative la production de biomasse algale ce qui explique la croissance en milieu SWW sans ajout de nutriments.

Nos résultats sur l'optimisation de production de biomasse sur les effluents laitiers secondaires rejoignent ceux de KARAVELI & DENIZ (2020) pour lesquels l'optimisation de la production de biomasse chez *Chlorella vulgaris* rapportée par la méthode de surface de réponse (RSM) sur la source et la concentration en azote (1 - 4 g/ L) dans un milieu défini ont été déterminées à une concentration de 4 et 1 g/ L, respectivement, en utilisant du NaNO₃ et de l'urée comme source d'azote.

Les effets positifs des paramètres chimiques sélectionnés, leur efficacité sur le développement et la production de biomasse chez *C. vulgaris* via une approche expérimentale ont permis de mettre en évidence que seul le NaNO₃ a été principalement efficace sur la concentration de la biomasse. Ainsi, le NaNO₃ jouait un rôle majeur pour l'augmentation de la productivité et le taux de croissance spécifique de *C. vulgaris*. De plus, en ce qui concerne les résultats obtenus, la diminution de la concentration d'azote a un effet positif sur la concentration de la biomasse. En ce sens, KONG et *al.* (2012) ont signalé un rendement maximal en biomasse chez *C. vulgaris* $X_{max} = 4,28$ g/ L lorsque les concentrations de la source d'azote KNO₃ étaient de 1,30 g/ L. De même, une productivité lipidique maximale de *C. vulgaris* de (247,16 mg/ L.J) a été atteinte lorsque la concentration de NaNO₃ était de 2,06 g/ L (XIE et *al.*, 2012).

3.1.2- Exploitation des résultats du modèle expérimental par l'étude de l'impact de la source et de la teneur en azote sur la cinétique de croissance de *C. vulgaris*

Après que les conditions optimales aient été déterminées, une nouvelle production de biomasse de *C. vulgaris* a été réalisée afin d'évaluer différents protocoles de supplémentation en azote sur sa croissance en utilisant les eaux usées salines en culture dans des flacons agités. Pour examiner les effets de l'optimisation de l'azote sur la production de biomasse, des niveaux



faibles et élevés de deux sources d'azote (organique simple ou complexe) ont été testés sur *C*. *vulgaris* et comparés au groupe témoin MBM et SWW seul (fig. 56).

Figure 56 : Optimisation de l'azote pour la production de biomasse chez C. vulgaris.

À partir des résultats obtenus, il est clair que la croissance cellulaire a augmenté de manière significative au cours du temps en présence des deux sources d'azote. Ainsi, la croissance cellulaire n'a pas été inhibée de manière significative avec une concentration croissante d'azote sur SWW au-delà de 3 g/L et 3.2 g/L, respectivement, en présence d'urée et d'extrait de levure, seulement une légère réduction du rendement cellulaire a été rapportée. En revanche, une réduction drastique de la croissance cellulaire a été observée tout au long de la croissance sur SWW en présence d'une concentration en urée de 24 g/L.

Ainsi, il y avait une proportion inverse entre la concentration de la biomasse obtenue à la fin de l'études et la concentration de la source azotée. Des études antérieures ont suggéré que la dynamique de la concentration d'azote dans les milieux de culture entraîne souvent une augmentation ou une diminution du rendement de la biomasse algale (TAM et WONG, 1996; DHUP et DHAWAN, 2014). L'azote est la pierre angulaire de plusieurs métabolites synthétisés dans la biomasse végétale. L'augmentation des nutriments conduit à catalyser une série de processus physiologiques de la plante, qui à leur tour accélèrent la synthèse de la biomasse (LAI et *al.*, 2011). Chez les algues, l'augmentation de l'azote dans les milieux de croissance maximise les densités cellulaires (CHEN et *al.*, 2011), mais au-delà d'un certain niveau de tolérance, elle entraîne des effets néfastes sur la survie et la croissance des algues (DHUP et DHAWAN, 2014). La culture au niveau des SWW seuls n'a pas empêché *C. vulgaris* de bien se développer. Ceci rejoint nos observations précédentes quant à la richesse des eaux usées laitières en divers composants organiques, NH4+, phosphate, sulfate, ions métalliques et d'autres nutriments (SU et *al.*, 2011; YONEZAWA et *al.*, 2012; TIAN et *al.*, 2012).

Ces substances peuvent fournir des nutriments adéquats pour la croissance des algues, en particulier les monosaccharides, qui peuvent être efficacement utilisés par Chlorella comme source de carbone supplémentaire (ZHANG et al., 2014). Il est admis que pour les microalgues chlorophytes, la diminution de la teneur en azote dans le milieu a un impact défavorable sur le rendement en biomasse (GOIRIS et al., 2015). Dans la présente étude, il semble que le ratio (N:P) existant au niveau de l'effluent corresponde à un optimum de croissance pour la souche considérée. Malgré cette situation, il est clair que lorsque l'urée était utilisée comme source azotée dans le milieu à base d'effluent laitier, les paramètres de croissance de C. vulgaris sont affectés positivement mais pas la concentration en biomasse. Ainsi, grâce à l'analyse de la variance (ANOVA), les concentrations d'azote et leur nature ont eu une influence nonsignificative sur la concentration cellulaire maximale $X_{(max)}$ (p > 0.05) mais une influence très significative concernant la productivité volumétrique $P_{(max)}$ (p < 0.05) et le taux de croissance spécifique μ_{max} (p < 0.05). Les meilleurs résultats de ($X_{(max)} = 10.28$ g/L), ($P_{(max)} = 3,076$ g/ L. J) et un $\mu_{max} = 0.810 J^{-1}$, en comparaison avec la culture sur MBM et SWW seul, ont été obtenus dans des cultures avec [(NH₂) CO - urée] (1.5 g/L). Par contre sur les cultures avec [l'extrait de levure (YE)] les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'ajout de 1.6 g/ L ($P_{(max)}$ = 2,946 g/ L.J) et ($\mu_{max} = 0,792 J^{-1}$). Ces derniers restent proportionnellement faibles par rapport au milieu MBM ($P_{(max)}$ = 3,006 g/ L.J) et (μ_{max} = 0,799 J⁻¹) (tab. XXVIII), ce qui rejoint les observations de RODRIGUES-SOUSA et al. (2021) pour qui un milieu à base d'effluent laitier nécessite une faible quantité d'azote afin de ne pas altérer la productivité des microalgues.

Par ailleurs, les résultats obtenus confirment les prédictions statistiques obtenues à différents intervalles de confiance lorsque la validation des résultats prédits a été déterminée à l'aide de Design–Expert. Toutefois, seules les faibles concentrations ont eu des effets positifs sur les paramètres de croissance de *C. vulgaris*. En effet, leur absence dans le milieu SWW seul n'a pas induit de retard voire de carences dans le développement de la chlorelle.

Tableau XXVIII : Effet de la source et de la concentration d'azote sur les paramètres de croissance de *Chlorella vulgaris* en culture sur les eaux usées salines comparées à ceux des milieux témoins SWW seul et MBM (p < 0.05).

Essais	$P_{(max)}$ (g/ L. J)	$\mu_{max} (Jours^{-1})$
SWW	2.857 ± 0,0424	0,783 ± 0,0045
SWW (Urea 1,5 g/ L)	3,076 ± 0,048	0,810 ± 0.0047
SWW (Urea 3 g/L)	2.959 ± 0.039	0,794 ± 0,004
SWW (Urea 9 g/ L)	2.939 ± 0,0457	0,792 ± 0,0048
SWW (Urea 15 g/ L)	2.753 ± 0,0458	0,772 ± 0,0051
SWW (Urea 24 g/ L)	1,878 ± 0,052	0,548 ± 0,0061
SWW (YE 1,6 g/ L)	2,946 ± 0,029	0,792 ± 0,003
SWW (YE 3,2 g/ L)	2,932 ± 0,0085	0,791 ± 0,0009
SWW (YE 6,4 g/ L)	2,186 ± 0,0408	0,582 ± 0,0042
SWW (YE 10 g/ L)	2,415 ± 0,0396	0,604 ± 0,0037
SWW (YE 14 g/ L)	2,458 ± 0,0334	0,608 ± 0,0031
MBM	3,006 ± 0,0034	0,799 ± 0,0003

Les résultats obtenus dans le cadre de cette expérimentation sont supérieurs à ceux rapportés par WANG et *al.* (2018) pour *Chlorella pyrenoidosa* en culture sur un milieu à base de lactosérum de tofu sans dilution. Ainsi, ces auteurs ont enregistré une productivité de la biomasse en condition hétérotrophe ($P_{max} = 0.72 \pm 0,0192$ g/ L.J). De plus, le résultat, sur la productivité volumétrique, obtenu sur le milieu MBM est supérieur à celui rapporté par ces mêmes auteurs sur le milieu synthétique BG-11 ($P_{max} = 0.36 \pm 0.0028$ g/ L.J) dans les mêmes conditions.

Dans la production de biomasse de microalgues, le choix du milieu de culture est extrêmement important, combinant un faible coût et des conditions adéquates pour la croissance et l'obtention de la composition biochimique d'intérêt. Dans ce contexte, l'utilisation de l'urée est importante en raison de son accessibilité, étant non-explosive comme le NaNO₃, et ayant un faible coût d'exploitation par rapport à l'extrait de levure (KARAVELI & DENIZ, 2020). Dans le présent travail, l'utilisation du glucose sur la croissance de *Chlorella vulgaris*, cultivée dans des conditions hétérotrophes, est présentée dans la figure 57.



Figure 57 : Variation du taux du glucose lors de la croissance de *C. vulgaris* en culture sur SWW sous l'effet de différentes sources et concentrations en azote.

Le milieu SWW a été utilisé dans cette expérience comme milieu de base pour la croissance hétérotrophe de *C. vulgaris*. En général, la croissance de *C. vulgaris* à 20 g/ L de glucose n'a pas induit une consommation complète de la source de carbone au niveau des différents essais sous l'influence de la source et de la concentration d'azote. En moyenne, 14 % de glucose restait dans le milieu en présence d'urée et d'extrait de levure. La même constatation est faite au niveau des milieux témoins SWW seul et MBM où la proportion d'énergie (20 g/ L de S_{Glu}) non consommée était de 13.84 et de 9.73 %, respectivement. Plus la concentration en urée était élevée, plus la consommation de glucose était réduite ce qui se traduit directement sur la croissance cellulaire. Les effets stimulants du glucose sur la croissance des microalgues ont été documentés dans de nombreux rapports (CHEIRSILP et TORPEE., 2012; YU et *al.*, 2012) et
constitue la principale source de carbone dans la plupart des systèmes de culture hétérotrophes (PEREZ-GARCIA et *al.*, 2011). Par conséquent, l'augmentation de cet élément influence à la fois la croissance, mais aussi le métabolisme des microalgues (RODRIGUES-SOUSA et *al.*, 2021). Nos résultats suggèrent que le rapport C/N est critique pour la production de biomasse, qui a également été signalé et influencé par d'autres variables telles que la température, les micronutriments, la salinité et le pH avec un impact sur la croissance (TAKAGI et *al.*, 2006 ; HEREDIA-ARROYO et *al.*, 2010; CHEN et *al.*, 2011; BARTLEY et *al.*, 2013 ; HAN et *al.*, 2013) et qui pourraient jouer un rôle dans les résultats des coefficients de rendements observés (fig. 58).



Figure 58 : Coefficients de rendement $(Y_{X/S})$ durant la culture hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* dans les SWW sous l'effet de différentes sources et concentrations d'azote en culture sur un agitateur-incubateur orbital (20 g /L glucose).

Il est important de souligner que les résultats obtenus étaient supérieurs à ceux rapportés, en condition hétérotrophe, par ESPINOSA-GONZALEZ et *al*. (2014) au niveau des cultures avec du perméat du lactosérum hydrolysé par voie enzymatique ou le coefficient de rendement ($Y_{X/S}$) était de (0.41 ± 0.06) et de (0.35 ± 0.01) chez *Chlorella pyrenoidosa*, respectivement, à 10 et 30 g/ L de sucres monomères. Toutefois, il est important de noter que certaines cultures à haute densité cellulaire étaient rapportées pour *C. protothecoides* par XIONG et *al*. (2008) utilisant des facteurs de croissance et des hormones, qui améliorent les taux de croissance, mais ont un impact négatif sur l'environnement et l'économie des procédés.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'évolution de la croissance de *C. vulgaris* par une comparaison avec des cultures sur le milieu nutritif défini (DM) (BG11) sous de faibles concentrations (2 g/L) de sources d'azote [NaNO₃ et l'extrait de levure (YE)] (résultat non présenté). Les résultats obtenus (annexe 5) montrent que l'utilisation de SWW seul est beaucoup plus favorable au développement de *Chlorella vulgaris* en condition hétérotrophe (10 g/L glucose) comparativement à sa culture dans son milieu de base traditionnel (BG11). De plus, l'ajout d'une source d'azote dans le milieu SWW n'a montré aucune différence significative avec les résultats en SWW seul. Ainsi, les résultats de cette expérience peuvent être considérés

comme concluants. De ce fait, il semble que la meilleure combinaison et concentration en sel additionnée au milieu SWW est de ne pas incorporer du tout le sel sélectionné dans les eaux usées salines. Cette information est très intéressante, car les coûts des nutriments représentent souvent 20 à 30 % des coûts d'exploitation totaux pour la production de biodiesel algal. De même, nous avons constatés 11 jours de phase stationnaire dans les cultures sur SWW (annexe 5) cela ouvre la perspective de l'utilisation de SWW en fed-batch sans addition de nutriments.

3.2- Culture en bioréacteurs

3.2.1- Validation du modèle expérimental pour les facteurs physiques par la méthode des réponses de surface MRS

Pour surmonter les limitations associées aux cultures discontinues alimentées dans des flacons agités, le processus a été étendu à des bioréacteurs de 1,4 L, dans lesquels du SWW et/ou du MBM (témoin) ont été testés afin d'optimiser les paramètres physiques. À cet effet, après détermination des conditions optimales pour le niveau maximal de concentration de biomasse chez *Chlorella* sur les SWW, nous avons entrepris l'étude de l'impact de ces paramètres sur la production de biomasse en fonction de la vitesse de rotation des turbines (*RPM* – rotation par minute) et de l'intensité d'aération de la cuve (*VVM* – volume par volume de milieu par minute). Le but étant de connaître quel paramètre influence la valeur du K_La.

3.2.1.1- Méthodologie de surface de réponse en milieu défini (MBM) et les eaux usées salines (SWW) pour le K_La par variation de la vitesse d'agitation et du débit d'air

Cet ensemble d'expérience a été conçu par plan composite central (CCD) en utilisant RSM et a évalué les effets des facteurs physiques (vitesse d'agitation et débit d'air) sur le K_La. Selon les tableaux XXIX et XXX, la gamme des facteurs sélectionnés était de 500 à 900 min⁻¹ et de 1.1 à 2 L. L/ min et de 300 à 800 min⁻¹ et de 1.1 à 2 L. L/ min pour MBM et SWW, respectivement. Le K_La est changeant en fonction des facteurs sélectionnés allant de 0,0157 à 0,0519 et de 0,0071 à 0,0471 pour MBM et SWW, respectivement. Suivant les facteurs d'optimisation, le K_La a été effectué trois fois au point central (700 min⁻¹ et 1.5 L. L/ min) pour MBM et (550 min⁻¹ et 1.5 L. L/ min) pour SWW. Selon les résultats de ces trois réplications, les valeurs moyennes du K_La ont été calculées à 0,0339 pour le réacteur qui contenait du MBM comme milieu de culture et à 0,0223 pour le réacteur avec le milieu SWW.

Mesure	Factor 1	Factor 2	K _L a
	A : vitesse d'agitation	B : débit d'oxygène	
	RPM (min ⁻¹)	VVM (L. L/ min)	
1	900	1,5	0,0519
2	841	1,9	0,0517
3	841	1,1	0,0475
4	700	1,5	0,0348
5	700	1,5	0,0341
6	700	2,0	0,0329
7	700	1,5	0,0328
8	700	1	0,0259
9	559	1,9	0,0233
10	559	1,1	0,0173
11	500	1,5	0,0157

Tableau XXIX : Matrice de la conception expérimentale et résultats expérimentaux du K_La en milieu MBM.

Mesure	Factor 1	Factor 2	KLa
	A : vitesse d'agitation	B : débit d'oxygène	
	RPM (min ⁻¹)	VVM (L. L/ min)	
1	727	1,9	0,0471
2	800	1,5	0,0466
3	727	1,1	0,0340
4	550	1,5	0,0230
5	550	1,5	0,0224
6	550	1.5	0,0215
7	550	1	0,0177
8	500	1,5	0,0177
9	373	1,9	0,0101
10	373	1,1	0,0079
11	300	1,5	0,0071

Tableau XXX : Matrice de la conception expérimentale et résultats expérimentaux du K_La en milieu SWW.

On peut voir à partir des tableaux (XXIX et XXX) que la valeur du coefficient de transfert d'oxygène K_La augmente avec l'augmentation de la fréquence du mélange (*RPM*) et l'augmentation de l'intensité de l'air (*VVM*) et par conséquent, il-y-a augmentation du transfert d'oxygène. Toutefois, la vitesse d'agitation influence le plus le transfert d'oxygène. Ainsi, la variation due au débit d'air paraît faible par rapport à la variation du régime d'agitation.

À partir des données mesurées, le polynôme de calcul de la valeur du K_La, valable pour les cultures 1 et 2 sur MBM, a été évalué par le programme Design – Expert

$$\begin{split} K_{L}a &= -0,06027 + (5,54 \cdot 10^{-5} \cdot \text{RPM}) + (0,047306 \cdot VVM) + (-9 \cdot 10^{-6} \cdot \text{RPM} \cdot VVM) \\ &+ (3,94 \cdot 10^{-8} \cdot \text{RPM}^2) + (-0,0113 \cdot VVM^2). \end{split}$$

De la même manière, le polynôme des cultures 3 et 4 sur SWW a été créé :

 $K_{L}a = 0.0352 + (-0.0001 \cdot RPM) + (-0.02077 \cdot VVM) + (4.36 \cdot 10^{-5} \cdot VVM \cdot RPM) + (1.105 \cdot 10^{-7} \cdot RPM^2) + (0.00162 \cdot VVM^2).$

Le test statistique de la valeur du coefficient de transfert d'oxygène K_La en milieu MBM et SWW a été effectué par le test de Fisher (F) pour l'analyse de la variance (ANOVA), donné dans les tableaux XXXI et XXXII.

Response	_										
	Sum of Mean F p-value										
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F						
Model	0,001578	5	0,000316	50,31256	0,000282	significant					
A-RPM	0,001507	1	0,001507	240,1637	2,03 E-05	5					
B-VVM	5,05E-05	1	5,05E-05	8,048525	0,036375						
AB	8,10E-07	1	8,10E-07	0,129098	0,734044						
A ²	3,50E-06	1	3,50E-06	0,558161	0,488624						
B ²	1,13E-05	1	1,13E-05	1,795706	0,237903						
Residual	3,14E-05	5	6,27E-06								
Lack of Fit	2,93E-05	3	9,77E-06	9,485893	0,096862	Not significant					
Pure Error	2,06E-06	2	1,03E-06								
Std. Dev	0.0002	R-Squared	0.9997								
Mean	0.0163	Adj R-Squared	0.9994								
C.V. %	1.53	Pred R-Squared	0.9991								
		Adeq Precision	164.9665			_					

Tableau XXXI : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle pour le KLa en milieu MBM.

À partir du tableau XXXI, la *p*-value était inférieure à 0,05 avec une valeur de 0,000282, il n'y avait que 0.0282 % de chances pour que la « valeur F du modèle » aussi importante se produise en raison du bruit. Les valeurs de F et p impliquent que le modèle quadratique était significatif pour le KLa en milieu MBM. La valeur F du Lack of Fit (absence d'ajustement) de 9,49 impliquait que le « Lack of Fit » n'était pas significatif par rapport à l'erreur pure. Il y avait 9,69 % de chances pour que la valeur F du « Lack of Fit » aussi importante se produise en raison du bruit. L'insignifiance de la valeur « Lack of fit » était une circonstance souhaitée pour une convergence du modèle aussi proche que possible de la réalité. Statistiquement, la signification du modèle et la non-significativité de la valeur « Lack of fit » indiquaient que le modèle était approprié. Comme on le voit dans le tableau XXXI, le coefficient de régression R² d'une valeur de 0,9997 indiquait que le modèle de régression représentait 99,97 % des résultats expérimentaux et exprimait une bonne réponse d'ajustement. Cela indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites et implique que le modèle mathématique est très fiable pour la valeur du KLa en milieu MBM dans la présente étude (KARAVELI & DENIZ, 2020). Par ailleurs, Un CV (1.53 %) inférieur signifie une plus grande fiabilité de l'expérience (KONG et al, 2012).

Ainsi, selon le modèle décrit dans le tableau XXXI, on peut dire que la variation de vitesse d'agitation en (rpm), avec une *p*-value inférieure à 0,0001 a un impact très significatif sur les valeurs du K_La dans le milieu (MBM). Alors que le débit d'air en (vvm), avec une *p*-value de 0,036 n'a qu'un impact significatif sur les valeurs du K_La dans le milieu (SWW).

Response				K _L a		
	-					
	Sum of		Mean	F	<i>p</i> -value	
Source	Squares	Df	Square	Value	Prob > F	
Model	0,001935	5	0,000387	65,88051	0,000146	significant
A-RPM	0,001769	1	0,001769	301,1372	1,16E-05	
B-VVM	6,5E-05	1	6,5E-05	11,05717	0,020888	
AB	2,97E-05	1	2,97E-05	5,056326	0,074405	
A ²	6,73E-05	1	6,73E-05	11,45584	0,019575	
B ²	2,31E-07	1	2,31E-07	0,039258	0,850743	
Residual	2,94E-05	5	5,87E-06			
Lack of Fit	1,69E-05	3	5,64E-06	0,906532	0,562579	Not significant
Std. Dev	0.0002	R-Squared	0.9996			2
Mean	0.0105	Adj R-Squared	0.9993			
C.V. %	2.11	Pred R-Squared	0.9976			
Press	0.85	Adeq Precision	144.9561			_

Tableau XXXII : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle pour le K_La en milieu SWW.

L'analyse du tableau XXXII permet de faire sortir les mêmes remarques décrites s'agissant des surfaces de réponse pour le K_La en milieu MBM. Ainsi, La valeur F du modèle de 65,88 implique que le modèle est significatif. Il n'y a que 0,0146 % de chances qu'une "valeur F du modèle" aussi importante puisse se produire en raison du bruit. La valeur P est utilisée comme outil pour vérifier la signification de chaque variable, qui indique également la force de l'interaction entre chaque variable indépendante. Selon LI et *al.* (2007) plus les valeurs de p dans cette étude sont inférieures à 0,05 ce qui indique que les termes du modèle sont significatifs. La

valeur p associée à la valeur F est utilisée pour déterminer si la valeur F était suffisamment grande pour montrer une signification statistique (JALILIANNOSRATI et *al.*, 2013). La valeur F du *Lack of Fit* de 0,90 implique que le manque d'ajustement (*Lack of Fit*) n'est pas significatif par rapport à l'erreur pure.

L'ajustement du modèle a été vérifié par le coefficient de détermination R^2 , qui a été calculé à 0,9996, indiquant que 99,96 % de la variabilité de la réponse pouvaient être expliquées par le modèle. Cela indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites et implique que le modèle mathématique est très fiable pour la valeur du K_La en milieu SWW dans la présente étude. En ajoutant des facteurs au modèle, la valeur R^2 a augmenté indépendamment des facteurs significatifs ou non-significatifs (MONTGOMERY, 2001; MYERS et *al.*, 2016). À cet effet, la valeur ajustée de R^2 (Adj. R^2) n'a pas augmenté par l'ajout de facteurs au modèle ce qui montre que la significativité du modèle était élevée (MYERS et *al.*, 2016). Par ailleurs, là aussi, le coefficient de variation (CV) indique une valeur inferieure CV (2.11 %) ce qui signifie une plus grande fiabilité de l'expérience (KONG et *al*, 2012).

Globalement, selon le modèle décrit dans le tableau XXXII, on constate que l'effet de la variation de la vitesse d'agitation en (rpm), avec une p-value inférieure à 0,0001 a un impact très significatif sur les valeurs du K_La dans le milieu (SWW). Alors que le débit d'air en (vvm), avec une p-value de 0,021 n'a qu'un impact significatif sur les valeurs du K_La dans le milieu (SWW). Nos résultats corroborent ceux de DAHMOUNE et *al.* (2014), où nous observons que la petite valeur de p dans l'ANOVA (P < 0,001) indique que le modèle peut être utilisé pour optimiser les variables de condition de croissance, comme le montre notre étude.

La figure 59 montre le tracé tridimensionnel des variables de réponse obtenu pour modéliser la courbure des différentes réponses directement affectées par les variables indépendantes. Les valeurs maximales sont présentées au cours des phases logarithmiques pour tous les traitements et les études ont montré un point maximal de 0,0519 et 0,0471 pour MBM et SWW, respectivement.



Figure 59 : Illustrations en 3D des diagrammes des surfaces de réponse montrant les effets des facteurs physiques (agitation et débit d'air) sur la valeur de K_La ; (A) Sur MBM ; (B) Sur SWW.

La valeur la plus élevée de K_La (0,0519) sur MBM a été mesurée à une vitesse d'agitation de 900 min⁻¹ et à un débit d'air de 1,5 (L. L/ min), alors que la valeur la plus élevée du K_La (0,0471) sur SWW a été mesurée à une vitesse d'agitation de 727 min⁻¹ et à un débit d'air de 1,9 (L. L/ min).

Les paramètres biologiques, chimiques et physiques jouent un rôle important dans la production de biomasse chez les microalgues. Dans cette étude, la vitesse d'agitation et le débit d'air sont des paramètres physiques qui jouent un rôle dynamique dans la stimulation de la valeur du KLa et par conséquent sur l'augmentation du transfert d'oxygène, un paramètre essentiel dans les cultures aérobies. Il est d'autant plus important que l'utilisation des eaux usées salines de l'industrie laitière induit souvent des problèmes de turbidité pour la culture de microorganismes.

À cet effet, sur le milieu MBM, les deux paramètres influencent la valeur du K_La. La vitesse de rotation (*rpm*) influence plus que le débit d'air (*vvm*). Ainsi, la variation observée due au débit d'air (*vvm*) est faible par rapport à la variation de régime de rotation. À cet égard, l'impact sur le K_La quand le débit d'air et de 1,5 ou 2 *vvm* est quasiment nul. Par conséquent, on peut penser qu'il n'y a pas d'intérêt particulier à faire augmenter le débit d'air à 2 *vvm* s'agissant de culture sur ce milieu. En effet, en maintenant la vitesse de rotation à 700 min⁻¹ et en augmentant le débit d'air de 1,5 à 2 L. L/ min, il y avait une augmentation non-significative du K_La. Inversement, en maintenant la valeur de l'aération à 1,5 L. L/ min et en augmentant la vitesse de rotation de 700 à 900 min⁻¹, le K_La a augmenté de plus de 52%. Ce résultat explique pourquoi il n'est pas possible de maintenir un K_La constant si la vitesse de rotation change.

Dans le milieu SWW, les mêmes observations ont été enregistrées, à savoir un faible impact du débit d'air sur le K_La même s'il reste significatif. Néanmoins, comme pour le milieu MBM la vitesse de rotation à un effet marqué sur la valeur du K_La.

Ainsi, pour les deux milieux, nous pouvons conclure qu'il est plus intéressant et efficace de maintenir un régime de rotation élevé et de garder un débit d'air de l'ordre de 1.5 L. L/ min pour les cultures de *C. vulgaris* en bioréacteur.

Les résultats obtenus dans cette étude sont conformes à ceux obtenus par TAM et WONG (1996) et CONVERTI et *al.* (2009) sur les niveaux de vitesse d'agitation optimale. Toutefois, des différences ont été notées par rapport à d'autres facteurs comme la nature du milieu de croissance utilisé pour la culture de *C. vulgaris*, mais le plus important reste l'effet de la température. Sur ce dernier point, nous avons observé une différence dans la physiologie des microalgues qui n'était pas la même à 25°C, 30°C et 35 °C, d'où l'impact sur le taux de croissance des cultures (résultats non présentés, cf. annexe 6).

3.2.2- Exploitation des résultats du modèle expérimental pour la culture batch de *C*. *vulgaris* sur les eaux usées salines en bioréacteurs

Lorsque les conditions optimales pour la culture hétérotrophe de *C. vulgaris* sur les effluents laitiers aient été déterminées en flacons agités et que les conditions d'aération et d'agitation en fermenteur aient été optimisées, une nouvelle production de *C. vulgaris* a été réalisée sur SWW sans supplémentation en macronutriments.

Les résultats de contrôle et de validation des conditions optimales de culture à l'échelle fermenteur sont donnés par les figures 60 et 61.



Figure 60 : Cinétique de croissance de *C. vulgaris* en culture hétérotrophe dans un bioréacteur sur SWW à (400 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose).



Figure 61 : Cinétique de croissance de *C. vulgaris* en culture hétérotrophe dans un bioréacteur sur SWW à (700 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose).

Selon les résultats obtenus, il paraît clair que *C. vulgaris* peut se développer dans un volume de 700 mL. En raison de l'augmentation du K_La avec l'augmentation de la vitesse de rotation sous un débit d'air constant, le taux de croissance spécifique devrait théoriquement augmenter avec une vitesse accrue. Toutefois, les données enregistrées signalent que la phase stationnaire sur les deux conditions (400 et 700 rpm) n'a pas été atteinte au même moment. Même qu'elle était plus lente et faible sous une agitation à 700 rpm ce qui a donné des paramètres de croissance plus intéressants s'agissant de culture sous un régime d'agitation de 400 rpm. Ainsi,

sous les conditions d'optimisations (400 rpm ; 1.5 vvm) les résultats de la croissance de *C*. *vulgaris* ont permis l'obtention d'un taux de croissance spécifique de l'ordre de (μ_{max} 0,0909 ± 0,006 h⁻¹) et une productivité volumétrique de l'ordre de (P_{max} 0.413 ± 0.0167 g/ L. h) avec un coefficient de rendement correspondant de ($Y_{X/S}$ = 0,704 ± 0.002) et une concentration maximale de X_{max} (12,98 ± 0,02 g/ L). Alors que sous les conditions d'optimisation (700 rpm ; 1.5 vvm), les résultats de ces mêmes paramètres ont été moins importants. Ainsi, nous avons enregistré un μ_{max} = 0,0522 ± 0,056 h⁻¹ et un P_{max} = 0.224 ± 0.0394 g/ L. h avec un $Y_{X/S}$ = 0,663 ± 0.002) et une X_{max} = 11,08 ± 0,52.

Ces mêmes observations sont rapportées en examinant la culture de *C. vulgaris* dans le milieu MBM sous des conditions d'optimisation (400 rpm ; 1.5 vvm) et (700 rpm ; 1.5 vvm) (résultats non présentés). À cet égard, nous avons constaté un ralentissement voire une inhibition de la croissance sous l'effet d'agitation élevée (700 rpm) (annexe 7). Ainsi, sous une agitation de 700 rpm, la concentration de glucose était presque constante et l'augmentation de la biomasse était presque minime. De plus, presque tout l'agent antimousse a été pompé dans le bioréacteur quelques heures après le début de la culture, cela peut supposer avec une certitude presque absolue que l'absence de croissance de la biomasse était due aux propriétés inhibitrices de cet antimousse.

En conséquence, les valeurs inférieures à 700 rpm sur SWW et MBM pourraient s'expliquer, d'une part, par le fait que la microalgue ne semblait pas avoir exactement la même physiologie de développement qu'avec l'agitation à 400 rpm. En effet, une couleur assez différente du milieu a été remarquée qui était plus pâle qu'avec le test à 400 rpm. D'autre part, l'agitation élevée (700 rpm) a induit une surconsommation d'anti-mousse en raison de la formation de beaucoup de mousses à cette vitesse par rapport aux cultures sous 400 rpm et cela au niveau des deux milieux SWW et MBM.

De manière générale, l'augmentation du taux de croissance spécifique suit l'augmentation du K_La ce qu'est confirmé avec d'autres tests notamment à 200 rpm et 400 rpm (non présentés). Les résultats obtenus étaient logiques étant donné que les microalgues avaient la même physiologie, notamment la couleur. Toutefois, l'augmentation de l'agitation à partir de 600 rpm a induit de faibles taux de croissance pour atteindre les plus faibles taux à 800 rpm. Dans tous les essais, l'utilisation de l'anti-mousse (10 ml d'anti-mousse SE dilué au 1/10) a été mis à l'intérieur du réacteur, mais ce n'était pas suffisant à partir de 700 rpm.

Par ailleurs, la concentration de glucose présent dans la culture variait au cours des deux cultures batch. La diminution de la concentration de glucose au début de la culture était plus faible, en raison du faible taux de croissance se produisant à faible concentration cellulaire. Plus tard, à mesure que le taux de croissance à haute concentration cellulaire augmentait, la diminution de la concentration de glucose était plus abrupte dans le fermenteur. Ainsi, le glucose présent dans la culture d'algues en début de la culture batch a été épuisé à la fin de la croissance cellulaire sur le milieu SWW (fig. 65 et 66). Les résultats obtenus sur les eaux usées salines (400 rpm, 1.5 vvm) sont inférieurs à ceux rapportés par XU et *al.* (2021) lors de la croissance hétérotrophe en fermenteur de 1 L (200 rpm, 0.5 vvm) de *Chlorella sorokiniana* sur le milieu de culture défini. En effet, à partir des résultats d'optimisation, les auteurs rapportent une concentration maximale de croissance de l'ordre de $X_{max} = 15.1$ g/L avec du glucose à 30 g/L.

3.2.3- Test de culture fed-batch de *C. vulgaris* sur les eaux usées salines sous des conditions optimales

En référence aux résultats des investigations primaires, le processus de production de biomasse chez *Chlorella vulgaris* a été optimisé sur le milieu SWW en culture discontinu alimenté. L'essai de production de biomasse via un test fed-batch avait pour objectif de mettre en lumière la capacité de réutilisation du milieu SWW sans ajout de sels et de prouver par la même occasion les conclusions démontrées au préalable par les tests d'optimisations selon lesquels le milieu SWW contient suffisamment de sel pour permettre une culture productive de *C. vulgaris* en condition hétérotrophe. L'évolution de la densité de culture dans le fermenteur est tracée dans la figure 62.



Figure 62 : Cinétique de croissance de la culture fed-batch de *C. vulgaris* dans un bioréacteur dans les SWW à (400 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose).

La concentration en biomasse de la culture à l'intérieur du fermenteur a augmenté au cours de la culture durant 40 h, de la valeur initiale de 0.98 au début à 11,08 g/ L à la fin de la première culture et qui reste légèrement inférieure au 12.98 g/ L obtenue dans la culture batch (fig. 61) ce qui confirme nos observations sur l'importance de la concentration de biomasse à l'inoculation. De plus, les résultats de la croissance de *C. vulgaris* montrent que l'ajout seulement de 20 g/ L glucose à la fin de la phase stationnaire a permis la reprise de la croissance de *C. vulgaris* pour atteindre une concentration maximale avoisinant les ($X_{max} = 17$ g/ L). Cela renseigne sur la richesse du milieu en nutriments dont les effets sur la croissance de la microalgue ont été démontrés en culture sur des flacons agités.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette culture se rapprochent de ceux rapportés par ESPINOSA-GONZALEZ et *al.* (2014) lors de la croissance hétérotrophe en fermenteur (5 L) de *Chlorella protothecoides* dans le perméat de lactosérum. En effet, à partir des résultats

d'optimisation, la culture hétérotrophe de *C. protothecoides* en fed-batch a permis l'obtention d'une concentration maximale de biomasse de $(X_{max} = 17.2 \pm 1.3 \text{ g/ L})$. Toutefois, dans le milieu à base de perméat de lactosérum de l'azote (extrait de levure) a été additionné avec un total de sucre monomère de (105,9 g glucose, 93,9 g galactose). De plus, la comparaison de nos résultats avec ceux enregistrés par WANG et *al.* (2018) chez *C. pyrenoidosa* en culture fedbatch sur les eaux usées du lactosérum de tofu (TWW) brut alimenté avec un total de 20 g/ L de glucose, montre que nos résultats sont amplement supérieurs à ceux-ci et de l'ordre de X_{max} = 3,66 g/ L.

Par ailleurs, la comparaison de nos données avec d'autres recherches cultivant des espèces du genre *Chlorella* en culture fed-batch dans un fermenteur (7.5 L) montre que les résultats obtenus dans cette étude sont inférieurs à première vue à ceux de XU et *al*. (2021) sur un milieu défini (milieu synthétique) avec 30 g/ L de glucose en début de culture et alimenté avec 10 g/ L de glucose avec une stratégie d'alimentation constante en plusieurs étapes. Néanmoins, les 83.25 ± 0.75 g/ L de biomasse algale ne sont atteints qu'après 216 h de culture, pour une consommation de glucose totale de 750 g/ L.

4- Conclusion

Aujourd'hui, les microalgues peuvent être utilisées comme matières premières pour produire des carburants liquides et gazeux avec une valeur énergétique relativement élevée. Toutefois, dans la production de biomasse microalgale, le choix du milieu de culture est extrêmement important, combinant un faible coût et des conditions adéquates pour la croissance et l'obtention de la composition biochimique d'intérêt.

Dans le présent travail, le processus de production de biomasse algale a été optimisé en appliquant la méthodologie de surface de réponse, une méthode d'évaluation des effets des facteurs via la recherche de conditions optimales. Dans cette étude, cet outil permet d'améliorer le processus de production de microalgues influencé, d'une part, par les composants chimiques (macronutriments : N, P et Mg) du milieu de croissance utilisant des eaux usées secondaires de l'industrie laitière pour la production de microalgues en flacons agités. D'autre part, par les facteurs physiques de l'environnement dans le cadre de culture en bioréacteurs via l'optimisation de l'impact de la vitesse d'agitation et du débit d'air sur le K_La.

Au cours des expérimentations, les microalgues ont été cultivées en conditions hétérotrophes en utilisant le milieu SWW comme base de milieu de culture.

Les résultats en flacons agités de la réponse de surface pour le modèle de conception expérimentale montrent que seul l'azote agit de façon positive dans le milieu de culture sur l'augmentation et la production de biomasse et donc sur la productivité. Toutefois, l'exploitation des résultats du modèle expérimental, par l'étude de l'impact de la concentration et de la source d'azote, a montré l'apport que peut avoir l'ajout de sel (urée) sur la croissance de *C. vulgaris* par rapport à l'extrait de levure. De plus, seul l'ajout de faibles quantités en azote pouvait influer sur le taux de croissance spécifique et par conséquent sur la productivité. Alors qu'elle n'avait aucun effet significatif sur la teneur en biomasse. Ainsi, il semble que la meilleure combinaison en sel pour la production de biomasse et de ne pas mettre de sel.

Les résultats de l'optimisation des facteurs physiques en bioréacteurs (vitesse de rotation des turbines (rpm) et de l'intensité d'aération de la cuve (vvm)) sur le K_La ont montré que

l'augmentation de la vitesse d'agitation influe positivement sur le K_La. Alors que l'intensité de l'aération n'avait qu'un effet minime au niveau des eaux usées laitières. À cet égard, la variation de débit d'air de 1.5 à 2 *vvm* n'avait pas d'incidence remarquable sur le K_La. Théoriquement, il est admis que l'augmentation de la vitesse d'agitation avait un effet positif sur le K_La et par conséquent sur la croissance des cellules microalgales. Toutefois, l'exploitation des résultats du modèle expérimental, pour la culture batch de *C. vulgaris* sur SWW en bioréacteurs, a montré que les fortes rotations (> 600 *rpm*) influent négativement sur la physiologie des cellules microalgales ce qui se traduit par une coloration pâle du milieu. De même qu'ils induisent un ralentissement voire une inhibition de la croissance au-delà de 800 *rpm*. En plus, ils conduisent à une forte utilisation d'anti-mousse, à partir de (700 *rpm*), dont on ne connaît pas les effets négatifs sur la croissance des microalgales. Reste que leur utilisation il se pourrait que leur utilisation puisse avoir un lien avec la viscosité et la conductivité du milieu.

L'utilisation des SWW en culture fed-batch a mis en lumière la bonne composante en sels du milieu, favorable pour la culture et la production de biomasse chez *C. vulgaris*. Elle a mis en lumière la nécessité de l'utilisation d'une bonne concentration d'inoculum, en début de culture, pour permettre l'obtention de concentrations finales élevées.

Par conséquent, le prix du support optimal de culture avec SWW n'augmente donc pas, ce qui confirme la très bonne caractéristique économique de ce support recyclé. A cet égard, l'utilisation de SWW peut vraiment être une nouvelle méthode durable de production d'algues.

5- Références Bibliographiques

➢ ARUMUGAM M., AGARWAL A., ARYA M. C. & AHMED Z., 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresour*. *Technol.*, 131: 246 − 249.

➢ BARTLEY M., BOEING W., DUNGAN B., HOLGUIN F. O. & SCHAUB T., 2013. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. J. Appl. Phycol., 1 − 7.

➢ BOHUTSKYI P., LIU K., KESSLER B. A., KULA T., HONG Y., BOUWER E. J., BETENBAUGH M. J. & ALLNUTT F. T., 2014. Mineral and non-carbon nutrient utilization and recovery during sequential phototrophic-heterotrophic growth of lipid-rich algae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 5261 − 5273.

BOROWITZKA M. A. & VONSHAK A., 2017. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *Eur. J. Phycol.*, 52: 407 – 418.

CHAMBERLIN J., HARRISON K. & ZHANG W., 2018. Impact of nutrient availability on tertiary wastewater treatment by Chlorella vulgaris, *Water Environ. Res.*, 90: 2008 – 2016, <u>https://doi.org/10.2175/106143017x15131012188114</u>

CHEIRSILP B. & TORPEE S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.*, 110: 510–516

➤ CHEN C-Y., YEH K-L., AISYAH R., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technol.*, 102(1): 71 – 81. CHEN M., TANG H., MA H., HOLLAND T. C., NG K. Y. S., SALLEY S. O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.*, 102: 1649 – 1655.

▶ CHISTI Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25(3): 294 – 306.

≻ CHINNASAMY S., BHATNAGAR A. & CLAXTON R., 2010. Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. *Bioresour. Technol.*, 101: 6751 – 6760.

➤ CHINNASAMY S., BHATNAGAR A., HUNT R.W., DAS K.C., 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101: 3097 – 3105.

CHURCH J., HWANG J.-H., KIM K.-T., MCLEAN R., OH Y.-K., NAM B., JOO J. C., LEE W. H., 2017. Effect of Salt Type and Concentration on the Growth and Lipid Content of *Chlorella vulgaris* in Synthetic Saline Wastewater for Biofuel Production. *Bioresource Technology*, 243:147 – 153.

CONVERTIA., CASAZZA A. A., ORTIZ E. Y., PEREGO P., & DEL BORGHI M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, Chemical Engineering and Processing. *Process Intensification*, 48(6): 1146 – 1151.

> DAHMOUNE F., SPIGNO G., MOUSSI K., REMINI H., CHERBAL A. & MADANI K., 2014. Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwaveassisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.*, 61, 31–40.

DAROCH M., GENG S. & WANG G., 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy*, 102: 1371 – 1381.

➤ **DE-BASHANA L. E., MORENO M. & HERNANDEZ J. P., 2002.** Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense. Water Res.*, 36: 2941 – 2948.

➢ DE OLIVEIRA NUNES I. V., BASTOS INOUE C. H., RODRIGUES SOUSA A. E., MONTEIRO DE CARVALHO J. C., DA ANUNCIAÇÃO GOMES A. M. & CHUEI MATSUDO M., 2021. Tertiary treatment of dairy industry wastewater with production of *Chlorella vulgaris* biomass: evaluation of effluent dilution. *Revista Brasileira* de *Ciências Ambientais*,

DHUP S. & DHAWAN V., 2014. Effect of nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition of *Monoraphidium sp. Bioresour. Technol.*, 152: 572 – 575.

► FENGA Y., LIA C. & ZHANG D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, 102(1): 101 – 105

▶ **FRANKLIN N. M., STAUBER J. L., LIM R. P. & PETOCZ P., 2002.** Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (Chlorella sp.): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 2412 – 2422.

FRIED S., MACKIE B. & NOTHWEHR E., 2003. Nitrate and phosphate levels positively affect the growth of algae species found in Perry Pond. *Tillers*, 4: 21 - 24.

➤ GARCIA-OCHOA F. & GOMEZ E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.*, 27: 153 – 176.

GOIRIS K., VAN COLEN W., WILCHES I., LEÓN TAMARIZ F., DE COOMAN L. & MUYLAERT K., 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research.*, 7: 51 – 57.

➢ GULDHE A., KUMARI S., RAMANNA L., RAMSUNDAR P., SINGH, P. & RAWAT I., 2017. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. J. Environ. Manage., 203: 299 − 315.

➢ GUO J., ZHUANG Y., CHEN L., LIU J., LI D. & YE N., 2012 Process optimization for microwave-assisted direct liquefaction of *Sargassum polycystum C. Agardh* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 120: 19 − 25.

▶ HAN F., WANG W., LI Y., SHEN G., WAN M. & WANG J., 2013. Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light-dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. *Bioresour*. *Technol.*, 132: 182 – 189.

➢ HANNON M., GIMPEL J., TRAN M., RASALA B. & MAYFIELD S., 2010.Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels.*, 1(5): 763 − 784. doi: 10.4155/bfs.10.44

> HANRAHAN G., GARZA C., GARCIA E. & MILLER K., 2007. Experimental design and response surface modeling: A method development application for the determination of reduced inorganic species in environmental samples. *Journal of Environmental Informatics*, 9(2): 71 – 79.

HEREDIA-ARROYO T., WEI W. & HU B., 2010. Oil accumulation via heterotrophic/ mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 1978 – 1995.

➢ HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M. & DARZINS A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal.*, 54 (4): 621 – 639.

➢ INOSTROZA C., SOLIMENO A., GARCÍA J., FERNÁNDEZ-SEVILLA J. M., & ACIÉN F. G., 2021. Improvement of real-scale raceway bioreactors for microalgae production using computational fluid dynamics (CFD). *Algal Res.*, 54, 102207.

➤ JALILIANNOSRATI H., AMIN N. A. S., TALEBIAN-KIAKALAIEH A., & NOSHADI I., 2013. Microwave assisted biodiesel production from *Jatropha curcas* seed by two-step *in situ* process: Optimization using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 136: 565 – 573.

➢ KARAVELI Ö. & DENIZ İ., 2020. Bio-designing of Culture Conditions for Chlorella vulgaris Using Response Surface Methodology. Aquat. Sci. Eng., 35(4): 110 − 118.

KARAPINAR-KAPDAN I. & ASLAN S., 2008. Application of the Stover–Kincannon kinetic model to nitrogen removal by *Chlorella vulgaris* in a continuously operated immobilized photobioreactor system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83: 998 – 1005.

➢ KONG W. B., HUA S. F., CAO H., MU Y. W., YANG H., SONG H., & XIA C. G., 2012. Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(3): 360 − 367.

➤ KOTHARI R., PRASAD R., KUMAR V. & SINGH D. P., 2013. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater Bioresource Technology, 144: 499 – 503.

KOTHARI R., PATHAK V. V., KUMAR V. & SINGH D. P., 2012. Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: an integrated approach for treatment and biofuel production, *Bioresour. Technol.*, 116: 466 – 470.

▶ LAI J., YU Z., SONG X., CAO X. & HAN X., 2011. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.*, 405: 6 – 17.

> LI K., LIU Q., FANG F., LUO R., LU Q., ZHOU W., 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: a review. *Bioresour. Technol.*, 291:121934.

▶ LIY., CUIF., LIUZ., XUY. & ZHAOH., 2007. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH–30 using response surface methodology. *Enzyme Microb*. *Technol.*, 40: 1381 – 1388.

➤ MANDAL M. K., CHANU N. K. & CHAURASIA N., 2020. Exogenous addition of indole acetic acid and kinetin under nitrogen-limited medium enhances lipid yield and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase & diacylglycerol acyltransferase genes in indigenous microalgae: a potential approach for biodiesel production. *Bioresource Technology.*, 297(1): 122439. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122439.

> MARKOU G. & NERANTZIS E., 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. Biotechnology Advances., 31(8): 1532 - 1542.

➢ MONTGOMERY D. C., 2001. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons. Inc., 10th Edition, New York, 752 p.

➢ MYERS R. H., MONTGOMERY D. C., & ANDERSON-COOK C. M., 2016. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons Inc., New York.

PEREZ-GARCIA O, ESCALANTE F. M. E., DE-BASHAN L. E. & BASHAN Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water Res., 45: 11 – 36.

RAWAT I., RANJITH KUMAR R., MUTANDA T. & BUX F., 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl., Energy*, 88: 3411 – 3424.

RODOLFI L., ZITTELLI G. C., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N. & BONINI G., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102: 100 – 12.

➢ RODAS-ZULUAGA L. I., CASTILLO-ZACARÍAS C., NÚÑEZ-GOITIA G., MARTÍNEZ-PRADO M. A., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ J., LÓPEZ-PACHECO I. Y., SOSA-HERNÁNDEZ, J. E., IQBAL H. M. N. & PARRA-SALDÍVAR R., 2021. Implementation of kLa-based strategy for scaling up *Porphyridium purpureum* (red marine microalga) to produce high-value phycoerythrin, fatty acids, and proteins. *Mar. Drugs*, 19: 290. <u>https://doi.org/10.3390/md19060290</u> ➢ RODRIGUES-SOUSA A. E., NUNES I. V. O., MUNIZ-JUNIOR A. B., CARVALHO J. C. M., MEJIA-DA-SILVA L. C., & MATSUDO M. C., 2021. Nitrogen supplementation for the production of *Chlorella vulgaris* biomass in secondary effluent from dairy industry. *Biochemical Engineering Journal*, 165 : 107818.

SU H., ZHANG Y., ZHANG C., ZHOU X. & LI J., 2011. Cultivation of *Chlorella* pyrenoidosa in soybean processing wastewater. *Bioresour. Technol.*, 102: 9884 – 9890.

➤ TAKAGI, M., KARSENO, YOSHIDA, T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacyl-glyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 101: 223 – 226.

➤ TAM N. F. Y. & WONG Y. S., 1996. Effect of ammonium concentration on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresour. Technol.*, 57: 45 – 50.

➤ TIAN Y., KUMABE K., MATSUMOTO K., TAKEUCHI H., XIE Y. & HASEGAWA T., 2012. Hydrolysis behavior of tofu waste in hot compressed water. *Biomass Bioenergy*, 39: 112 – 119.

➢ VO HOANG NHAT P., NGO H. H., GUO W. S., CHANG S. W., NGUYEN D. D. & NGUYEN P. D., 2018. Can algae-based technologies be an affordable green process for biofuel production and wastewater remediation? *Bioresour*. *Technol.*, 256: 491 − 501.

> YAN C. & ZHENG Z., 2013. Performance of photoperiod and light intensity on biogas upgrade and biogas effluent nutrient reduction by the microalgae *Chlorella sp. Bioresour*. *Technol.*, 139: 292–299.

➤ YANG J., CAO J., XING G. & YUAN H., 2015. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresour. Technol.*, 175: 537 – 544.

➤ YU P., ZHAO C., HE J., LI X., TANG J. & ZHOU Z., 2012. Huang Isolation of a novel strain of Monoraphidium sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock *Bioresour*. *Technol.*, 121: 256 – 262.

➢ XIE T., SUN Y., DU K., LIANG B., CHENG R. & ZHANG Y., 2012. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella sp.* for oil production, *Bioresource Technology*, 118: 235 − 242.

➤ XIN L., HONG-YING H., KE G. & YING-XUE S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp. Bioresour. Technol.*, 101: 5494 – 5500.

XU Q., HOU G., CHEN J., WANG H., YUAN L., HAN D., HU Q. & JIN H., 2021. Heterotrophically ultrahigh-cell-density cultivation of a high protein-yielding unicellular alga *Chlorella* with a novel nitrogen-supply strategy. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9: 774854. doi: 10.3389/fbioe.2021.774854

➢ WANG L., MIN M., LI Y., CHEN P., CHEN Y., LIU Y., WANG Y. & RUAN R., 2010. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 1174 − 1186.

➢ WU H. & MIAO X., 2014. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus obliquus in response to nitrate levels. Bioresour. Technol., 170: 421 – 427. ➢ YONEZAWA N., MATSUURA. H., SHIHO M., KAYA K., WATANABE M. M., 2012. Effects of soybean curd wastewater on the growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* strain BOT-22. *Bioresour*. *Technol.*, 109: 304 – 307.

➤ **ZHANG W., ZHANG P., SUN H., CHEN M., LU S., LI P., 2014.** Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresour. Technol.*, 173: 52 – 58.

Chapitre II.

Partie 3 : Culture Hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* dans les eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage.

 Djillali Ghobrini, Tomáš Potocar, Jana Smolova, Gabriela Krausova, Saliha Yakoub-Bougdal and Tomáš Brányik.

1. Heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using saline waste water from the demineralization of cheese whey.

Biotechnology Letters 42(2): 209–217. https://doi.org/10.1007/s10529-019-02770-7

Résumé

Le dessalement du lactosérum de fromage par électrodialyse produit des eaux usées salines (SWW), sûres et riches en nutriments. Dans cette étude, la faisabilité de la culture de microalgues en utilisant SWW comme milieu de base a été étudiée, l'objectif est de prouver qu'il peut être considéré comme un milieu alternatif à la culture hétérotrophe de la microalgue verte d'eau douce *Chlorella vulgaris*.

Les résultats ont indiqué que grâce à l'optimisation de la concentration en glucose, de la source d'azote et de la salinité du milieu SWW la croissance des microalgues en flacons agités en utilisant un milieu SWW prétraité (PSWW) présentait une meilleure performance.

La croissance de *C. vulgaris* dans des conditions optimisées a été testée dans des bioréacteurs. Différents milieux à base de SWW ont été testés, le PSWW et le PSWW dilué à 50 % (DPSWW) ont été comparés par rapport à celui du milieu défini (DM) un variant du milieu régulier d'algues vertes BG-11. Bien que les productivités de la biomasse dans les milieux DPSWW (0,315 g /L. h, peptone de soja) et PSWW (0,152 g /L. h, peptone de soja) aient été significativement inférieures à celles du DM (0,315 g /L. h, peptone de soja), les milieux à base de SWW ont nécessité d'ajout de l'azote qu'à hauteur de 66 et 33 % par rapport au milieu DM pour obtenir la croissance des microalgues, respectivement.

Par ailleurs, les coûts de production potentiellement plus faibles de la biomasse algale produite et l'utilisation significative des SWW pour produire des composés biologiques de grandes valeurs ajoutées et/ ou même du biodiesel sont de vrais avantages qui font de ce milieu une alternative convenable pour une culture efficace de microalgues.

Mots-clés : Chlorella vulgaris, eaux usées salines, biomasse, culture, bioréacteur.

Abréviations :

IM : Milieu d'inoculum (milieu de base modifié). DM : Milieu défini (milieu de base modifié). DPSWW : Eaux usées salines prétraité et dilué. K_{La} : Coefficient volumique de transfert d'oxygène. P_{max} : Productivité volumétrique maximale de la biomasse. PSWW : Eaux usées salines prétraité. SWW : Les eaux usées salines. S_{in} : Concentration initiale de glucose. S_{fin} : Concentration finale de glucose. μ_{max} : Taux de croissance spécifique.

 X_{max} : Concentration maximale en biomasse.

 $Y_{X/S}$: Coefficient de rendement.

1- Introduction

Les microalgues sont généralement associées à un régime de croissance photoautotrophe, mais bon nombre de leurs représentants sont également capables de croissance hétérotrophe, mixotrophe ou photohétérotrophe (CHEW et *al.*, 2018). En général, la culture hétérotrophe de microalgues est considérée comme avantageuse en raison des densités cellulaires élevées réalisables, des coûts en aval réduits, des taux de croissance spécifique élevés, des besoins en terres faibles, de l'indépendance du climat, etc. De plus, les capacités de fermentation disponibles dans le monde continuent de croître (RADER et LANGER, 2018).

En plus, des défis liés aux densités cellulaires élevées (rhéologie, demande d'oxygène, évacuation de la chaleur), les principales contraintes à la production de biomasse de microalgues hétérotrophes sont les coûts élevés associés aux équipements de culture axéniques (bioréacteurs) (BUMBAK et *al.*, 2011), la quantité d'algues capables de ce mode de croissance et limitée avec la difficulté à produire des métabolites induits par la lumière (PEREZ-GARCIA et *al.*, 2011).

La faisabilité économique de la culture hétérotrophe de microalgues semble clairement positive pour les produits de hautes valeurs ajoutées telles que les acides gras polyinsaturés, les pigments, les antioxydants, les polysaccharides, les aliments destinés à l'alimentation humaine et à l'aquaculture (MORALES-SANCHEZ et *al.*, 2017). Cependant, rendre la culture hétérotrophe également économiquement viable pour des produits de faible valeur ajoutée telle que les biocarburants, est un défi. Dans ces cas, il est avantageux d'utiliser les déchets alimentaires et agricoles et les eaux usées comme source de nutriments non-conventionnels (LOWREY et *al.*, 2016; CHEW et *al.*, 2018).

Une application fréquemment suggérée pour la culture des microalgues phototrophes est le traitement des eaux usées (LI et *al.*, 2019). Cependant, les nutriments des eaux usées peuvent également être exploités dans les cultures de microalgues hétérotrophes. Ainsi, pour améliorer encore le bilan énergétique de ces cultures, des sous-produits ou des déchets peuvent être utilisés comme source de nutriments. Parmi eux, ceux issus de processus alimentaires qui peuvent présenter des avantages, notamment grâce à leurs sources appropriées en carbone (substrat de faible poids moléculaire) et d'azote (PEREZ-GARCIA et *al.*, 2011). Cependant, l'utilisation de déchets doit influencer de manière significative les paramètres de la cinétique de croissance des microalgues, sinon le rapport coût – bénéfice est réduit en raison d'une productivité de la biomasse plus faible.

Les eaux usées ont un potentiel significatif pour être utilisées comme sources d'eau et de nutriments pour la culture de microalgues. Selon leur origine, ils peuvent être divisés en déchets ménagers, de lixiviat, agricoles, de raffinages et industriels (par exemple, le bétail et les denrées alimentaires) (ZHANG et *al.* 2016).

Plusieurs supports de culture à base d'eaux usées ont été récemment étudiés dans le cadre de la culture de microalgues vertes. Ainsi, NZA-YISENGA et *al.* (2018) ont utilisé les eaux municipales. CHOI et *al.* (2018) ont travaillé sur les effluents laitiers et WANG et *al.* (2018) ont étudié le lactosérum du tofu comme base de milieu pour la culture de *Chlorella vulgaris* en condition hétérotrophe (WANG et *al.*, 2018) pour ne citer que cela.

Des quantités énormes de lactosérum de fromage et de sous-produits de lactosérum (environ 4 millions de tonnes) sont produites chaque année dans l'UE (European Whey Processors,

2017/18), dont l'utilisation comme produits destinés à l'alimentation humaine est limitée par la forte teneur en minéraux (8 – 10% p/v) (DIBLIKOVA et *al.*, 2013). Par conséquent, les préparations pour nourrissons à base de lactosérum de fromage nécessitent une déminéralisation (dessalement) de ce produit avant usage. Ceci peut être réalisé par électrodialyse (GERNIGON et *al.*, 2011). Toutefois, les eaux usées salines (SWW) produites par ce mécanisme représentent un problème environnemental important (DIBLIKOVA et *al.*, 2013). Toutefois, leur utilisation dans le cadre de cultures microbiennes précédentes atteste que le SWW était une source appropriée de minéraux pour la culture des *Thraustochytrids* marine (HUMHAL et *al.*, 2017).

Le but de la présente étude était de tester expérimentalement le concept selon lequel les SWW étaient une ressource appropriée pour la culture hétérotrophe de la microalgue verte d'eau douce *Chlorella vulgaris*. Les conditions de culture pour *C. vulgaris* (source d'azote, concentration en glucose, salinité) et le matériel utilisé (flacon agité, bioréacteur) ont été optimisés d'abord en utilisant un milieu défini (DM) puis les résultats obtenus ont été adoptées pour la culture de *C. vulgaris* dans un milieu alternatif à base d'eaux usées salines (SWW).

2- Matériels et méthodes

2.1- Micro-organisme

Le microorganisme utilisé était *Chlorella vulgaris* Beijerinck, souche 256, isolée en Nouvelle-Zélande en 1952 et déposée dans la collection des organismes autotrophes (CCALA) à Trebon[°], République tchèque.

2.2- Milieux de culture synthétique

La culture a été stockée sur des boîtes de Pétri avec un milieu d'inoculum, qui contenait 1,5% d'agar (tab. XXXIII).

Constituent	Concentration (mg. L ⁻¹ eau distillée)
Glucose	20000
NaNO ₃	8000
KH_2PO_4	1400
MgSO ₄ , 7H ₂ O	500
$C_{10}H_{12}O_8N_2NaFe$	40
CaCl ₂	88
H_3BO_3	0.832
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.95
MnCl ₂ , 4H ₂ O	3.3
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0.616
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2.7
(NH4)6M07O24	0.17
(NH ₄)VO ₃	0.014

Tabl	leau	XX	XII	:	Co	omp	osi	tion	du	mil	ieu	d	'inocu	lum	(I	M)
------	------	----	-----	---	----	-----	-----	------	----	-----	-----	---	--------	-----	----	---	---

La conduite des expériences est réalisée dans des Erlenmeyer en culture sur un agitateurincubateur orbital et en bioréacteurs visant à étudier l'effet des sources d'azote sur la croissance. Un milieu de base synthétique a été réalisé, considéré dans notre expérimentation comme étant le milieu défini (DM) (tab. XXXIV).

Composition	Concentration (mg. L ⁻¹ eau distillée)
Glucose	10000
KH ₂ PO ₄	4000
MgSO ₄ , 7H ₂ O	3300
CaCl ₂	0.054
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.097
H ₃ BO ₃	0.022
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.0062
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0.01
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0.007
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2.7
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.0035

Tableau XXXIV: Composition du milieu défini (DM)

2.3- Milieu à base d'eaux usées salines (SWW) provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage

Le SWW a été obtenu auprès d'une entreprise laitière (Moravia Lacto a. S., République tchèque) où il a été produit pendant le dessalement du lactosérum de fromage par électrodialyse (EWDU 6xEDR-II/250-0.8, MEGA a.s., République tchèque). Le prétraitement de SWW a été réalisé comme décrit dans le chapitre II partie 1. La composition chimique du milieu SWW prétraité (PSWW) est donnée par le tableau XXXV pour lequel correspond une conductivité de $(1320 \pm 95 \text{ mS/ m})$.

Composition	Concentration
Composition	(g/ kg).
Lactose	$1,97\pm0,81$
N Kjeldahl	$0,22\pm0,06$
Cl ⁻	$1,22 \pm 0,3$
Р	$1,04 \pm 0,38$
SO_4^{2-}	$0,\!42 \pm 0,\!13$
Ca ² ?	$0,12 \pm 0,03$
Mg^{2} ?	$0,21 \pm 0,07$
K ?	$3,29 \pm 0,52$
Na?	$2,93 \pm 0,58$
NO ³⁻	$4,05 \pm 0,26$
Protéines	$2,26 \pm 0,22$
NH ⁴ ?	$0,22\pm0,05$
N total	$0,72 \pm 0,03$

Tableau XXXV : Composition chimique du milieu SWW prétraité (en g/ kg).

Les analyses du milieu PSWW ont été réalisées par EMPLA AG s.r.o. (www.empla.eu, République tchèque), sauf pour le N_{total} (Monitoring s.r.o., www.moni.cz, République tchèque). Comme pour le milieu défini (DM), l'effet des différentes sources d'azote a été évalué sur le milieu PSWW et le milieu PSWW dilué avec de l'eau distillée (50 %) (DPSWW) pour des cultures en flacons agités et en bioréacteur. En fonction du milieu et du test effectué, les deux milieux ont été supplémentés soit avec du glucose seul comme source de carbone et d'énergie,

soit avec des sources de glucose et d'azote (N) mis ensemble avec le maintien d'un rapport C:N dans le milieu de 8:1.

2.4- Conditions de culture

Selon XIN et *al*. (2010) la composition élémentaire des cellules de microalgues peut fournir une indication sur le rapport optimal en nutriments dans les eaux usées pour une souche considérée. A cet effet, nous allons nous intéresser, en premier lieu, aux conditions optimales spécifique pour notre souche microalgale pour de meilleure productivité.

Ainsi, après avoir déterminé le rapport (C:N) dans le milieu qui était de 8:1 par l'analyse élémentaire de la biomasse cultivée sur milieu artificiel (IM) et réalisait à l'aide d'un vario EL Cube (Elementar, Royaume-Uni) (annexe 4). Nous avons travaillé d'abord en utilisant un milieu défini (DM) pour la détermination de la source d'azote, la concentration en glucose et de la salinité spécifiques pour la croissance de *C. vulgaris* puis les résultats obtenus ont été adaptés pour la culture de *C. vulgaris* dans un milieu alternatif à base d'eaux usées salines (SWW) en bioréacteur sous l'effet des paramètres d'optimisation détermines par (MSR).

2.4.1- Inoculum

L'inoculum de *Chlorella vulgaris* pour les expériences de culture a été cultivé pendant 5 jours dans des flacons d'Erlenmeyer de 500 ml (diamètre du fond 100 mm, hauteur 175 mm, diamètre du col 29 mm) avec 300 ml de milieu IM (fig. 63), agités à 150 tr/min et à 30 °C.



Figure 63 : Préculture sur le milieu IM

La suspension cellulaire de la préculture a ensuite été utilisée pour inoculer le milieu DM stérile, le milieu PSWW et le milieu DPSWW à 10 % (v/v) du volume total.

2.4.2- Culture en flacons agités

2.4.2.1- Sélection de la source d'azote

Sous un rapport (C:N) de (8:1) nous avons évalué différents protocoles de supplémentation en source d'azote sur la croissance de *C. vulgaris*. Les cultures en flacons agités de *Chlorella vulgaris* dans le milieu DM ont été cultivées jusqu'à la phase stationnaire dans les mêmes

conditions que l'inoculum. Les expériences en flacons agités ont été réalisées sur des cultures parallèles et en trois répétitions (fig. 64).



Figure 64 : Culture en flacons agités sous différentes sources et teneurs en azote

Les différentes sources d'azote (N) qui ont été ajoutées dans le DM (avec 10 g/L de glucose) et testées pour leur effet sur la croissance de la biomasse figure dans le tableau XXXVI.

Composition	Concentration (g/ L eau distillée)					
(NH ₂) CO - urea	4.2					
NH4OH	4.6~(25-27 %)					
NaNO ₃	3					
Extrait de levure	4.7					
Peptone de viande	3.3					
Peptone de soja	4.9					

Tableau XXXVI : Sources et teneurs en azote dans le milieu défini (DM)

Les sources d'azote complexes contenaient 106, 149 et 98,8 gN kg⁻¹, respectivement, d'extrait de levure, de peptones de viande et de soja. Les analyses de la teneur en azote ont été réalisées chez GEMATEST s.r.o. (www. gematest.cz, République tchèque). Sauf indication contraire, les composants du milieu ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich.

2.4.2.2- Optimisation de la concentration du glucose

Pour ce test, la concentration optimale de glucose (10, 20, 40 et 80 g/L) a été déterminée sous l'influence de deux sources d'azote sélectionnées, sur la base du test précédent, à savoir la peptone de soja et l'urée.

Par ailleurs, a des concentrations initiales de glucose plus élevées dans le DM, la quantité de la source d'azote ajoutée a été augmentée afin de maintenir un rapport C:N dans le milieu à 8:1.

2.4.2.3- Effets de la salinité

L'effet de la salinité dans le milieu, exprimée en conductivité, a été principalement testé en additionnant du NaCl pour la culture de *C. vulgaris* dans le milieu défini (DM) à 850, 1320,

1700 et 2000 mS/ m sous l'influence des deux sources d'azote. Les résultats sont comparés aux cultures dans les eaux usées laitières (SWW et DSWW).

2.4.3- Culture en fermenteur

Les cultures en fermenteurs ont été réalisées dans des bioréacteurs de 1,4 L (Multifors, Infors HT, Suisse) avec un volume de travail de 700 mL (fig. 65). Les cultures avaient les paramètres suivants : le pH était maintenu à 6,8 (H₂SO₄ ou NaOH), la vitesse d'agitation était de 400 rpm (2 turbines Rushton, 6 pales, diamètre 38 mm), une température de 30 °C et un débit d'air de 1 vvm (volume d'air/volume (utile) de fermenteur /min).

Un régime fed-batch a été appliqué pour la culture hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* dans le milieu DM et les milieux à base d'effluent (PSWW et DPSWW). A noter que les expériences en fermenteur ont été réalisées dans des cultures parallèles en deux répétitions.



Figure 65 : Bioréacteurs (Multifors, Infors HT, Suisse) de 1,4 L

Par ailleurs, pour tous les tests effectués le pH, des milieux IM, DM, PSWW et DPSWW, a été ajusté à 6,8 avec NaOH (1 M) et sont stérilisés dans un autoclave à 121 °C pendant 15 min.

2.5- Analyse gravimétrique de la biomasse et du taux de glucose par HPLC

Afin de déterminer l'évolution de la courbe de croissance des suspensions cellulaires algales, des prélèvements réguliers sont effectués quotidiennement dans les différents milieux utilisés et les courbes sont tracées sur la base d'une analyse gravimétrique telle que décrite précédemment (chap. II part. 1). Ainsi, des échantillons de suspensions cellulaires ont été centrifugés dans des tubes Eppendorf (2 mL) pré-pesés à 18 x 10⁴ rpm durant 7 min. Les culots

cellulaires ont ensuite été lavés deux fois avec de l'eau distillée et séchés à 105 °C pendant 24 h avant de mesurer le poids des cellules sèches.

Le surnageant a été filtré à travers un filtre en nylon de 0,2 μm pour l'analyse des variations des teneurs en glucose. Les concentrations de glucose ont été déterminées par HPLC (PDA Agilent 1100, Agilent Technologies, USA) avec un détecteur d'indice de réfraction. Une colonne Watrex polymère IEX H (8 μm , 250 x 8 mm) a été utilisée avec 9 mM d'acide H₂SO₄ dans de l'eau dégazée et désionisée comme phase mobile. Le volume d'injection était de 10 μ L et le débit était de 0,5 mL min⁻¹.

Les concentrations de glucose ont été calculées sur la base de courbes d'étalonnage créés à l'aide de standards.

2.6- Paramètres de la cinétique de croissance

Les paramètres utilisés pour caractériser les cultures en flacon agité et en fermenteur sont : Le coefficient de rendement $(Y_{X/S})$ et la productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{max}) .

 $Y_{X/S}$ a été calculé comme suit :

$$Y_{X/S} = \frac{X_{max} [g/L] - X_{in} [g/L]}{S_{in} [g/L] - S_{fin} [g/L]}$$

Tandis que P_{max} a été calculé ainsi :

$$(P_{max}) [g/L \cdot h] = \frac{X_{max} [g/L] - X_{in} [g/L]}{t [h]}$$

Où X_{max} est la concentration maximale de la biomasse, X_{in} est la concentration initiale de la biomasse, S_{in} est la concentration initiale de glucose, S_{fin} est la concentration de glucose à X_{max} et t est la durée de culture résultant en X_{max} .

2.7- Analyse statistique

Les données expérimentales ont été évaluées statistiquement à l'aide du test de Student (t). Tous les énoncés de signification étaient basés sur une probabilité de p < 0,05. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

3- Résultats et discussion

3.1- culture en flacons agités

3.1.1- Sélection de la source d'azote

Le milieu défini a été utilisé pour cribler et quantifier la source optimale de l'azote chez *Chlorella vulgaris* dans des conditions de croissance hétérotrophe avec le glucose comme source de C et d'énergie (10 g de concentration initiale de glucose L⁻¹). Dans ces expériences, les sources d'azote (N) ont été ajoutées au milieu DM en des quantités garantissant le rapport C:N de 8:1. Ces expériences ont été réalisées dans des flacons agités et dans des conditions conduisant à un coefficient volumique de transfert d'oxygène (K_La) de 3,96 ± 0,41 h⁻¹. Sur la base des données de la figure 66, l'addition de peptone de soja a donné lieu à la fois à un

coefficient de rendement $(Y_{X/S})$ et à une productivité volumétrique de la biomasse (P_{max}) des plus élevés.



Figure 66 : Productivités volumétriques de la biomasse (P_{max}) et coefficients de rendement correspondants ($Y_{X/S}$) pendant la culture hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* dans le DM avec différentes sources d'azote en culture sur un agitateur-incubateur orbital (10 g /L glucose).

Les deux valeurs dans les cultures en présence de la peptone de soja étaient significativement différentes de celles obtenues avec d'autres sources d'azote [p (5,7 x 10⁻⁵ – 0,024) < 0,05]. À l'autre extrémité de l'échelle, le NaNO₃ était la source d'azote entraînant les plus faibles $Y_{X/S}$ et P_{max} à un niveau statistiquement significatif [p (5,7 x 10⁻⁵ – 0,049) < 0,05]. En effet, le P_{max} dans le milieu DM avec NaNO₃ était 14,5% inférieure à celle enregistrée en présence de la peptone de soja.

En général, les sources d'azote les plus complexes ont entraîné des $Y_{X/S}$ et P_{max} plus élevés, la seule exception étant l'urée. En effet, les valeurs $Y_{X/S}$ et P_{max} pour la croissance de *C. vulgaris* dans le milieu DM avec l'urée étaient statistiquement similaires à la croissance avec l'extrait de levure et la peptone de viande (p > 0,05), mais étaient significativement plus faibles par rapport à la peptone de soja (p < 0,05).

En conséquence, les deux sources d'azote (peptone de soja et l'urée) ont été sélectionnées pour d'autres expériences en fonction de leur coût et en tant que produits chimiques de qualité alimentaire fabriqués en grande quantité.

3.1.2- Optimisation de la concentration du glucose

Pour ce test, le milieu défini DM a été utilisé pour déterminer la concentration optimale de glucose.

Les deux sources d'azote sélectionnées, sur la base des tests précédents, à savoir la peptone de soja et l'urée ont été testées. Le rapport C:N initial de 8:1 dans le milieu DM a été maintenu constant et les résultats montrent que les valeurs de $Y_{X/S}$ et P_{max} pour la croissance de *C*. *vulgaris* dans le milieu DM, avec la peptone de soja ou l'urée, diminuent avec l'augmentation de la concentration initiale de glucose (fig. 67).



Figure 67 : Productivités volumétriques de la biomasse (P_{max}) et les coefficients de rendement correspondants ($Y_{X/S}$) pendant la culture hétérotrophe de *Chlorella vulgaris* dans le milieu DM avec de la peptone de soja et de l'urée comme sources d'azote dans des cultures en flacons agités à différentes concentrations initiales de glucose (S_{in}).

À la concentration initiale de glucose la plus basse (10 g /L), correspond un $Y_{X/S}$ [p (3,3 x 10^{-4}) < 0,05] et un P_{max} [p (6,2 x 10^{-3}) < 0,05] qui étaient significativement plus élevés dans le milieu DM en présence de peptone soja que le milieu DM avec de l'urée. Ainsi, pour la peptone de soja comme source d'azote (N), la consommation de glucose était complète jusqu'à une concentration initiale de la source de carbone dans le milieu de 40 g /L ($X_{max} = 15,2 \pm 0,05$ g /L). Tandis qu'à 80 g /L, environ 33 % du glucose initial est resté non consommé dans le milieu et la concentration maximale X_{max} a atteint (20,3 ± 0,05 g /L).

De la même manière, la consommation du glucose sur le milieu DM en présence d'urée était également complète, et cela, jusqu'à une concentration initiale de glucose de 40 g /L. Toutefois, la concentration maximale (X_{max}) était significativement plus faible (12,5 ± 0,25 g /L). En outre, à une concentration initiale de glucose de 80 g /L, environ 58 % du glucose sont restés dans le milieu DM en plus de l'urée non consommée. A cet effet, la concentration maximale atteinte n'était que de X_{max} = 10,9 ± 0,27 g /L.

En ce sens, les résultats d'autres recherches, traitant de l'effet des concentrations élevées de glucose sur la croissance d'espèces microalgales et par conséquent sur le taux de croissance spécifique, indiquent l'effet négatif des concentrations plus élevées de glucose sur le taux de croissance spécifique observé chez *Chlorella protothecoides* (XIONG et *al.*, 2008) et *Chlorella vulgaris* (DOUCHA et LIVANSKY', 2012).

3.1.3- Effets de la salinité

L'effet de la salinité dans le milieu a été principalement testé en cultivant *C. vulgaris* dans des flacons agités dans le milieu DM additionné de NaCl. Le milieu défini avait des conductivités de 400, 440 et 690 mS/ m et cela en fonction des sources N : peptone de soja, urée et NaNO₃, respectivement. L'ajout de NaCl a augmenté la salinité du milieu, exprimée en conductivité du milieu DM, à 850, 1320, 1700 et 2000 mS/ m (fig. 68).



Figure 68 : Culture de C. vulgaris dans des flacons agités dans le DM additionné de NaCl.

Les résultats obtenus montrent que la productivité volumétrique (P_{max}) de *C. vulgaris* à une concentration initiale de glucose de 10 g/L, dans des cultures en flacons agités, n'a pas été affecté de manière significative par une conductivité moyenne inférieure à 850 mS/ m (tab XXXVII).

Cependant, l'ajout supplémentaire de NaCl a diminué la productivité de manière visible, qui était de P_{max} de 18% sous une conductivité de (1320 mS/ m), de 25% sous une conductivité de 1700 mS/ m) et de 35% sous une conductivité de (2000 mS/ m) pour la peptone soja. Aussi, la productivité volumétrique a diminué de la même façon mais de manière plus abrupte s'agissant de l'urée comme source d'azote. Ainsi, le P_{max} était réduit de 15% sous une conductivité de (1320 mS/ m), de 25% sous une conductivité de (1320 mS/ m), de 25% sous une conductivité de (1700 mS/ m) et de 37% sous une conductivité de (2000 mS/ m).

Tableau XXXVII : Coefficient de rendement moyen $(Y_{X/S})$ et productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{max}) pour la culture hétérotrophe de *C. vulgaris* en flacons agités (10 g /L glucose) dans différents milieux (DM, PSWW et DPSWW) et sources d'azote.

N source	DM (conductiv	vité, mS m ⁻¹)		PSWW ^a	DPSWW ^b		
	440/400/690e	850	1320 1700 2		2000		
Peptone soja	0.593° 0.134 ^d	- 0.132 ^d	- 0.110 ^d	- 0.100 ^d	- 0.087 ^d	_	_
Urée	$0.540^{c} \ 0.125^{d}$	- 0.119 ^d	- 0.106 ^d	- 0.094 ^d	- 0.078 ^d	_	_
NaNO ₃	$0.488^{c} \ 0.115^{d}$	0.471° 0.113 ^d	_	_	_	_	_
NO ³⁻ , NH ₄ ?, protéines	_	_	_	_	_	$0.440^{\circ} \ 0.090^{d}$	$0.486^{\circ} 0.103^{d}$

^a Conductivité 1320 mS m⁻¹; ^b Conductivité 660 mS m⁻¹; ^c $Y_{X/S}$; ^d P_{max} ; ^e Conductivité du DM avec du peptone soja /urée/NO³⁻.

Par ailleurs, la culture de *C. vulgaris* dans le milieu DM (à une concentration initiale de glucose de 10 g/ L) avec du NO³⁻ comme source d'azote (N) sous influence du NaCl, additionné pour des valeurs de conductivité de (850 mS/ m) a donné un $Y_{X/S}$ et un P_{max} égal à 0,471 ± 0,003 et 0,113 ± 0,002 g/ L h, respectivement. En plus, ces valeurs ne différaient pas statistiquement [p (0,39) > 0,05] de celles obtenues sans addition de NaCl à 690 mS/ m (tab. XXXVII). À cet égard, ces résultats confirment les observations tirées de cette expérience à savoir que la variation de la conductivité dans le milieu DM en deçà de 850 mS/ m n'a pas effet négatif sur la culture de *C. vulgaris*. Ainsi, l'effet de la salinité ne se manifestait qu'à des valeurs de conductivité supérieure ou égale à 850 mS/ m.

La croissance hétérotrophe de *C. vulgaris* dans des flacons agités en milieu PSWW (1320 mS/ m) avec une concentration initiale de glucose de 10 g.L⁻¹ a entraîné une croissance de la biomasse de DX = $4,7 \pm 0,07$ g/ L (DX = $X_{max} - X_{in}$) avec un coefficient de rendement moyen $Y_{X/S}$ et une productivité volumétrique maximale de la biomasse P_{max} , respectivement, de 0,44 \pm 0,003 et 0,09 \pm 0,0015 g/ L. h. Le processus de production de biomasse chez *Chlorella vulgaris*, sur cette condition, a été alimenté avec du glucose supplémentaire à 10 g/ L. Ainsi, le glucose additionné a été converti en biomasse de $X_{max} = 8,3 \pm 0,07$ g/ L. Cette augmentation de la biomasse pendant 92 h s'est accompagnée d'une diminution du N total dans le PSWW de 0,4 gN/ L. À cet égard, le $Y_{X/S}$ et P_{max} de l'expérience de culture totale (fed-batch) étaient respectivement de 0,46 et 0,086 g/ L. h.

Par ailleurs, la dilution du milieu PSWW (DPSWW, 660 mS/m, 10 g/ L de glucose initial) a abouti à une amélioration en biomasse, ce qui a donné résultat à un coefficient de rendement moyen $Y_{X/S}$ et une productivité volumétrique maximale de la biomasse P_{max} de 0,486 ± 0,002 et 0,103 ± 0,002 g/ L. h, respectivement. De même, les différences entrent valeurs de $Y_{X/S}$ et P_{max} obtenues dans les milieux PSWW et DPSWW étaient statistiquement significatives (p < 0,05).

Il est important de signaler que la croissance de *C. vulgaris* dans le milieu PSWW sans ajout de source de carbone (C) et d'azote (N), a entraîné une croissance de la biomasse très faible de l'ordre de DX = 0.3 ± 0.028 g/L.

Enfin, la comparaison du coefficient de rendement moyen $Y_{X/S}$ et de la productivité volumétrique maximale de la biomasse P_{max} obtenue sur le milieu DM (10 g/ L de glucose initial, conductivité 850 mS/ m, NO³⁻ comme source N) avec ceux obtenus sur le milieu DPSWW (10 g/ L de glucose initial, conductivité 660 mS/ m, NO³⁻, NH⁴⁺, protéines comme sources N), montre ces deux paramètres étaient significativement différentes (p < 0,05) (XXXVII). Cependant, la productivité volumétrique (P_{max}) atteinte en milieu DPSWW n'était que 9 % inférieure à celle du milieu DM (850 mS/ m, NO³⁻ comme source N), tandis que la concentration en biomasse X_{max} en milieu DPSWW (5,9 g/ L) était de 13 % plus élevée.

3.2- Culture en fermenteurs

3.2.1- Culture de C. vulgaris sous un régime fed-batch

Les paramètres de culture obtenus dans des bioréacteurs remués et aérés sous un régime fedbatch reflétaient un K_La plus élevé de ce système, qui atteignait (67,7 ± 2,3 h⁻¹) et (54,4 ± 2,1 h⁻¹) respectivement sur le milieu DM et PSWW (fig. 69).



Figure 69 : Culture de *C. vulgaris* dans des bioréacteurs sur le milieu DM et (D) PSWW sous un régime fed-batch.

Les courbes de croissance dans la figure 70 montrent que la culture de *C. vulgaris* dans le milieu DM avec du glucose et de la peptone de soja a donné une productivité volumétrique totale de la biomasse de ($P_{max} = 0,348$ g/ L. h) pour un coefficient de rendement de $Y_{X/S} = 0,565$ comparable aux valeurs obtenues dans les cultures en flacons agités (fig. 70A). La même culture avec de l'urée comme source d'azote a conduit à une productivité volumétrique totale de la biomasse de ($P_{max} = 0,371$ g/ L. h) et un coefficient de rendement de $Y_{X/S} = 0,558$ (fig. 70B). Les différences entre la productivité volumétrique totale de la biomasse (P_{max}) obtenu en utilisant les différentes sources d'azote étaient statistiquement significatives (p (0,0191) < 0,05). En outre, pour la peptone soja et l'urée, le P_{max} le plus élevé a été atteint après la



deuxième addition de glucose et d'azote, et il était de 1,12 g/L.h et de 1,22 g/L.h pour les deux sources d'azote respectivement pour les deux sources d'azote.

Figure 70 : Concentration en poids sec de la biomasse (X) et en glucose (S_{GLU}) pendant la culture en fed-batch de *Chlorella vulgaris* en DM (A, B), PSWW (C, D) et DPSWW (E, F) en utilisant de la peptone de soja (A, C, E) et l'urée (B, D, F) comme sources N.

Pour vérifier l'applicabilité du milieu PSWW dans la production de biomasse microalgale, une culture fed-batch dans un bioréacteur a été réalisée. La croissance de *C. vulgaris* en milieu PSWW a été réalisée dans les deux premiers batch avec uniquement du glucose ajouté et sans ajout d'azote. La troisième addition de glucose a été réalisée soit avec de la peptone de soja soit avec de l'urée (avec un rapport C/N - 8:1).

La culture avec l'addition de glucose et de peptone soja (seulement au niveau du 3ème batch) (figure 70C) a donné une productivité volumétrique totale de la biomasse de l'ordre de (P_{max})

= 0,152 g/ L. h à un coefficient de rendement de $Y_{X/S}$ = 0,407, qui était significativement plus faible (p < 0,05) par rapport à la culture en milieu DM.

Des résultats similaires ont été trouvés pour la culture en milieu PSWW avec l'addition de glucose et d'urée (seulement au niveau du 3^{ème} batch) où le $P_{max} = 0,142$ g/ L. h avec un $Y_{X/S} = 0,404$ (fig. 70D). Toutefois, les productivité volumétriques P_{max} dans les cultures fed-batch D(PSWW) en bioréacteurs étaient significativement plus élevé (p < 0,05) que dans le milieu PSWW dans les cultures en flacon agité (tab. XXXVII).

Afin de confirmer l'effet négatif de la salinité, la culture en fed-batch a été répétée dans du milieu PSWW dilué (DPSWW). Ici, le premier batch de milieu DPSWW a été complété uniquement avec du glucose, tandis que les sources d'azote (N) ont été ajoutées avec les deuxième et troisième ajout de glucose.

La culture de microalgues avec de l'urée a donné une productivité volumétrique totale de la biomasse de (P_{max}) = 0,265 g/ L. h avec un coefficient de rendement de $Y_{X/S}$ = 0,466 (fig.70F), tandis qu'avec la peptone de soja le P_{max} = 0,315 g/ L. h et le $Y_{X/S}$ = 0,542 (fig. 70E). La culture en milieu DPSWW avait des paramètres significativement meilleurs (P_{max} , $Y_{X/S}$) que ceux en milieu PSWW. Bien que la productivité volumétrique totale de la biomasse avec la peptone de soja (P_{max} = 0,315 g/ L. h) soit significativement inférieure à la culture en milieu DM [p (0,001 – 0,031) < 0,05], les productivités de la biomasse étaient de 90 et 85% identiques à celles obtenues dans le milieu DM avec la peptone de soja et l'urée, respectivement.

Les productivités de la biomasse de Chlorella vulgaris obtenues dans ce travail sur milieu DPSWW étaient plus élevées ($P_{max} = 0.315$ g/L.h, peptone de soja comme source N) que celles issues de la fermentation à haute densité de Chlorella protothecoides dans un bioréacteur avec une stratégie de fed-batch améliorée (alimentation en glucose et extrait de levure au niveau du milieu de base synthétique MB). Ainsi, les valeurs étaient $P_{max} = 0,277$ g/L.h et $Y_{X/S} =$ 0,447 à un $X_{max} = 51,2$ g/L (XIONG et al., 2008). Néanmoins, un P_{max} plus élevé (1,416 g/L.h) a été atteint pour Chlorella protothecoides lors d'une culture hétérotrophique dans le milieu BM à une concentration initiale élevée de biomasse de 36 g/L. La culture de cette quantité d'inoculum a été réalisée de manière autotrophique et a pris 17 jours. Par conséquent, le P_{max} total pour l'ensemble du processus était de 0,256 g /L. h (BOHUTSKYI et al., 2014). Une productivité volumétrique totale de la biomasse significativement plus élevée $P_{max} = 1,22$ - 3,52 g /L.h a été obtenue pour Chlorella vulgaris BEIJ., 1996/H 14 dans des bioréacteurs en culture fed-batch sur le milieu BM avec du glucose et de l'urée (DOUCHA et LIVANSKY, 2012). Toutefois, cela pourrait être attribué à l'extraordinaire caractéristique de croissance de cette souche. Néanmoins des productivités de biomasse volumétrique quelque peu comparables ont été obtenues dans ce travail mais uniquement dans la phase de croissance, après la troisième addition de glucose et d'azote dans le milieu de base DM ($P_{max} = 1,12 - 1,22$ g/L.h). Après cette phase, la culture fed-batch dans ce travail n'a pas été poursuivie mais de nouvelles augmentations du taux de croissance peuvent être émises.

Les productivités de la biomasse de diverses *Chlorella sp.* cultivées de manière hétérotrophe dans un milieu utilisant des eaux usées étaient significativement plus faibles par rapport au milieu PSWW utilisé dans ce travail. Par exemple, en culture hétérotrophe, la productivité volumétrique totale (P_{max}) de *Chlorella pyrenoidosa*, dans les eaux usées du lactosérum de tofu avec 10 g /L de glucose, était de 0,03 g /L.h (WANG et *al.*, 2018). De même chez *Chlorella*

vulgaris, en culture dans de la vinasse provenant de la fermentation de la mélasse, la productivité volumétrique totale était de ($P_{max} = 0,028$ g/L. h, et cela sans ajout de source externe de carbone (QUINTERO-DALLOS et *al.*, 2019). Dans cette optique, le P_{max} le plus élevé rapporté sur les mélasses résiduelles à base de glucose pour *Chlorella protothecoides* était de 0,121 g/L. h (YAN et *al.*, 2011). D'autres exemples de cultures hétérotrophes ou mixotrophes de microalgues utilisant des sources de carbone organique à faible coût sont résumés dans les travaux de ZHANG et *al.* (2016).

La teneur totale en azote du milieu PSWW (déterminée par digestion oxydative, ISO 11905-1) a diminué pendant la culture de *C. vulgaris* dans des flacons agités de 0,45 gN L⁻¹. Cela correspond théoriquement à un rapport C/N de 8 :1 de la biomasse et à la consommation de de 8,1 g /L de glucose pour la croissance de la biomasse algale. A cet égard, un coefficient de rendement de $Y_{X/S} = 0,46$ s'additionne à 9,5 g /L de glucose qui ont été utilisés à des fins énergétiques. Par conséquent, la stratégie de culture fed-batch dans les milieux PSWW et D PSWW a été appliquée pour utiliser les sources d'azote disponibles et ce n'est qu'après leur épuisement que des sources d'azote externes supplémentaires (peptone de soja ou urée) ont été ajoutées. Cette stratégie pour le milieu DPSWW a abouti à des $Y_{X/S}$ et P_{max} de la biomasse chez *Chlorella* comparables à ceux obtenus dans des cultures fed-batch en bioréacteur sur le milieu DM.

Par ailleurs, le P_{max} un peu plus faible dans les cultures utilisant le milieu PSWW peut être compensé par le prix inférieur du milieu, puisque les sources d'azote ont été ajoutées uniquement avec le troisième ajout de glucose.

4- Conclusion

La culture hétérotrophe dans des bioréacteurs avec des paramètres de processus contrôlés est bien établie dans les biotechnologies microbiennes. Il est également économiquement prometteur d'exploiter le potentiel de croissance hétérotrophe des microalgues dans les bioréacteurs pour d'autres raisons. Ainsi, la culture hétérotrophe de microalgues permet d'obtenir des cultures à haute densité cellulaires, qui offrent des avantages économiques supplémentaires dans la récolte et la transformation en aval. Les produits potentiels de la culture de microalgues hétérotrophes sont la biomasse, les lipides (biodiesel), les acides gras polyinsaturés, les pigments, les caroténoïdes, les protéines et l'hydrogène (H₂).

Dans cette étude, la croissance hétérotrophe de la microalgue verte d'eau douce *Chlorella vulgaris* a d'abord été optimisée dans un milieu de base DM (en culture sur des flacons agités), puis les résultats ont été appliqués dans des cultures en flacons agités et en bioréacteur (régime fed-batch) dans des milieux à base d'eaux usées salines (SWW) produits lors de la déminéralisation du lactosérum de fromage. Il en ressort qu'il n'est pas nécessaire de traiter de grandes quantités de SWW produites dans l'industrie laitière, car elles contiennent des nutriments précieux, facilement assimilables par les microalgues notamment *Chlorella vulgaris*.

En effet, dans nos conditions de culture, le milieu SWW prétraité pouvait être utilisé sous la forme non diluée (PSWW) et diluée (DPSWW) dans la culture d'une microalgue vert d'eau douce. La dilution du milieu SWW prétraité (DPSWW) a abouti à une amélioration de la production de biomasse de la culture en flacons agitées par rapport à la culture sur le milieu non

dilué PSWW. En outre, la productivité volumétrique (P_{max}) atteinte en milieu DPSWW n'était que 9 % inférieure à celle du milieu DM (850 mS/ m, NO³⁻ comme source d'azote), tandis que la concentration en biomasse X_{max} en milieu DPSWW (5,9 g/ L) était de 13 % plus élevée.

Par ailleurs, la culture en bioréacteurs sous un régime fed-batch a montré que les productivités de la biomasse dans les milieux DPSWW (0,315 g/L.h, peptone de soja) et PSWW (0,152 g/L.h, peptone de soja) étaient significativement inférieures à celles du milieu DM (0,315 g/L.h, peptone de soja). Néanmoins, les milieux à base de SWW (DPSWW et PSWW) ont nécessité l'ajout d'azote qu'à hauteur de 66 et 33 %, respectivement, par rapport au milieu DM pour obtenir la croissance des microalgues.

Ainsi, il est évident que malgré les coûts de transport et de prétraitement associés aux milieux à base d'eaux usées salines (PSWW et DPSWW), le coût total du DM sera plus élevé. Toutefois, pour une analyse économique fiable, une mise à l'échelle des expériences de culture doit être réalisée et une attention particulière doit être accordée principalement au taux de transfert d'oxygène en tant que paramètre crucial de la croissance des microalgues aérobies sur du carbone organique. De même, des sources alternatives de carbone à faible coût pourraient être considérées pour être combinées avec le PSWW pour réduire davantage les coûts de production. Néanmoins, pour un équilibre matériel, énergétique et économique fiable, des données d'expérience à plus grande échelle seraient nécessaires.

6- Références bibliographiques

- BOHUTSKYI P., KULA T., KESSLER B.A., HONG Y., BOUWER E. J., BETENBAUGH M.J. & ALLNUTT A.C.T., 2014. Mixed trophic state production process for microalgal biomass with high lipid content for generating biodiesel and biogas. *Bioenergy Res.*, 7: 1174 – 1185.
- BUMBAK F., COOK S., ZACHLEDER V., HAUSER S., KOVAR K., 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91: 31 – 46.
- CHEW KW., CHIA SR., SHOW PL., YAP YJ., LING TC., CHANG JS., 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: a review. J. Taiwan Inst. Chem. Eng., 91: 332 – 344.
- CHOI YK., JANG HM., KAN E., 2018. Microalgal biomass and lipid production on dairy effluent using a novel microalga, *Chlorella sp.* isolated from dairy wastewater. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 23: 333 – 340.
- DIBLIKOVA' L., CURDA L., KINCL J., 2013. The effect of dry matter and salt addition on cheese whey demineralization. *Int. Dairy J.*, 31: 29 – 33.
- DOUCHA J., LIVANSKY' K., 2012. Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. J. Appl. Phycol., 24: 35 – 43.
- European Whey Processors Association. Economic report 2017/18. <u>http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user_upload/</u>Public_Documents/Facts_and_Figures/EDA _Economic_ Report_2017.pdf. Accessed 14 Sept 2019.
- GERNIGON G., SCHUCK P., JEANTET R., BURLING H., 2011. Encyclopedia of dairy sciences, 2nd eds. Elsevier, London

- HUMHAL T., KASTANEK P., JEZKOVA Z., CADKOVA A., KOHOUTKOVA A. & BRANYIK T., 2017. Use of saline waste water from demineralization of cheese whey for cultivation of *Schizochytrium limacinum* PA-968 and *Japonochytrium marinum* AN-4. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 40:395 – 402.
- LI K., LIU Q., LUO FFR., LU Q., ZHOU W., HUO S., CHENG P., LIU J., ADDY M., CHEN P., CHEN D., RUAN R., 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: a review. *Bioresour. Technol.*, 291:121934
- LOWREY J., BROOKS M.S. & ARMENTA RE., 2016. Nutrient and media recycling in heterotrophic microalgae cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 1061 – 1075.
- MORALES-SANCHEZ D., MARTINEZ-RODRIGUEZ OA., MARTINEZ A., 2017. Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest. J. Chem. Technol. Biotechnol., 92: 925 – 936.
- NZAYISENGA JC., ERIKSSON K., SELLSTEDT A., 2018. Mixotrophic and heterotrophic production of lipids and carbohydrates by a locally isolated microalga using wastewater as a growth medium. *Bioresour. Technol.*, 257: 260 – 265.
- PEREZ-GARCIA O., ESCALANTE FME., DE-BASHANAB LE., BASHAN Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.*, 45:11 – 36.
- QUINTERO-DALLOS V., GARCIA-MARTINEZ JB., CONTRERAS-ROPERO JE., BARAJAS-FERRERIRA C., BARAJAS-SOLANO AF., LAVECCHIA R., ZUORRO A., 2019. Vinasse as a Sustainable Medium for the Production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. Water 11:1526
- RADER RA, LANGER E. S. 2018. Worldwide biopharmaceutical manufacturing capacity analysis: growth continues across the board. <u>https://bioprocessintl.com/business/economics/worldwide-biopharmaceutical-manufacturingcapacityanalysis-growth-continues-across-the-board/</u>. Accessed 28 Sept 2019
- WANG S. K., WANG X., MIAO J., TIAN Y. T., 2018. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. *Bioresour. Technol.*, 253: 79 – 84.
- XIONG W., LI X., XIANG J., 2008. High-density fermentation of microalga Chlorella protothecoides in bioreactor for microbio-diesel production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 29 – 36.
- XIN L., HONG-YING H., KE G., YING-XUE S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.*. *Bioresource Technology*, 101: 5494 – 5500.
- YAN D., LU Y., CHEN Y-F., WU Q., 2011. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresour*. *Technol.* 102: 6487 – 6493.
- TIAN-YUAN Z., HONG-YING H., YIN-HU W., LIN-LAN Z., XUE-QIAO X., XIAO-XIONG W., GUO-HUA D., 2016. Promising solutions to solve the bottlenecks in the largescale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 60: 1602 – 1614.

Chapitre III
Chapitre III : Culture de microalgues natives du type *Chlorella vulgaris* dans du lactosérum originaire des fromageries industrielles pour la production du biodiesel.

Contexte :

En raison de leur teneur relativement élevée en lipides de types saturés et insaturés, de leurs propriétés de croissance rapide et de leur production élevée de biomasse, les microalgues sont reconnues comme des candidats prometteurs et durables pour la production de biodiesel, un carburant vert et durable.

La production de biocarburant d'origine algale présente de nombreux avantages, outre l'argument de la productivité, la compatibilité des algocarburants avec les infrastructures pétrolières actuelles de traitement et de distribution permet déjà de grandes économies. Le concept algal repose sur le principe de capter et de concentrer l'énergie diffuse de la lumière ou l'énergie chimique de certains rejets en les convertissant en biomasse algale, il est possible d'extraire de cette dernière des biocarburants via des transformations chimiques ou enzymatiques et produire au final du biodiesel ou du bioéthanol. La séquestration du carbone et la combustion propre (du biodiesel de microalgues) sont également des aspects attrayants de l'exploitation des microalgues pour la production de biodiesel. De même les microalgues sont étudiées pour être utilisées dans le traitement des eaux usées.

Ainsi, une culture à grande échelle de ces micro-organismes est nécessaire. Afin de pallier aux difficultés liées au déploiement commercial de la technologie des biocarburants à base de microalgues. Ces dernières doivent êtres aptes à croitre dans un milieu de culture économiquement adapté, de l'emploi de méthode de récolte à faible consommation d'énergie et de l'usage de technique d'extraction de lipides qui soit rentable et efficace. A ce titre, les procédés basés sur le traitement de la biomasse sèche sont non économiques en raison des apports énergétiques impliqués. A cet effet, les méthodes qui fonctionnent avec des boues d'algues ou une pâte humide sont préférées. Par ailleurs, l'inconvénient de la culture autotrophe caractérisée par une faible concentration en biomasse dans le milieu et la dépendance à la lumière du soleil (ou aux sources lumineuses) constitue un autre frein au développement de la filière algale. A cet effet, de nombreux chercheurs tentent de trouver d'autres solutions, qui coûteraient moins chers pour produire des microalgues, comme changer les processus de production avec l'utilisation des milieux alternatifs, de préférence les eaux usées.

Aujourd'hui, le succès et la viabilité économique d'une industrie des biocarburants à base de microalgues dépendront d'un certain nombre de facteurs, notamment la sélection de souches résistantes qui présentent des taux de croissance exceptionnels, des profils lipidiques adaptés à

la production de biodiesel et une tolérance à croitre dans un large éventail de condition environnementale.

La production de lait n'a cessé de croître, de sorte que l'industrie laitière est devenue la principale industrie de transformation agricole. Les eaux usées laitières proviennent principalement des usines de transformation qui produisent du fromage, du beurre et d'autres produits laitiers. Ils sont riches en matières organiques dissoutes principalement sous forme de protéines (3,8 %), de matières grasses (3,6 %) et de lactose (4,5 %). L'azote et le phosphore sont également présents, provenant principalement des protéines du lait. Reste qu'elles sont pauvres en solides en suspension, à l'exception du caillé fin présent dans les déchets du lactosérum du fromage.

Dans cette étude, les effluents liquides laitiers sont proposés, d'une part, afin de remplacer les milieux de culture de synthèse dans la perspective d'amélioration des taux de croissance et de la teneur en lipides neutres, d'espèces indigènes du genre *Chlorella*, car elles sont considérées comme les deux principaux obstacles à la commercialisation des biocarburants algaux. D'autre part, pour traiter ces eaux industrielles et réduire leur impact dans l'environnement, car ils représentent un grave problème de santé publique. De même, dans l'optique de réduction des coûts de production de biodiesel, des méthodes d'extraction de lipides à base de pâte algale humide seront considérées et comparées aux procédés basés sur le traitement de la biomasse sèche.

Mots-clés : Microalgues oléagineuses, espèces natives, effluent industriel, lactosérum, nutriments, accumulation de lipides, optimisation, procédés d'extraction, solvant, transestérification, biodiesel.

Chapitre III. Partie I : Production de biodiesel à partir de *Chlorella sp*. un mutant native de couleur jaune en culture sur les effluents laitiers.

- Djillali Ghobrini, Tomáš Brányik, Saliha Yakoub-Bougdal, Kamal Aïboud, Leila Kebbab, Djamel Daoud, Nacéra Lahouel Rachid Bouarab, Mohammed Oumsalem, and Lyes Zanoun.
- 1. Production of biodiesel from the locally isolated yellow strain of *Chlorella sp.* using dairy wastewater as a growth medium.

AIP Conference Proceedings 2190, 020097 (2019).

(Papier conférence)<u>https://doi10.1109/IRSEC.2018.8702962</u>

Résumé

Dans cette étude, une microalgue unicellulaire indigène a été isolé et considéré pour son potentiel de production de biodiesel en optimisant sa capacité à croître dans les effluents laitiers en condition hétérotrophe. A cet effet, une souche sauvage jaune de *Chlorella sp.* isolée dans une oasis à Ghardaïa (Sahara septentrional algérien), a été criblée pour sa capacité de production de biomasse et de lipides. Les résultats ont montré que l'utilisation des eaux usées laitières peut remplacer l'utilisation d'un milieu artificiel tel que le BG11 pour la culture des algues d'eau douce.

L'addition d'azote et de magnésium aux eaux usées laitières a considérablement augmenté la productivité en matière de biomasse et de lipides. Ainsi, la productivité volumétrique maximale a atteint $(0,051 \pm 0,0007)$ g /L. h, alors que la productivité à l'intérieur du milieu de contrôle BG11 était de $(0,044 \pm 0,0018)$ g /L. h. La démarche sur la production de lipides a montré un potentiel élevé de la souche mutante pour la production du biodiesel. Ainsi, le taux de lipides totaux enregistré chez *Chlorella sp.* en phase de décroissance, sur les effluents laitiers supplémentés en nutriments, dépasse en moyenne 27% de la biomasse algale sèche. Par ailleurs, la qualité du biodiesel obtenu est comparable au diesel conventionnel et au biodiesel standard ASTM.

Mots-clés : *Chlorella sp.*, souche mutante jaune, effluent laitier, productivité de la biomasse, extraction, lipides, biodiesel.

Abréviations :

ASTM : American Society for Testing and Materials DWW : Effluents laitiers FAMEs : Esters méthyliques d'acides gras HPDWW : Effluent laitier hydrolysé et prétraité PDWW : Effluent laitier prétraité P_{max} : Productivité volumétrique maximale de la biomasse $P_{Lipides}$: Productivité lipidique SWW : Les eaux usées salines μ_{max} : Taux de croissance spécifique WW : Eaux usées X_{max} : Concentration maximale en biomasse

1-Introduction

Aujourd'hui, le biodiesel est principalement produit à partir de cultures oléagineuses, d'huiles végétales usagées ou de graisses animales (DEMIRBAS et *al.*, 2016). Parmi les cultures oléagineuses les plus utilisées figure soja. Ce dernier est consommé à la fois dans l'alimentation humaine et animale, par conséquent, son utilisation pour la production de biodiesel pourrait accroître la concurrence et les prix dans les secteurs de l'alimentation humaine et animale (MUELLER et *al.*, 2011).

Dans un contexte social, la croissance s'oriente vers le développement durable de nos ressources et la recherche continue de biocombustibles peu coûteux et plus propres. Les biocarburants à base de microalgues semblent être une alternative à la consommation des combustibles fossiles traditionnels tels que le charbon et le pétrole (RAWAT et *al.*, 2013). En effet, ces plantes microscopiques ont la possibilité d'être cultivées de différentes manières pour produire des composés ayant un potentiel énergétique comme les lipides neutres de la classe des triglycérides (*TAGs*), source intéressante de biodiesel (CHEN et *al.*, 2018). Les microalgues en tant que matière première pour le biodiesel sont considérées parmi les candidats plausibles et sont préférées pour remplacer le diesel pétrolier en raison de ses similitudes structurelles et de ses émissions de gaz comparativement plus faibles (BRENNAN & OWENDE, 2010). L'autre attrait majeur de l'utilisation de la biomasse microalgale pour la production de biodiesel réside dans son potentiel à générer jusqu'à 58 700 L d'huile par hectare, soit au moins un à deux ordres de grandeur supérieurs à ceux des autres cultures oléagineuses (CHISTI, 2007; CHEN et *al.*, 2011).

Les espèces du genre *Chlorella* sont des microalgues vertes unicellulaires, sphériques, présentant une reproduction asexuée. Ces microalgues sont représentatives du phytoplancton des lacs et des étangs et peuvent également être trouvées dans différents types de sols (QIAO et *al.*, 2009). De par leurs propriétés physiologiques (croissance rapide, un cycle de vie simple) et leur capacité à accumuler des teneurs élevées en lipides, elles sont largement étudiées et exploitées dans le monde entier dans plusieurs secteurs pour leur haute valeur nutritionnelle, anti-inflammatoire, et énergétique (DALIRY et *al.*, 2017; KATIYAR et *al.*, 2017).

Au cours de la dernière décennie, l'application des microalgues dans l'ingénierie et la biotechnologie des biocarburants a suscité un grand intérêt. Néanmoins, malgré les avancées significatives de la recherche sur les microalgues comme matière première pour le biodiesel, ce diesel alternatif est loin d'être techniquement réalisable, économiquement compétitif, écologiquement acceptable et facilement disponible (MEHER et *al.*, 2006). Un large éventail d'approches répondant aux exigences d'exploitation d'huile microalgale ont été exploitées pour cultiver des microalgues à des fins énergétiques. Toutefois, beaucoup s'accordent à dire que la clé du succès, entre autres, pour optimiser la croissance des algues et la production de lipides à moindre coût serait l'utilisation des eaux usées des effluents industriels principalement laitiers (CHOI et *al.*, 2018; WANG et *al.*, 2018). En effet, ces eaux résiduaires sont l'une des alternatives possibles pour répondre aux besoins nutritionnels de ces microorganismes, car ce substrat bon marché constitue une source importante de nutriment et de matière organique avec une disponibilité sans limite. De même le recyclage des eaux usées pourrait avoir un impact positif sur l'environnement avec la préservation des ressources en eau douce (YADAVALLI et *al.*, 2014).

Le lactosérum ou « petit-lait » est le principal co-produit agricole obtenu lors de la fabrication du fromage. De couleur jaune-verdâtre, le lactosérum est composé d'environ 95 % d'eau, de la majeure partie du lactose, de 20 % des protéines du lait, de sels minéraux solubles et de très peu de matières grasses. Toutefois, la composition du lactosérum dépend du type de fromage produit mais, aussi des conditions de la formation du lait (DURHAM & HOURIGAN, 2007). Jusqu'à récemment, le lactosérum servait majoritairement à l'alimentation du bétail et à l'élaboration de préparations laitières et souvent les fromageries écoulaient leur lactosérum dans l'environnement (sol, lac, rivière, etc.) (BLASCHEK, 2007; YADAVALLI et al., 2014). A cet égard, les éléments nutritifs et contenus organiques du lactosérum constituent une sérieuse menace pour la qualité de l'eau qui aboutit à l'hypereutrophisation (ou dystrophisation) et sont parfois à l'origine de pollution plus grave due à la fermentation des matières organiques modifiant, ainsi, les propriétés physico-chimiques des écosystèmes aquatiques (ALVAREZ, 2011). En Algérie, 13860 tonnes de lactosérum sont produites par an. Toutefois, la valorisation de ce co-produits est à son balbutiement pour ne pas dire absente. Ainsi, les champs de son utilisation restent larges et un usage pour la culture des microalgues peut, d'une part, potentiellement traiter et réduire les teneurs élevées en éléments nutritifs, d'autre part, de produire voire d'améliorer les taux de croissance et la teneur en lipides chez des espèces microalgales.

Le but du présent travail est de montrer l'intérêt des microalgues dans la biotechnologie environnementale pour la valorisation du lactosérum et la production de biodiesel via la culture sur ces effluents d'une souche microalgale localement isolée *Chlorella sp.* GM12 (un mutant de couleur jaune) obtenue suit à une réorientation du métabolisme de la souche isolée induite par un changement dans la composition du milieu de culture.

2- Matériels et méthodes

2.1- Prélèvement et méthode d'échantillonnage

2.1.1- Prélèvement des microalgues

Le prélèvement de microalgues a été réalisé au niveau d'un bassin qui appartient aux travaux d'un puits de forage d'eau situé à Metlili dans la wilaya de Ghardaïa à une profondeur de 0-10 cm. L'opération a été effectuée au mois de février 2019 par temps ensoleillé (entre 12h et 14h), moment où la transparence à la lumière est optimale et sous une température de 18 °C (fig. 71)



Figure 71 : Situation géographique de la région d'étude et site de prélèvement.

La procédure d'échantillonnage est réalisée ainsi :

- Les échantillons ont été récoltés dans des bouteilles en verre ;
- Trois prélèvements ont été effectués pour servir aux différentes analyses (physicochimiques et biologiques);
- Une fois le prélèvement effectué, les bouteilles où flacons d'échantillonnage sont recouverts avec du papier aluminium, étiqueté (numéro de l'échantillon, date, lieu, heure de prélèvement et température) et conservés au niveau d'une glacière pour être transporté au laboratoire.

2.1.2- Identification et caractérisation des espèces microalgales dans les échantillons prélevés

Avant toute analyse, une observation au microscope optique à différents grossissements doit être effectuée afin d'assurer la présence des microalgues au niveau des échantillons.

L'identification est réalisée à l'aide d'un microscope optique (x40 et x 100) de type *Optica* WF10X/22 sur lequel est intégré une caméra digitale M-699. La lecture directe sur ordinateur est rendue possible grâce au logiciel *Optica Vision Pro*. Une identification plus poussée a permis de mettre en évidence la présence de différentes espèces algales dans les échantillons prélevés. Pour ce faire, une goutte d'eau est mise sur une lame de verre recouverte d'une lamelle transparente. Le dispositif est alors passé au microscope optique pour observation (x40 et x100).

2.1.3- Analyses physicochimiques de l'eau collectée

La nature et la composition de l'eau conditionnent le développement et la répartition des microalgues. Ainsi, en fonction des espèces d'intérêt et de la qualité du milieu aquatique (salin, alcalin, etc.) le milieu de culture d'isolement est choisi.

A cet effet, les analyses physicochimiques ont été effectuées à l'aide d'un multi-paramètre de type HANNA HI 9829, équipé de sondes HI 7609829 : pH, thermomètre, oxymètre et conductimètre.

2.2- Isolement, identification et purification de la souche de Chlorella sp.

Basé sur le principe de dilution, l'isolement des souches de chlorelle a été réalisé dans des boites de Petri contenant le milieu BG11 modifié connu pour convenir à toutes les souches de microalgues, principalement vertes et aux cyanobactéries (chap. II, part. 1). Néanmoins, pour l'obtention de souches de chlorelle et de mutant (couleur jaune et orange) une modification est apportée à ce milieu à savoir une dilution des concentrations en microélément I et II qui le rend spécifique à la culture et à la prolifération des espèces du genre *Chlorella* (voire la composition chap. II, part. 1). Aussi, au milieu de culture, 5 g.L⁻¹ de glucose ont été additionnés, le pH est ajusté à 6.8 avant autoclavage (110 °C, 15 min) et solidifié par de l'agar à 15 ‰, ce qui favorise l'apparition de souches mutantes jaunes et ou oranges. Les boites sont incubées dans une chambre de culture à 30 °C sous éclairement continu et une intensité lumineuse de 300 lux.

En fonction du diamètre des boites de Pétri, un volume de 1 à 3 mL de la solution d'eau échantillonnée est versé dans les boites de Pétri contenants, déjà, le milieu de culture BG11 modifié. Les boites sont hermétiquement fermées et maintenues dans les conditions suscitées

(fig. 72). Les colonies formées sont transférées sur de nouvelles boites de pétri par repiquages en stries.



Figure 72 : (a) Colonies vertes isolées sur le milieu solide BG11 ; (b) Colonies jaunes isolées sur le milieu solide (BG11) modifié.

La purification des souches est assurée par des repiquages successifs sur des boites de Petri avec le même milieu ayant servi à l'isolation des colonies et sous les mêmes conditions (RIPPKA et *al.*, 1979) (fig. 73).



Figure 73 : Souche de Chlorella sp. (GM12) sur une boîte de Pétri

Les échantillons du genre *Chlorella* purifiés ont été identifiés sur la base de l'observation des propriétés morphologiques de la colonie, à l'œil nu, mais aussi des caractéristiques cyto-photo-morphométriques des cellules (taille, forme, couleur, etc.) au microscope optique et par l'utilisation des manuels de référence de GAYRAL (1975) et de De REVIERS (2002) et les clés de détermination de JANSE VAN VUUREN et *al.*, (2006), de LEE (2008) et de BELLINGER et SIGEE (2010).

Il est important de signaler que la modification du milieu avait pour objectif, d'une part, de favoriser l'apparition de colonies de Chlorelles de couleur jaune et/ ou orange, une propriété appréciée par les industriels car elles entraînent la réduction de la chlorophylle dans la cellule. D'autre part, de réduire les temps d'apparition des colonies entre 3 - 7 jours. De l'autre, cette modification permet, aussi, le développement rapide des souches isolées (2 jours maximum) dans le cas des repiquages en stries et dans les conditions environnementales précitées.

2.3- Culture de la souche localement isolée en mode hétérotrophe

2.3.1- Préparation de la culture mère (préculture)

Pour le lancement des paramètres de l'étude et afin de faire l'inoculation à partir des échantillons contenus dans les boites de Pétri, une préculture (phase d'adaptation) de la souche

est entreprise ainsi : une quantité de 10^8 (cellules/mL de milieu) est inoculée à l'aide d'une anse d'inoculation dans des flacons Erlenmeyer de 300 ml de contenance et remplis par 150 mL de milieu BG11 modifié auquel nous avons additionné de 10 g.L⁻¹ de glucose. Le pH est ajusté à 6.8 avant autoclavage (110 °C, 15 min). Les flacons sont alors incubés sur un agitateur orbital à 150 rpm à l'obscurité et à une température de (30 ± 2) °C (fig. 74).



Figure 74 : Précultures de Chlorella sp. (GM12) en condition hétérotrophe.

Généralement, deux répétitions sont nécessaires pour la réalisation des précultures. Toutefois, dans le cadre de souches nouvellement isolées, trois répétitions sont mises à incuber simultanément. Ainsi, le troisième flacon servira à déterminer la phase stationnaire de la préculture par gravimétrie (chap. II, part. 1) et ainsi de déterminer à quel moment précis la souche sera prête à être inoculée, dans notre cas, il est de 72 h (fig. 75).



Figure 75 : Suivi de la cinétique de croissance de la souche native *Chlorella sp.* GM12 au niveau des précultures sur le milieu (BG11) modifié.

2.3.2- Milieu de culture à base de lactosérum (effluent laitier)

Les effluents laitiers (DWW) utilisés sont de type acide (pH = 5,2). L'effluent (DWW) a été collecté dans une usine de production de lait localisé dans la région de Ghardaïa. Le contenu collecté a été conservé au réfrigérateur à 4 ° C. Pour utiliser le milieu d'effluent (DWW) comme support de culture pour la souche native *Chlorella sp.* GM12, il a été sujet à quelque traitement.

2.3.2.1- Milieu d'effluent prétraité (PDWW)

Le milieu PDWW a été préparé à partir de DWW qui a subi un prétraitement basé sur l'addition de NaOH (5M) jusqu'à pH 7, un chauffage ($\approx 80 \degree C$; 45 rpm) pendant 10 min dans le but d'induire une précipitation des protéines indésirables. Le milieu DWW est ensuite centrifugé à 6000 rpm pendant 10 minutes pour le débarrasser des particules en suspension. Enfin, le milieu PDWW obtenu, est autoclavé dans des bouteilles en verre à 110 C° pendant 15 min et est conservé dans des conditions de laboratoire avant utilisation.

2.3.2.2- Milieu d'effluent hydrolysé et prétraité (HPDWW)

Le milieu HPDWW a été préparé à partir de DWW en ajoutant de l'acide sulfurique (H₂SO₄) (1 M) jusqu'à pH 4,6 et un chauffage ($\approx 80 \degree C$; 45 rpm) pour une hydrolyse chimique pendant 10 minutes. Ceci a été suivi de l'addition de NaOH (5 M) jusqu'à pH 7, un chauffage ($\approx 80 \degree C$; 45 rpm) pour la précipitation de substance indésirable. Le milieu DWW va subir une centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes. A la fin, le milieu HPDWW obtenu est stérilisé par autoclavage à 110 ° C pendant 15 minutes et conservé dans des conditions de laboratoire.

2.3.3- Expériences de culture de microalgues

Au total, deux milieux de culture à base d'effluent laitier (PDWW et HPDWW) ont été testés en conditions hétérotrophes cultivées en flacons agités. Les résultats ont été évalués par comparaison avec des cultures sur un milieu nutritif artificiel BG11 modifié.

Ainsi, pour examiner les effets des conditions de croissance sur le développement de la biomasse algale en condition hétérotrophe, la souche jaune de *Chlorella sp.* (GM12) a été cultivée dans les milieux additionnés de 10 g.L⁻¹ de glucose. Les milieux ont été inoculés à partir des précultures avec 10% (v/v) de la suspension cellulaire, le pH a été ajusté à 6.8 avant autoclavage (110 °C – 15 min).

Afin d'optimiser la composition des milieux PDWW et HPDWW, deux types de sels (NaNO₃ et MgSO₄ 7H₂O) ont été associés aux cultures comme indiqué dans le tableau XXXVIII. Les expériences ont été réalisées dans des flacons d'Erlenmeyer de 500 ml avec 250 ml de milieu. Les flacons ont été incubés sur un agitateur rotatif (modèle WisdSHO-2D) à 150 rpm à (30 ± 2) °C pendant 120 h. Les expériences ont été réalisées, à l'obscurité, dans des cultures parallèles en double et les résultats sont présentés sous forme de moyennes.

croissance de la souche indiance (Jaune) Chiorend sp. (GW12).				
Milieu de culture ID	Supplémenté (g.L ⁻¹ milieu)			
PDWW 1	10 g/L glucose			
PDWW 2	$10 \text{ g/L glucose} + \text{NaNO}_3 (2.7 \text{ g.L}^{-1}) + \text{MgSO}_4 7\text{H}_2\text{O} (0.25 \text{ g.L}^{-1})$			
HPDWW 1	10 g/L glucose			
HPDWW 2	10 g/L glucose + NaNO ₃ (2.7 g.L ⁻¹) + MgSO ₄ 7H ₂ O (0.25 g.L ⁻¹)			
BG11 modifié	10 g/L glucose			

Tableau XXXVIII : Caractéristiques des milieux utilisés pour étudier la cinétique de croissance de la souche mutante (jaune) *Chlorella sp.* (GM12).

2.4- Détermination de la biomasse, du pH et de la consommation du glucose

Des prélèvements réguliers sont effectués sur les cultures afin de déterminer la courbe de croissance des souches isolées. Par ailleurs, le pH et la concentration en glucose au niveau des différents milieux utilisés ont été effectués en parallèle avec l'étude de la cinétique de croissance. A cet effet, 6 ml de milieu sont prélevés, à l'aide de micropipettes à embouts stériles, et placés dans des tubes Eppendorf (2 ml) pesés au préalable.

La biomasse a été déterminée par analyse gravimétrique (voire chap. II, part 1). Les paramètres de la cinétique de croissance des microalgues sont donnés par le taux de croissance spécifique (μ_{max}) et la productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{max}). Ils sont calculés en utilisant les équations (1) et (2), suivantes :

$$(\mu_{max}) [Jours^{-1}] = \frac{\ln \left|\frac{c_2}{c_1}\right|}{t_2 - t_1}$$
(1)
$$(P_{max}) [g/L \cdot h] = \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1}$$
(2)

Où c_1 et c_2 font référence à la concentration en biomasse [g/L] mesurée par gravimétrie en rapport avec le temps au début t_1 et à la fin t_2 , de la phase de croissance exponentielle, respectivement.

Le pH a été mesuré pour chaque échantillon prélevé sur les cultures à l'aide d'un pH-mètre, modèle HANNA HI 255. Le suivi du pH permet de détecter une anomalie au niveau des cultures par exemple les contaminations dans le milieu peuvent enregistrer à un pH changeant brusquement devenant souvent et dans ce cas (culture hétérotrophe) acide.

Le glucose a été quantifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC Shimadzu model Prominence LC-20AT) avec un détecteur à indice de réfraction en utilisant le surnageant des analyses gravimétriques réalisées au cours des cultures (comme décrit au niveau du chapitre II, partie 2). Les tests ont été effectués en double et les résultats seront présentés sous forme de valeurs moyennes.

2.5- Récolte, extraction et transestérification

Une fois les cultures effectuées, la biomasse algale a été récoltée. Ainsi, les échantillons de la masse cellulaire ont été récolté par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 minutes et lavé une fois avec de l'eau distillée (voire chap. III, part. 1). La biomasse algale humide a été récupérée dans des flacons en plastique de 50 ml qui sont mis au congélateur à - 80 °C pendant 48 h avant le séchage à froid.

La biomasse obtenue a été séchée par lyophilisation et la procédure d'extraction des lipides à partir de cellules de microalgues a été réalisée en se basant sur les travaux de ZHU et *al*. (2002) qui reste une modification de la méthode d'extraction par voie humide de Bligh et Dyer (1959).

Ainsi, les lipides ont été extraits en utilisant un mélange de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) assisté par des billes en céramique de 1 mm \emptyset . Pour environ 0,2 gramme d'échantillon de biomasse lyophilisé, 50 ml de mélange de solvants ont été utilisés (fig. 76). Par ailleurs, pour récupérer le maximum de biomasse les tubes de 15 ml ont été lavés deux fois avec 2 ml de

méthanol (UV) avant passage à 50 ml. Après centrifugation, la phase organique a été soigneusement recueillie et le solvant a été évaporé avec un évaporateur rotatif à 60°C.



Figure 76 : Protocole d'extraction des lipides à partir de microalgues par broyage à billes selon ZHU et *al.* (2002) modifié.

Les solvant réduits, les lipides totaux ont été mesurés par gravimétrie et calculés par le rapport p/p de la fraction soluble dans le chloroforme/méthanol à l'échantillon d'algues lyophilisées. La teneur totale en lipides a été mesurée en double et les résultats sont présentés sous forme de moyennes.

Le calcul de la teneur totale en lipides est exprimé en (g) selon l'équation suivante :

Lipide (g) = *Poids du bécher contenant l'extrait lipidique* – *Poids du bécher vide*

La teneur totale en lipides est calculée selon l'équation (Eq. 3) :

Teneur (%) =
$$c_L \left[\frac{g}{g}\right] x \ 100$$
 (3)
 $c_L \left[\frac{g}{g}\right] = \left(\frac{m_{huile}}{m_{biomasse}}\right)$

Avec $m_{biomasse}$ est le poids de la biomasse algale et m_{huile} est le poids des lipides totaux.

Par ailleurs, les productivités lipidiques de la culture batch (discontinue) ont été calculées à partir de l'équation (Eq. 4) :

$$(P_{Lipides}) [g/L \cdot jour] = \frac{w_G [g/L] \cdot c_L [g/g]}{t[J]}$$
(4)

Où w_G représente la production cumulée de la biomasse algale et *t* correspond au temps du déroulement de la culture.

Les échantillons de lipides ont été convertis en esters méthyliques d'acides gras (FAMEs) par transestérification avec du méthanol en utilisant (4 %) d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 98%) comme catalyseur et du n-hexane comme solvant selon la méthode de ZHANG et al. (2014). Ainsi, pour hydrolyser les liaisons esters, libérer les acides gras et former des esters méthyliques d'acides gras, un mélange de lipides – méthanol (1:65 p/v) acidifié par 4 % (p/p) (H_2SO_4 /huile) d'acide sulfurique concentré ont été utilisés le tout sous une agitation continue à 45 °C pendant 2 h. Après refroidissement, les FAMEs ont été extraits par deux lavages successifs avec 10 ml de n-hexane. Après lavage, le mélange a été centrifugé à 8000 g pendant 20 min. Les deux couches qui se sont formées après centrifugation ont été secouées pendant 20 minutes dans une ampoule à décanter. Laissées au repos pour la séparation des deux phases, la couche inférieure contenant la phase hydrophile a été retirée, tandis que la phase organique (couche supérieure) a été recueillie, puis lavée avec 10 ml d'eau déminéraliser chaude afin de neutraliser l'acide et éliminer le méthanol en excès. La séparation des phases organique (biodiesel) et aqueuse se fait à température ambiante. Après l'addition de sulfate de sodium anhydre, la phase organique est évaporée dans un évaporateur rotatif sous vide à 50°C avec une vitesse de 30 rpm. Une solution contenant du FAME a été recueillie et le rendement en biodiesel (% en poids) par rapport au poids de l'huile de microalgues a été estimé. Le rendement de la réaction est calculé selon la formule suivante (Eq. 5) :

Rendement (%) =
$$\left(\frac{m_{biodiesel}}{m_{huile}}\right) x \ 100$$
 (5)

Avec $m_{biodiesel}$ correspond au poids du biodiesel et m_{huile} correspond au poids de d'huile extraite.

2.6- Analyse physicochimique des FAMEs

Pour obtenir des données sur la nature de biodiesel obtenu, une étude de ses propriétés physicochimiques a été réalisée et est basé principalement sur la détermination de la densité. L'indice de réfraction a été obtenu en utilisant un réfractomètre ATAGO Abbe (fig. 77). Par ailleurs, le pH a également été calculé en utilisant un pH mètre modèle HANNA (HI 255).



Figure 77 : Réfractomètre ATAGO Abbe

2.7- Analyse statistique

Les données recueillies ont été présentées sous forme de valeurs moyennes \pm Ecart types et les valeurs moyennes ont été analysées par test de Student t (p < 0.05) pour détecter des différences significatives entre les différences conditions de culture pour les valeurs de la biomasse et la proportion de lipides produits.

3- Résultats et discussion

3.1- Analyse physicochimique des eaux de prélèvements

Le tableau XXXIX donne les principaux paramètres physicochimiques rapportés de l'analyse des eaux prélevées. Ainsi, il est clair que les échantillons d'eaux de la zone de prélèvement sont de nature douces (pH = 7.03) avec l'absence d'ions polluants.

Paramètres	Echantillon d'eaux		
<i>pH</i> en <i>Mv</i>	- 27,9		
pH	7,03		
Redox <i>mVoRP</i>	278,3		
Oxygène dissous %	57,1		
Oxygène dissous PPM	5,01		
Conductivité µs/cm	4521		
Conductivité absolue µs/cm	4027		
Résistivité $M\Omega.cm$	0.0002		
TDS ppm	2261		
Salinité <i>psu</i>	2,42		
Température °C	19,24		
Pression atmosphérique psi	14,038		

Tableau XXXIX : Caractéristiques physicochimiques des eaux de prélèvements

3.2- Croissance des microalgues

Au cours de cette étude, nous avons constaté que la souche jaune de *Chlorella* est capable de croître sur les milieux (PDWW1 et HPDWW1) qui sont à base d'effluents laitiers. Cependant, les résultats obtenus étaient inférieurs par rapport à la croissance des microalgues sur le milieu BG11. Néanmoins, l'addition de nutriment tel que l'azote $(2,7 \text{ g.L}^{-1})$ et le magnésium $(0,5 \text{ g.L}^{-1})$ aux eaux usées laitières (PDWW2 et HPDWW2) a permis d'augmenter la concentration en biomasse algale, de sorte que les résultats obtenus étaient plus élevés que ceux obtenus sur le milieu BG11 modifié. L'évolution temporelle de la croissance de la souche mutante *Chlorella sp*. GM12 est présentée dans la figure 78.

La figure 78 montre que la masse cellulaire des microalgues augmente sans passage par la phase de latence, ainsi, la croissance est linéaire dès les premières heures et la concentration moyenne en biomasse été comprise entre 2,65 et 3,53 g.L⁻¹. La figure 80 montre que la phase de croissance exponentiel dure environ 65 heures avant de voir les cultures en phase stationnaire caractérisée par une croissance stagnante. Par contre pour les milieux PDWW1 et HPDWW1



le plateau stationnaire n'est atteint qu'après 72 heures. Cette phase est un état d'équilibre ou le nombre de cellules dupliquée, en croissance, correspond au nombre de cellules mortes.

Figure 78 : Cinétique de croissance de *Chlorella sp.* (GM12) dans les différents milieux testés pendant la croissance hétérotrophe.

Sur la figure 80, on peut déduire au niveau des différentes courbes que les milieux de culture à base d'effluents laitiers (DWW) se scindent en deux groupes distincts. La différence de croissance entre les deux groupes semble être due à la présence de NaNO₃ et de MgSO₄ $7H_2O$ ajoutés dans le milieu. Les milieux additionnés de nutriments (PDWW2 et HPDWW2) ont entraîné une croissance de la biomasse supérieure d'environ 30%. D'un point de vue statistique ces deux milieux sont statistiquement similaires par contre ils présentent une différence très significative comparativement au milieu BG 11 modifié respectivement (p = 0,00018 < 0.05; p = 0,00051 < 0.05). Ces résultats rejoignent la plupart des rapports publiés précédemment, notamment ESPINOSA-GONZALEZ et al. (2014) qui montrent qu'une culture au niveau des d'eaux usées supplémentées en azote, avait tendance à accroitre et accélérer la croissance des microalgues en raison de l'immense disponibilité d'autres nutriments dans le milieu de culture. Les résultats ont également révélé que l'hydrolyse chimique du milieu à base d'effluent laitiers (DWW) n'avait pas d'effet positif sur la croissance des microalgues comparativement au milieu non hydrolysé, alors que la concentration du lactose dans le DWW pouvait aller jusqu'à 20 g.L⁻ ¹. Cela serait dû au temps de l'hydrolyse acide trop court dans notre expérimentation. En effet, ESPINOSA-GONZALEZ et al. (2014) travaillant avec le perméat du lactosérum ont observé que Chlorella protothecoides pouvait croitre aisément en assimilant simultanément le glucose mais aussi le galactose présent dans le perméat après un temps d'hydrolyse de l'effluent de 24 h. En ce sens, ceci démontre que notre souche Chlorella sp. GM12 ne peut pas assimiler ou dégrader le lactose ce qui rejoint plusieurs observations sur l'assimilation des disaccharides, en particulier du lactose, par Chlorella signalée comme négligeable (RODRIGUEZ, 1966; CERON GARCIA et al., 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011). A cet effet, il serait intéressant

d'ajouter de la galactosidase pour exploiter ce potentiel ou bien mettre des bactéries lactiques en coculture avec les microalgues.

Par ailleurs, l'absorption des nutriments par les microalgues est généralement affectée par la composition globale des éléments notionnels disponibles dans le milieu de culture. À cet égard, une source d'azote (N) est généralement requise dans le milieu de culture pour soutenir la croissance de la biomasse algale (KUO et *al.* 2014; LAM et *al.*, 2017). Ainsi, la faible concentration d'azote dans les eaux usées seules utilisées comme support de culture PDWW1 et HPDWW1, a induit des conditions de stress sur les cellules des microalgues. En effet, sous une faible concentration d'azote, la voie de synthèse de l'amidon des cellules microalgales est bloquée et le carbone assimilé est redirigé vers la production d'acides gras (LI et *al.*, 2010). Néanmoins, l'amidon est la source de carbone et d'énergie des microalgues et la réduction de la teneur en amidon dans les cellules de microalgues peut retarder leur efficacité d'assimilation de carbone et leur productivité en biomasse (LI et *al.*, 2008).

Les résultats obtenus dans cette expérience corroborent ceux que nous avons obtenus dans les mêmes conditions chez C. vulgaris CC256 cultivée dans les eaux usées salines (SWW) additionnée de nutriments, principalement de l'azote sous forme d'extrait de levure (2.8 g. L⁻¹ à 10 g. L⁻¹ de glucose), où le taux de biomasse à atteint (5 g. L⁻¹) comparativement à celui obtenus sur BG11 modifié (4 g. L⁻¹) dans les mêmes conditions, après 4 jours de culture (annexe 5). Nos résultats sur la concentration en biomasse produite dans des effluents laitiers rejoignent ceux rapportés par CASA et al. (2022) au niveau du lactosérum de ricotta, utilisé comme substrat pour la production de biomasse, montrant qu'un prétraitement des eaux usées avant leur utilisation a entraîné une amélioration des paramètres de la cinétique de croissance chez Chlorella vulgaris avec une concentration finale en biomasse de 3.2 g. L^{-1} , alors que la supplémentation en macronutriments n'a pas montré d'amélioration contrairement à nos résultats. De même LIANG et al. (2009) ont obtenu une densité de biomasse maximale de 2 g L^{-1} (en 6 jours) lorsque C. vulgaris s'est développé de manière mixotrophe dans les eaux usées urbaines avec 1 % (p/v) de glucose. Toutefois, le taux de croissance des microalgues dans notre expérimentation n'était pas aussi élevé que ceux rapportés par ESPINOSA-GONZALEZ et al. (2014) au niveau d'un milieu de culture synthétique et où le perméat de lactosérum hydrolysé a été utilisé comme principale source de carbone organique. Selon ces auteurs Chlorella protothecoides se développe mieux et produit des concentrations en biomasse plus élevées en condition hétérotrophe à la suite d'une hydrolyse enzymatique de l'effluent laitier durant 24 h à 30 °C. Ainsi, une concentration finale de biomasse de (4.3 ± 0.6) g. L⁻¹ a été obtenue à 10 g. L⁻¹ de sucre monomère et en présence de l'extrait de levure pour source d'azote. Dans cette même expérience l'utilisation du NaNO₃ comme source d'azote a induit une faible production de biomasse sur le même milieu comparativement à nos résultats 2.8 ± 0.4 g. L⁻¹. Ce qui confirme nos résultats précédents (chap. II, part 3) quant à l'utilisation d'azote sous forme organique pour améliorer les rendements des cultures de microalgue verte d'eau douce du genre Chlorella en condition hétérotrophe. Ces résultats ont confirmé que le milieu à base d'effluent laitier (DWW) est un milieu de base efficace pour la culture de Chlorella sp. sous un mode de culture hétérotrophe ce qui rejoint les observation de plusieurs auteurs, notamment WANG et al. (2018) et CASA et al. (2022).

Au cours de notre expérimentation le développement de la biomasse s'est opposé à la variation du glucose contenue dans les milieux de culture, du fait de sa consommation par les cellules microalgales ce qui démontre que l'espèce mutante utilisée dans cette étude était capable de se développer de manière hétérotrophe en présence de glucose (fig. 79).



Figure 79 : Évolution de la consommation de glucose chez *Chlorella sp.* (GM12) dans les différents milieux testés.

Pour ces expériences, les variations du taux de glucose à l'intérieur des milieux de culture ont été mesurées par HPLC. Les résultats montent qu'au niveau des cinq milieux utilisés, la consommation de glucose est conforme à la croissance de la biomasse. Fait intéressant, la consommation de glucose n'était pas complète dans toutes les expériences et même avec un temps de culture prolongé pour se stabiliser à hauteur de la phase stationnaire de culture. Ce qui corrobore encore une fois nos résultats obtenus précédemment chez C. vulgaris CC256 sur les effluents laitiers déminéralisés (SWW) (chap. II, part. 2). Ceci peut être expliqué, d'une part, par le fait que les fermentations ont été réalisés au niveau d'un milieu non enrichi par de l'oxygène ce qui induit une assimilation réduite voire nulle du glucose à compter de la phase stationnaire (HOLBROOK et al., 2014). D'autre part, nous constatons que le glucose était consommé en plus grande quantité lorsque la croissance des microalgues s'est déroulée au niveau des effluents laitiers additionnés de sucre pur et de nutriments (N et Mg) (PDWW2 et HPDWW2) par rapport aux cultures additionnées de sucre pur seulement (PDWW1 et HPDWW1). Ainsi, le glucose des milieux PDWW1 et HPDWW1 a été consommé partiellement. Ainsi, plus de 36 et 38 %, respectivement, de la concentration initiale en glucose sont restés dans le milieu de croissance à la fin de la culture. Par contre au niveau des milieux PDWW2 et HPDWW2 les teneurs initiales en glucose chutent respectivement de 73 % et 70 % après seulement 65 h de culture. A cet égard, les éléments inorganiques supplémentaires fournis pourraient avoir été responsables de la consommation accrue de glucose par la souche indigène de Chlorella. Ces observations sont en accord avec les travaux de ABREU et al. (2012) sur Chlorella vulgaris et FREYSSINET et NIGON (1980) chez Euglena gracilis où le lactosérum de fromage seul n'améliorait pas l'utilisation des glucides par les microalgues, par contre une simple hydrolyse du milieu peut favoriser son assimilation. Selon XIONG et al. (2008) la croissance et l'amélioration de la tolérance au glucose en condition hétérotrophe nécessite parfois des mixtures nutritives contenant 0,5 à 4 % de protéines, 1 à 3 % de sucre, 1 % d'acides aminés libres et 0,01 % d'hormones végétales. Ainsi, l'hydrolyse des effluents laitiers peut se révéler efficace pour stimuler la croissance des cellules (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014). Selon WOERTZ et al. (2009), la croissance des microalgues dans le cadre de traitement des eaux usées contribue au traitement principalement par l'assimilation des nutriments. Ainsi, le rapport C/N dans le milieu de culture doit être correctement ajusté afin d'assurer l'utilisation simultanée des deux sources par les microalgues et d'atteindre une efficacité optimale d'assimilation (CHIU et al. 2015). Par conséquent, la disponibilité des nutriments aux rapports spécifiques a un impact direct sur la croissance des microalgues car ils affectent considérablement l'assimilation du carbone et c'est ce qui a été mis en évidence dans notre précédant travail (chap. II, part. 3). Ainsi, un travail au préalable sur les optimums des rapports (C/N) pour chaque espèce est une nécessité pour une meilleure kinétique. Par exemple dans notre expérimentation sur les eaux usées saline le rapport (C/N) pour Chlorella vulgaris CC256 a été de (8/1) (chap. II, part. 3). Alors que durant les travaux de ESPINOSA-GONZALEZ et al. (2014) sur Chlorella protothecoides le rapport C/N été (50/1). De même avec ce ratio la concentration en biomasse, à 10 g. L⁻¹ de sucre, a doublé dans les cultures passant de 2.8 g. L⁻¹ à 6 g. L⁻¹. Il est également intéressant de voir que la concentration de glucose diminuait lentement si la concentration cellulaire maximale était sur le point d'être atteinte et cela au niveau des différentes conditions de culture ce qui a pour indication que l'état d'équilibre cellulaire est atteint.

Au cours de cette étude, il existe des différences importantes entre les taux de croissance spécifiques maximales. Ainsi, les (μ_{max}) les plus élevés pour *Chlorella sp.* GM12 ont été enregistré en utilisant une solution d'eau usée laitière hydrolysée et non hydrolysée additionnée de nutriments (HPDWW2 et PDWW2), respectivement, $(1,009 \pm 0,008)$ *jours*⁻¹ et $(1,012 \pm 0,005)$ *jours*⁻¹. Ces valeurs étaient près de 20 % supérieures à celles obtenues lorsque les cellules étaient cultivées dans le même milieu sans addition de nutriments (PDWW1 et HPDWW1) (tab. XXXX). Par conséquent, un manque d'azote semble inhiber la croissance des microalgues. De ce fait, il parait que la source d'azote supplémentaire dans les effluents influence le rapport C/N qui, devient favorable aux besoins des microalgues et de ce fait agit sur le taux de croissance spécifique.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation sur les eaux usées laitières supplémentées d'azote ont été deux fois supérieurs à ceux enregistrés par CASA et *al.* (2022) ayant utilisé du lactosérum de la ricotta ou une valeur de $(\mu_{max}) = (0.528 \pm 0.144)$ *jours*⁻¹ a été enregistrée et qui reste, même, inférieure aux données que nous avons enregistré en utilisant les eaux résiduaires seules PDWW1 et HPDWW1, respectivement, $(0,80 \pm 0,015)$ et $(0,81 \pm 0,012)$ *jours*⁻¹. Par contre, un simple prétraitement du lactosérum de la ricotta par de la chaleur (120 °C durant 20 min) a entraîné un taux de croissance spécifique maximal de (1.032 ± 0.144) *jours*⁻¹) (CASA et *al.*, 2022). Alors qu'un traitement par microfiltration tangentielle (procédés de séparation par membranes) de ces effluents a entrainé une augmentation importante de $(\mu_{max}) = (2.28 \pm 0.12)$ *jours*⁻¹ dans la même expérience.

cultivee en conditions neterotropnes à 30 C.				
Paramètre de culture				
(μ) [<i>Jours</i> ⁻¹]				
$0,80 \pm 0,015$				
$1,012 \pm 0,005$				
$0,81 \pm 0,012$				
$1,009 \pm 0,008$				
$0,96 \pm 0,014$				

Tableau XXXX : Paramètres de croissance de la souche mutante (jaune) *Chlorella sp.* (GM12) cultivée en conditions hétérotrophes à 30 *C*.

Il est important aussi de souligner que les résultats obtenus étaient supérieurs à ceux rapportés pour *C. vulgaris* cultivé de manière mixotrophe dans des milieux préparés avec des eaux usées laitières (DWW). En ce sens, ABREU et *al.* (2012) ont rapporté des taux de croissance spécifiques maximales (μ_{max}) de 0.12, 0.43 et 0.47 *jours*⁻¹ pour *C. vulgaris* cultivée de manière mixotrophe dans des milieux inorganiques additionnés de (DWW), de (DWW) hydrolysée et d'un mélange de glucose (5 g/L) et de galactose (5 g/L), respectivement.

Pour caractériser la productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{max}) des cultures en flacon agité, le P_{max} a été calculé selon la formule (Eq. 2). Ainsi, les résultats sur la productivité en biomasse, au niveau des différents milieux utilisés, ont été significativement influencés par les conditions nutritionnelles (fig. 80).



Figure 80 : Productivité de la biomasse chez *Chlorella sp.* (GM12) dans les différents milieux en condition hétérotrophe.

Les résultats démontrent clairement que le milieu PDWW1 ($0,032 \pm 0,0016$) g/L. h ne peut pas concurrencer le milieu BG11 ($0,044 \pm 0,0018$) g/L \cdot h, mais le milieu PDWW2 qui est supplémenté en azote et en magnésium donne de meilleures productivités ($0,051 \pm 0,0007$) g/L \cdot h. Le même constat est rapporté sur les cultures dans le milieu HPDWW1 (hydrolysé) sans apport supplémentaire en (N) et en (Mg) où la productivité en matière de biomasse était réduite ($0,033 \pm 0,0013$) g/L \cdot h comparativement à celle enregistrée au niveau du milieu synthétique BG11 modifié et au niveau du résidu laitier hydrolysé HPDWW2 ($0,0504 \pm 0,0012$) g/L \cdot h. Ainsi, l'apport des deux sels aux milieux de culture à base d'effluents laitiers (DWW) rend ces derniers plus compétitifs que le BG11 modifié.

Les faibles productivités sur les milieux à base d'effluent liquide laitier seuls (PDWW1) et (HPDWW1) revient au fait que ces milieux contenaient un ratio (carbone:azote) (C:N) faible par rapport aux ratios typiques pour des conditions optimales de production de biomasse algale souvent de l'ordre de (C:N, 6:1) (USAD, 1992). Ainsi, l'addition de l'azote dans les eaux usées laitières a fait monter le rapport et a permis une meilleure productivité et une meilleure croissance. Nos observations corroborent avec ceux de CHIU et al. (2015). Selon ces auteurs les rapports (C:N) devraient être pris en compte lorsque les eaux usées constituent la source de nutriments pour la culture de microalgues à base d'eaux usées. En effet, Le rapport C/N fait référence à la quantité relative de carbone organique et de teneur en azote dans le substrat qui sert d'indicateur de la disponibilité des nutriments. Par conséquent, PDWW2 et HPDWW2 peuvent être présentés comme une alternative aux milieux de culture traditionnels de synthèse pour la culture d'espèces microalgales d'eaux douces comme les espèces du genre Chlorella ce qui rejoint les observations de CHEN et al. (2015). En effet, les eaux usées laitières peuvent être utilisées comme milieu rentable pour la culture des microalgues en raison de leur abondance mais aussi car ils sont riches en nutriments ce qui représente, entre autres, un potentiel important dans le traitement des effluents laitiers. Selon GUPTA et al. (2016) les espèces du genre Chlorella présentent un potentiel dans le traitement des eaux usées, qui, couplé à l'accumulation simultanée de lipides présente un avantage certain pour des applications en biocarburant.

La comparaison de nos résultats avec d'autres auteurs qui utilisent les eaux usées comme milieu de culture permet de faire ressortir ce qui suit :

La phycoremédiation des eaux usées à l'aide de microalgues présente ces derniers comme une alternative aux traitements des effluents liquides. En effet, en plus de la séquestration du CO_2 principale avantage environnemental de l'utilisation des algues, il y'a la phycoremédiation (WELLS et *al.*, 2017).

Les espèces du genre *Chlorella* ont la capacité de se développer tout aussi bien sur les effluents organiques que sur les effluents inorganiques (en présence de lumière). Selon PEREZ-GARCIA et *al.* (2011) certains genres de microalgues (telles que *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.*) ont la capacité d'utiliser des substrats organiques comme sources d'énergie et de carbone pour leur croissance. Ainsi, la culture mixotrophe/hétérotrophe de ces catégories de microalgues est un moyen efficace de surmonter la limitation de la lumière et d'améliorer le rendement en biomasse/biodiesel par unité de surface. De même avec l'addition de substrats

organiques assimilables, la densité énergétique du milieu de culture peut être significativement augmentée (ZHANG et *al.*, 2016).

Dans notre cas, la culture de *Chlorella sp*. GM12 contenu dans les DWW était faite en mode hétérotrophe. Par conséquent, des densités cellulaires élevées dans le milieu à base de DWW prétraité et supplémenté de nutriment ont été enregistrées. La phase stationnaire sur les cultures a été atteinte avant 72 h, sur lesquelles aucune contamination n'a été rapportée.

Un comportement cinétique similaire de culture batch a été signalé lors de la culture de *C. vulgaris* dans des milieux à base d'effluents laitiers (DWW). Ainsi, en tenant compte de la concentration finale de la biomasse, la productivité volumétrique chez *Chlorella vulgaris* CC256 rapportée au cours de nos précédentes recherches (voire chap. II, part. 3) montre que l'utilisation des eaux usées salines après prétraitement (à glucose de 10 g/L) permet l'obtention de productivité importante (P_{max}) = (0,09 ± 0,0015) g/L. h. Néanmoins, la dilution des eaux usées salines prétraitées PSWW (DPSWW) a abouti à une amélioration de la productivité volumétrique avec un (P_{max}) = (0,103 ± 0,002) g/L. h.

Selon plusieurs auteurs, l'utilisation des eaux usées comme principale source de nutriments pour la culture des microalgues doit être souvent associée à un prétraitement (traitement chimique, thermique, dilution, utilisation de source de carbone, etc.) (QIN et al., 2014; ZHANG et al., 2016); de même que plusieurs variables, telles que : la température, les micronutriments, la salinité et le pH qui influencent la croissance doivent être pris en considération (HEREDIA-ARROYO et al., 2010; CHEN et al., 2011; BARTLEY et al., 2013; HAN et al., 2013). En effet, une concentration élevée en nutriments peut induire des croissances non constantes voir parfois entraver la croissance (LAM et al., 2017; CHIU et al., 2015) ; de même que la présence de matières organiques, notamment, de sucres non assimilables et l'existence d'une biocénose spécifique peuvent favoriser l'arrêt de la croissance (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014; LAM et al., 2017). Ainsi, la présence de protéines et autres macroéléments peuvent induire une certaine turbidité dans le milieu et agir négativement sur la croissance (CASA et al., 2022). En outre, pour pallier les effets négatifs de l'utilisation des eaux usées, les cultures sur les (DWW) des espèces du genre Chlorella, par exemple, sont habituellement réalisées en autotrophie ou mixotrophie, voir la combinaison de deux modes autotrophe/hétérotrophe ou bien mixotrophe/hétérotrophe et plus récemment en croissance hétérotrophe pour entraîner une production élevée de biomasse et une accumulation de teneur élevée en lipides dans les cellules (ZHANG et al., 2016). A cet égard, de hautes densités cellulaires ont pu être enregistrées en croissance hétérotrophe chez Chlorella. Ainsi, CASA et al. (2022) rapportent en fermenteur une productivité élevée par rapport à nos résultats 0,22 g/L · h, alors que l'étude en laboratoire sur des flacons agités induit une faible productivité. Par ailleurs, XIONG et al., (2008) ont enregistré une productivité en biomasse chez Chlorella protothecoides en milieu basal dans un fermenteur de l'ordre de $(P_{max}) = 0,277$ g/L. h. Ces valeurs plus élevées dans ces conditions pourraient s'expliquer par un profil de mélange différent qui s'est produit en raison d'un volume de substrat plus élevé. Selon GENEVOIS et al. (2019) travailler avec des volumes élevés pourrait avoir une incidence positive sur l'accès des cellules aux nutriments, principalement dans la phase de croissance exponentielle. Ces mêmes observations ont été enregistrées lors de nos travaux sur C. vulgaris au niveau du fermenteur (chap. II, part 3). Ainsi, la concentration et la productivité de la biomasse ont également été significativement influencées par les conditions

nutritionnelles ce qui corrobore les observations de ABREU et *al.* (2012). Dans une étude récente, l'optimisation du milieu du lactosérum de tofu en condition hétérotrophe a entraîné chez *Chlorella vulgaris* une productivité élevée en biomasse (P_{max}) = 0,03 g/L. h. (WANG et *al.*, 2018).

En tenant compte des productivités de la biomasse de diverses *Chlorella sp.* cultivées de manière hétérotrophe, autotrophe et mixotrophe dans un milieu utilisant des effluents laitiers en culture batch, nous pouvons conclure que nos résultats étaient significativement supérieurs à ceux obtenus par WANG et *al.* (2018) avec du lactosérum de tofu qui ont entraîné chez *Chlorella vulgaris* une productivité en biomasse de $(P_{max}) = 0.03$ g/L.h en condition hétérotrophe. Les travaux de QIN et *al.* (2014) dans les eaux usées laitières ont entraîné des résultats de la productivité de l'ordre de $(P_{max}) = 0.0187$ g/L.h en condition autotrophe. Mais aussi, de ceux de ABREU et *al.* (2012), en condition mixotrophe où un maximum de productivité a été obtenu en utilisant une solution à base de poudre de lactosérum hydrolysé $(P_{max}) = 0.75$ g/L.jour.

Aussi, la productivité en biomasse de la souche *Chlorella sp* GM12 dans nos conditions de culture était identique et parfois moins élevée que celle rapportée dans la littérature sur *Chlorella sp.* en culture sur d'autres types d'effluents. Ainsi, l'utilisation du jus de sorgho doux comme source de carbone chez *Chlorella protothecoides* a permis une productivité cellulaire de $(P_{max}) = 0.05$ g/L. h après 120 h de culture en flacons agités. LOIS-MILEVICICH et *al.* (2020) ont rapporté une productivité de 0,0196 g/L. h chez *C. vulgaris* cultivée dans des milieux à base d'eaux usées de brasserie, soit un ordre de moins que celle obtenue dans cette étude.

L'accroissement de la biomasse chez *Chlorella sp.* (GM12) dans tous les milieux testés s'est accompagnée d'une augmentation progressive du pH (fig. 81). Ces mêmes observations ont été remarquées au niveau des cultures hétérotrophes de *Chlorella vulgaris* souche CC256 réalisées au cours de notre travail (chap., II part. 1 et 2). En effet, le pH est passé de 6,8 à 7,98 – 8,80 après 95 heures de culture avec une stagnation à partir de ce temps. Les valeurs enregistrées, lors de nos expériences, montrent que le milieu à base de lactosérum (naturel ou hydrolysé) auquel est additionné de l'azote et du magnésium est plus alcalin que les milieux contenant du lactosérum sans aucun ajout de nutriments.

Le pH du milieu de culture est l'un des facteurs importants dans la culture des microalgues. En effet, la variation du pH dans le milieu de culture peut facilement affecter le métabolisme cellulaire et la croissance de la biomasse des microalgues (MOSTAFA et *al.*, 2012). Un pH approprié pour une croissance optimale de la plupart des espèces de microalgues se situe dans la plage neutre à alcaline. Cependant, il existe des espèces de microalgues exceptionnelles (par exemple *Dunaliella*) qui sont capables de se développer dans des conditions très acides sous un pH aussi bas que 1 (RAVEN, 1990). Selon GOLDMAN et *al.* (1982), la production de biomasse de microalgues vertes telles que *Chlorella vulgaris* était significativement affectée par le pH du milieu de culture (GOLDMAN et *al.*, 1982). Par ailleurs, les limites de tolérance au pH des microalgues sont déterminées soit par une influence chimique sur le milieu de croissance, soit par des effets métaboliques sur les cellules (GOLDMAN et *al.*, 1982). Ainsi, il a été détecté que le métabolisme vigoureux des microalgues entraîne généralement une augmentation drastique du pH avec le processus de culture sans supplémentation en CO_2 (ZHANG et *al.*, 2016; WANG et *al.*, 2018).



Figure 83 : Évolution du pH au cours de l'évolution de la biomasse chez *Chlorella sp.* (GM12) dans les différents milieux de culture.

Au vu des résultats obtenus dans la figure 88, nous constatons que les valeurs du pH dans les différents milieux testés augmentent progressivement pour se maintenir dans la zone d'intervalle (7,5 - 9) où nous remarquons que les cultures se déroulent dans de bonnes conditions, sans contamination et sans limitation de croissance. En effet, pour les tests que nous avons réalisés sur les cultures hétérotrophes de *C. vulgaris* certaines des cultures présentaient des contaminations et elles affichaient dans la majorité des cas, un pH très acide inférieur à 3. Par ailleurs, les mêmes observations ont été recueillies s'agissant de pH très alcalin au-delà de 11 dans les cultures.

Dans nos résultats, les valeurs de pH qui se superposent sur les valeurs optimales de l'accroissement de la biomasse correspondent à un pH (8,8) et sont obtenues sur les milieux de contrôle BG11 modifié et ceux de lactosérum additionné de nutriments (N et Mg). Ainsi, le pH a augmenté avec la croissance des algues jusqu'à ce qu'il atteigne une phase stationnaire en raison de l'accumulation d'OH dans le milieu de culture (RICHMOND et GROBBELAAR, 1986).

Par ailleurs, l'augmentation du pH augmente la salinité du milieu de croissance, ce qui est très nocif pour les cellules d'algues, principalement s'agissant d'espèces d'eau douce (JUNEJA et *al.*, 2013). Cependant, certaines espèces de microalgues d'eau douce comme *C. vulgaris* peuvent survivre sur une large gamme de pH. De même les taux de croissance maximale et les productivités de la biomasse chez cette espèce ont été observés à un pH compris entre 9 - 10 par ARIEF et *al.* 2009.

3.3- Teneur totale en lipides

Étant donné que la présence de lipides dans les cellules microalgales est entourée de couches de phospholipides polaires de la membrane cellulaire, la division de la couche est nécessaire pour libérer les lipides non polaires (ZHANG et *al.*, 2014). Sur la base de ce principe, l'extraction des lipides dans la présente étude a été réalisée en utilisant un solvant mixte du Chloroforme – méthanol assisté par des billes en céramique qui a pour objectif d'améliorer le

processus de cavitation afin que la cellule soit facile à lyser. L'analyse de la teneur en lipides a été réalisée pour voir l'effet des différents milieux de culture sur la synthèse des acides gras. La figure 88 montre la quantité moyenne totale de lipides obtenue après 115 h de culture sans utiliser de limitation nutritionnelle (culture en phase de décroissance) (fig. 82).



Figure 82 : Comparaison des teneurs en lipides (% de la biomasse en poids sec) et des productivités lipidiques chez *Chlorella sp.* (GM12) en fonction de la composante du milieu.

Il est admis que les micro-organismes oléagineux réservent des lipides pendant la phase de croissance et de carence en azote et les dégradent dans des conditions de carence en carbone (PAPANIKOLAOU et al., 2004; FAKAS et al., 2007). Dans notre étude, le rendement lipidique le plus élevé obtenu lors de la perturbation cellulaire assistée par des billes en céramique des microalgues était, comme dans le cas de la croissance cellulaire, au niveau des cultures réalisées sur les milieux PDWW2 et HPDWW2 par rapport au milieu BG11 modifié, après 115 heures de culture, respectivement, $(24.71 \pm 4.6 \%)$, $(27.26 \pm 3.86 \%)$ et $(18.76 \pm 3.04 \%)$ durant une alimentation normale. Ainsi, nos résultats de la teneur en lipides sur les milieux à base d'effluents sont dans la fourchette la plus courante, pour la production de biodiesels compétitifs, entre 20 et 30 % ce qui correspond à une valeur de 58700 L de lipides.ha⁻¹, une productivité très supérieure aux valeurs des cultures oléagineuses conventionnelles telles que le soja qui peut produire environ 636 L de lipides.ha⁻¹ (HIDALGO et al., 2013). L'analyse statistique a fait ressortir une différence entre la quantité de lipides produite et qui étaient statistiquement significative par rapport au milieu synthétique (p=0.0194 < 0.05; p=0.0110 < 0.05). Ce qui rejoint les observations de CHEN et al. (2015) qui ont constaté que la teneur en lipides des microalgues cultivées dans les eaux usées augmentait remarquablement de 10 % à 25 - 30 % par rapport à celles obtenues sur le milieu de synthèse, et qui reste convertible en biodiesel.

Le traitement des eaux usées à l'aide de microalgues pour éliminer les nutriments et générer de la biomasse pour les biocarburants est effectué par divers chercheurs. Tous s'accordent à dire que les microalgues peuvent être cultivées dans des eaux usées agricoles riches en nutriments

pour la production de biocarburants. Notamment, la microalgue verte *Chlorella sp.* qui cultivée dans les eaux usées laitiers a pu atteindre une productivité en acides gras de 0,23 g.m⁻²j⁻¹ (JOHNSON et WEN, 2010). Nos résultats corroborent ceux obtenus par YUSOF et *al.* (2011) chez *C. vulgaris* où le taux de lipides total enregistré pendant une alimentation normale était de 26,71 % sur milieu de culture enrichi avec un effluent gazeux.

Toujours chez *C. vulgaris* et sans limitation de nutriments, DOS SANTOS et *al.* (2015) ont rapporté, sur sept (07) méthodes d'extraction, une teneur totale en lipides dans la biomasse sèche sur un milieu de culture synthétique d'environ 19 %. Les résultats ont été enregistrés avec un mélange d'extraction Chloroforme/méthanol (2:1, v/v) ce qui corrobore nos résultats sur le milieu BG11. A cet égard, l'obtention d'une quantité totale en lipides conséquente à partir de la faible fraction cellulaire utilisée peut être attribuée dans notre cas au procédé d'extraction appliqué. En effet, plusieurs recherches ont mis en évidence que les mélanges chloroforme : méthanol ont tendance à être plus efficaces dans l'extraction des lipides totaux. Pour cette raison, les combinaisons de solvants (Chloroforme : méthanol) sont utilisées pour assurer une extraction complète de tous les lipides neutres, aussi bien sous forme de globules lipidiques libres que sous forme de complexes associés aux protéines (PURKAN et *al.*, 2019). Ainsi, ce mélange extrait à la fois les lipides neutres par le chloroforme et les lipides polaires par le méthanol (DOS SANTOS et *al.*, 2015). A cet égard, ce mélange est actuellement le plus utilisé pour l'extraction des lipides à partir de micro-organismes et s'avère être très efficace (VICENTE et *al.*, 2009; CHEIRSILP et *al.*, 2011; BOYD et *al.*, 2012).

Cela s'explique par le fait que lorsqu'une cellule de microalgue est exposée à un solvant organique non polaire, tel que le chloroforme, le solvant pénètre dans la membrane cellulaire et interagit avec les lipides neutres (c'est-à-dire les triglycérides) présents dans le cytoplasme. Le solvant interagit avec les lipides en raison des forces de van der Walls pour former un complexe solvant organique-lipide neutre. Ce complexe, entraîné par un gradient de concentration, diffuse à travers la membrane cellulaire et le film de solvant organique statique entourant la cellule, entrainant le solvant organique à travers. En conséquence, les lipides neutres sont extraits des cellules et restent dissous dans le solvant organique non polaire. Certains lipides neutres se trouvent dans le cytoplasme sous forme de complexe avec des lipides polaires (c'est-à-dire des phospholipides, des glycolipides, des stérols, des caroténoïdes) (DOS SANTOS et al., 2015). Ce complexe est fortement lié via des liaisons hydrogènes aux protéines de la membrane cellulaire. Les interactions de van der Waals formées entre les solvants organiques non polaires et les lipides neutres sont insuffisantes pour perturber ces associations lipides-protéines membranaires, rendant nécessaire l'utilisation d'un solvant organique polaire, comme le méthanol ou l'éthanol pour former des liaisons hydrogène avec les lipides polaires du complexe (HALIM et al., 2012; HIDALGO et al., 2016). Ainsi, les mélanges Chloroforme/méthanol permettent d'extraire entre-entres, caroténoïdes, chlorophylle, stérols, triglycérides, cires, aldéhydes, acides gras, phospholipides et glycolipides. Par ailleurs, l'emploi des billes en céramique est une technique d'extraction efficace, car elle ne modifie pas la qualité de la fraction lipidique et réduit la quantité de solvant utilisée. Ensemble le mélange de solvant et la fonction mécanique renforcent l'efficacité de l'extraction. Ainsi, la fonction mécanique peut perturber les cellules des microalgues permettant une plus grande pénétration du solvant dans les cellules, pour faciliter la mise en contact des lipides avec les solvants organiques.

Par ailleurs, la stratégie de production de lipides mentionnée ci-dessus a provoqué un effet indésirable sur la productivité en lipides, comme le montre la figure 89. Ainsi, nous avons observé que la production de lipides augmentait tandis que la productivité en lipides diminuait. Théoriquement, c'est parce que les augmentations de la production de la biomasse l'ont emporté sur les augmentations de la production de lipides et, par conséquent, la productivité en lipides a diminué. A cet effet, dans les cultures HPDWW, par exemple, la « production cumulative de lipides » a augmenté de plus de 35 %, passant de 18.205 % (HPDWW1) à 28,26 % (HPDWW2) (mlipides/mbiomasse) (voir figure 83), tandis que la « productivité de lipides par les cellules » a diminué d'environ 70 % entre (HPDWW2) et (HPDWW1). De même, dans les cultures dans le milieu PDWW, la « production cumulative de lipides » a augmenté de 33 %, passant de 16.69% (PDWW2) à 24.71% (PDWW2) (mlipides/mbiomasse) (voir figure 84), tandis que la « productivité de lipides par les cellules » a diminué d'environ 64 % entre (PDWW2) et (PDWW1). Ainsi, l'augmentation de la production de lipides était due à l'augmentation substantielle du nombre de cellules et de la biomasse plutôt qu'à la production de lipides dans une cellule. Par conséquent, la teneur en lipides a diminué tandis que la productivité des lipides a augmenté. A cet effet, la production de lipides par les cellules était moindre sur les milieux à base (DWW) additionnés de nutriments par rapport à ceux utilisés seuls, probablement en raison de l'apport d'azote pour l'alimentation des cellules microalgales pendant la fermentation. De ce fait, la stratégie batch utilisée peut être plus bénéfique pour augmenter la biomasse plutôt que la teneur en lipides chez Chlorella sp. GM12 puisque la carence de l'azote est essentielle pour favoriser l'accumulation de lipides (JAKOBSEN et al., 2008; RODOLFI et al., 2009; WIDJAJA et al., 2009). A cet égard, les milieux à faible teneur en azote ont contribué à une augmentation globale de la teneur en lipides de 6 % à 62 % dans différentes études (HU & GAO, 2006; NIGAM et al., 2011; USLU et al., 2011) tandis que la productivité lipidique est passée de 6 mg/L. jour à 8 mg/L. jour (WIDJAJA et al., 2009).

Les mêmes observations rapportées dans la présente étude ont été faites par MUJTABA et *al.* (2012) lors de la culture de *Chlorella vulgaris* pour la production de lipides sous un processus en deux étapes, composé d'une croissance en conditions riches en nutriments suivie d'une culture sans azote. Dans cette étude, la teneur en lipides a diminué de 53 % dans le milieu riche en nutriments à 43 % sous privation d'azote, tandis que la productivité des lipides a augmenté de 77,1 mg/L.jour.

Par ailleurs, il convient, ainsi, de noter que dans les quatre schémas de culture avec les effluents laitiers (DWW), c'est-à-dire (PDWW1)/(PDWW2) et (HPDWW1)/(HPDWW2) que la teneur en lipides a diminué et que la productivité des lipides a augmenté. Cette observation indique qu'en plus de la concentration en azote du milieu, d'autres facteurs peuvent jouer un rôle dans la production de lipides. En effet, l'hydrolyse du milieu (DWW) peut avoir eu un impact sur d'autres facteurs tels que la teneur en phosphore et les microéléments (précipitation), la forme chimique de l'azote (formation d'acides aminés), mais aussi l'ammonium par rapport au nitrate, qui peuvent également contribuer à l'amélioration de la productivité des lipides et à la réduction de la teneur en lipides. Tout cela explique en partie la différence notable entre la productivité et la teneur enregistrée sur les deux milieux lesquels étaient significativement différents (p > 0.05) ce qui rejoint les observations de HAMEDI et *al.* (2016) sur *Chlorella vulgaris* qui ont

travaillé en différant le milieu d'ensemencement du milieu de production (stratégie de culture en deux étapes).

3.4- Transestérification acide de l'huile microalgale

À partir de la quantité d'huile extraite de l'espèce microalgale indigène *Chlorella sp.* GM12 et qui correspond à un total de 0.759 g, la transestérification a été dressée en fonction du protocole indiqué (fig. 83).



Figure 83 : Hydrolyse des liaisons esters et formation des esters méthyles d'acides gras.

Au cours de notre expérimentation, un catalyseur acide est utilisé pour convertir les acides gras libres en esters par estérification. Néanmoins, les catalyseurs alcalins de type homogène (NaOH et/ ou KOH), sont la voie la plus recommandée pour la production de biodiesel, car ils agissent à basse température avec un rendement de conversion élevé et en peu de temps. Toutefois, leur propriété à induire la production de savon à partir des acides gras libres dans les huiles ne convient pas à la production de biodiesel microalgale en raison de la teneur élevée en acides gras libres dans les huiles algales (HIDALGO et al., 2013). A cet égard, les catalyseurs types acides minéraux restent les plus utilisés pour la production du biodiesel algale bien qu'ils nécessitent des temps de réponse plus longs et une température plus élevée que les catalyseurs alcalins. Actuellement, avec l'acide sulfurique (H₂SO₄), l'acide chlorhydrique (HCl) sont les catalyseurs acides homogènes les plus utilisés pour surmonter la limitation de la teneur élevée en acides gras libres et sont généralement utilisés lorsque la teneur en acides gras libres est supérieure à 1 % (PAPAYANNAKOS, 2014). Il est important de signaler que certaines études ont pris part à l'utilisation des deux catalyseurs successivement et à intervalle de temps. Le catalyseur acide est utilisé pour convertir les acides gras libres en esters par estérification. Une fois que la teneur en acides gras libres atteint moins de 1 %, une deuxième étape de transestérification des huiles est réalisée en utilisant un catalyseur alcalin (PARK et al., 2015).

La production d'ester méthylique d'acide gras (*FAME*) est réalisée en mélangeant les lipides extraits avec du méthanol dans une réaction de transestérification à l'aide d'un catalyseur acide, l'acide sulfurique H₂SO₄. Les glycérides présentes dans les lipides sont transformées en glycérols et en esters méthyliques. Étant donné que la transestérification est une réaction

réversible, l'excès de l'alcool primaire dans la réaction est nécessaire pour orienter la réaction vers la production de *FAME* car il est responsable de la rupture des liaisons glycérine-acide gras (AL-WIDYAN et AL-SHYOUKH, 2002; GHADGE et RAHEMAN, 2006; ABDULLOH et *al.*, 2014). Cependant, un fort excès de méthanol peut provoquer une diminution du rendement de séparation entre les phases ester et glycérine (MIAO & WU, 2006). Le méthanol a été choisi comme réactif dans l'étude car il est considéré comme matériau bon marché, ayant un point d'ébullition bas et son excès est facilement éliminé de la phase organique (PARK et *al.*, 2015).

Le biodiesel produit est récupéré dans une ampoule pré-pesée à l'aide d'un évaporateur rotatif et la quantité de biodiesel obtenue a été calculée, basée sur des mesures gravimétriques selon l'équation suivante :

$$\begin{split} m_{(biodiesel)} &= m_{(ampoule\ remplie)} - m_{(ampoule\ vide)} \\ \text{Avec}\ m_{(ampoule\ vide)} &= 161.6585\ g. \\ m_{(biodiesel)} &= 162,1877 - 161,6585 \\ m_{(biodiesel)} &= 0.5292\ g \end{split}$$

Une fois la quantité du biodiesel déterminé, il nous a été possible de déduire la proportion de lipides qui a été transformée en biodiesel. Cela est très important, car il renseigne sur la nature des acides gras contenue au niveau des lipides extraits à partir de la souche microalgale *Chlorella sp.* GM12. Ainsi, sur la base de la masse lipidique associée à la transestérification nous allons déterminer la quantité totale moyenne en lipides présente dans notre biomasse algale. La teneur moyenne en lipides est donnée ainsi :

Teneur (%) =
$$\left(\frac{m_{(huile)}}{m_{(biomasse)}}\right) x \ 100 = \left(\frac{0.759}{3.58}\right) x \ 100 = 21.2 \%$$

Avec $m_{(biomasse)}$ correspond à la biomasse algale totale produite durant la croissance de *Chlorella ssp.* GM12 durant la culture sur les différents supports.

De ce fait, le rendement obtenu de la réaction de Transestérification est de :

$$R (\%) = \left(\frac{m_{(biodiesel)}}{m_{(huile)}}\right) x \ 100 = \left(\frac{0.5292}{0.759}\right) x \ 100$$
$$R (\%) = 69.7 \ \%$$

Un rendement en biodiesel correspondant à 67,9 % indique, d'une part que les conditions de transestérification se sont bien déroulées, d'autre part, que le total de lipides extrait contenait une variété d'acides gras qui sont facilement convertible en biodiesel. Cependant, tous les lipides accumulés dans les microalgues ne peuvent pas être transformés en biodiesel, ce qui indique que les lipides neutres sont plus importants que la teneur totale en lipides (HIDALGO et *al.*, 2013). Par ailleurs, il convient de rappeler que la teneur et le profil des acides gras sont également affectés par les facteurs environnementaux, des différentes phases de croissance et des conditions de culture. Ainsi, la présence de fer pouvait stimuler l'accumulation de lipides liée à l'accumulation de lipides (LIU et *al.*, 2008; MATA et *al.*, 2010; SHARMA et *al.*, 2012). Ainsi, en déterminant la méthode d'extraction la plus efficace pour obtenir les lipides totaux, associée à de meilleures conditions de croissance, peut assurer des rendements élevés en biodiesel (EHIMEN et *al.* 2010; LEE et *al.*, 2013). A cet égard, MIAO et WU (2006), dans des

conditions de culture hétérotrophe de *Chlorella protothecoides*, ont obtenu des rendements élevés de biodiesel avec des niveaux de rapport molaire (méthanol : huile) de 45:1 et 56:1, respectivement de 68 % et 63 %.

L'ester méthylique d'acide gras (*FAME*) est le composant principal du biodiesel et, par conséquent, la composition chimique du profil *FAME* distinctif joue un rôle essentiel dans la détermination des propriétés du biodiesel produit. Les espèces du genre *Chlorella* sont connues pour contenir des acides gras à chaîne plus courte (longueur de 16 à 18 carbones) qui conviennent parfaitement à la production de biodiesel (CANAKCI et VAN GERPEN 2001; MIAO et WU, 2006). Selon KNOTHE (2008), les acides palmitiques, stéariques, oléiques et linoléniques sont reconnus comme les acides gras les plus courants contenus dans le biodiesel algal. Selon LEE (2010), l'acide linoléique (C18:2) est l'acide gras polyinsaturé le plus présent chez *C. vulgaris*, ceci est dû, entre autres, à l'extraction au méthanol. En effet, en comparaison avec d'autres solvants, l'extraction au méthanol conduit souvent à un pourcentage élevé de C18:2, qui est un composant majeur des lipides membranaires (MEESTERS et *al.*, 1996).

Par conséquent, cela explique que les lipides extraits avec du méthanol ont une teneur élevée en phospholipides, car le méthanol (polaire) et les phospholipides (dont la tête est polaire) ont la même polarité et sont solubles l'un dans l'autre. Par ailleurs, acide linoléique (C18:2), qui provient principalement des phospholipides, est présent en quantité relativement élevée durant la phase de croissance. Alors que sa quantité relative diminue pendant la phase d'accumulation des lipides au profil des principaux constituants des triglycérides accumulés qui sont l'acide stéarique (C18:0) et oléique (C18:1) (MEESTERS et *al.*, 1996).

3.5- Caractéristiques du biodiesel issu de l'huile microalgale

Les propriétés d'un biodiesel comme carburant alternatif, sont déterminées par la structure de ses composants en esters gras. Pour évaluer le potentiel du biodiesel produit dans notre expérimentation en tant que substitut du diesel fossile, nous avons évalué les propriétés des esters méthyliques d'acides gras (FAME) obtenus à partir de l'huile microalgale de *Chlorella sp.* (GM12). Au vu de la quantité de biodiesel obtenu, l'étude s'est focalisée sur la détermination de la densité, l'indice de réfraction et le pH. La plupart de ces paramètres respectent les limites établies par l'ASTM (American Society for Testing and Materials) relatives à la qualité du biodiesel (MA et HANNA, 1999; LANG et *al.*, 2001; KNOTHE, 2006; MOSER, 2009). Les résultats de l'analyse sont présentés dans le tableau XXXXI.

Pour plus d'informations sur les caractéristiques, les propriétés, les standards et les normes d'utilisation du biodiesel voir (KNOTHE, 2006 et MOSER, 2009).

Tableau XXXXI : Caractéristiques	du biodiesel	obtenu à pa	artir de l'h	uile algale d	e Chlorella
sp. (GM12) par transestérification ac	ide.				

Critères	Biodiesel	Diesel ^a	Biodiesel standard ASTM
Densité (g.cm ⁻¹)	0.882	0.81 - 0.89	086 - 0.90
<i>pH</i> ; T: 16 °C	4.605	5.5 - 8.0	Neutral
<i>n</i> ²⁰ ; T: 16°C	1.452	1.444 - 1.484	_

^a Les données sur le carburant diesel ont été tirées de la littérature publiée, comme indiqué dans le texte.

Les propriétés physiques et énergétiques du biodiesel issu de l'huile de *Chlorella sp*. (GM12) étaient en général comparables à celles du diesel fossile. Les résultats montrent que notre biodiesel présente des caractéristiques très proches de celles du diesel fossile et du biodiesel au standard mondial. Ainsi, la densité obtenue pour notre produit appartient à la gamme du biodiesel standard ASTM et du diesel fossile. Toutefois, le pH est un peu plus acide que les références du diesel fossile et du biodiesel, cela pourrait s'expliquer entre-autres par l'usage d'une concentration de 4% d'acide sulfurique (H₂SO₄, 98%) comme catalyseur et ou bien que les temps de lavage qui servent généralement à atténuer l'acidité du biodiesel fussent trop courts. Cependant, un simple ajustement du pH peut rectifier cette anomalie. Par ailleurs, le biodiesel obtenu était de couleur jaune, ce résultat a déjà été rapporté par MOSTAFA et *al*. (2012) chez *Oscillatoria sp* et *Wollea saccata*.

Globalement et parce que le biodiesel produit à partir de lipides microbiens dans cette étude répond aux normes précitées, l'espèce native *Chlorella sp.* (GM12) a un grand potentiel pour la production de biodiesel. De même, le biodiesel produit peut facilement intégrer les moteurs à explosion actuel (CHISTI, 2007; AFIFY et *al.*, 2010).

4- Conclusion

Aujourd'hui, les microalgues sont considérées comme de bons candidats pour la production de carburant en raison de leurs avantages par rapport aux autres cultures énergétiques. La production de biodiesel à partir de biomasse de microalgues fournit non seulement une solution plausible pour diversifier la matière première de la biomasse renouvelable actuelle, mais améliore également considérablement le cycle de vie du biodiesel. De plus, l'utilisation des eaux usées comme source de nutriments pour cultiver des microalgues pourrait encore améliorer la durabilité de cette matière première renouvelable. Dans ce sens, une souche indigène du *Chlorella* a été étudiée pour sa capacité à croitre et à produire des lipides sur les effluents laitiers.

Ainsi, la méthode adoptée pour l'isolement et la purification de souche native du genre *Chlorella* a permis d'avoir des colonies, de couleur jaune, induites par la modification du milieu de culture de base BG11, après seulement 3-5 jours d'incubation. Les repiquages successifs et répétés sur le milieu modifié ont permis l'isolement et la purification de la souche jaune *Chlorella sp.* GM12 avec un maximum de 2-3 jours d'incubation à chaque inoculation.

En outre, la souche native *Chlorella sp.* GM12 isolée a pu se développer dans les conditions de culture arrêtées (effluents laitiers et milieu synthétique). Ainsi, les résultats ont montré que l'utilisation du lactosérum peut se soustraire à l'utilisation d'un milieu synthétique comme le BG11 dans la culture de la souche mutante *Chlorella sp.* GM12. En effet, un apport supplémentaire en nutriment inorganique (N et Mg) au lactosérum, qu'il soit hydrolysé (HPDWW2) ou non (PDWW2), a incité les cellules de microalgues à augmenter le rendement en biomasse et de façon significative, respectivement 0,0367 g/L · h et 0,037 g/L · h par rapport à la productivité sur le milieu BG11 qui était de 0,033 g/L · h. Par ailleurs, les eaux usées utilisées sans ajout de nutriment PDWW1 et HPDWW ont également induit la croissance cellulaire de *Chlorella sp.* GM12. Néanmoins, les quantités de biomasse induites ne peuvent pas concurrencer le milieu BG11. Toutefois, le recyclage des effluents

laitiers est une bonne stratégie pour relever certains défis de la filière tout en s'attaquant à d'autres problèmes écologiques tels que l'eutrophisation.

Par ailleurs, la croissance hétérotrophe de *Chlorella sp.* GM12, sur les effluents laitiers, entraîne une accumulation de teneur élevée en lipides dans les cellules. Ainsi, une grande quantité d'huile de microalgue a été efficacement extraite de ces cellules hétérotrophes en utilisant une mixture (Chloroforme/méthanol). Ainsi, les eaux usées supplémentées de nutriments inorganiques (HPDWW2) et (PDWW2) ont provoqué une augmentation du rendement en lipides totaux, respectivement, en moyenne 28,26 % et 24,71 % par rapport au milieu synthétique 18,77 %. Tandis que la productivité lipidique a diminué d'environ 64 % et 70% sur ces milieux, respectivement.

La quantité d'huile de microalgue efficacement extraite de cellules hétérotrophes a été convertie en biodiesel par transestérification acide à hauteur de 67.9 % ce qui dénote que notre biodiesel contient un nombre important de TAG facilement convertible en FAME. En outre, les résultats, de l'analyse des propriétés du biodiesel obtenu, démontrent que les propriétés physiques du biodiesel et du diesel conventionnel sont proches. A cet égard, la densité de FAME se situe dans la gamme des normes ASTM pour le biodiesel.

Aujourd'hui, la viabilité économique dans la production de biodiesel à partir de la biomasse microalgale n'a pas été atteinte. Ainsi, l'extraction des lipides reste le processus le plus important avant leur transestérification, car son efficacité est directement liée à l'efficacité globale du processus de production de biodiesel. Cependant, à ce jour, l'extraction des lipides intra-cellulaires est énergétiquement exigeante. Par conséquent, il est nécessaire de développer des procédés d'extraction moins chers et efficaces pour parvenir à une production industrielle de biodiesel en utilisant, par exemple, des biomasses microalgales humides à des coûts appropriés.

5- Références bibliographiques

> AFIFY A. M. R., SHALABY E. A. & SHANAB S. M. M., 2010. Enhancement of biodiesel production from different species of algae. *Grasas y Aceites*, 61(4): 416 - 422.

➢ ABDULLOH A., MARYAM S., AMINAH N. S., TRIYONO T., TRISUNARYANTI W., MUDASIR M. & PRASETYOKO D., 2014. Modification of Turen's Bentonite with AlCl₃ for Esterification of Palmitic Acid. Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis, 9(1): 66 – 73.

ABREU A. P., FERNANDES B., VICENTE A. A., TEIXEIRA J. & DRAGONE J., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. Bioresource Technology, 118: 61 – 66.

➤ AL-WIDYAN M. I. & AL-SHYOUKH A. O., 2002. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresour. Technol.*, 85: 253 – 256.

➢ AMANULLAH A., BUCLAND B. & NIENOW A., 2004. Mixing in the fermentation and cell culture industries. In: PAUL EL ATIEMO-OBENG V. A.& KRESTA S. M. (eds) Handbook of Industrial Mixing. Wiley & Sons, NY, pp 1071 − 1170.

▶ **BLIGH E.G., DYER W.J., 1959.** A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911 – 917. DOI 10. 1139/y59-099

BELLINGER E. G. et SIGEE D. C., 2010. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. *John Wiley & Sons*, Ltd., 264 p.

BLASCHEK K. M., WENDORFF W. L. & RANKIN S. A., 2007. Survey of Salty and Sweet Whey Composition from Various Cheese Plants in Wisconsin. Journal of Dairy Science, 90 (4): 2029 – 2034.

BRENNAN L. &OWENDE P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14(2): 557 – 577.

➢ BOYD A. R., CHAMPAGNE P., MCGINN P. J., MACDOUGALL K. M., MELANSON J. E. & JESSOP P. G., 2012. Switchable hydrophilicity solvents for lipid extraction from microalgae for biofuel production. *Bioresour. Technol.*, 118 : 628 − 632.

CANAKCI M. & VAN GERPEN J.., 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. American Society of Agricultural Engineers, 44(6): 1429 – 1436.

➤ CASA N. E., LOIS-MILEVICICH J., ALVAREZ P., MATEUCCI R & DE ESCALADA Pla M., 2022. Chlorella vulgaris cultivation using ricotta cheese whey as substrate for biomass production. J. Appl. Phycol., <u>https://doi.org/10.1007/s10811-022-02685-</u> <u>3</u>

➤ CERON GARCIA M. C., CAMACHO F. G., MIRON A. S., SEVILLA J. M. F., CHISTI Y. & GRIMA E. M., 2006. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(5): 689 – 694.

CHEN J., DONG W., ZHANG X., TYAGI R. D., DROGUI P., SURAMPALLI R.
 Y., 2018. The potential of microalgae in biodiesel production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 90: 336 – 346.

CHEN C.-Y., KAO P.-C., TSAI C.-J., LEE D.-J. & CHANG J.-S., 2013. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and *CO*₂ fixation with *Spirulina platensis. Bioresource technology*, 145 : 307 – 312.

> CHEN C-Y., YEH K-L., AISYAH R., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technol.*, 102(1): 71 - 81.

CHEN M., TANG H., MA H., HOLLAND T. C., NG K. Y. S. & SALLEY S. O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour*. *Technol.*, 102 : 1649 – 1655.

CHEIRSILP, B., SUWANNARAT, W., NIYOMDECHA, R., 2011. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnol.*, 28: 362 – 368.

▶ CHISTI Y., 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv., 25(3): 294 – 306.

CHIU S-Y., KAO C-Y., CHEN T-Y., CHANG Y-B., KUO C-M., LIN C-S., 2015. Cultivation of Microalgal *Chlorella* for Biomass and Lipid Production Using Wastewater as Nutrient Resource, *Bioresource Technology*, <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.080</u>

➢ CHOI YK., JANG HM., KAN E., 2018. Microalgal biomass and lipid production on dairy effluent using a novel microalga, *Chlorella sp.* isolated from dairy wastewater. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 23: 333 − 340. DALIRY S., HALLAJISANI A., MOHAMMADI ROSHANDEH J., NOURI H. & GOLZARY A. 2017. Investigation of optimal condition for Chlorella vulgaris microalgae growth. "Global Journal of Environmental Science Management 3(2): 217 – 30.

DOS SANTOS R. R., MOREIRA D. M., KUNIGAMI C. N., ARANDA D. A. G. & TEIXEIRA C. M. L. L., 2015. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 95 – 97.

EHIMEN E., SUN Z. & CARRINGTON C., 2010. Variables affecting the *in-situ* transesterification of microalgae lipids. Fuel 89(3): 677 – 684.

➤ ESPINOSA-GONZALEZ I., PARASHAR A. & BRESSLER D. C., 2014. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology*, 155: 170 – 176.

FREYSSINET G. & NIGON V., 1980. Growth of *Euglena gracilis* on whey. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9 (4): 295–303.

➢ GAO C., ZHAI Y., DING Y. & WU Q., 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga Chlorella protothecoides. Applied Energy, 87: 756 – 761.

➢ GHADGE S. & RAHEMAN H., 2006. Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, 97(3): 379 − 384.

➤ GOLDMAN J.C., AZOV Y., RILEY R. B. & DENNETT M. R., 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 57: 1 – 13.

➢ GUPTA J., AGARWAL M. & DALAI A., 2016. Optimization of biodiesel production from mixture of edible and nonedible vegetable oils. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 8: 112 − 120.

▶ HALIM R., DANQUAH M. K. & WEBLEY P. A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnol. Adv.*, 30: 709 – 732.

▶ HAN F., WANG W., LI Y., SHEN G., WAN M. & WANG J., 2013. Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light-dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. *Bioresour. Technol.*, 132: 182 – 189.

HEREDIA-ARROYO T., WEI W. & HU B., 2010. Oil accumulation via heterotrophic/ mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 1978 – 1995.

→ HIDALGO P., CIUDAD G. & NAVIA R., 2016. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii*, for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 201: 360 – 364. <u>10.1016/j.biortech.2015.11.031</u>

➢ HIDALGO P., TORO C., CIUDAD G. & NAVIA R., 2013. Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 12: 179 − 199

▶ HU H. & GAO K., 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis sp.* to environmental factors under elevated CO2 concentration. *J. Biotechnol. Lett.*, 28: 987 – 992.

> JAKOBSEN A. N., AASEN I. M., JOSEFSEN K. D. & STROM A. R., 2008. Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in *Thraustochytrid aurantiochytrium* sp. Strain T66: effects of N and P starvation and O₍₂₎ limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80: 297 – 306.

➤ JANSE VAN VUUREN S., TAYLOR J. C., GERBER A. et VAN GINKEL C., 2006. Easy identification of the most common freshwater algae. a guide for the identification of microscopic algae in south African freshwaters. North-West University and department of water affairs and forestry. 200 pp.

➤ **JOHNSON M. B. & WEN Z., 2010.** Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 85: 525 – 534.

KATIYAR R., GURJAR B., BISWAS S., PRUTHI V., KUMAR N. & KUMAR, P., 2017. Microalgae: an emerging source of energy-based bio-products and a solution for environmental issues. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 72: 1083 – 1093.

▶ **KNOTHE, 2006.** Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. JAOCS, 83(10): 823 –33.

➢ KUO C. M., CHEN T. Y., LIN T. H., KAO C. Y., LAI J. T., CHANG J. S., LIN C. S., 2015. Cultivation of *Chlorella sp.* GD using piggery wastewater for biomass and lipid production, *Bioresour. Technol.*, 194: 326 − 333.

➤ LAM M. K., YUSOFF M. I., UEMURA Y., LIM J. W., KHOO C. G., LEE K. T., ONG H. C., 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, 103: 197 – 207.

LANG X., DALAI A. K., BAKHSHI N. N., REANEY M. J. & HERTZ P. B., 2001.
Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour. Technol.*, 80:
53 – 62.

LEE J., YOO C., JUN S., AHN C. OH H., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.*, 101(1): 575 – 577.

LEE R. E., 2008. Phycology. Cambridge: Cambridge University Press, (4th ed.)., 547 p.

➢ LI Y., HAN D., HU G., SOMMERFELD M. & HU Q., 2010. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biotechnol*. *Bioeng.*, 107: 258 − 268.

➢ LI Y., HORSMAN M., WANG B., WU N. & LAN Q. C., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 629 − 636.

▶ LIANG Y. N, SARKANY N. & CUI Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnol. Lett., 31(7): 1043 – 1049.

▶ LIU Z., WANG G. & ZHOU B., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour*. *Technol.*, 99(11) : 4717 – 4722.

▶ LOS D. A. & MURATA N., 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals, *Biochim. Biophys. Acta*, 1666 (2): 142 – 157.

➤ MA F. & HANNA M. A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, 70: 1 – 15.

➤ MATA T., MARTINS A. & CAETANO N., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew. Sustain. Energy. Rev., 14(1): 217 – 232.

➢ MIAO X. &WU Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour. Technol., 97(6): 841 − 846.

➤ **MEESTERS P., HULJBERTS G. & EGGINK G., 1996.** High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 575 – 579.

➤ MEHER L. C., VIDYA–SAGAR D., NAIK S. N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. Renew Sust *Energ. Rev.*, 10(3): 248 – 268

➤ MOSTAFA S. S., SHALABY E. A. & MAHMOUD G. I., 2012. Cultivating microalgae in domestic wastewater for biodiesel production, *Not. Sci. Biol.*, 4: 56 – 65.

➤ MUELLER S. A., ANDERSON J. E. & WALLINGTON T. J., 2011. Impact of biofuel production and other supply and demand factors on food price increases in 2008. *Biomass Bioenerg.*, 35(5): 1623 – 1632.

▶ MUJTABA G., CHOI W., LEE C. G. & LEE K., 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to starvation conditions. *Bioresour. Technol.*, 123 : 279 – 283.

▶ NIGAM S., RAI M.P. & SHARMA R., 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 7(3): 124 – 129.

➢ PARK J. Y., PARK M. S., LEE Y. C. & YANG J. W., 2015. Review Advances in Direct Transesterification of Algal Oils from Wet Biomass, *Bioresource Technology*, 184: 267 − 275.

▶ **PIENKOS P. T. & DARZINS A., 2009.** The promise and challenges of microalgalderived biofuels. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 3: 431 – 440.

PEREZ-GARCIA O., ESCALANTE F. M. E., DE-BASHAN L. E. & BASHAN, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.*, 45: 11 – 36.

➢ PURKAN P., ALINA N., ABDULLOH A., ABDILLAH S., WIWIN R., WIWIE S., HAMIDA N., SEUNG W. K., 2019. Biodiesel production by lipids from Indonesian strain of microalgae *Chlorella vulgaris*. Open Chem., 17: 919 − 926.

▶ QIAO H., WANG G. & ZHANG X., 2009. Isolation and characterization of *Chlorella* sorokiniana GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. J. Phycol., 45: 1153 – 1162.

QIN L., SHU Q., WANG Z., SHANG C., ZHU S., XU J., LI R., ZHU L. & YUAN Z., 2014. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172: 1121 – 1130. 10.1007/s12010-013-0576-5

RAVEN J. A., 1990. Sensing pH? *Plant Cell Environ.*, 13: 721 – 729.

RAWAT I., RANJITH KUMAR R., MUTANDA T. & BUX F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energ.*, 103: 444 – 467.

RICHMOND A., GROBBELAAR J. U., 1986. Factors affecting the output rate of Spirulina platensis with reference to mass cultivation. *Biomass*, 10: 253 – 264.

RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J. G., HERDMAN M. & STANIER
 R. Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol., 111(1) 61.

RODOLFI L., ZITTELLI G. C., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N., BONINI G. & TREDICI M. R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102: 100 – 112.

RODRIGUEZ M., 1966. Utilization of sugars by *Chlorella* under various conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 43: 139.

SHARMA K., SCHUHMANN H. & SCHENK P., 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. Energies 5:1532–1553

➢ USDA, 1992. Agricultural waste characteristics. Agricultural waste management field handbook, United States Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Washington, D.C.

➤ USLU L., ISIK O., KOC K. & GOKSAN T., 2011. The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *Afr. J. Biotechnol.*, 10: 386 – 389.

➢ VICENTE G., MARTINEZ M. & ARACIL J., 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.*, 92: 297 − 305.

➤ WANG S. K., WANG X., MIAO J., TIAN Y. T., 2018. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. *Bioresour. Technol.*, 253: 79 – 84.

➢ WELLS M. L., POTIN P., CRAIGIE J. S., RAVEN J. A., MERCHANT S. S., HELLIWELL K. E., SMITH A. G., CAMIRE M. E. & BRAWLEY S. H., 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of applied phycology*, 29: 949 – 982.

▶ WIDJAJA A., CHIEN C. C. & JU Y. H., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. J. Taiwan. Inst. Chem. Eng., 40: 13 – 20.

➢ XIONG W., LI X., XIANG J. & WU Q., 2008. Fermentation à haute densité de microalgues *Chlorella protothecoides* en bioréacteur pour la production de micro-biodiesel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78: 29 − 36.

➤ YADAVALLI R., RAO C.S., RAO R.S. & POTUMARTHI R., 2014. Dairy effluent treatment and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* and *Euglena gracilis*: study on open and closed systems. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 9: 368 – 373. <u>https://doi.org/10.1002/apj.1805</u>

➢ YUSOF Y. A. M., BASARI J. M. H., MUKTI N. A., SABUDDIN R., MUDA A. R., SULAIMAN S., MAKPOL S. & NGAH W.Z.W., 2011. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *African Journal* of *Biotechnology*, 10: 13536 – 13542.

> ZHANG Z., WANG B., HU Q., SOMMERFELD M., LI Y., HAN D., 2016. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 113: 2088

ZHANG X. L., YAN S., TYAGI R. D., DROGUI P. & SURAMPALLI R. Y., 2014. Ultrasonication Assisted Lipid Extraction from Oleaginous Microorganisms. *Bioresource Technology.*, 158: 253 – 261. 10.1016/j.biortech.2014.01.132
➤ ZHU M., ZHOU P. P. & YU L. J., 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, 84 (1): 93 – 95.

Chapitre III.

Partie II : Effets de la composition du lactosérum du fromage sur la croissance et la teneur en lipides de la microalgue verte native *Chlorella sp.* pour la production de biodiesel par voie humide.

1. Effects of cheese whey composition on growth, and lipid content of indigenous microalga *Chlorella sp.* for biodiesel production.

Résumé

Les rejets d'eaux usées laitières posent de sérieux problèmes environnementaux aux masses d'eau réceptrices lorsqu'elles ne sont pas correctement traitées, principalement parce qu'elles contiennent des nutriments tels que le phosphore et l'azote. Leur traitement en utilisant des microalgues pourrait être une solution adéquate pour réduire l'eutrophisation des eaux de surface, ainsi qu'en fournissant de la biomasse bon marché pour la production de biodiesel.

Dans ce travail, une souche verte native de type *C. vulgaris*, isolée dans l'oasis de Metlili (Sahara nord algérien), a été évaluée pour sa capacité à se développer dans du lactosérum de fromage (CWW) et pour son potentiel à produire du biodiesel à faible coût dans des conditions hétérotrophes. Les résultats montrent, que l'utilisation du milieu CWW, après traitement et sans ajout de nutriment, une croissance cellulaire inférieure à celle obtenue dans les cultures témoins (milieu BG11 modifié) (MBM). Par contre, l'addition de nutriments (N, P et Mg), au lactosérum de fromage (MCWW) traité, a fourni les meilleures conditions pour la production de biomasse ce qui a permis d'augmenter la productivité de 0,04 g/ L. h à 0,086 g/ L. h sur les milieux à base d'effluents. Par ailleurs, les teneurs en lipides obtenues à partir de la biomasse humide prélevée de culture dans le milieu MCWW se rapprochent de celle obtenue dans les cultures sur le milieu artificiel MBM et elles représentent, respectivement, 25.69 % et 32.41 % de la biomasse algale sèche. Par ailleurs, la teneur totale en biodiesel était de 18.55 % qui correspond à une valeur de 4.78 % g FAME/g de cellules microalgales sèches converties en biodiesel. Ce qui renseigne sur un profil en lipides chez *Chlorella sp*. GM2 non-favorable pour la production de biodiesel.

Mots-clés : *Chlorella sp.*, lactosérum, fromage Takemarit, biomasse, productivité, extraction, voie humide, biocarburant algal.

^{1.} Djillali Ghobrini, Zakaria Ghobrini, Lila Belkacemi, Tassadite Mazzari, Saliha Yakoub-Bougdal and Tomas Branyik.

Abréviations :

ASTM : American Society for Testing and Materials CWW: Lactosérum de fromage DNM : Milieu nutritif défini (variant du BG 11) FAMEs : Esters méthyliques d'acides gras MBM : Milieu de base modifié MCWW : Lactosérum de fromage modifié P_{max} : Productivité volumétrique maximale de la biomasse $P_{Lipides}$: Productivité lipidique S_{in} : Concentration initiale de glucose S_{fin} : Concentration finale de glucose SWW : Les eaux usées salines μ_{max} : Taux de croissance spécifique WW : Eaux usées X_{max} : Concentration maximale en biomasse $Y_{X/S}$: Coefficient de rendement.

1- Introduction

Aujourd'hui, le biodiesel issu de microalgues est considéré comme l'une des alternatives viables pour remplacer le diesel pétrolier (PATEL et *al.*, 2018). En effet, les lipides des microalgues sont solubles dans les solvants organiques et les principaux constituants des lipides sont des molécules lipidiques neutres et polaires de types saturés et insaturés (MUBARAK et *al.*, 2015). Les avantages importants des microalgues par rapport aux cultures agricoles sont leur renouvellement, le taux de croissance rapide et aucune nécessité de terres arables. Par ailleurs, la séquestration du carbone et la combustion propre sont également des aspects attrayants de l'exploitation des microalgues pour la production de biodiesel (CHEN et *al.*, 2018). Par ailleurs, les caractéristiques physico-chimiques du biodiesel à base d'algues ont des propriétés similaires à celles du diesel traditionnel, telles qu'un point d'éclair plus élevé, moins de toxicité, une biodégradation plus rapide et une meilleure lubrification (ARANSIOLA et *al.*, 2014; VEILLETTE et *al.*, 2015). A cet égard, le biocarburant issu des algues présenterait une empreinte carbone quasi-neutre (JONES et *al.*, 2012).

De nombreux efforts de recherche ont été consacrés à la production de biodiesel à partir de microalgues comme source d'huile au lieu des huiles végétales traditionnelles (KIM et *al.*, 2013; RAWAT et *al.*, 2013). Toutefois, étant donné que le coût des matières premières représente 75 % du coût total de la production de biodiesel (PRATOOMYOT et *al.*, 2015), les choix de la souche, du procédé de culture et d'extraction approprié sont les éléments les plus importants pour garantir un biodiesel à faible coût de production (PURKAN et *al.*, 2019).

Les rejets d'eaux usées industrielles alimentaires posent de sérieux problèmes environnementaux aux masses d'eau réceptrices (DE OLIVEIRA NUNES et *al.*, 2021). Le principal effet du rejet des eaux usées riches en composés organiques et en produits chimiques inorganiques tels que les phosphates et les nitrates est l'eutrophisation (ABDEL-RAOUF et *al.*, 2012; YAMASHITA & AMAMOTO-IKEMOTO, 2014). Il s'agit d'un problème mondial qui peut être résolu par l'utilisation de microalgues (DRAGONE et *al.*, 2009; ABDEL-RAOUF et *al.*, 2012 ;). A cet effet, l'utilisation de microalgues est souhaitable, car elles sont capables, de jouer un double rôle, de bioremédiation des eaux usées par l'élimination des nutriments en excès dans les eaux usées et avec une accumulation concomitante de biomasse pour le traitement en aval (LETELLIER M. & BUDZINSKI, 1999; WIDJAJA et *al.*, 2009). Ainsi, la dépollution des eaux usées par les microalgues est un procédé écologique sans pollution secondaire tant que la biomasse produite est réutilisée et permet un recyclage efficace des nutriments (CHINNASAMY et *al.*, 2010; MUBARAK et *al.*, 2015).

En plus des défis en amont liés à une culture efficace à grande échelle, le développement de processus efficaces et économique pour l'extraction d'huile et la conversion de biodiesel à partir de microalgues est également essentiel pour la réussite de la mise à l'échelle des transformations en aval (HALIM et *al.*, 2012). Ainsi, l'extraction des lipides à partir de la biomasse microalgale est une étape importante, car son efficacité est directement liée à l'efficacité globale du processus de production de biodiesel. L'étape d'extraction de l'huile comprend la désintégration cellulaire par des méthodes mécaniques, chimiques ou biologiques et la collecte de l'huile par un solvant (PARK et *al.*, 2015). Toutefois, les méthodes conventionnelles d'extraction des lipides intracellulaires sont énergétiquement exigeantes et préjudiciables à l'environnement (CHISTI, 2007; BRENNAN & OWENDE, 2010; KOBERG et *al.* 2011; HALIM et *al.*, 2012).

Ainsi, une évaluation du cycle de vie (ECV) de la production de biocarburants utilisant des microalgues a indiqué que le séchage et l'extraction au *n*-hexane représentaient jusqu'à 90 % de l'énergie totale du procédé (LARDON et *al.*, 2009). Récemment, des procédés avancés d'extraction d'huile par voie humide ont été suggérés pour surmonter ces verrous (HALIM et *al.*, 2011; ADAM et *al.*, 2012; CHENG et *al.*, 2013; TANZI et *al.* 2013). Selon YANG et *al.* (2014) l'extraction des lipides à partir d'une biomasse algale humide est une méthode plus économique, car elle réduit les coûts prohibitifs en lien avec le séchage de la biomasse.

Bien que de nombreuses microalgues soient extrêmement riches en lipides et soient utilisées comme matière première pour le biodiesel. Certains chercheurs se sont concentrés sur Chlorella sp, car elle est facilement disponible, peut être aisément cultivée à échelle de laboratoire et possède un profil lipidique adapté à la production du biodiesel (LIU et al. 2008; MIAO & WU, 2006; RODOLFI et al., 2009; XIONG et al., 2008). Cette espèce se reproduit principalement par autosporulation et peut, le cas échéant, être cultivée de manière photoautotrophe, mixotrophe ou hétérotrophe sur les eaux usées laitières et municipales pour l'élimination des nutriments et la production simultanée de lipides transformables en biodiesel (HALFHIDE et al., 2015). De plus, Chlorella est connue pour contenir des acides gras à chaîne plus courte (longueur de 16 à 18 carbones) qui conviennent parfaitement à la production de biodiesel (MIAO & WU, 2006; XU et al., 2006). Par ailleurs, la culture commerciale de cette espèce est bien connue et les effets stimulants de la supplémentation en source de carbone sur sa croissance sont bien documentés. Ainsi, la supplémentation en carbone organique, à savoir le glucose (CHEIRSILP & TORPEE, 2012 et YU et al., 2012) dans les cultures mixotrophes et hétérotrophes s'est avérée bénéfique pour améliorer la productivité de la biomasse et des lipides (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014).

L'objectif de cette étude était de trouver un support de culture, locale, durable et moins coûteux pour remplacer les supports artificiels afin de produire des huiles végétales à faible coût pour le marché du biodiesel. Dans ce contexte, le présent travail a évalué l'utilisation des eaux usées de l'industrie laitière (lactosérum du fromage Takemarit) pour la culture hétérotrophe de la microalgue *Chlorella sp.*. Les effets de divers paramètres de culture telles que la quantité et la qualité de nutriments additionnés ont été évaluées en comparant les données de la croissance cellulaire, de la productivité en biomasse et de la teneur totale en lipides extraits à partir de la biomasse algale humide avec des cultures en milieu de base (BM) le BG11 modifié

2- Matériels et Méthodes

2.1- Analyses physico-chimiques des prélèvements d'eau

La nature et la composition de l'eau conditionnent le développement et la distribution des microalgues. Les paramètres de l'eau tels que le pH, la température, l'oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés sur les sites d'échantillonnage avec un analyseur multiparamètre (HI 9829 multi, HANNA) (voire chap. III, part. 1).

2.2- Isolement, purification et identification de la souche

L'isolement des différentes espèces de microalgues a été basé sur le principe de dilution et est réalisé sur le milieu basique (BM) (une variante du milieu BG11) (tab. XXXXII).

L'identification de la souche indigène de *Chlorella sp.* GM2 a été réalisée par l'observation des caractéristiques cyto-morphométriques des cellules (taille, forme et couleur, etc.) au microscope en utilisant des manuels de référence de GAYRAL (1975) et De REVIERS (2002) et les clés de détermination de JANSE VAN VUUREN et *al.*, (2006) LEE (2008) et BELLINGER et SIGEE (2010).

Composition	Concentration (mg. L ⁻¹ eau distillée)	
(NH2) CO - urea	1100	
KH ₂ PO ₄	238	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	204	
CaCl ₂	88	
$C_{10}H_{12}O_8N_2NaFe$	40	
H_3BO_3	0.832	
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.946	
$MnCl_{2}, 4H_{2}O$	3.294	
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0.616	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2.678	
(NH4)6M07O24	0.172	
(NH ₄)VO ₃	0.014	

Tableau XXXXII: Composition du milieu de base (BM)

De 1 à 3 ml d'eau, sont prélevés et cultivés sur le milieu solide de base (BM) dans des boîtes de Pétri (Agar Bacto 15 ‰). L'ensemble a été mis sous illumination artificielle continue (100 μ E.m⁻².s⁻¹). De plus, la purification de la souche *Chlorella sp.* a été basée sur la méthode des repiquages en stries à l'intérieur des boîtes de Pétri, comme le montre la figure 86 (RIPPKA et *al.*, 1979). Les caractéristiques et les particularités morphologiques de la souche locale de *Chlorella sp.* ont démontré son étroite similitude avec le genre *Chlorella*. Les cellules individuelles de la souche de chlorelle sont de couleur verte, unicellulaires, de forme sphérique, comme le montre la figure 84.



Figure 84 : Purification et observation de la souche native Chlorella sp. GM2 (Gx40)

2.3- Eaux usées du lactosérum de fromage (CWW)

Le CWW a été collecté auprès d'une petite industrie laitière située dans la région de Ghardaïa qui représente l'étage bioclimatique aride à vocation laitière. Cette petite usine produit le "fromage Takemarit" typique de cette région du sud algérien à base de lait cru et de sels. Ainsi, la propriété principale de ces eaux usées de couleur jaune verdâtre reste son acidité (pH = 4,87) avec ses taux de matière grasse très importante (fig. 85).



Figure 85 : Milieu CWW collecté dans une laiterie locale (a: avant ; b: après traitement)

Par ailleurs, l'effluent ainsi collecté a été immédiatement congelé $(-4 \, ^{\circ}C)$ pour éviter toute activité biologique et prétraité avant son utilisation comme base de milieu de culture de la souche sélectionnée. Ainsi, le milieu CWW a été autoclavé à 80 $^{\circ}C$ pendant 15 min, puis filtré à travers un tissu en laine. Par la suite, le pH du milieu a été ajusté à 7 avec NaOH 5M et chauffé pendant 10 minutes à 80 $^{\circ}C$ sous une agitation à 150 rpm (voire chap. II, part. 1).

2.4- Conditions de préculture

Les cellules de la souche native *Chlorella sp.* GM2 en culture à l'intérieur d'une boîte de Pétri, ont été inoculées à hauteur de 10^8 cells.ml⁻¹ dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml avec 125 ml de milieu nutritif défini stérile (DNM), un second variant du milieu de culture BG11 dans lequel nous avons augmenté la quantité de trois sels N, P et Mg, respectivement, 3 g/L, 1,5 g/L et 0,5 g/L. A cette composition, nous avons additionné 10 g/L de glucose, le pH a été ajusté à 6,8 avant autoclavage (110°C, 15 min) et les erlenmeyers ont été incubés à l'obscurité sur un agitateur orbital (Wisd SHO-2D) à 150 rpm à 30 °C pendant 5 jours (fig. 86). Cette expérience a été réalisée en trois répétitions (voire chap. III, part, 1, sect. 2.3.1)



Figure 86 : Préculture de la souche indigène Chlorella sp. GM2 (après 5 jours)

2.5- Conditions de culture

La souche sauvage verte *C. vulgaris* GM2 a été étudiée pour sa capacité à se développer dans les eaux usées de lactosérum de fromage (CWW). Pour cela, nous avons étudié son comportement sur ce milieu de culture utilisé seul mais également modifié, où trois sources de

- KH₂PO₄ (3 g/L)

 $- MgSO_4$,7H₂O (1 g/L).

sels ont été ajoutés, sélectionnées au préalable sur la base de tests antérieurs voir (chap. II, part 2) et (chap. II, part 3). Les résultats ont été évalués par comparaison avec des cultures sur milieu nutritif standard modifié (MBM) comme indiqué dans le tableau XXXXIII.

	1	
Tests	Milieux de culture	Supplémenté
MBM	BG11 modifié selon GHOBRINI et al. (2018) et (2020)	- Glucose (10 g/L)
		- Peptone soja (5 g/L)
		- KH ₂ PO ₄ (3 g.L ⁻¹)
		- MgSO ₄ ,7H ₂ O (1 g/L).
CWW	Eaux usées de lactosérum de fromage	- Glucose (10g/L)
MCWW	CWW modifié selon GHOBRINI et al. (2018) et (2020)	- Glucose (10 g/L)
		- Peptone soja (5 g/L)

Tableau XXXXIII : Caractéristiques des différentes conditions de culture

Les milieux de culture ont été ensemencés (10 % v/v du volume total) dans des erlenmeyers contenant 250 mL de milieux stériles. Les cultures en flacons agités de la souche sauvage *C. vulgaris* GM2 ont été mises à incuber dans les mêmes conditions (150 tr/min et 30°C pendant 5 jours), jusqu'à la phase de décroissance. Les expériences ont été effectuées en double dans des cultures parallèles (fig. 87).



Figure 87 : Culture hétérotrophe de la souche native Chlorella sp. GM2 sur un agitateur orbital.

2.6- Analyse de la biomasse et du taux de glucose

Afin de suivre la cinétique de croissance des suspensions cellulaires, des prélèvements réguliers ont été effectués quotidiennement dans les différents milieux utilisés. Les courbes de croissance ont été déterminées sur la base d'une analyse gravimétrique telle que décrite précédemment (chap. II part. 1). Ainsi, 2 mL d'échantillons de suspensions cellulaires ont été centrifugés dans des microtubes pré-pesés de 2 mL à 14 x 10⁴ rpm pendant 5 min. Les culots cellulaires ont ensuite été lavés une fois avec 1 ml d'eau distillée avant la 2ème centrifugation. Enfin, les culots cellulaires ont été séchés à 105 °C pendant 24 h avant de prendre le poids des cellules sèches. Le surnageant, de la première centrifugation, a été filtré à travers un filtre

seringue de 0,22 µm pour la quantification du glucose. Les taux de glucose ont été considérés sur la base de courbes d'étalonnage formées à l'aide d'étalons et déterminés par HPLC (HPLC Agilent, services modèle 1100) avec un détecteur à indice de réfraction (fig. 88).



Figure 88 : Courbes d'étalonnage du glucose (g/ L).

Une colonne Watrex polymère IEX H (8 μ m, 250 × 8 mm) a été utilisée avec de l'acide H₂SO₄ dilué (v/v : 1/1000 mL) dans de l'eau dégazée et désionisée comme phase mobile. Le volume de l'injection était de 10 μ L et le débit était de 1 mL min⁻¹. Le temps de rétention du glucose est compris entre 4,80 min et 5,35 min.

Les paramètres utilisés pour caractériser la culture en flacons agités sont la productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{max}) et le coefficient de rendement ($Y_{X/S}$). Le P_{max} a été calculé par la formule suivante (Eq. 1) :

$$(P_{max}) [g/L \cdot h] = \frac{c_2 [g/L] - c_1 [g/L]}{t_2[h] - t_1[h]}$$

Tandis que Y_{X/S} a été calculé comme :

$$(Y_{X/S}) = \frac{X_{max} [g/L] - X_{in} [g/L]}{S_{in}[g/L] - S_{fin}[g/L]}$$

X_{max} est la concentration de biomasse maximale,

X_{in} est la concentration de biomasse initiale,

S_{in} est la concentration de glucose initiale,

 S_{fin} est la concentration de glucose à X_{max} et $t_2 - t_1$ est la durée de culture résultant en X_{max} .

2.7- Analyse gravimétrique des lipides et production de biodiesel

Les teneurs en lipides totaux (TL) et leur productivité ont été déterminées par la méthode gravimétrique. Pour ce faire, 70 mL de suspensions cellulaires en phase de décroissance logarithmique (environ 98 heures après l'inoculation) ont été récoltés par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min.

Les culots de la biomasse préparés en double ont ensuite été lavés par centrifugation deux fois avec de l'eau distillée. Après cela, l'extraction des lipides a été réalisée en se basant sur les travaux de ZHU et *al*. (2002) qui restent une modification de la méthode d'extraction par voie

humide de Bligh et Dyer (1959) telle que décrite précédemment (chap. III part. 1) avec quelques ajouts.

Ainsi, un mélange de 2 mL de billes de céramique de 1 mm et 5 mm \emptyset ont été ajoutés dans des tubes en plastique jaugés contenant une biomasse algale humide concentrée (~ 400 mg) auxquels nous avons ajouté 13 mL de méthanol (MeOH). Les flacons ont été agités au vortex pendant 120 secondes.

Ensuite, la suspension a été transférée dans un nouveau tube en verre de 50 mL de contenance, additionné de 30 mL de chloroforme. Pour collecter tous les résidus cellulaires, le contenu du 1^{er} flacon a été lavé 2 fois avec 1 mL de (MeOH). Le mélange a été mis sur un agitateur secoueur (70 rpm) à 40 °C pendant 24 h. Cette étape a été suivie d'une centrifugation à 6000 rpm pendant 15 min.

Les surnageants ont été collectés par filtration à travers du papier Wattman. Le filtrat clarifié a été transféré dans un flacon en verre préséché et pré-pesé. Le solvant a été éliminé par évaporation rotative (60 °C) et séché davantage jusqu'à un poids constant en utilisant une étuve (50 °C). Toutes les expériences ont été réalisées en double et les valeurs moyennes ont été rapportées.

Par ailleurs, pour mieux apprécier la teneur en lipides purs, l'extrait obtenu précédemment a été pesé puis dissous dans 6 mL d'un mélange (2:2:1:1) (hexane : toluène : acétone : méthanol) (v/v/v/v) pour éliminer les protéines et autres composés non lipidiques extraits au cours de l'expérimentation (JONES et *al.*, 2012). La solution a été décantée et le flacon a été séché à 50°C et pesé à nouveau et les résultats ont été rapportés.

Pour rapporter les teneurs en lipides totaux, la différence entre les deux poids a été enregistrée comme la masse totale de lipides extraits m_{huile} . Les résultats sont présentés sous forme de moyennes exprimées en (g) selon l'équation suivante (Eq. 2) :

 $m_{huile}(g) = Poids du bécher contenant l'huile - Poids du bécher vide$

L'accumulation des lipides a été déterminée en mesurant les paramètres sous cités et ils sont calculés en utilisant les équations (3), (4) et (5), respectivement :

La teneur totale en lipides (TL), exprimée en pourcentage de poids sec (% poids sec).

$$TL [\%] = \frac{m_{huile}}{m_{biomasse humide}} X \, 100$$
 (Eq. 3)

Avec $m_{biomasse}$ est le poids de la biomasse algale et m_{huile} est le poids total des lipides.

La productivité ($P_{Lipides}$) : La productivité lipidique est un facteur lié à la teneur en lipides et à la productivité de la biomasse. Il a été calculé comme suit :

$$(P_{Lipides}) [g/L \cdot jour] = \frac{w_G [g/L] \cdot m_{huile} [g/g]}{t[J]}$$
(4)

Où w_G est la production cumulée de la biomasse algale et t correspond au temps du déroulement de la culture.

 \blacktriangleright Le coefficient de rendement (Y_{X/S})

$$(Y_{X/S}) = \frac{X_{huile} [g]}{S_{in}[g] - S_{fin}[g]}$$
(5)

 X_{huile} est la masse totale de lipides extraits ; S_{in} est la concentration de glucose initiale ; S_{fin} est la concentration de glucose à X_{huile}.

La conversion des lipides extraits en esters méthyliques d'acides gras (FAME) a été réalisée par transestérification acide avec du méthanol en utilisant de l'acide H_2SO_4 (v/v : 4/100 ml) comme catalyseur et du n-hexane comme solvant, telle que décrite précédemment (chap. III part. 1). Le biodiesel produit est récupéré dans une ampoule pré-pesée à l'aide d'un évaporateur rotatif et la quantité de biodiesel obtenue est calculée, basée sur des mesures gravimétriques selon l'équation suivante (Eq : 6) :

$$m_{(biodiesel)} = m_{(ampoule \ remplie)} - m_{(ampoule \ vide)} \tag{6}$$

Le rendement de la réaction est calculé selon la formule suivante (Eq. 7) :

Rendement (%) =
$$\left(\frac{m_{biodiesel}}{m_{huile}}\right) x \ 100$$
 (7)

Avec $m_{biodiesel}$ correspond au poids du biodiesel et m_{huile} correspond au poids de d'huile extraite.

2.8- Caractérisation des propriétés physico-chimiques du biodiesel

Les caractéristiques physico-chimiques du biodiesel ont été principalement axées sur la détermination de la densité. L'indice de réfraction a été obtenu à l'aide du réfractomètre ATAGO Abbe. Le pH a été réalisé par pH-mètre modèle HANNA (HI 255).

2.9- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2019. Les données expérimentales ont été évaluées statistiquement à l'aide du test t de Student et toutes les affirmations de signification sont basées sur une probabilité de p < 0.05.

3- Résultats et discussion

3.1- Cinétique de la croissance et les taux de consommation de glucose chez Chlorella sp.

Chlorella sp. GM2 a été cultivée sur les effluents laitiers pour connaître son profil de croissance avant d'être utilisée dans le processus de transestérification. D'après les expériences réalisées en flacon agité, en croissance hétérotrophe avec du glucose initiale à 10 g/L, les résultats montrent qu'après 97 h de culture, la souche sauvage *Chlorella sp.* GM2 est capable de croître dans les eaux usées du lactosérum de fromage (fig. 89).



Figure 89 : Courbes de croissance (X) et concentration en glucose (S_{GLU}) pendant la culture de la souche sauvage *Chlorella sp.* GM2 en flacons agités dans les milieux MBM (A), CWW (B) et MCWW (C). Les barres d'erreur représentent un écart-type (n = 2)

Les résultats obtenus indiquent la faisabilité d'utiliser les eaux usées du lactosérum de fromage, après traitement, pour cultiver des microalgues. Ces dernières montrent une croissance cellulaire similaire à celle obtenue pour les cultures témoins (MBM). A cet effet, la croissance des microalgues dans les 3 milieux testés a montré un schéma typique des croissances algales avec 3 phases : croissance logarithmique, stationnaire et mort cellulaire avec absence de la phase de latence. L'absence de la phase de latence et l'utilisation rapide du substrat observés sur les milieux à base du lactosérum de fromage suggèrent son rôle bénéfique dans la promotion de la croissance des algues, qui est probablement due à d'autres nutriments présents dans cet effluent, notamment l'azote et les minéraux. Ainsi, la phase logarithmique s'est produite au-delà de deux jours de culture, ce qui a été indiqué par une augmentation significative de la concentration en biomasse chez *Chlorella sp.* GM2. Dans cette phase, les cellules de microalgues absorbent les nutriments en excès dans le milieu pour soutenir leur croissance, de

sorte que le nombre de cellules a augmenté de manière logarithmique. Au 3^{ème} jour, la croissance de la souche indigène *Chlorella sp.* GM2 est entrée dans sa phase stationnaire, caractérisée par une croissance stagnante. Dans cette phase, le nombre de cellules produites et de cellules mortes est en équilibre. Ces mêmes résultats ont été rapportés par plusieurs auteurs notamment ESPINOSA-GONZALEZ et *al.* (2014), CHOI et *al.* (2018), DE OLIVEIRA NUNES et *al.* (2020), KHALAJI et *al.* (2021) et CASA et *al.* (2022). Une croissance constante des espèces du genre *Chlorella* est constatée au niveau d'eaux usées laitières avec absence ou présence de phases de latence en lien avec l'inoculum utilisé. Par ailleurs, la connaissance de ce paramètre est pertinente pour améliorer le temps du processus et la teneur en biomasse finale dans la culture (ZHANG et *al.* 2017; CHENG et *al.* 2018).

Dans une production de biomasse microalgale, le choix du milieu de culture est extrêmement important et la combinaison des deux facteurs milieu de faible coût et conditions adéquates est véritablement importante. Dans le présent travail, l'utilisation des effluents laitiers a été évaluée par différents paramètres de croissance. Ainsi, le poids de la biomasse sèche (X) (fig. 91) et les paramètres de culture obtenus dans les cultures en flacons agités sous un régime batch montrent que la biomasse la plus élevée est obtenue sous l'effet de l'ajout de source de nutriments (N, P et Mg) au milieu de culture, ce qui a permis d'atteindre 4.775 ± 0,0825 et 4.458 ± 0,0825 g/ L dans les milieux MBM et MCWW, respectivement et qui étaient statistiquement similaires (p < 0,05). Mais dans le CWW, aucun autre composant n'a été ajouté au milieu pour obtenir la croissance des microalgues. Une faible concentration de biomasse a été enregistrée, atteignant seulement 3,33 ± 0,047 g/ L plus faible à un niveau statistiquement significatif (p (0,21) > 0,05) comparativement aux résultats obtenus avec MBM et MCWW. Par ailleurs, cette augmentation de la biomasse pendant 97 h de culture s'est accompagnée d'une diminution de la concentration initiale en glucose (S_{Glu}) (cf. figure 91).

Nos résultats corroborent les travaux de plusieurs recherches sur la culture hétérotrophe de Chlorella au niveau des effluents laitiers. Ainsi, plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation de substrats bon marché avec une teneur en glucose dans la production de Chlorella comme stratégie pour diminuer le coût du milieu de culture (CHENG et al., 2009; GAO et al., 2010; SUN et al., 2013; CASA et al., 2022). A cet égard, la chlorelle a pu se développer dans des eaux usées d'origine diverses, et avec succès dans plusieurs études concernant le traitement des eaux usées (WANG et al. 2010; GE et CHAMPAGNE, 2016; CHOI et al., 2018; RODRIGUES-SOUSA et al., 2021). CASA et al. (2022) ont observé non seulement la possibilité de produire de la biomasse algale chez Chlorella vulgaris dans du lactosérum de ricotta prétraité avec une concentration maximale de l'ordre de X_{max} (2.52 ± 0.09 g/ L), mais aussi l'efficacité de cette microalgue à éliminer l'azote et le phosphore. De plus, ESPINOSA-GONZALEZ et al., (2014) ont observé des composés organiques, présents dans le lactosérum du fromage, qui augmentent la productivité de la biomasse des microalgues en conditions de croissance hétérotrophe. BELLUCCI et al. (2020) ont utilisé différentes communautés d'espèces de microalgues (dont Chlorella spp.) pour le traitement tertiaire des eaux usées municipales. Ils indiquent que ces micro-organismes photosynthétiques contribuaient également à la désinfection de ces eaux usées. Toutefois, malgré la capacité prometteuse des microalgues à éliminer les nutriments des eaux usées et à générer une biomasse de haute qualité,

les variations des concentrations de nutriments pourraient entraver la mise en œuvre du traitement tertiaire à base de microalgues (CHAMBERLIN et *al.*, 2018).

Par ailleurs, la concentration de la biomasse maximale produite sur le milieu CWW sans apport de nutriment supplémentaire ($X_{max} = 3.33 \pm 0.047$ g/L) corrobore les données que nous avons rapportées chez Chlorella vulgaris au niveau des eaux usées salines provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage (SWW) où des cultures sans ajout de sels supplémentaires ont donné une croissance acceptable sur ses effluents (voir chap. II part 2), mais aussi chez le mutant Chlorella sp. GM12 (voir Chap. III part. 1). Ce résultat rejoint les observations de ESPINOSA-GONZALEZ et al. (2014) chez Chlorella protothecoides, ou les auteurs rapportent que cette dernière peut se développer dans les effluents laitiers sans apport supplémentaire en nutriments et que seule une simple addition de carbone organique permet une assimilation des nutriments pour une croissance soutenue. Selon KHALAJI et al., (2021) la concentration initiale en éléments nutritifs est importante dans les effluents laitiers, ce qui permet une croissance soutenue des microalgues jusqu'à des taux de dilution de 50 %. Alors qu'au-delà de 75 % de dilution, la concentration en oligoéléments devient non suffisante voire non disponible pour le développement cellulaire. A cet égard, il a été largement rapporté que les effluents d'origine laitière sont riches en divers composants organiques ou inorganiques, tels que les monosaccharides, oligosaccharides, vitamines, acides organiques, NH₄⁺, phosphate, sulfate, ions métalliques et autres nutriments (TIAN et al., 2012; DIBLÍKOVÁ et al., 2013; WANG et al., 2018; KHALAJI et al., 2021; CASA et al., 2022).

Par ailleurs, les conditions expérimentales ont également influencé de manière significative la productivité de la biomasse et le coefficient de rendement (p = 0,001). Ainsi, sur la base des données de la figure 90, la croissance de la souche sauvage dans des flacons agités montre que les milieux de contrôles à base d'effluent CWW entraînent le plus faible coefficient de rendement ($Y_{X/S} = (0.472 \pm 0.007)$ correspondant à une productivité volumétrique de la biomasse de ($P_{max} = 0,0397 \pm 0,0006$ g/ L. h). Toutefois, l'ajout des macronutriments (N, P et Mg) dans les effluents laitiers, a permis au milieu MCWW de présenter un coefficient de rendement ($Y_{X/S}$) et une productivité volumétrique (P_{max}) des plus élevés, respectivement, $Y_{X/S}$ = ($0,6146 \pm 0,03$) et un $P_{max} = (0,0861 \pm 0,0017$ g/ L. h), comparables à ceux obtenus sur le milieu MBM qui sont de l'ordre de $0,6994 \pm 0$,0394 et de $0,0926 \pm 0,0017$ g/ L. h, respectivement. Ainsi, l'analyse statistique pour les deux paramètres ($Y_{X/S}$) et (P_{max}) de croissance de la souche sauvage *Chlorella sp*. GM2 dans MBM et MCWW sont statistiquement similaires (p > 0,05). Cependant, ces valeurs diffèrent statistiquement (p (0,43) < 0,05) de celles obtenues avec le milieu CWW. Le P_{max} dans CWW est inférieur de 57,13 % par rapport à MBM et de 53,89 % par rapport à MCWW.

Il est important de souligner que les résultats obtenus sont supérieurs à ceux rapportés, en condition hétérotrophe, par ESPINOSA-GONZALEZ et *al*. (2014) au niveau des cultures avec du perméat du lactosérum hydrolysé par voie enzymatique où le coefficient de rendement (Y_{X/S}) est de 0.41 ± 0.06 chez *Chlorella pyrenoidosa*. WANG et *al*. (2018) pour *Chlorella pyrenoidosa* en culture sur un milieu à base de lactosérum de tofu ont enregistré une productivité de la biomasse de P_{max} (0.03 ± 0.0008 g/ L. h), bien que cette productivité fût bien supérieure par rapport au milieu synthétique P_{max} (0.015 ± 0.0012 g/ L. h) dans les mêmes conditions. Dans la

même expérience, ces auteurs rapportent que l'utilisation des dilutions en culture n'a pas donné lieu à de meilleurs résultats. En ce sens, l'utilisation du lactosérum non dilué a permis de bons rendements avec une stabilisation de la croissance à partir du premier jour de culture. Par conséquent, l'utilisation d'eaux usées à 100% (sans dilution) peut être recommandée pour des conditions hétérotrophes, évitant ainsi l'augmentation des volumes et réduisant l'utilisation d'eau pour la dilution.



Figure 90 : Productivités volumétriques de la biomasse (P_{max}) et coefficients de rendement correspondants ($Y_{X/S}$) au cours de la culture hétérotrophe de la microalgue indigène *Chlorella sp.* GM2 dans les différents milieux testés (les barres d'erreur représentent un écart type de n = 2)

Dans la production de biomasse de microalgues, le choix du milieu de culture est extrêmement important, combinant un faible coût et des conditions adéquates pour la croissance et l'obtention de la composition biochimique d'intérêt. Ainsi, selon les supports utilisés, les 10 g/L de glucose ajouté ont été transformés en biomasse. La consommation du glucose était incomplète sous une concentration initiale de 10 g/L, à l'intérieur des trois milieux testés. Ainsi, en milieu CWW, la proportion d'énergie (10 g/L de S_{Glu}) consommée était plus faible, et environ 28 % de glucose restent dans le milieu, par rapport au glucose non consommé dans les milieux MBM et MCWW, respectivement, 13,82 % et 15,99 %. Les effets stimulants du glucose sur la croissance des microalgues ont été documentés dans de nombreux rapports (CHEIRSILP et TORPEE., 2012; YU et *al.*, 2012) et constituent la principale source de carbone dans la plupart des systèmes de culture hétérotrophes (PEREZ-GARCIA et *al.*, 2011). Les résultats d'études antérieures utilisant du glucose dans des cultures mixotrophes et hétérotrophes de souches prometteuses de Chlorella ont montré que la supplémentation en glucose entraîne une augmentation significative de la croissance et de la productivité de la biomasse (O'GRADY et MORGAN., 2011). Par ailleurs, il a été rapporté que la capacité des microalgues à utiliser des sources de carbone organique pour leur croissance dépend fortement de la souche. Cela repose sur la disponibilité du transport dans la cellule et la présence de voies enzymatiques pour convertir la source de carbone en précurseurs appropriés pour le métabolisme du carbone (AZMA et al., 2011). Bien que la supplémentation en sources de carbone organique ait montré des effets stimulants sur la croissance de nombreuses souches et genres de microalgues, de telles supplémentations sont généralement coûteuses et augmentent le coût des applications en aval (LI et al., 2007). Par conséquent, la recherche de sources de carbone appropriées et à faible coût continue et nécessaire pour améliorer la croissance, la biomasse et la productivité lipidique des microalgues pour une matière première bon marché du biodiesel. D'ailleurs, l'utilisation du lactose présent dans le lactosérum du fromage serait une des solutions à mettre en place. Alors que certains genres de microalgues comme Scenedesmus est capable d'utiliser le lactose pour leur croissance (GIRARD et al., 2014). Pour d'autres par contre, une simple hydrolyse enzymatique du lactose peut mettre à leur disposition du glucose et du galactose pour favoriser leur croissance comme par exemple *Chlorella vulgaris* (ESPINOSA-GONZALEZ et *al.*, 2014).

Par ailleurs, le pH initial au niveau des trois milieux de culture a augmenté de (~ 15 %), en moyenne de ~ $6.73 \text{ à} \sim 7.93$, et cela, avec la croissance des algues jusqu'à ce qu'il atteigne une phase stationnaire. Cela en raison de l'accumulation d'OH dans le milieu de culture (RICHMOND et GROBBELAAR, 1986). Cet intervalle correspond à un pH optimal pour la croissance de Chlorella qui reste comprise entre environ 6,3 à 7,5 (BOROWITZKA, 2005; MAYO, 1997). Par conséquent, grâce à une analyse complète, les résultats de cette étude, sur le pH des milieux de culture, ont confirmé nos précédents résultats sur Chlorella vulgaris CC256 et la souche mutante Chlorella sp. GM12. En effet, la croissance des microalgues peut modifier le pH du milieu, ce qui affecte à son tour la croissance de ces derniers. Une étude sur le déséquilibre protonique lors de la culture de microalgues a rapporté que l'alcalinité était produite ou consommée en fonction de la source d'azote et de son processus métabolique et l'effet plus important sur le pH du milieu que l'assimilation du carbone (WANG & CURTIS, 2016). Selon HUO et al. (2012) la dynamique du pH dans le milieu dépend fortement du métabolisme, de la consommation de nitrate, de la dégradation des acides organiques et de la réduction des sulfates. Par ailleurs, l'ajustement des valeurs du pH initiales des cultures fournit un autre moyen d'optimiser l'accumulation de lipides des microalgues, A cet effet, chez *Chlorella sp.* la valeur de pH initiale optimale pour l'accumulation de lipides doit être comprise entre 7.0 et 9.0 (ZHANG et al., 2014).

3.2- Teneur en lipides, productivité et rendement lipidiques

L'analyse gravimétrique des lipides est donnée sur la figure 93. Cette analyse a été initiée pour déterminer l'effet des différents milieux de culture sur la production de lipides à partir d'une biomasse humide. La teneur moyenne totale en lipides obtenue après 98 h de culture, sans utilisation de limitation en nutriments, nous a permis d'enregistrer les meilleurs taux au niveau des milieux MBM et MCWW, respectivement, $(32 \pm 2.83 \%)$ et $(25,78 \pm 2.199 \%)$. Par

contre la quantité minimale d'accumulation de lipides a été observée au niveau des cultures sur le milieu CWW dans les mêmes conditions de travail et reste moyennement faible par rapport aux deux milieux modifiés (21 ± 0.707 %). Entre les cultures en milieu MBM et MCWW, il n'y a pas de différence significative dans la teneur en lipides (p > 0,05). En revanche, il y a une différence significative entre les teneurs en lipides sur les deux milieux et le milieu CWW (p < 0,05).



Figure 91 : Teneur en lipides et productivité lipidique moyenne de *Chlorella sp.* GM2 sous différentes conditions nutritionnelles.

Les résultats obtenus pour la fraction lipidique dans le cadre de cette étude sont satisfaisants, car ils présentent, pour toutes les conditions de culture, des teneurs (TL > 20 %) (fig. 99). Ainsi, la coextraction accrue des lipides due à la présence d'eaux dans les cellules pourrait avoir potentiellement contribué à cette valeur. L'eau facilite l'extraction par le gonflement de la matrice cellulaire et joue un rôle naturel de co-solvant polaire (POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007). Les mélanges (chloroforme: méthanol) utilisés pour assurer une extraction complète de tous les lipides neutres, aussi bien sous forme de globules libres (gouttelettes lipidiques) que sous forme de complexes associés à des protéines qui ont montré leur efficacité ce qui les place loin devant les autres solvants organiques pour extraire efficacement les lipides totaux. A cet effet, ces mélanges extraient à la fois les lipides neutres par le chloroforme et les lipides polaires par le méthanol (DOS SANTOS et al., 2015). Le chloroforme a la capacité de dissoudre les cellules pour l'extraction facile des lipides neutres (acylglycérols et acides gras libres) et des lipides polaires (phospholipides et glycolipides), il y a une réticence quant à l'utiliser pour l'extraction de l'huile en raison de la toxicité des solvants chlorés (PARK et al., 2015). Comme alternative, l'hexane hydrophobe est fréquemment proposé en raison de son extraction sélective dans les lipides neutres et de sa faible toxicité (HALIM et al., 2011).

Les différentes conditions nutritionnelles ont également eu des effets différents sur l'accumulation de lipides et qui se trouvent en quantité moindre dans le milieu MCCW (25,78 ± 2.199 %) par rapport au contrôle (le milieu synthétique) MBM (32 ± 2.828 %), probablement en raison de la présence de l'azote en quantité supérieure pendant la fermentation. En effet, il est bien établi que la composition des effluents laitiers soit également généralement chargée en nutriments surtout en N et P (ABDEL-RAOUF et al., 2012; ABREU et al., 2012). De plus, les variations des conditions de culture des microalgues (passages de la préculture à la culture) ont un effet prolongé sur la physiologie de ces microorganismes et sur la productivité en biomasse et en lipides. Ainsi, des études antérieures ont rapporté que l'accumulation de lipides est améliorée dans des conditions de température et de la composante du milieu (macro-micro éléments) (TAKAGI et al., 2006; CHEN et al., 2011; BARTLEY et al., 2013). De même, les facteurs tels que le rapport C/N, le prétraitement et le pH initial influencent directement la disponibilité du carbone et/ou peuvent modifier la disponibilité des nutriments essentiels pour la biomasse algale (JAMES, 2013; CAROTENUTO et al., 2020). En ce sens, la stratégie d'utilisation des effluents laitiers dans notre cas peut être plus bénéfique pour augmenter la biomasse plutôt que la teneur en lipides de Chlorella sp. GM2 puisque l'épuisement de l'azote en culture est essentiel pour favoriser l'accumulation de lipides (JAKOBSEN et al., 2008; RODOLFI et al., 2009; WIDJAJA et al., 2009), ce qui suggère que le rapport C/N est critique pour l'accumulation des lipides dans nos conditions.

A notre connaissance, il n'existe pas de données sur l'extraction de lipides à partir de pâte de microalgues humides cultivées dans des effluents laitiers. Les études précédentes ont rapporté que la teneur en lipides, dans des biomasses sèches, des espèces de Chlorella contenaient environ 9 à 35 % lorsqu'elles étaient cultivées sur diverses eaux usées (JOHNSON & WEN, 2010; SHEN et al., 2017). Les résultats obtenus, dans le présent travail, sont supérieurs à ceux que nous avons trouvés dans le cadre de la culture d'un mutant Chlorella sp. GM12 au niveau des effluents laitiers en condition hétérotrophe (chap. III, part. 1), ce qui peut être en raison du taux de croissance et de la densité cellulaire plus élevés dans cette étude. En tenant compte des teneurs lipidiques totales de diverses Chlorella sp., avec le même procédé d'extraction (Chloroforme : méthanol), cultivées de manière hétérotrophe, autotrophe et mixotrophe dans un milieu utilisant des effluents laitiers en culture batch, nous pouvons conclure que nos résultats étaient supérieurs à ceux obtenus par (ESPINOSA-GONZALEZ et al. (2014) sur du perméat de lactosérum, de l'ordre de (24.6 \pm 1.5 %). Identique à ceux de ABREU et al. (2012), en conditions mixotrophes où la teneur lipidique varie entre 26 et 30 % en fonction de la composition du milieu à base d'effluent laitier. Néanmoins, nos résultats sont inférieurs à ceux de ABREU et al. (2012) enregistrés en conditions autotrophes où une teneur en lipides plus élevée (42 %) a été obtenue. Néanmoins, ils restent supérieurs à ceux de CHOI et al. (2018) où les lipides extraits à la fois de C. vulgaris et de Chlorella sp. cultivées sur les effluents laitiers non dilués et dilués variaient de 7 à 23 % en conditions autotrophes. Tous ces auteurs s'accordent à dire que les cultures au niveau des effluents laitiers ont été favorables à la production de lipides comparativement au milieu synthétique BG11.

En comparant nos résultats avec des procédés ayant traité de la biomasse algale humide, nous constatons que nos résultats étaient supérieurs à ceux rapportés par VELASQUEZ-ORTA et *al.* (2013). Ces auteurs, ont travaillé avec des microalgues marines et des eaux douces séchées

à 0%, 1,5% et 10% d'humidité et rapportent des teneurs en lipides pour *Chlorella sp.* très faibles de l'ordre de (TL = 12 %). Toutefois, ces auteurs ont utilisé la sonication comme processus mécanique de rupture de la paroi cellulaire, un solvant monophasique et de faible température. Cependant, nos résultats sont moyennement faibles par rapport à d'autres recherches notamment ceux de CAO et *al.* (2013). Ces auteurs ont suivi un mode opératoire différent. En effet, nous avons constatés l'usage de température très élevée (en moyenne 120 °C) qui peut aller jusqu'à 235 °C dans le cadre des travaux de LEVINE et *al.* (2010), et cela, pour remplacer le pré-séchage. En effet, chez *Chlorella pyrenoidosa* par exemple le rendement en lipides diminuait tandis que la teneur en eau augmentait de 0 à 90 % pour des températures d'extraction inférieure à 90 °C. Alors qu'une teneur en eau comprise entre 5 % et 90 % semble n'avoir aucun effet négatif sur le rendement à 150 °C (CAO et *al.*, 2013). Selon ces auteurs, l'excès d'eau disponible compense les effets d'une température plus élevée dans le mélange réactionnel. Par conséquent, un état d'équilibre est créé et pourrait rendre la réaction de transestérification plus efficace (TRAN et *al.*, 2013; IM et *al.*, 2014).

Dans cette étude la teneur totale en lipides issus de la biomasse microalgale humide a été comparée à la teneur de l'extraction à partir de biomasse sèche réalisée dans les mêmes conditions (résultats non présentés). Cette dernière s'est révélée, en moyenne, supérieure soit le quart de celle obtenue pour toutes les conditions de culture. Ce résultat peut être attribué en partie à l'eau résiduelle dans les cellules qui agissent comme une barrière empêchant le transfert des molécules analyte dans les fluides en masse. Ces résultats sont en accord avec les observations de divers chercheurs ayant étudié les méthodes d'extraction des lipides par voie humide (LEE et *al*, 2010; HALIM et *al*. 2011; WAHLEN et *al.*, 2011). Selon HIDALGO et *al*. (2013) dans le cadre des extractions à partir d'une biomasse humide, les rendements lipidiques peuvent être affectés négativement. Néanmoins, HALIM et *al*. (2014) chez *Tetraselmis suecica*, ont rapporté que l'extraction par solvant ne réduit pas significativement le rendement de l'huile dans le cadre de biomasse humide lorsque le taux d'humidité reste inférieur à 20 % et tant que le mélange reste monophasique (méthanol ou hexane/isopropanol). Ainsi, l'extraction à l'hexane de lipides à partir de la poudre de microalgue séchée ou de la pâte de microalgue humide (20 %) a montré des rendements lipidiques comparables (HALIM et *al.*, 2014).

Par conséquent, il est clair que les procédés existants, qu'ils soient à base de biomasse sèche ou humide, nécessitent encore une température élevée, de longue durée d'extraction ou des apports énergétiques élevés (XU et *al.*, 2011). Par conséquent, les techniques d'extraction des lipides ne sont limitées qu'à l'échelle du laboratoire et la méthode idéale convenant à l'extraction à l'échelle industrielle n'a pas encore été établie (YANG et *al.*, 2014).

La productivité lipidique de *Chlorella sp.* GM2 dans les différentes conditions de culture a été comparée et illustrée dans la figure 93. Par rapport aux cultures dans les milieux MBM et MCWW, une productivité lipidique plus élevée ($P_{lipides} = 21 \text{ mg/L. J}$) a été obtenue dans le milieu CWW à la fin de la phase de croissance stationnaire (environ 98 h). D'autres auteurs (ESPINOSA-GONZALEZ et *al.*, 2014) ont également montré que la productivité en lipides chez *C. vulgaris* au niveau des milieux de culture avec des effluents laitiers et dans des conditions de croissance hétérotrophe pouvait dépasser celle du milieu de synthèse. En ce sens, WANG et *al.* (2018) ont obtenu la productivité lipidique la plus élevée ($P_{lipides} = 170.8 \pm 10.7$

mg/L j) lorsque les cellules ont été cultivées dans une eau usée de lactosérum de tofu (TWW) sans ajout de nutriments en condition hétérotrophe. La productivité lipidique dérivée du milieu TWW était de 4,45, 1,78 et 1,92 fois supérieure à celle obtenue dans les cultures utilisant le milieu BG11 dans des conditions autotrophes, hétérotrophes et mixotrophes, respectivement. Pour ABREU et *al.* (2012) la productivité lipidique a été grandement améliorée (P_{lipides} = 253 mg/L.J) lorsque les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture additionné d'une solution de poudre de lactosérum de fromage hydrolysée. Aussi, en raison du taux de croissance plus élevé en culture avec du carbone organique, ces chercheurs ont enregistré une productivité lipidique six fois plus élevée que la culture photoautotrophe (P_{lipides} = 42 mg/L.J).

Le séchage thermique de la biomasse est une étape très énergivore et qui peut représenter 85% de la consommation totale d'énergie (LARDON et *al.*, 2009). Au cours de notre étude et pour réduire les coûts d'extraction à partir de biomasse sèche, nous avons comparé le séchage thermique de la biomasse algale suivant deux méthodes. La première consiste en l'utilisation d'une étuve Memmert à 40°C et la deuxième par l'utilisation d'un séchoir solaire indirect avec chicanes $T = [30 \pm 15]$ °C. Les deux méthodes ont été appliquées jusqu'à un poids constant (fig. 92). Le résultat des cinétiques de séchage a montré qu'avec le séchage assisté par étuve, la biomasse récupérée se déshydrate plus rapidement que par l'utilisation du séchoir solaire indirect (résultats non présentés). Ainsi, pour la stabilité du poids de la biomasse, il a fallu 21 heures dans le cas de séchage dans l'étuve et 30 heures en séchoir solaire indirect ce qui confirme l'efficacité du séchage en étuve en matière de temps. Néanmoins, les résultats confirment l'efficacité du séchage de la biomasse par le séchoir solaire indirect malgré les fluctuations de température en relation avec le rayonnement. En effet, les résultats de l'analyse statistique montrent que les deux techniques de séchage utilisées lors de notre travail sont très voisines entre elles ((p = 0,00037) < 0.05).



Figure 92 : Séchoir solaire indirect avec chicanes.

Selon BENSEDDIK et *al.* (2020), les procédés de séchage solaire peuvent jouer un rôle dans l'amélioration de la teneur en composés biologiques actifs dans la matière végétale en assurant le maintien de la teneur et de la couleur initiale du produit. Toutefois, de nombreux processus

de séchage entraînent généralement des modifications de la qualité et une réduction de la quantité de composés bioactifs (RATTI., 2001). A cet égard, une caractérisation de la biomasse devra être conduite afin de s'assurer de la composition et de son maintien.

Dans notre cas, les résultats au séchoir solaire indirect ont été plus que satisfaisants, car comparables à ceux du séchage à l'étuve. Malgré la durée de séchage (31 h), le gain d'énergie peut combler les longues durées de séchage. A noter que le séchage par lyophilisation (la méthode la plus efficace) de la biomasse algale de *Chlorella sp*. GM12 a duré 24 h après passage au congélateur durant 48 h à (– 80) °C (chap. III, part. 1). Ainsi, en raison des énormes investissements et de la forte consommation d'énergie, la lyophilisation n'est généralement utilisée que pour des produits à haute valeur ajoutée, principalement dans le secteur pharmaceutique (RATTI., 2001). Différents procédés de déshydratation et leur consommation énergétique, pour traiter les microalgues sont donnés par XU et *al.* (2011).

Les rendements de production de lipides ont suggéré des efficacités d'utilisation du substrat comparable pour tous les groupes de culture. Les résultats des coefficients de rendements lipidiques obtenus sont présentés au niveau de la figure 93.



Figure 93 : Coefficients de rendement en lipides de *Chlorella sp.* GM2 cultivée à 10 g/L de glucose au niveau des cultures batch.

Pour les trois milieux testés, les rendements lipidiques de *Chlorella sp*. GM2 après extraction des lipides bruts par la méthode de BLIGHT–DYER, utilisant un mélange de solvants (chloroforme/méthanol), se sont avérées être approximativement comprises entre $Y_{(X/S)}$ (0,051± 0,004) et (0,066±0,002) relativement faibles à ceux rapportés pour *Chlorella* dans la littérature. En effet, ESPINOSA-GONZALEZ et *al.*, (2014), avec la même méthode d'extraction, rapporte des coefficients de l'ordre de (0.10±0.01) pour des cultures de *Chlorella protothecoides* à base d'effluents laitiers, et de l'ordre de (0.15 ± 0.01) au niveau du milieu nutritif défini en l'occurrence le BG11 à 10 g/L de glucose. Cependant, ces résultats sont en rapport avec des extractions utilisant une poudre microalgale sèche.

Les résultats sur le $Y_{(X/S)}$ pour recherches utilisant de la biomasse humide montrent que nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par HALIM et *al.*, (2014) sur une biomasse algale

humide de *Chlorococcum sp.* où deux procédés ont été testés pour la production de biodiesel à l'échelle du laboratoire. D'un côté, l'extraction au dioxyde de carbone supercritique (SC CO_2) (Dans cet état le CO₂ à la viscosité d'un gaz et la densité d'un liquide, ce qui fait de lui un bon solvant), de l'autre, l'extraction au Soxhlet (à l'hexane). Les résultats ont montré que l'extraction au SC CO_2 a atteint un rendement lipidique supérieur à l'extraction au Soxhlet, respectivement, 0,058 et 0,032. Selon Halimi et *al.* (2014) les faibles valeurs de coefficients de rendement peuvent être attribuées à plusieurs facteurs importants tels que l'effet du ratio C:N, l'épuisement de l'azote, le moment de la récolte ainsi que la méthode d'extraction et les solvants de la réaction.

Cependant, la teneur en lipides de la souche de *Chlorella sp.* utilisée dans notre étude, est considérablement inférieure à celle rapportée pour d'autres espèces de microalgues oléagineuses comme *Nannochloropsis sp.* (Y = 0.250) et *Botryococcus braunii* (Y = 0.286) (ANDRICH et *al.*, 2005; LEE et *al.*, 1998). Ainsi, l'utilisation de cette souche particulière de *Chlorella sp.* GM2 pour la production commerciale de biodiesel semble peu attrayante.

Dans ce travail, nous avons utilisé les lipides issus de la biomasse microalgale, dits lipides bruts, qui contiennent fréquemment plusieurs composés non-lipidiques (des protéines et des glucides qui se lient fortement aux lipides). Mais aussi les lipides purifiés obtenus par un mélange de solvant (2:2:1:1) (hexane : toluène : acétone : méthanol) (v/v/v/v). Les lipides purifiés ont été quantifiés et utilisés pour calculer le rendement d'extraction sans interférence du complexe non lipidique. Les résultats visuels montrent que les composés liposolubles des cellules microalgales non purifiées sont apparus dans un vert noirâtre avec la chlorophylle et les caroténoïdes comme composants principaux, tandis que les composés liposolubles des cellules microalgales purifiées sont apparus dans un état de graisse jaune clair et qui sont principalement des composés lipidiques (appelés huiles) (fig. 94).



Figure 94 : Couleur des composés liposolubles des cellules microalgales purifiées (a) et non purifiées (b).

Le traitement, à base de solvant des lipides bruts, a divisé la teneur lipidique en deux voire en trois dans le cas des milieux à base d'effluents. Ainsi, les résultats de la culture dans les eaux usées CWW et MCWW ont permis de produire les teneurs en lipides pures les plus faibles par rapport au milieu synthétique MBM, respectivement, $(6.2 \pm 0.95 \%)$, $(10.58 \pm 2.164 \%)$ et $(16.21 \pm 1.35 \%)$. D'autres auteurs BRAR et *al.* (2019) ont également rapporté des teneurs totales en lipides faibles chez *C. pyrenoidosa* cultivée sur les effluents laitiers dilués [un ratio de 3:1] de l'ordre de 10.36 %, après 25 jours de culture autotrophe. A cet égard, la caractérisation biochimique a révélé que la teneur en protéines était de 21,8 % chez *C.* *pyrenoidosa*. Toutefois, il est généralement admis que la croissance autotrophe induit de faible accumulation de lipides comparativement à des croissances en mode hétérotrophe ou mixotrophe (ABREU et *al.*, 2012). De même, chez *Chlorococcum sp.* HALIM et *al.* (2014) avait enregistré un faible rendement en lipides totaux de l'ordre de TL = 7,1 %.

3.3- Biodiesel produit à partir des cultures hétérotrophes de Chlorella sp. GM2

Il convient de rappeler que le rendement en biodiesel peut changer en fonction de la teneur et du profil lipidique qui eux sont sujets aux variations des conditions de croissance, des espèces évaluées et des conditions de la transestérification (fig. 95).



Figure 95 : Conversion des acides gras de la souche native *Chlorella sp.* GM2 en biodiesel par transestérification acide.

Au cours de notre étude, le biodiesel produit, après purification par de l'eau chaud, est récupéré à l'aide d'un évaporateur rotatif (fig. 96) et la quantité de biodiesel obtenu a été calculée en fonction des équations (Eq : 6 et 7) et les résultats sont présentés dans le tableau XXXXIV.



Figure 96 : Séparation du biodiesel par décantation et évaporation de la phase organique.

Critères	Lipides bruts	Lipides purifiés
$m_{(biomasse)}$	2.886 g	2.886 g
$m_{(huile\ totale)}$	0.744 g	0.299 g
Teneur moyenne en huile (%)	25.77 %	10.35 %
$m_{(biodiesel)}$	0.138 g	0.274 g
Rendement en biodiesel (%)	18.55 %	91.71 %

Tableau XXXXIV : Quantité de biodiesel obtenue suite à la culture de *Chlorella sp.* GM2 sur les effluents laitiers

Les rendements en biodiesel étaient de 18.55 % au niveau des lipides bruts et de 91.71 % au niveau des lipides purifiés. Ces deux résultats correspondent respectivement à 4.78 % et 9.49 % (g FAME/g cellules microalgales) de la biomasse algale ayant été convertie en biodiesel. Partant du principe que tous les lipides ne peuvent pas être convertis en biodiesel (*FAME*) et que tous les lipides bruts sont facilement solubles dans un solvant organique, la différence dans la teneur en lipides transformée en biodiesel peut être probablement attribuée au fait que d'autres molécules (par exemple, les phospholipides) étaient également converties en biodiesel. Ces mêmes observations ont été rapportées par d'autres recherches (WAHLEN et *al.* 2011 ; CAO et *al.*, 2013). Ainsi, CAO et *al.*, (2013) ont obtenu des valeurs, pour le biodiesel, supérieures à 100 % alors que la teneur en FAME n'était que de 89,81 %. A cet égard, le *FAME* est le seul paramètre permettant d'évaluer directement et précisément le potentiel de biodiesel algal (RATLEDGE et WILKINSON, 1988).

Au cours de notre travail, il est clair que l'augmentation de la teneur en eau (~ 80 %) a jouée en défaveur des rendements en biodiesel, qui ont diminué sous la valeur de 20 % comparativement aux résultats obtenus sur la biomasse algale séchée (44.14 %) (résultats non présentés). Ces résultats corroborent les observations de plusieurs études précédentes qui ont rapporté que le rendement en biodiesel a été affecté négativement par des teneurs élevées en eaux (> 30 %) (WAHLEN et al. 2011; CAO et al., 2013; HIDALGO et al., 2013; HALIM et al., 2014). CAO et al. (2013) ont étudié la production de biodiesel sous différentes températures (90, 120 et 150 °C), à partir de la biomasse de microalgues séchées et humides (0, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 80 et 90 %) d'humidité. Les résultats indiquent que les teneurs en biodiesel sont toutes supérieures à 87 % sous différentes teneurs en eau à une température de 120 °C. Les résultats étaient inférieurs à 20 % s'agissant de la biomasse algale humide (> 70 %) à une température de réaction inférieure à 90 °C. Ils suggèrent qu'une température plus élevée pourrait partiellement compenser l'effet négatif de l'eau sur la transestérification. De même, ils attribuent ceci au fait qu'une température élevée pourrait accélérer la réaction (biomasse de microalgues, méthanol, n-hexane et catalyseur) et rendre la transestérification plus efficace. Ainsi, ils concluent que l'eau disponible nécessite plus d'énergie pour que la réaction se produise efficacement.

Par ailleurs, nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par WAHLEN et *al.* (2011) qui ont constaté que lors de l'utilisation de 100 mg de biomasse de microalgues avec 400 mg d'eau distillée (teneur en eau 80 %) pour produire du biodiesel, le rendement FAME était de 54 % dans les conditions de réaction de 5 ml de méthanol, 1,8 % (v/v) H₂SO₄, 80 °C et 20 min de temps de réaction.

3.4- Caractéristiques du biodiesel issu de l'huile microalgale traitée et non traitée

Dans la présente étude, le potentiel des algues à produire du biodiesel a été étudié dans des conditions de laboratoire contrôlées. Traditionnellement les propriétés du biodiesel telles que la densité, la viscosité, le point d'éclair, le point de colmatage du filtre à froid, le point de solidification et la valeur calorifique sont les points à prendre en considération pour évaluer le potentiel du biodiesel en tant que substitut du carburant diesel. Toutefois, pour des raisons matérielles, seule la densité, le pH et l'indice de réfraction ont été déterminés. La comparaison des propriétés du diesel fossile (MA & HANNA, 1999; LANG et *al.*, 2001; VICENTE et *al.*, 2004), du biodiesel issu de microalgues et de la norme ASTM (American Society for Testing and Materials) sur le biodiesel est présentée dans le tableau XXXXV. La plupart de ces paramètres sont conformes aux limites établies par l'ASTM concernant la qualité du biodiesel (ANTOLIN et *al.*, 2002).

Tableau XXXXV : Comparaison des propriétés du biodiesel obtenu à partir de l'huile de microalgue au diesel fossile et de la norme ASTM sur le biodiesel

Caractère étudié	Biodiesel	Biodiesel total	Diesel ^a	Biodiesel standard
				ASTM
Densité (g.cm ⁻¹)	0.862	0.877	0.81 - 0.89	086 - 0.90
<i>pH</i> ; Т: 16 °С	6.41	5.91	5.5 – 8.0	Neutral
<i>n</i> ²⁰ ; T: 16 °C	1.469	1.553	1.444 - 1.484	-

^a Les données sur le carburant diesel ont été tirées de la littérature publiée, comme indiqué dans le texte.

Les propriétés physiques du biodiesel à base d'huile de microalgue sont, en général, comparables à celles du diesel fossile. Le biodiesel à base d'huile de microalgue purifiée a montré un pH plus neutre que celui du biodiesel à base d'huile de microalgue brut. Alors que l'indice de réfraction du biodiesel à base d'huile de microalgue non traité est supérieur au standard du diesel fossile. Par ailleurs, les biodiesels obtenus, présentent en fonction de l'huile de microalgue utilisée, traitée ou non traitée, deux couleurs différentes, respectivement, vert clair et vert sombre (fig. 97).



Figure 97 : Propriété physique du biodiesel utilisant un système d'extraction par co-solvant (a : huile de microalgue à l'état brut ; b : huile de microalgue purifiée).

Les mêmes résultats sur la couleur du biodiesel ont été rapportés par AFIFY et *al.* (2010). Ainsi, du vert clair a été déjà observé au niveau du biodiesel obtenu à partir de l'huile extraite à partir d'une macroalgue verte comme la laitue de mer *Ulva lactuca*, rouge *Galaxaura oblongata* et la microalgue verte *Spiruline platensis*. Alors que le vert sombre a été observé au niveau du biodiesel produit à partir de l'huile extraite à partir d'une macroalgue rouge *Asporagopsis taxiformis*.

Il est important de signaler que sans interférence du complexe non lipidique, l'huile prétraitée ne contenait pas de sédiments et de débris. A l'inverse, l'huile de microalgue non traitée a subi une filtration via du papier Wattman avant et après transestérification.

4- Conclusion

Pour augmenter davantage le rendement en lipides et réduire le coût du biodiesel, le lactosérum de fromage a été étudié comme source alternative au milieu de culture synthétique. Dans cette optique, nous avons évalué l'influence que peuvent exercer les milieux de culture non conventionnels (effluents laitiers) et les méthodes d'extraction sur la culture de microalgue localement isolée dans le but de produire du biodiesel à moindre coût.

Les résultats obtenus indiquent clairement que la souche native *Chlorella sp.* GM2 a la capacité de croître, d'accumuler des lipides et d'atteindre une concentration et une productivité élevées en biomasse en culture hétérotrophe sur les effluents laitiers (CWW). Ainsi, grâce à un simple ajustement de la concentration en nutriments, le CWW a présenté une meilleure performance de culture qui se rapproche de celle du milieu BG11 Modifié. En effet, en utilisant CWW comme milieu de base additionné des macroéléments (N, P et Mg) les productivités de la biomasse ont atteint 0,086 g/ L. h.

Des teneurs en lipides importantes sont obtenues via le procédé d'extraction par voie humide, mais elle reste faible comparativement aux procédés à base de biomasse sèche. Les meilleurs rendements en milieu à base d'effluent sont prélevés de culture cellulaire dans MCWW, se rapprochent de ceux obtenus dans les cultures sur le milieu artificiel MBM et ils représentent, respectivement, 25.69 % et 32.41 %. Par contre, la productivité lipidique, la plus élevée 21 mg/L. jour, a été enregistrée sur le milieu du lactosérum de fromage sans apport supplémentaire en nutriments (CWW), un milieu pauvre en azote, facteur essentiel pour favoriser l'accumulation de lipides. A cet égard, les teneurs lipidiques obtenues en milieu MCWW sont le fait du taux de croissance et de densité cellulaire plus élevés. En ce sens, la stratégie d'utilisation des effluents laitiers dans notre cas peut être plus bénéfique pour augmenter la productivité en biomasse plutôt qu'en lipides.

Par ailleurs, le biodiesel produit est de standard mondial. Par contre, seule une faible teneur en lipides totale a été convertie en biodiesel (18.55 %), ce qui correspond à une valeur de 4.78 % (g FAME/g cellules microalgales) de la biomasse algale sèche convertie en biodiesel. Ce résultat renseigne sur un profil en lipides chez *Chlorella sp*. GM2 non favorable pour la production de biodiesel. Ainsi, les faibles rendements obtenus montrent que la culture de *Chlorella sp*. dans nos conditions, ne favorise pas la production de biodiesel. Néanmoins, l'utilisation de lipides purifiés par solvant organique a permis, d'une part, une augmentation légère du rendement et réduire de l'autre la proportion de sédiments dans le biodiesel produit. Aujourd'hui, il est admis que la microalgue *Chlorella sp.* peut se développer de manière hétérotrophe avec le glucose comme source de carbone et accumuler une forte proportion de lipides qui conviennent à la production de biodiesel. A cet égard, pour réduire les coûts de production de biodiesel, il serait judicieux de cultiver ces microalgues sur les effluents laitiers avec l'usage d'autre alternative de carbone organique, par exemple l'hydrolyse enzymatique du lactose et/ou d'autres effluents riches en carbone organique assimilable par ces cellules comme les déchets de datte. Comme le milieu du lactosérum de fromage ne contient généralement pas de composé toxique, la biomasse algale accumulée dedans, peut être utilisée pour produire des co-produits de grande valeur ajoutée. De plus, il faut penser à inclure l'utilisation du séchage solaire indirect pour sécher la biomasse algale, car son efficacité est directement liée à l'efficacité globale du processus de production de biodiesel.

5- Références bibliographiques

➤ ABDEL-RAOUF N., AL-HOMAIDAN A A.A. & IBRAHEEMB I. B. M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi J. Biol. Sci., 19(3): 257 – 275.

ABREU A. P., FERNANDES B., VICENTE A. A., TEIXEIRA J. & DRAGONE G.,
2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source *Bioresour*. *Technol.*, 118 : 61 – 66.

➢ ADAM F., VIAN M. A., PELTIER G. & CHEMAT F., 2012. "Solvent-Free" ultrasound assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresour. Technol.*, 114, 457 − 465.

> ANTOLIN G., TINAUT F.V. & BRICENO Y., 2002. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresour. Technol.*, 83: 111 – 114.

➢ ARANSIOLA E. F., OJUMU T. V., OYEKOLA O. O., MADZIMBAMUTO T. F. & IKHU-OMOREGBE D., 2014. A review of current technology for biodiesel production: state of the art. *Biomass Bioenerg.*, 61: 276 − 97.

➢ AZMA M., MOHAMED M. S., MOHAMAD R., RAHIM R. A., ARIFF A. B., 2011. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology *Biochem. Eng. J.*, 53 (2): 187 − 195.

➢ BARTLEY M., BOEING W., DUNGAN B., HOLGUIN F. O. & SCHAUB T., 2013. PH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. J. Appl. Phycol., 1 − 7.

BELLINGER E. G. et SIGEE D. C., 2010. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. *John Wiley & Sons*, Ltd., 264 p.

BELLUCCI M., MARAZZI F., NADDEO L.S., PIERGIACOMO F., BENEDUCE L., FICARA E. & MEZZANOTTE V., 2020. Disinfection and nutrient removal in laboratoryscale photobioreactors for wastewater tertiary treatment. J. Chem. Technol. Biotechnol., 95: 959 – 966. <u>https://doi.org/10.1002/jctb.6010</u>.

BENSEDDIK A., BENAHMED-DJILALI A., AZZI A., ZIDOUNE M. N., BENSAHA H., LALMI D. & ALLAF K., 2020. Effect of drying processes on the final quality of potimarron pumpkin (*Cucurbita maxima*) powders, Journal of Dispersion Science and Technology, DOI: 10.1080/01932691.2020.1823233 **BLIGH E. G. & DYER W. J., 1959.** A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*, 37: 911–917.

BOROWITZKA M. A., 2005. Culturing Microalgae in Outdoor Ponds. In Andersen R. A., 2005. Algal Culturing Techniques. *Elsevier Academic Press*, Amsterdam, Chap. (14), 205 – 218.

BRAR A., KUMAR M. & PAREEK N., 2019. Comparative Appraisal of Biomass Production, Remediation, and Bioenergy Generation Potential of Microalgae in Dairy Wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 10: 678. doi: 10.3389/fmicb.2019.0067810.

BRENNAN L. & OWENDE P., 2010. Biofuels from microalgae A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24: 557 – 577.

CAO H., ZHANG Z., WU X. & MIAO X., 2013. Direct Biodiesel Production from Wet Microalgae Biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through *In Situ* Transesterification. BioMed Research International, Volume 2013, Article ID 930686, 6 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2013/930686

➤ CAROTENUTO C., GUARINO G., D'AMELIA L. I., MORRONE B. & MINALE M., 2020. The peculiar role of C/N and initial pH in anaerobic digestion of lactating and nonlactating water buffalo manure. *Waste Manag.*, 103: 12 – 21.

➤ CASA N. E., LOIS-MILEVICICH J., ALVAREZ P., MATEUCCI R & DE ESCALADA Pla M., 2022. Chlorella vulgaris cultivation using ricotta cheese whey as substrate for biomass production. J. Appl. Phycol., <u>https://doi.org/10.1007/s10811-022-02685-</u> <u>3</u>

CHAMBERLIN J., HARRISON K. & ZHANG W., 2018. Impact of nutrient availability on tertiary wastewater treatment by Chlorella vulgaris, *Water Environ. Res.*, 90: 2008 – 2016. https://doi.org/10.2175/106143017x15131012188114.

CHEN M., TANG H., MA H., HOLLAND T. C., NG K. Y. S. & SALLEY S. O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.*, 102: 1649 – 1655.

➤ CHEIRSILP B. & TORPEE S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.*, 110: 510–516

CHENG J., YU T., LI T., ZHOU J. H. & CEN K.F., 2013. Using wet microalgae for direct biodiesel production via microwave irradiation. *Bioresour. Technol.*, 131: 531 – 535.

> CHENG P., WANG Y., OSEI-WUSU D., LIU T. & LIU D., 2018. Effects of seed age, inoculum density, and culture conditions on growth and hydrocarbon accumulation of *Botryococcus braunii* SAG807-1 with attached culture. *Bioresour. Bioprocess.*, 5: 15.

≻ CHENG Y., LU Y., GAO C. & WU Q., 2009. Alga-Based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. *Energy Fuels*, 23: 4166 – 4173.

➤ CHINNASAMY S., BHATNAGAR A., HUNT R.W., DAS K.C., 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101: 3097 – 3105.

CHISTI Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25: 294 – 306.

CHOI YK., JANG HM., KAN E., 2018. Microalgal biomass and lipid production on dairy effluent using a novel microalga, *Chlorella sp.* isolated from dairy wastewater. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 23: 333 – 340.

DEJOYE TANZI C., ABERT VIAN M. & CHEMAT F., 2013. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable *process*. *Bioresource Technology*, 134: 271 – 275.

> DE OLIVEIRA NUNES I. V., BASTOS INOUE C. H., RODRIGUES SOUSA A. E., MONTEIRO DE CARVALHO J. C., DA ANUNCIAÇÃO GOMES A. M. & CHUEI MATSUDO M., 2021. Tertiary treatment of dairy industry wastewater with production of *Chlorella vulgaris* biomass: evaluation of effluent dilution. *Revista Brasileira* de *Ciências Ambientais*,

> DE REVIERS B., 2002. Biologie et phylogénie des algues. Edt. Belin, Paris, France.

➢ DIBLÍKOVÁ L., CURDA L. & KINCL J., 2013. The effect of dry matter and salt addition on cheese whey demineralization. *International Dairy Journal*, 31: 29 − 33.

➢ DRAGONE G., MUSSATTO S. I., OLIVEIRA J. M. & TEIXEIRA J. A., 2009. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.*, 112 (4): 929 − 935.

▶ ESPINOSA-GONZALEZ I., PARASHAR A. & BRESSLER D. C., 2014. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology*, 155 : 170 – 176.

SAYRAL P., 1975. Les Algues. Morphologie, Cytologie, Reproduction, Écologie. Doin, Paris, France.

➤ GE S. & CHAMPAGNE P., 2016. Nutrient removal, microalgal biomass growth, harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. *Water Res.*, 88: 604 – 612.

➢ HALFHIDE T., ÅKERSTRØM A., LEKANG O. I., GISLERØD H. R. & ERGAS S. J., 2014. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions, *Algal Res.*, 6: 152 − 159. <u>https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.009</u>.

HALIM R., DANQUAH M. K. & WEBLEY P. A., 2012. Extraction of oil from microalgae of biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.*, 30: 709 – 732.

▶ HALIM R., GLADMAN B., DANQUAH M. K. & WEBLEY P. A., 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102: 178 – 185.

→ HALIM R., RUPASINGHE T. W. T., TULL D. L. & WEBLEY P. A., 2014. Modelling the kinetics of lipid extraction from wet microalgal concentrate: A novel perspective on a classical process. *Chemical Engineering Journal*, 242: 234 – 253.

→ HIDALGO P., TORO C., CIUDAD G. & NAVIA R., 2013. Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 12: 179 – 199.

→ HUO S., WANG Z., ZHU S., ZHOU W., DONG R. & YUAN Z., 2012. Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresource Technology*, 121: 76 – 82.

➤ IM H., LEE H., PARK M. S., YANG J-W., LEE J. W., 2014. Concurrent extraction and reaction for the production of biodiesel from wet microalgae. *Bioresour. Technol.*, 152: 534 – 537.

➢ JAKOBSEN A. N., AASEN I. M., JOSEFSEN K. D. & STROM A. R., 2008. Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in *Thraustochytrid aurantiochytrium sp.* Strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80: 297 – 306.

▶ **JAMES S. C., 2013.** Simulating pH effects in an algal-growth hydrodynamics model. *J. Phycol.*, 49: 608 – 615.

➤ JANSE VAN VUUREN S., TAYLOR J. C., GERBER A. et VAN GINKEL C., 2006. Easy identification of the most common freshwater algae. a guide for the identification of microscopic algae in south African freshwaters. North-West University and department of water affairs and forestry. 200 pp.

➢ JONES J., MANNING S., MONTOYA M., KELLER K. & POENIE M., 2012. Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. J. Am. Oil. Chem. Soc., 89: 1371 − 1381.

➤ JOHNSON M. B. & WEN Z., 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 525 – 534.

➤ KIM S., PARK J.-E., CHO Y.-B. & HWANG S.-J., 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour. Technol.*, 144: 8 – 13.

KHALAJI M., HOSSEINI S A., GHORBANI R., AGH N., REZAEI H., KORNAROS M. & KOUTRA E., 2021. Treatment of dairy wastewater by microalgae *Chlorella vulgaris* for biofuels production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <u>https://doi.org/10.1007/s13399-021-01287-2</u>

▶ LANG X., DALAI A. K. & BAKHSHI N. N., 2001. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour*. *Technol.*, 80: 53 – 62.

➤ LARDON L., HÉLIAS A., SIALVE B., STEYER J.-P., BERNARD O., 2009. Lifecycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science and Technology*, 43: 6475 – 6481.

LEE J. Y., YOO C., JUN S.Y., AHN C. Y. & OH H. M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.*, 101: S75–S77

LEE R. E., 2008. Phycology. Cambridge: Cambridge University Press, (4th ed.)., 547 p.

LETELLIER M. & BUDZINSKI H., 1999. Microwave Assisted Extraction of Organic Compounds. Analusis, 27: 259 – 271. 10.1051/analusis:1999116.

➤ LEVINE R. B., COSTANZA-ROBINSONM M. S., SPATAFORA G. A., 2011. Neochloris oleoabundans grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. Biomass Bioenerg., 35: 40 – 49.

LIX., XU H. & WU Q., 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 98 (4): 764 – 771.

▶ LIU Z., WANG G. & ZHOU B., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour*. *Technol.*, 99(11): 4717 – 4722.

▶ LU Y., ZHAI Y., LIU M. & WU Q., 2010. Biodiesel production from algal oil using cassava (Manihot esculenta Crantz) as feedstock. *J. Appl. Phycol.*, 22: 573 – 578.

➤ MA F. R. & HANNA M. A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.*, 70:1-15.

➢ MAYO A. W., 1997. Effects of Temperature and pH on the Kinetic Growth of Unialga Chlorella vulgaris Cultures Containing Bacteria. Water Environment Research, 69 (1): 64 − 72.

➢ MIAO X. & WU Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour. Technol., 97(6): 841 − 846.

> MUBARAK M., SHAIJA A. &SUCHITHRA T.V., 2015. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production.

➢ O'GRADY J. & MORGAN J. A., 2011. Heterotrophic growth and lipid production of Chlorella protothecoides on glycerol. Bioprocess Biosyst. Eng., 34 (1): 121 − 125.

> PARK J.-Y., PARK M. S., LEE Y.-C. & YANG J.-W., 2015. Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass. *Bioresource Technology*, 184: 267 – 275.

PEREZ-GARCIA O., ESCALANTE F. M. E., DE-BASHAN L. E. & BASHAN Y.,
2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, 45 (1): 11 – 36.

▶ **PITTMAN JK., DEAN AP. & OSUNDEKO O., 2011.** The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.*, 102: 17 – 25.

➢ POURMORTAZAVI, S. M. & HAJIMIRSADEGHI, S. S., 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis – review. *Journal of chromatography A*, 1163: 2 − 24.

PRATOOMYOT J., SRIVILAS P. & NOIRAKSAR T., 2015. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *J. Sci. Technol.*, 26(6): 1179 – 1187.

PURKAN P., ALINA N., ABDULLOH A., ABDILLAH S., WIWIN R., WIWIE S., HAMIDA N., SEUNG W. K., 2019. Biodiesel production by lipids from Indonesian strain of microalgae *Chlorella vulgaris*. Open Chem., 17: 919 – 926.

➢ RATLEDGE C., & WILKINSON S. G., 1988. An overview of microbial lipids. In: RATLEDGE C., & WILKINSON S. G., 1988. Microbial Lipids. eds. Academic press, London, Vol. 1, pp: 3 − 22.

RATTI C., 2001. Hot Air and Freeze-Drying of High Value Foods a Review. J. Food Eng., 49: 311 – 319.

RAWAT I., RANJITH KUMAR R., MUTANDA T. & BUX F., 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable bio-fuels production. *Appl. Energy*, 88 (10): 3411 – 3424.

RODOLFI L., ZITTELLI G. C., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N., BONINI G.
TREDICI M. R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102: 100 – 112.

➢ RODRIGUES-SOUSA A.E., NUNES I.V.O., MUNIZ A.B., CARVALHO J.C.M., MEJIA-DA-SILVA L.C. & MATSUDO M.C., 2021. Nitrogen supplementation for the production of *Chlorella vulgaris* biomass in secondary effluent from dairy industry Biochemical Engineering Journal, 165: 107818-107818, SHEN, L., NDAYAMBAJE J. D., MURWANASHYAKA T., CUI W., MANIRAFASHA E., CHEN C., WANG Y. & LU Y., 2017. Assessment upon heterotrophic microalgae screened from wastewater microbiota for concurrent pollutants removal and biofuel production. *Bioresour. Technol.*, 245: 386 – 393.

SUN X., WANG C., LI Z., WANG W., TONG Y. & WEI J., 2013. Microalgal cultivation in wastewater from the fermentation effluent in Riboflavin (B2) manufacturing for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 143: 499 – 504.

TAKAGI M., KARSENO K. & YOSHIDA T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 101(3): 223 – 226.

TANZI C. D., VIAN M. A. & CHEMAT F., 2013. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresour. Technol.*, 134: 271 – 275.

TIAN Y., KUMABE K., MATSUMOTO K., TAKEUCHI H., XIE Y., HASEGAWA T., 2012. Hydrolysis behavior of tofu waste in hot compressed water. Biomass Bioenergy 39, 112–119.

➤ TRAN D. T., CHEN C. L. & CHANG J. S., 2013. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of Chlorella vulgaris ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst. *Bioresour. Technol.*, 135: 213 – 221.

➢ VICENTE G., MARTINEZ M. & ARACIL J., 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.*, 92: 297 − 305.

➤ WAHLEN B. D., WILLIS R. M. & SEEFELDT L. C., 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed cultures, *Bioresource Technology*, 102 (3): 2724 – 2730,

▶ WANG J., CURTIS W. R., 2016. Proton stoichiometric imbalance during algae photosynthetic growth on various nitrogen sources: Toward metabolic pH control. J. Appl. Phycol., 28: 43 – 52.

➤ WANG L., MIN M., LI Y., CHEN P., CHEN Y., LIU Y., WANG Y., RUAN R., 2010. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl. Biochem. Biotech.*, 162: 1174 – 1186.

➤ WANG S. K., WANG X., MIAO J., TIAN Y. T., 2018. Tofu whey wastewater is a promising basal medium for microalgae culture. *Bioresour*. *Technol.*, 253: 79 – 84.

▶ WIDJAJA A., CHAO-CHANG C. & YI-HSU J., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40: 13 – 20.

➤ XIONG W., LI X., XIANG J. & WU Q., 2008. Fermentation à haute densité de microalgues *Chlorella protothecoides* en bioréacteur pour la production de micro-biodiesel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78: 29 – 36.

➤ XU L., BRILMAN D. W. F., WITHAG J. A. M., BREM G. & KERSTEN S., 2011. Assessment of a dry and wet route for production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. *Bioresour. Technol.*, 102: 5113 – 5122. ➤ XU H., MIAO X. & WU Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. J. Biotechnol., 126(4): 499 – 507.

➤ YAMASHITA T. & YAMAMOTO-IKEMOTO R., 2014. Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater Treatment Plant Effluent via Bacterial Sulphate Reduction in an Anoxic Bioreactor Packed with Wood and Iron. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.*, 11(9): 9835 – 9853.

➢ YANG F., XIANG W., SUN X., WU H., LI T. & LONG L., 2014. A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum sp.* at Room Temperature. *Mar. Drugs*, 12: 1258 − 1270. doi:10.3390/md12031258

➤ YU P., ZHAO C., HE J., LI X., TANG J. & ZHOU Z., 2012. Huang Isolation of a novel strain of Monoraphidium sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock *Bioresour*. *Technol.*, 121: 256 – 262.

ZHANG L., LU H., YUANHUI Z., MA S., LIU Z., DUAN N., LIU M., SI B. & LU J., 2017. Effects of strain, nutrients concentration and inoculum size on microalgae culture for bioenergy from post hydrothermal liquefaction wastewater. *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, 10: 194 – 204.

> ZHANG Q., WANG T. & HONG Y., 2014. Investigation of initial pH effects on growth of an oleaginous microalgae Chlorella sp. HQ for lipid production and nutrient uptake. Water Science & Technology, 70(4): 712 - 719.

Conclusion générale

Les microalgues sont considérées comme une ressource énergétique durable et prometteuse, en raison de leur capacité à accumuler de grandes quantités de lipides adaptés à la production de biodiesel qui présente les mêmes caractéristiques qu'un carburant pétrolier. Le biocarburant à base d'algues est techniquement faisable. Cependant, à ce jour, la viabilité économique n'a pas été atteinte.

Pour le succès de tout biocarburant durable, il y a trois considérations principales : la faisabilité technique, la viabilité économique, et la durabilité des ressources.

Les eaux usées laitières sont une source abondante pour des ressources limitées comme le phosphore et l'azote. De même, l'élimination des nutriments de ces eaux usées est cruciale du point de vue de la bioéconomie circulaire. La culture de microalgues est une option efficace dans le traitement des eaux usées laitières, en raison de leur capacité à se développer rapidement dans des environnements à fortes charges d'azote et de phosphore inorganique et en présence de diverses substances organiques.

Au cours de cette étude, *Chlorella vulgaris* a été criblée pour sa capacité à croître sur les eaux usées laitières (lactosérum des fromageries industrielles et ses dérivés) sous différents régimes pour la production de biomasse algale pour le marché du biodiesel. Cette approche est complétée par la production du biodiesel algal à faible coût à partir de souches autochtones de *Chlorella sp.*, une verte et un mutant de couleur jaune via des procédés d'extraction de lipides par voie humide et sèche, respectivement.

Les processus autotrophes sont toujours la principale méthode de culture des microalgues vertes d'eau douces, en particulier dans les opérations à grande échelle. Néanmoins, dans nos conditions, l'usage des eaux usées laitières provenant de la déminéralisation du lactosérum du fromage (SWW) nécessitait des conditions particulières, soit des dilutions pour de meilleurs rendements.

La stratégie de culture mixotrophe sur les eaux usées laitières (SWW) a démontré que le consortium Chlorella vulgaris – Lactobacillus helveticus pouvait améliorer le taux de croissance spécifique et les productivités volumétriques grâce à l'échange de carbone organique et a révélé une relation symbiotique entre la microalgue verte – bactérie lactique.

L'optimisation des conditions de culture hétérotrophe de C. vulgaris sur le milieu défini (DM) a montré, d'une part, que le rapport (C :N) dans le milieu sont important pour l'obtention de bonne productivité. De l'autre, la culture de C. vulgaris sur les eaux usées laitières (SWW) a prouvé la nécessité des dilutions pour l'augmentation des rendements en biomasse.

Par ailleurs, les milieux à base d'effluents, dilués et non dilués, ont nécessité l'addition de l'azote uniquement à partir de la deuxième et de la troisième culture, respectivement, pour obtenir une croissance soutenue des microalgues en stratégie fed-batch,.

Par ailleurs, l'isolation de souches autochtones a montré la flexibilité du métabolisme des microalgues suit une simple addition du glucose dans le milieu d'isolation. Cela a permis de réduire les temps d'apparition des colonies (3 à 5 jours) et de purification de la souche par repiquages répétés sur boîtes de Pétri (1 à 2 jours).

La production de biodiesel a montré que le séchage de la biomasse algale est plus que nécessaire pour l'obtention de meilleurs rendements lipidiques. En ce sens, il faut penser à inclure l'utilisation du séchage solaire indirect pour sécher la biomasse algale, car son efficacité est directement liée à l'efficacité globale du processus de production de biodiesel.

Pour parfaire notre travail sur les effluents laitiers, il est recommandé de travailler sur d'autres sources de carbone ou bien de travailler sur des souches microalgales capables de dégrader le lactose ou même isolé des souches microalgales contenues dans les effluents laitiers qui seront par conséquent capables d'assimiler le lactose. De plus, il est nécessaire de favoriser la coculture microalgues – bactéries lactiques via le procédé d'immobilisation cellulaire et ou/ l'utilisation d'un consortium de microalgues.

Par ailleurs, la capacité des microalgues a visé le biodiesel est bien établie. Néanmoins, l'extraction des lipides pose de nombreux problèmes compte tenu des exigences énergétiques, mais aussi des problèmes environnementaux et de santé publique que pose l'usage de solvants dérivés du pétrole surtout s'agissant de grandes quantités de biomasse a traité.

A cet effet, il serait plus judicieux de travailler sur l'usage de bio-solvant comme les terpènes, présents dans les déchets agricoles comme les pelures d'agrumes reconnues comme biodégradables donc plus sûres pour l'environnement.
Annexe



Annexe 1 : Variations quantitatives de la biomasse via spectrophotométrie

Figure 1 : Courbes d'étalonnage de la biomasse (g.L⁻¹) au niveau des spectrophotomètres

<u>Annexe 2</u>: Exemple de calcule du K_La pour une vitesse d'agitation de 900 rpm avec un débit d'oxygène de 1.5 L. L/ min.



Figure 2 : Calcule de la dépendance de la concentration de l'oxygène en fonction du temps dressés à partir du plan d'expérience pour la mesure du K_La en milieu défini (tab. XIX ; chap. II, part 2).

Dans la figure 5, l'équation de régression de forme :

$$y = ax + b$$

Où a il exprime la direction de la ligne et correspond :





Figure 3 : Evaluation du coefficient volumique de transfert d'oxygène K_La par méthode de dégazage en fonction du temps dressés à partir du plan d'expérience pour la mesure du K_La en milieu défini (tab. XIX ; chap. II, part 2).

<u>Annexe 3</u>: Effet des facteurs chimiques sur la production de biomasse chez *Chlorella vulgaris* décrits par le modèle de régression.



Figure 4 : Illustration en 3D du tracé de la surface de réponse montrant les effets de (N) et (P) sur la production de biomasse par *C. vulgaris*, à une concentration de Mg constante (0.25 g/ L).

Annexe 4 : Analyse élémentaire de Chlorella vulgaris.

- Analyse élémentaire via un analyseur élémentaire Elementar – Vario Micro Cube

Déf. : L'analyse élémentaire (CHNSO) fonctionne sur le principe d'une combustion catalytique et une séparation des gaz libérés lors de cette combustion. Elle est fiable et peu onéreuse et permet de déterminer les quantités (%) de carbone (C), d'hydrogène (H), d'azote (N), de soufre (S) et d'oxygène (O) présentes dans un échantillon.

Principe de l'appareil

L'analyse élémentaire par combustion utilise deux tubes installés en série dans une enceinte calorifugée, chaque tube pouvant être chauffé indépendamment. Le premier tube est le siège de la réaction d'oxydation et le deuxième celui de la réaction de réduction (fig. 5).



Figure 5 : Principe de fonctionnement de l'analyseur Elementar – Vario Micro Cube (<u>https://lmp.edu.umontpellier.fr/elem</u>)

Les réactions :

- Dans le tube de gauche (CHNS)

$$N \rightarrow NO_{\chi} \rightarrow N_{2}$$

$$C \rightarrow CO_{2} \rightarrow CO_{2}$$

$$H \rightarrow H_{2}O \rightarrow H_{2}O$$

$$S \rightarrow SO_{3} \rightarrow SO_{2}$$

- Dans le tube de droite (CN)

$$NO_x \rightarrow N_2$$

$$CO_2 \rightarrow CO_2 \quad \text{Combustion}$$

$$H_2O \rightarrow H_2O$$

$$SO_2 \rightarrow SO_3 \rightarrow SO_2$$

Pour que la combustion soit totale et s'affranchir des problèmes de fractionnement isotopique, un excès d'oxygène est apporté lors de la chute de l'échantillon dans le tube de combustion et conditionné dans des capsules d'étain pour une combustion flash. Directe suivie par une combustion catalytique de la capsule et de l'échantillon à une température de 1150°C dans un premier four. La réduction des gaz de combustion sur le cuivre chaud est effectuée dans un deuxième four à 850°C. Les gaz formés d'analyse N₂, CO2, H₂O et SO₂ passent par un piège à eau constitué d'anhydrone (Mg(ClO₄)₂. Ils entrent ensuite dans une colonne chromatographique TPD (colonne de désorption à température programmable), qui sépare les différents gaz

<u>Annexe</u>

élémentaires avant leur introduction dans le catharomètre (détecteur de signal) (Thermal Conductivity Detector – TCD). Le détecteur compare la conductivité thermique du gaz à analyser et celle de la référence (C.N.S) grâce à un capteur en filament à deux circuits gazeux, i) un circuit de référence où circule le gaz vecteur pur (Hélium) et ii) un circuit de mesure balayé par un flux gazeux comportant le gaz vecteur (Hélium) et les gaz dégagés par la combustion de l'échantillon (azote moléculaire et dioxyde de carbone). Un logiciel connecté à l'analyseur élémentaire permet la lecture à partir du détecteur (fig. 6).



Figure 6 : Pics des différents gaz obtenus suite à l'analyse élémentaire (<u>https://lmp.edu.umontpellier.fr/elem</u>)

Protocole d'analyse des échantillons de Chlorella vulgaris

- Les échantillons de microalgue en culture sur le milieu de base défini (DM) sont centrifugés pendant 10 minutes à 6000 g.
- Le surnageant est éliminé et le culot est rincé 1 fois avec de l'eau ultrapure.
- Après séchage (une nuit à 60 C°), une masse de 1,5 à 2,5 mg est placée dans une cupule d'étain.
- La cupule est purgée par un courant d'hélium puis fondue avec l'augmentation de la température jusqu'à 1021 °C.
- Une réaction d'oxydation est mise en place et une formation des gaz simples comme le dioxyde de carbone (CO₂), la vapeur d'eau (H₂O), le diazote (N₂) et le dioxyde de soufre (SO₂).
- Ces gaz sont acheminés à l'aide de l'hélium pour être séparés dans la colonne.
- La détection se fait par la lecture de la conductivité thermique des gaz et fournit selon la concentration des éléments chimiques un signal caractéristique.

Pour des besoins de fiabilité, cette opération est réalisée en tripliquât. De même que l'appareil de mesure a été calibré avant utilisation.

<u>Annexe 5</u>: Evaluation de la croissance de *C*. *vulgaris* par comparaison avec des cultures sur milieu nutritif défini (DNM) sous de faible concentration et source d'azote.



Figure 7 : Comparaison de la concentration de la biomasse chez *C. vulgaris* en SWW sous de faible concentration et source d'azote

<u>Annexe 6</u>: Impact des paramètres (vitesse d'agitation à débit d'air constant et de la température) sur le taux de croissance μ de *C*. *vulgaris*



Figure 8 : L'impact de l'augmentation de la vitesse de l'agitateur à débit d'air constant sur le taux de croissance spécifique chez *C. vulgaris* à 30 °C.



Figure 9 : Impact de la température Impact de la température à (400 rpm, 1 vvm) sur le taux de croissance spécifique chez *C. vulgaris*

Annexe 7 : Culture en fermenteur sur milieu MBM à vitesse d'agitation et débit d'air constant.



Figure 9 : Cinétique de croissance de *C. vulgaris* en culture hétérotrophe dans un bioréacteur sur MBM à (400 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose).



Figure 10 : Cinétique de croissance de *C. vulgaris* en culture hétérotrophe dans un bioréacteur sur MBM à (700 rpm, 1.5 vvm et 20 g/ L de glucose).

Optimisation de la production de biomasse chez *Chlorella vulgaris* cultivée dans des eaux usées laitières (lactosérum des fromageries industrielles et ses dérivés) pour la production d'algo-carburant

Résumé :

Les microalgues constituent des cibles de choix pour un futur énergétique stable et plus respectueux de l'environnement. L'avancement récent des biotechnologies a montré l'intérêt croissant autour de ces cellules tant les applications qui convergent autour sont nombreuses. Néanmoins, le coût de la production reste très élevé diminuant l'intérêt économique d'une production industrielle principalement pour les produits à faible valeur ajoutée comme les biocarburants.

Une des solutions proposait dans ce travail serait de réduire et de manière écologique le coût de production de la biomasse algale par la conception et le développement d'un procédé de culture de microalgues basé sur le recyclage des eaux usées salines (SWW) (lactosérum des fromageries et ses dérivés) pour le marché du biodiesel. Ainsi, *Chlorella vulgaris* sera examinée pour sa capacité à croître sur le milieu SWW à différent régime de croissance. L'optimisation de la composition du milieu SWW (azote, phosphore, magnésium) et le coefficient de transfert volumétrique du dioxygène (K_{La}) ont été déterminées par la méthode des surfaces de réponses (RSM) et évaluées statistiquement par le logiciel Design-Expert, respectivement, en flacons agités et en bioréacteur.

En outre, la productivité dans le milieu résiduaire a été optimisée en fonction de la nature de la source d'azote additionnée, de la teneur optimale en glucose sur la base d'un rapport (C:N) (8 :1) dans le milieu mais aussi de la teneur moyenne de la salinité tolérée par l'espèce dulcicole. Enfin, la productivité des microalgues, en conditions optimisées, a été expérimentée dans des bioréacteurs avec différents supports tel que le SWW et le SWW dilué (DSWW). Les résultats ont été évalués statistiquement par rapport au milieu défini (DM) une variante du milieu de base BG11.

Par ailleurs, à l'instar de l'agriculture moderne, le succès et la viabilité économique d'une industrie des biocarburants à base de microalgues dépend, notamment de la sélection de souches autochtones avec une productivité élevée et une forte teneur en lipides. A cet effet, une production de biodiesel à base de lipides extraites à partir de deux souches natives de type *Chlorella*, isolées dans une oasis à Ghardaïa (l'une verte et un mutant de couleur jaune), a été réalisée. Les résultats montrent des teneurs en lipides plus élevée chez les souches cultivées sur le milieu résiduel laitier (DWW) par rapport à celles cultivées sur le milieu artificiel (BG11) et qui dépassent en moyenne 27% du poids de la biomasse sèche. En outre, pour les deux souches, plus de 67 % des lipides produits ont été transformés en biodiesel, ce qui signifie que les lipides contenaient une composition favorable en acides gras pour la production de biodiesel. Ainsi, après analyse, la qualité du biodiesel obtenu a été comparable au diesel conventionnel.

Mots-clés : *Chlorella vulgaris*, photobioréacteurs, développement de procédés, eaux usées salines, déchets industriels, plan d'expérience, méthode des surfaces de réponses, biomasse, souche native, écologie industrielle, traitement des effluents laitiers, bioréacteur, lipides, biodiesel.

Optimization of biomass production by *Chlorella vulgaris* cultivated in dairy wastewater (demineralized and non-demineralized cheese whey) for the production of algae-fuel

Abstract:

Microalgae are prime targets for a stable energy future that is more respectful of the environment. The recent advancement of biotechnology has shown the growing interest on these cells, as the applications converging around them are numerous. Nevertheless, the cost of production remains very high reducing the economic interest of industrial production mainly for low added value products such as biofuels.

One of the solutions proposed in this work would be to reduce and in an ecological way the production cost of algal biomass by the design and development of a microalgae culture process based on the recycling of saline wastewater (SWW) from the demineralization of cheese whey for the biodiesel market. Thus, *Chlorella vulgaris* will be examined for its ability to grow on SWW medium at different growth regimes. The optimization of the composition of the SWW medium (nitrogen, phosphorus, magnesium) and the volumetric transfer coefficient of dioxygen (K_{La}) were determined by the response surface method (RSM) and statistically evaluated by the Design-Expert software, respectively, in shake flasks and in a bioreactor.

In addition, the productivity in the waste medium was optimized depending on the nature of the nitrogen source added, the optimal glucose content based on a (C: N) (8: 1) ratio in the environment but also the average salinity content tolerated by the freshwater species. Finally, the productivity of microalgae, under optimized conditions, was tested in bioreactors with different supports such as SWW and diluted SWW (DSWW). The results were statistically evaluated against defined medium (DM) a variant of BG11 base medium.

Moreover, like modern agriculture, the success and economic viability of a microalgae-based biofuel industry depends, in particular, on the selection of native strains with high productivity and high lipid content. To this end, a production of biodiesel based on lipids extracted from two native strains of *Chlorella*, isolated in an oasis of Ghardaïa (green strain and a mutant of yellow color), was carried out. The results show higher lipid content in strains grown on dairy residual medium (DWW) compared to those grown on artificial medium (BG11) and which exceed on average 27% of the weight of the dry biomass. In addition, for both strains, more than 67% of the lipids produced were transformed into biodiesel, which means that the lipids contained a favourable composition of fatty acids for the production of biodiesel. Thus, after analysis, the quality of the biodiesel obtained was comparable to conventional diesel.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, photobioreactors, process development, saline wastewater, industrial waste, experimental design, response surface method, biomass, native strain, industrial ecology, dairy effluent treatment, bioreactor, lipids, biodiesel.



Laboratoire de Bioprocess and Modeling

(Ecole Nationale Supérieure des Technologies Chimiques, Prague, Czechia) Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, RP 17, Tizi-Ouzou, 15000 Algérie

