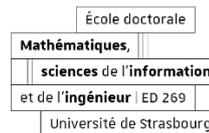




**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



**ÉCOLE DOCTORALE MATHÉMATIQUES, SCIENCES DE L'INFORMATION ET DE  
L'INGÉNIEUR – ED269  
UMR 7357**

**THÈSE** présentée par :

**Julie FARINACCI**

soutenue le : **14 juin 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Énergétique et Génie des procédés**

**Biomasse photoactivée pour le traitement  
des eaux résiduaires : influence des  
conditions opératoires sur le potentiel de  
récupération de ressources**

**THÈSE dirigée par :**

**M. Laurent Julien**

Professeur, ENGEES/ICUBE

**RAPPORTEURS :**

**Mme CASELLAS Magali**

Maîtresse de Conférences HDR, Université de Limoges

**M. BERNARD Olivier**

Directeur de recherche, INRIA

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme SORIC Audrey**

Professeure, Centrale Méditerranée

**M. HREIZ Rainier**

Maître de conférences, Université de Lorraine

## Table des matières

Glossaire .....	6
Liste des figures .....	7
Introduction.....	13
Partie I : Bibliographie.....	17
I.1. Place du CHRA en traitement des eaux usées .....	17
I.1.1. La STEU conventionnelle .....	17
I.1.1.1. Les prétraitements et les traitements physico-chimiques .....	17
I.1.1.2. Les traitements biologiques intensifs et extensifs .....	18
I.1.1.3. Les traitements tertiaires.....	21
I.1.2. Les pollutions carbonée, azotée et phosphorée .....	22
I.1.3. Le chenal à haut rendement algal (CHRA) .....	24
I.1.4. Comparaison du CHRA avec d'autres systèmes de traitement.....	26
I.1.5. Conclusion.....	27
I.2. Le consortium microalgues-bactéries .....	28
I.2.1. Les bactéries .....	28
I.2.1.1. Les métabolismes bactériens .....	28
I.2.1.2. Le traitement aérobie des eaux usées par les bactéries.....	29
I.2.2. Les microalgues.....	31
I.2.2.1. Généralités .....	31
I.2.2.2. Métabolisme : photosynthèse et assimilation .....	33
I.2.2.3. La structure des chloroplastes.....	34
I.2.3. Les interactions microalgues-bactéries .....	35
I.2.4. Conclusion.....	37
I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries .....	38
I.3.1. Les besoins nutritionnels .....	38
I.3.1.1. Le carbone .....	39
I.3.1.2. L'azote .....	42
I.3.1.3. Le phosphore .....	45
I.3.1.4. Le ratio C:N:P.....	46
I.3.1.5. L'oxygène.....	47
I.3.1.6. Les micronutriments : magnésium, soufre et calcium .....	48

I.3.2. Les paramètres environnementaux .....	50
I.3.2.1. Le pH .....	50
I.3.2.2. La lumière .....	50
I.3.2.3. La température .....	52
I.3.2.4. Présence de prédateurs.....	53
I.3.3. Les paramètres opérationnels .....	53
I.3.3.1. Le mélange .....	53
I.3.3.2. Le temps de séjour hydraulique (TSH).....	55
I.3.3.3. L'âge des boues (ADB) .....	56
I.4. La caractérisation de la biomasse .....	58
I.4.1. La composition biochimique .....	58
I.4.1.1. Lipides .....	59
I.4.1.2. Glucides .....	62
I.4.1.3. Protéines .....	64
I.4.2. L'activité biologique .....	65
I.4.2.1. Respirométrie.....	65
I.4.2.2. Photorespirométrie.....	68
I.4.2.3. Modélisation .....	70
I.4.3. Conclusion.....	71
I.5. La valorisation de la biomasse .....	72
I.5.1. Les voies de valorisation de la biomasse .....	72
I.5.1.1. La valorisation agricole et alimentaire .....	72
I.5.1.2. La valorisation énergétique en biocarburant .....	72
I.5.2. Les conversions thermochimiques .....	78
I.5.2.1. La combustion .....	78
I.5.2.2. La pyrolyse .....	78
I.5.2.3. La liquéfaction.....	79
I.5.3. La conversion chimique : la transestérification.....	79
I.5.3.1. Le biodiesel.....	79
I.5.3.2. Les triglycérides .....	80
I.5.3.3. La réaction de transestérification.....	80
I.5.3.4. Le biodiesel à partir de microalgues et bactéries.....	81
I.5.4. Les conversions biochimiques .....	82

I.5.4.1. La fermentation alcoolique.....	82
I.5.4.2. La digestion anaérobie.....	85
I.5.4.3. La fermentation obscure.....	89
I.5.5. Conclusion.....	91
I.6. L'Analyse du Cycle de Vie (ACV).....	92
I.6.1. Généralités.....	92
I.6.2. Application au traitement des eaux usées.....	92
I.7. Conclusions générales.....	93
Partie II : Matériels et Méthodes.....	95
II.1. Pilotes expérimentaux.....	95
II.1.1. Inoculum de microalgues et bactéries.....	95
II.1.2. Eaux usées synthétiques.....	96
II.1.3. Photobioréacteurs séquentiels avec CO <sub>2</sub> .....	97
II.1.3.1. Descriptif.....	97
II.1.3.2. Fonctionnement : alimentation et extraction.....	98
II.1.3.3. Modalité : le dioxyde de carbone CO <sub>2</sub> .....	100
II.1.4. Chenal à haut rendement algal (CHRA).....	100
II.1.4.1. Descriptif.....	100
II.1.4.2. Fonctionnement.....	102
II.1.4.3. Modalités.....	105
II.2. Méthodes analytiques.....	108
II.2.1. Biomasse.....	108
II.2.1.1. MES et MVS.....	108
II.2.1.2. Productivité et productivité cumulée.....	108
II.2.1.3. Composition biochimique.....	109
II.2.2. Traitement des eaux usées.....	110
II.2.3. Activité du consortium de microalgues et de bactéries.....	110
II.2.3.1. Modélisation.....	111
II.2.3.2. Détermination expérimentale du $k_{LaO_2}$ .....	114
II.2.4. 4. Analyse statistique.....	115
II.2.4.1. Boîtes à moustaches.....	115
II.3. Analyse du Cycle de Vie (ACV).....	116
II.3.1. Logiciel ACV4E.....	116
II.3.2. Description des filières.....	116

II.3.2.1.	Filière boues activées.....	117
II.3.2.2.	Filière filtre planté de roseaux (FPR) .....	117
II.3.2.3.	Filière CHRA.....	118
II.3.3.	Objectifs et champ de l'étude .....	118
II.3.4.	Inventaire de la filière CHRA .....	119
II.3.4.1.	Carbone.....	120
II.3.4.2.	Azote.....	120
II.3.4.3.	Phosphore et micropolluants .....	121
II.3.4.4.	Boues .....	122
II.3.4.5.	Consommation électrique .....	122
II.3.5.	Impacts environnementaux .....	122
Partie III : Résultats et discussion.....		124
III.1.	Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse	124
III.1.1.	Dosage des lipides .....	124
III.1.1.1.	Réactifs et échantillons .....	124
III.1.1.2.	Protocole .....	125
III.1.1.3.	Étalonnage.....	125
III.1.1.4.	Le temps de réaction .....	127
III.1.1.5.	Les ajouts dosés .....	128
III.1.1.6.	Blanc de réactifs et essais de compensation .....	130
III.1.1.7.	Discussion .....	132
III.1.2.	Les glucides .....	134
III.1.2.1.	Réactifs et échantillons .....	134
III.1.2.2.	Protocole .....	134
III.1.2.3.	Étalonnage.....	134
III.1.3.	Les protéines.....	135
III.1.3.1.	Réactifs et échantillons .....	136
III.1.3.2.	Protocole .....	136
III.1.4.	Discussion.....	136
III.1.5.	Conclusion.....	137
III.2.	Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO <sub>2</sub> .....	138
III.2.1.	Traitement des eaux usées .....	138
III.2.1.1.	La DCO.....	139

III.2.1.2. L'azote .....	140
III.2.1.3. Le phosphore.....	144
III.2.2. Suivi du pH et de l'oxygène dissous .....	145
III.2.3. Productivité de la biomasse .....	149
III.2.4. Composition de la biomasse .....	153
III.2.5. Conclusions .....	155
III.3. Chenal à haut rendement algal (CHRA) .....	157
III.3.1. Fonctionnement à concentration en biomasse fixe.....	158
III.3.1.1. Influence de la vitesse d'agitation.....	158
III.3.1.2. Changement de la charge en azote des eaux usées synthétiques .....	169
III.3.2. ADB fixe et concentration en biomasse variable .....	181
III.3.2.1. Productivité de la biomasse .....	182
III.3.2.2. Traitement des eaux usées .....	184
III.3.2.3. Activité biologique du consortium microalgues-bactéries .....	189
III.3.2.4. Conclusions.....	194
III.4. ACV .....	196
III.4.1. Comparaison entre BA, FPR et CHRA .....	196
III.4.2. Exploitation, Rejets et émissions, Fin de vie des boues et Pathogènes .....	201
III.4.3. Conclusions .....	205
Conclusion et perspectives.....	206
Annexes.....	I
Annexe A    ACV .....	I
A.1 Bilan matière du CHRA.....	I
A.2 Données brutes des impacts environnementaux des 3 filières.....	II
A.3 Histogrammes des impacts environnementaux relatifs à chaque filière.....	III
Références.....	I

## Glossaire

ACV : Analyse du cycle de vie

ADB : Âge des boues

AGS : Acide gras saturé

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AOB (Ammonia oxidizing bacteria) : Bactérie oxydatrice de l'ammoniac

ATP : Adénosine triphosphate

ASM (Activated sludge model) : Modèle biocinétique de boues activées

BA : Boues activées

CFD (Computational fluid dynamics) : Mécanique des fluides numérique

CHRA : Chenal à haut rendement algal

COT : Carbone organique total

DBO5 : Demande biochimique en oxygène à 5 jours

DCO : Demande chimique en oxygène

EH : Equivalent-habitant

EMAG : Esters méthyliques d'acide gras

EPS : Exopolysaccharides

EU : Eaux usées

FPR : Filtre planté de roseaux

MES : Matières en suspension

MVS : Matières volatiles en suspension

NADPH<sub>2</sub> : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NGL : Azote global

NOB (Nitrite oxidizing bacteria) : Bactérie oxydatrice des nitrites

NTK : Azote total Kjeldahl

OD : Oxygène dissous

OUR (Oxygen uptake rate) : Taux de consommation de l'oxygène

OTR (Oxygen transfer rate) : Taux de transfert d'oxygène

PT : Phosphore total

SBR (Sequencing batch reactor) : Réacteur séquentiel

STEU : Station de traitement des eaux usées

TA : Titre alcalimétrique

TAC : Titre alcalimétrique complet

TAG : Triglycérides

TSH : Temps de séjour hydraulique

UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) : Réacteur anaérobie à flux ascendant avec couche de boue

ZHA : Zone humide artificielle

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Qualité moyenne du rejet des lagunages naturels français pour une capacité inférieure à 2000 EH (E=entrée et S=sortie) (Durot and Molle, 2015) .....	21
<b>Tableau 2.</b> Ordre de grandeur des fractions de l'azote en entrée de station exprimées par rapport à NTK (Deronzier et al., 2001).....	22
<b>Tableau 3.</b> Pollution par EH (Degrémont, 2004).....	23
<b>Tableau 4.</b> Performances minimales de traitement attendues pour la DCO .....	24
<b>Tableau 5.</b> Performances minimales de traitement attendues pour les paramètres azote et phosphore, dans le cas des stations rejetant en zone sensible à l'eutrophisation. ....	24
<b>Tableau 6.</b> Métabolismes des bactéries.....	29
<b>Tableau 7.</b> Classification générale des espèces chimiques .....	38
<b>Tableau 8.</b> Abattement de la DCO, NTK, NGL et PT en fonction du TSH (Pham, 2018) ....	56
<b>Tableau 9.</b> Composition en protéines, glucides et lipides de différentes espèces de microalgues (% de matière sèche) (Trivedi et al., 2015).....	58
<b>Tableau 10.</b> Paramètres de culture, caractéristiques de la biomasse et paramètres de la photorespirométrie .....	69
<b>Tableau 11.</b> Équation de Monod et ses paramètres .....	71
<b>Tableau 12.</b> Avantages et inconvénients des techniques de récupération (Abdelaziz et al., 2013; Barros et al., 2015; Singh and Patidar, 2018) .....	75
<b>Tableau 13.</b> Avantages et inconvénients des méthodes de séchage (Kim and Kim, 2022)....	76
<b>Tableau 14.</b> Techniques de déstructuration cellulaire des microalgues (Dejoye, 2013) .....	77
<b>Tableau 15.</b> Différences entre la fermentation alcoolique et la digestion anaérobie .....	82
<b>Tableau 16.</b> Teneur en amidon des microalgues (John et al., 2011).....	83
<b>Tableau 17.</b> Production de méthane de la digestion anaérobie de biomasse microalgale (Ward et al., 2014) .....	89
<b>Tableau 18.</b> Produits et concentrations dans les eaux usées synthétiques .....	96
<b>Tableau 19.</b> Protocoles d'extraction .....	104
<b>Tableau 20.</b> Chronologie des conditions opératoires testées dans le CHRA.....	106
<b>Tableau 21.</b> Composition des eaux usées synthétiques entrantes .....	107
<b>Tableau 22.</b> Paramètres opératoires pour les différents âges des boues .....	107
<b>Tableau 23.</b> Micro-méthodes pour les analyses physico-chimiques.....	110
<b>Tableau 24.</b> Cinétiques du modèle.....	111
<b>Tableau 25.</b> Paramètres du modèle .....	113
<b>Tableau 26.</b> Valeurs initiales de $OPR_{max}$ , $OUR_{endogène}$ et $\mu_{B,max}X$ .....	113
<b>Tableau 27.</b> Charges et concentrations à traiter par la station de 1500 EH .....	117
<b>Tableau 28.</b> Composition des eaux usées en entrée et en sortie en $g.m^{-3}$ et en $g.j^{-1}.hab^{-1}$ ....	120
<b>Tableau 29.</b> Bilan matière du CHRA.....	121
<b>Tableau 30.</b> Impacts environnementaux et unités fournis par ACV4E .....	123
<b>Tableau 31.</b> Etudes utilisant la méthode SPV avec la nature de l'échantillon et l'étalon utilisé .....	126
<b>Tableau 32.</b> Hausse de l'absorbance dans le temps pour différentes quantités de <i>Chlorella</i> .....	128
<b>Tableau 33.</b> Teneur en lipides selon différentes méthodes de quantification.....	132

<b>Tableau 34.</b> Composition de <i>Spiruline</i> et <i>Chlorelle</i> avec f : fournisseur et e : expérimental .....	136
<b>Tableau 35.</b> Concentration moyenne de la DCO et abattement moyen R en sortie de R1 et R2 avant-après injection de CO <sub>2</sub> (*la DCO et l'abattement en sortie de R1 avant CO <sub>2</sub> n'ont pas été calculés, car les échantillons non filtrés ont rendu les mesures trop variables).....	140
<b>Tableau 36.</b> Concentration moyenne de l'azote global NGL et abattement moyen R en sortie de R1 et R2 avant-après injection de CO <sub>2</sub> .....	143
<b>Tableau 37.</b> Concentration moyenne des orthophosphates et abattement moyen R en sortie de R1 et R2 avant-après injection de CO <sub>2</sub> .....	145
<b>Tableau 38.</b> Régression linéaire avec intervalle de confiance à 95% pour les photobioréacteurs R1 et R2 .....	150
<b>Tableau 39.</b> Régression linéaire pour R1 et R2 avant et après injection de CO <sub>2</sub> .....	151
<b>Tableau 40.</b> Composition moyenne de la biomasse avant-après injection de CO <sub>2</sub> dans R1 et R2.....	154
<b>Tableau 41.</b> Caractéristiques électriques pour deux vitesses d'agitation.....	158
<b>Tableau 42.</b> Productivité cumulée à vitesse haute et vitesse basse.....	160
<b>Tableau 43.</b> Récapitulatif des paramètres du modèle pour chaque modalité.....	165
<b>Tableau 44.</b> Calage des paramètres à « Vitesse haute » et « Vitesse basse » .....	165
<b>Tableau 45.</b> Productivité avec l'EU standard et l'EU sans urée .....	170
<b>Tableau 46.</b> Composition biochimique moyenne sur l'ensemble des modalités « EU standard » et « EU sans urée ».....	171
<b>Tableau 47.</b> Pente moyenne de remontée de l'oxygène après alimentation .....	176
<b>Tableau 48.</b> Récapitulatif des paramètres du modèle pour chaque modalité.....	177
<b>Tableau 49.</b> Calage des paramètres pour les modalités « EU standard » et « EU sans urée » .....	177
<b>Tableau 50.</b> Pente moyenne de remontée du pH après alimentation .....	180
<b>Tableau 51.</b> Productivité cumulée pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».....	183
<b>Tableau 52.</b> Récapitulatif des paramètres du modèle pour chaque modalité.....	190
<b>Tableau 53.</b> Calage des paramètres pour les modalités « EU standard + ADB 5j », « EU sans viandox + ADB 5j » et « EU sans viandox + ADB 8j » .....	190
<b>Tableau 54.</b> Impacts environnementaux de la filière BA .....	202
<b>Tableau 55.</b> Impacts environnementaux de la filière FPR.....	203
<b>Tableau 56.</b> Impacts environnementaux de la filière CHRA.....	204

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Mécanismes biologiques au sein d'un consortium microalgues-bactéries.....	14
<b>Figure 2.</b> Nombre de publications à la suite d'une recherche sur le moteur <i>Scopus</i> avec les mots clés « <i>microalgae wastewater</i> » .....	15
<b>Figure 3.</b> Filière de traitement des eaux usées (Observatoire national des services publics d'eau et d'assainissement, 2009) .....	17
<b>Figure 4.</b> Schéma de fonctionnement d'un procédé par boues activées (Marcel and Pastor, 2012) .....	19
<b>Figure 5.</b> Schéma de principe du lagunage conventionnel (Sperling, 2007) .....	20
<b>Figure 6.</b> Schéma du fonctionnement d'une lagune facultative (adapté de (Tchobanoglous and Schroeder, 1985)).....	20
<b>Figure 7.</b> Les formes de l'azote.....	22
<b>Figure 8.</b> Prolifération d'algues vertes sur une plage de Saint-Brieuc (Pavard, 2019).....	23
<b>Figure 9.</b> Schéma d'un AIWPS avec un bassin anaérobie couvert, un bassin à haut rendement algal, un bassin de décantation et un lit de granulat filtrant (R Craggs et al., 2014) .....	24
<b>Figure 10.</b> Schéma d'un chenal à boucle simple (a) et à boucles en série (b) .....	25
<b>Figure 11.</b> Chenaux à haut rendement algal en Israël (Kloosterman, 2011) et en Californie (Fields et al., 2021) .....	25
<b>Figure 12.</b> Photobioréacteur plat (a) et tubulaire (b) (Bitog et al., 2011) .....	27
<b>Figure 13.</b> Schéma d'une cellule eucaryote et procaryote (National Center for Biotechnology Information, 2005) .....	28
<b>Figure 14.</b> Les réactions de conversion de l'azote .....	30
<b>Figure 15.</b> Microalgues unicellulaires (Savitsky, 2019) Ligne 1: <i>Caloneis amphisbaena</i> ; <i>Coelastrum</i> sp.; <i>Cymatopleura</i> sp.; <i>Chlorella</i> sp.; Ligne 2: <i>Cosmarium formosulum</i> ; <i>Pediastrum duplex</i> ; <i>Gyrosigma</i> ; <i>Scenedesmus dimorphus</i> . Ligne 3: <i>Cymbella</i> sp.; <i>Scenedesmus</i> sp.; <i>Characium</i> sp.; <i>Surirella</i> sp. Ligne 4: <i>Diatoma vulgare</i> ; <i>Pediastrum boryanum</i> ; <i>Trebouxia</i> sp.; <i>Nitzschia sigmoides</i> .....	32
<b>Figure 16.</b> Schéma de la phase claire et de la phase sombre dans le chloroplaste.....	33
<b>Figure 17.</b> Schéma des mécanismes de photosynthèse et de respiration .....	34
<b>Figure 18.</b> Schéma d'un chloroplaste (Ma, 2013).....	35
<b>Figure 19.</b> Structure de la chlorophylle a et b (Richfield, 2007) .....	35
<b>Figure 20.</b> Interactions microalgues-bactéries en traitement des eaux usées.....	36
<b>Figure 21.</b> Répartition du carbone inorganique ( $\text{CO}_2$ , $\text{HCO}_3^-$ et $\text{CO}_3^{2-}$ ) en fonction du pH...39	39
<b>Figure 22.</b> Répartition de l'ammoniac $\text{NH}_3$ et de l'ammonium $\text{NH}_4^+$ en fonction du pH.....	43
<b>Figure 23.</b> Hydrolyse de l'urée (ammonification) .....	43
<b>Figure 24.</b> Répartition du phosphore inorganique en fonction du pH .....	46
<b>Figure 25.</b> Evolution de la vitesse de croissance algale selon le ratio N:P (Richmond and Hu, 2013) .....	47
<b>Figure 26.</b> Cinétique de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse (adapté de Benedetti et al., 2018) .....	51
<b>Figure 27.</b> Exemple de roue à aubes (Pappalardo, 2018).....	54
<b>Figure 28.</b> Profils de vitesse sur une section horizontale dans le CHRA sans déflecteur (a) et avec déflecteur (b).....	55

<b>Figure 29.</b> Structure d'un phospholipide (adapté en français) (OpenStax, 2016).....	59
<b>Figure 30.</b> Structure d'un triglycéride (Lennert, 2005).....	60
<b>Figure 31.</b> Structure du B-carotène .....	60
<b>Figure 32.</b> Structure du glucose (Yikrazuul, 2009), du sucrose (NEUROtiker, 2007) et de l'amylose (Mattern, 2009) .....	62
<b>Figure 33.</b> Structure de la pectine (NEUROtiker, 2008).....	63
<b>Figure 34.</b> Schéma simplifié d'un acide aminé (Alberts et al., 2002).....	64
<b>Figure 35.</b> Formation d'une protéine à partir de deux acides aminés (Alberts et al., 2002)...	64
<b>Figure 36.</b> Schéma d'un respiromètre simple .....	66
<b>Figure 37.</b> Schéma d'un photorespiromètre et des populations bactériennes et algales (Rossi et al., 2020b) .....	70
<b>Figure 38.</b> Chaînes potentielles de production de biocarburant à partir de biomasse algale (Ryan, 2009) .....	74
<b>Figure 39.</b> Voies de valorisation énergétique de la biomasse (Muñoz and Guieysse, 2006)..	78
<b>Figure 40.</b> Réaction de transestérification de triglycérides avec un alcool (R-OH) avec R1,R2 et R3 des groupements alkyles présents dans les acides gras (Richard, 2011).....	81
<b>Figure 41.</b> Réaction de fermentation alcoolique (Davidcarmack, 2013) .....	84
<b>Figure 42.</b> Liens entre la fermentation obscure, la fermentation « acidogénique » et la digestion anaérobie (Turon, 2015).....	86
<b>Figure 43.</b> Schéma simplifié d'un méthaniseur (ADEME, 2021).....	87
<b>Figure 44.</b> Photo du photobioréacteur à double enveloppe.....	97
<b>Figure 45.</b> Schéma des photobioréacteurs (double et simple enveloppe) avec les kits d'injection de CO <sub>2</sub> .....	98
<b>Figure 46.</b> Fonctionnement du photobioréacteur séquentiel lors des phases d'extraction et de vidange .....	99
<b>Figure 47.</b> Schéma (vue de côté et de haut) du chenal (Pham, 2018).....	101
<b>Figure 48.</b> Photo du chenal à haut rendement algal avec le décanteur .....	101
<b>Figure 49.</b> Schéma (vue de haut et de côté) du décanteur (Pham, 2018).....	102
<b>Figure 50.</b> Schéma du CHRA avec les cuves d'eau claire et de concentrat et le décanteur .	102
<b>Figure 51.</b> Configuration du CHRA pendant l'extraction manuelle .....	105
<b>Figure 52.</b> Configuration du CHRA pendant l'extraction par pompage.....	105
<b>Figure 53.</b> Exemple de données d'oxygène dissous expérimentales et simulées .....	114
<b>Figure 54.</b> Schéma d'une boîte à moustaches (Gouvernement du Canada, 2021) .....	115
<b>Figure 55.</b> Schéma d'un filtre à écoulement vertical (Risch and Boutin, 2010).....	118
<b>Figure 56.</b> Périmètre du système (adapté de ((Risch et al., 2012)).....	119
<b>Figure 57.</b> Impacts et dommages environnementaux de la méthodologie ReCiPe2016 (adapté de (Huijbregts et al., 2017) dans le rapport (Delavaud et al., 2021)).....	122
<b>Figure 58.</b> Protocole d'analyse des lipides (Mishra et al., 2014).....	125
<b>Figure 59.</b> Etalonnage avec 0, 27, 40, 50, 70 µL d'acide oléique (gauche) et 30, 40, 50, 70 µL d'huile de colza (droite) .....	126
<b>Figure 60.</b> Courbes d'étalonnage avec l'acide oléique et l'huile de colza .....	127
<b>Figure 61.</b> Évolution de l'absorbance dans le temps pour différentes masses de Chlorelle..	128
<b>Figure 62.</b> Effet matrice sur l'absorbance par ajouts dosés .....	129
<b>Figure 63.</b> Ajouts dosés avec l'huile de colza .....	129

<b>Figure 64.</b> Ajouts dosés avec l'acide oléique .....	130
<b>Figure 65.</b> Essai de compensation avec (gauche) et sans (droite) vanilline pour <i>Chlorelle</i> .	131
<b>Figure 66.</b> Absorbance en fonction de la quantité de microalgues avec et sans vanilline ....	131
<b>Figure 67.</b> Absorbance corrigée par l'essai de compensation en fonction de la quantité de microalgues .....	132
<b>Figure 68.</b> Protocole d'analyse des glucides (Dubois et al., 1956).....	134
<b>Figure 69.</b> Courbe d'étalonnage avec le glucose .....	135
<b>Figure 70.</b> Évolution de la DCO dans R1 .....	139
<b>Figure 71.</b> Évolution de la DCO dans R2 .....	139
<b>Figure 72.</b> Formes de l'azote ( $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ , Norg) en sortie de R1 .....	141
<b>Figure 73.</b> Formes de l'azote ( $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ , Norg) en sortie de R2.....	142
<b>Figure 74.</b> Orthophosphates en sortie de R1 (gauche) et de R2 (droite).....	144
<b>Figure 75.</b> Évolution du pH avant l'injection de $\text{CO}_2$ (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière) .....	146
<b>Figure 76.</b> Évolution du pH après l'injection de $\text{CO}_2$ (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière) .....	147
<b>Figure 77.</b> Évolution de l'oxygène dissous avant l'injection de $\text{CO}_2$ (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière).....	148
<b>Figure 78.</b> Evolution de l'oxygène dissous après l'injection de $\text{CO}_2$ (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière).....	149
<b>Figure 79.</b> Évolution de la productivité cumulée de biomasse dans les photobioréacteurs R1 et R2 (la période vide correspond à la fermeture des locaux). Les croix rouges indiquent le démarrage de l'injection de $\text{CO}_2$ .....	150
<b>Figure 80.</b> Cinétique de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse (adapté de Benedetti et al., 2018) .....	152
<b>Figure 81.</b> Composition de la biomasse dans le photobioréacteur R1 .....	153
<b>Figure 82.</b> Composition de la biomasse dans le photobioréacteur R2 .....	154
<b>Figure 83.</b> Chronologie des modalités testées dans le CHRA (ADB = âge de boues) .....	157
<b>Figure 84.</b> Evolution de la productivité cumulée à « Vitesse haute » et « Vitesse basse » ..	159
<b>Figure 85.</b> Évolution de la composition globale de la biomasse à vitesse haute (avant trait) et vitesse basse (après trait) .....	160
<b>Figure 86.</b> Concentrations des espèces azotées en sortie à vitesse haute (n=10).....	162
<b>Figure 87.</b> Concentrations des espèces azotées en sortie à vitesse basse (n=9).....	162
<b>Figure 88.</b> Évolution de l'oxygène dissous dans le CHRA à vitesse haute et vitesse basse.	164
<b>Figure 89.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) à « Vitesse basse » .....	166
<b>Figure 90.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) à « Vitesse haute » .....	166
<b>Figure 91.</b> Evolution du pH dans le CHRA à vitesse haute et vitesse basse .....	168
<b>Figure 92.</b> Évolution de la productivité cumulée pour l'EU standard (gauche) et sans urée (droite).....	170
<b>Figure 93.</b> Evolution de la composition globale de la biomasse avec l'entrée standard (avant trait rouge) et sans urée (après trait rouge) .....	171

<b>Figure 94.</b> Concentration de la DCO en sortie avec l'EU standard et sans urée (n=9 pour EU standard entrée et sortie ; n=8 et n=35 pour EU sans urée entrée et sortie).....	172
<b>Figure 95.</b> Concentration des orthophosphates en sortie en sortie de chenal avec l'EU standard et sans urée.....	173
<b>Figure 96.</b> Concentration moyenne des espèces azotées en entrée (a) et sortie (b) de chenal avec l'EU standard.....	174
<b>Figure 97.</b> Concentration moyenne des espèces azotées en entrée (a) et en sortie (b) de chenal avec l'EU sans urée.....	175
<b>Figure 98.</b> Evolution de l'oxygène dissous dans le CHRA avec l'EU standard et sans urée.....	176
<b>Figure 99.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant la modalité « EU standard ».....	178
<b>Figure 100.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant la modalité « EU sans urée ».....	178
<b>Figure 101.</b> Évolution du pH dans le CHRA avec l'EU standard et l'EU sans urée.....	179
<b>Figure 102.</b> Évolution de la productivité cumulée de la biomasse pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».....	182
<b>Figure 103.</b> Concentration de la DCO en entrée et sortie de chenal pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».....	184
<b>Figure 104.</b> Concentration des orthophosphates en entrée et sortie pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».....	185
<b>Figure 105.</b> Concentration des espèces azotées en entrée (a) et sortie (b) pour « ADB 5j + EU sans viandox ».....	187
<b>Figure 106.</b> Concentration des espèces azotées en entrée (a) et sortie (b) pour « ADB 8j + EU sans viandox ».....	187
<b>Figure 107.</b> Concentration des espèces azotées en entrée (a) et en sortie (b) pour « ADB 5j + EU standard ».....	188
<b>Figure 108.</b> Evolution de l'oxygène dissous dans le CHRA pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».....	189
<b>Figure 109.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pour « EU standard + ADB 5j ».....	191
<b>Figure 110.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant « EU sans viandox + ADB 5j ».....	192
<b>Figure 111.</b> Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant la modalité « EU sans viandox + ADB 8j ».....	193
<b>Figure 112.</b> Evolution du pH dans le CHRA pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».....	194
<b>Figure 113.</b> Impacts environnementaux des trois filières de traitement (1).....	197
<b>Figure 114.</b> Impacts environnementaux des trois filières de traitement (2).....	199
<b>Figure 115.</b> Impacts environnementaux de la filière par boues activées (1).....	III
<b>Figure 116.</b> Impacts environnementaux de la filière par boues activées (2).....	III
<b>Figure 117.</b> Impacts environnementaux de la filière par filtre planté de roseaux (1).....	IV
<b>Figure 118.</b> Impacts environnementaux de la filière par filtre planté de roseaux (2).....	IV
<b>Figure 119.</b> Impacts environnementaux de la filière par CHRA (1).....	V
<b>Figure 120.</b> Impacts environnementaux de la filière par CHRA (2).....	V

## Introduction

Selon les Nations Unies, « plus de 80% des eaux usées à travers le monde (plus de 95% dans certains pays en développement) sont rejetées dans l'environnement sans traitement » (Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau : Les eaux usées: une ressource inexploitée - UNESCO Bibliothèque Numérique, 2017). Faute de traitement adapté, les effluents rejetés participent notamment à l'enrichissement en azote et phosphore des plans d'eau. Ces apports trop importants en nutriments entraînent une eutrophisation des milieux aquatiques qui déclenche une « efflorescence algale ». L'écosystème s'appauvrit et se dégrade à cause de la consommation excessive en oxygène des algues pour soutenir leur croissance. De plus, lorsqu'elles se décomposent, les algues libèrent des gaz dont le sulfure d'hydrogène qui est toxique et pose alors un risque pour l'homme. Le rapport de l'ONU préconise ainsi une gestion améliorée des eaux usées via différents leviers :

- Réduction de la pollution à la source ;
- Élimination de contaminants des flux d'eaux usées ;
- Réutilisation des eaux récupérées ;
- Récupération de sous-produits utiles.

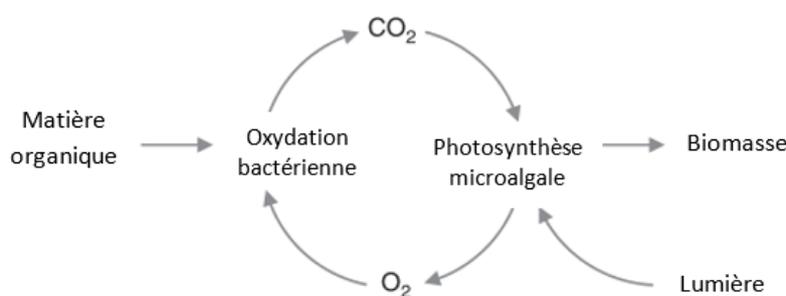
Pour traiter l'azote et le phosphore, les procédés conventionnels physiques ou chimiques peuvent devenir coûteux car ils requièrent d'importantes quantités de réactifs chimiques (par exemple, chlorure ferrique pour la précipitation du phosphore) et d'énergie (aération mécanique nécessaire à la nitrification) (Christenson and Sims, 2011). Parmi les filières de traitement biologique, le procédé à boue activée est le traitement le plus répandu où les composés organiques et azotés sont dégradés par diverses communautés de microorganismes, nécessitant un apport mécanique d'oxygène par aération des bassins. En sortie, les produits générés sont des boues en excès et des composés minéraux. La performance en récupération des ressources peut être améliorée, car dans l'effluent, une partie de l'azote est encore présente et le reste souvent dégazé sous forme de diazote gazeux (dénitrification). Les bactéries responsables de la dégradation du carbone et de l'azote assimilent du phosphore à leur matériel cellulaire. L'élimination par cette voie constitue environ 25% de la quantité journalière à dégrader. Pour améliorer le traitement du phosphore, les installations à boues activées réalisent un transfert sous forme particulaire soit par précipitation, soit par suraccumulation au sein de la biomasse épuratrice, soit par combinaison des deux processus (Deronzier and Choubert, 2004).

Après le traitement secondaire, le phosphore et l'azote minéral encore présents en sortie doivent être traités pour éviter une pollution supplémentaire des milieux récepteurs et aussi dans une optique de récupération des nutriments des eaux usées. Cette pratique de réutilisation des eaux usées et de récupération des ressources s'inscrit dans une politique de meilleure gestion des stations de traitement des eaux usées et de durabilité. De plus, les activités humaines impactent les cycles biogéochimiques de l'azote et du phosphore, avec par exemple l'exploitation des blocs de roches phosphatées pour fabriquer des fertilisants. Les parcelles agricoles sont fertilisées, souvent en excès, et les flux de nutriments excédentaires se retrouvent dans le milieu aquatique. Leur présence y conduit à une dégradation de la ressource en eau

ainsi qu'à une perturbation des écosystèmes existants, notamment par le phénomène d'eutrophisation déjà évoqué.

Dans ce contexte, les procédés reposant sur un couplage entre bactéries et microalgues présentent un fort potentiel pour le traitement des effluents à des coûts modérés, un impact écologique réduit et la possible valorisation des nutriments assimilés par la biomasse. Au sein des réacteurs, les acteurs du traitement sont des microalgues et des bactéries interagissant au sein d'un consortium via deux mécanismes biologiques (**Figure 1**) :

- Par photosynthèse grâce à la lumière du soleil, les microalgues convertissent le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et les nutriments présents (azote, phosphore) en biomasse et en dioxygène ( $\text{O}_2$ ) ;
- En parallèle, les bactéries utilisent l'oxygène libéré par les algues pour leur métabolisme conduisant à la dégradation des composés organiques et à l'oxydation de l'azote ammoniacal, tout en produisant les nitrates et le  $\text{CO}_2$  nécessaires aux algues.



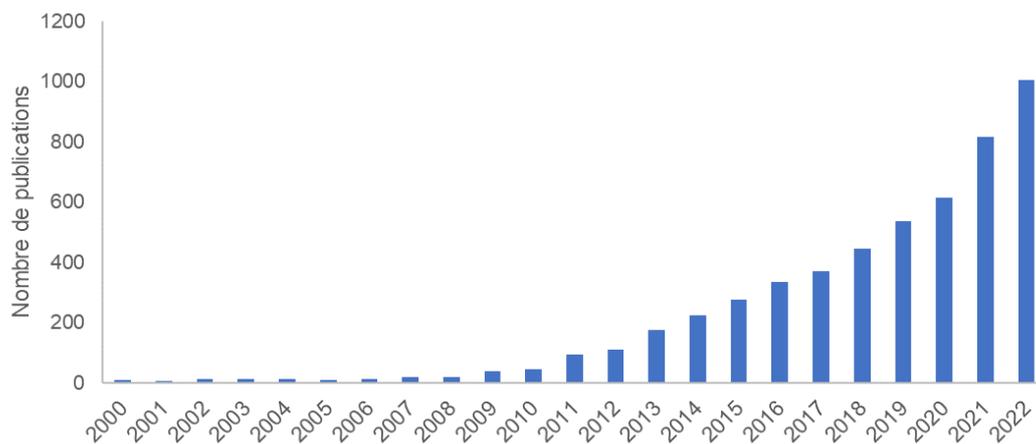
**Figure 1.** Mécanismes biologiques au sein d'un consortium microalgues-bactéries

Le second aspect à mettre en lumière est la possible valorisation des émissions de dioxyde de carbone dans le chenal. Selon le bilan annuel du Global Carbon Project, les émissions mondiales de  $\text{CO}_2$  ont atteint  $36.4 \pm 2$  Gt en 2021 (Friedlingstein et al., 2021). Pour limiter le réchauffement climatique, les émissions doivent être stoppées ou compensées en éliminant une quantité équivalente. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour piéger le  $\text{CO}_2$ , notamment par adsorption ou par absorption sur des composés à base de zéolithe ou d'amine (Mfoumou, 2012; Yamada, 2021). Certains organismes vivants comme les plantes, les arbres, les algues et les microalgues constituent une autre piste, car ils capturent le  $\text{CO}_2$  par photosynthèse. Il y a un double intérêt pour la culture d'algues, car l'apport en dioxyde de carbone représente 60% du coût en nutriments. Cette dépense peut être minimisée en utilisant le  $\text{CO}_2$  rejeté par des centrales électriques ou des industries similaires (Eloka-Eboka and Inambao, 2017). En outre, la culture de microalgues permet une valorisation de la biomasse produite sous différentes formes : fertilisant, récupération de phosphore, synthèse de molécules à haute valeur ajoutée, production de biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération...

Au siècle dernier, les carburants fossiles se sont imposés par leur simplicité d'extraction au détriment des biocarburants. L'épuisement des ressources et le changement climatique entraînent un regain d'intérêt pour les énergies renouvelables, incluant les biocarburants considérés comme une alternative pertinente aux fossiles. Les biocarburants de troisième génération sont fabriqués à partir de biomasse algale. Les microalgues présentent un potentiel à ce niveau, car elles peuvent produire de la biomasse en grandes quantités avec un taux de

croissance rapide. Elles n'occupent pas des espaces normalement exploitées pour les cultures agricoles. La biomasse algale peut être fournie à longueur d'année pour la chaîne de production. Enfin, les algues peuvent être cultivées en eaux usées ou salées, ce qui peut en réduire l'impact sur les réserves d'eau douce (Schenk et al., 2008).

Combiner le traitement des eaux usées et la valorisation d'une biomasse générée par un consortium microalgues-bactéries constitue une piste prometteuse faisant l'objet d'un intérêt croissant de la communauté scientifique ces dernières années (**Figure 2**).



**Figure 2.** Nombre de publications à la suite d'une recherche sur le moteur *Scopus* avec les mots clés « *microalgae wastewater* »

Cependant, l'application à taille réelle de ce procédé fait encore l'objet d'un certain nombre de questionnements. Il n'existe notamment pas de lignes directrices faisant l'objet d'un consensus pour le dimensionnement. Aussi, la valorisation de la biomasse produite dans le contexte des eaux usées peut s'avérer plus complexe que dans le cas de cultures pures de microalgues. Le présent manuscrit de thèse s'intéresse ainsi aux enjeux suivants :

- Quel est le comportement du procédé face à la variabilité des eaux usées ? En sus des performances épuratoires, le potentiel de valorisation énergétique de la biomasse sera étudié à travers le prisme de la productivité de la biomasse et de sa composition biochimique.
- Quelle est la dynamique du consortium algues-bactéries face à la variabilité des conditions opératoires ?
- Quels sont les flux d'azote, de phosphore et d'oxygène en jeu lors du traitement dans différentes conditions ?
- Quel est le degré de pertinence environnementale de ce procédé par rapport aux filières conventionnelles ?

Afin de répondre à ces questionnements, différentes méthodologies ont été mises en place dans ce travail de thèse :

- La validation de méthodes analytiques simples et rapides pour déterminer le contenu biochimique de la biomasse en termes de protéines, glucides et lipides ;
- Le suivi de la dynamique du consortium microalgues-bactéries par une mesure continue de l'oxygène dissous associée à un modèle de respirométrie *in-situ* : la modélisation des données expérimentales acquises permet d'investiguer les diverses communautés

de microorganismes présentes et les mécanismes biologiques et physiques à l'œuvre dans le système, au regard notamment des flux d'oxygène ;

- L'analyse du cycle de vie d'un scénario de traitement des eaux usées avec un chenal à haut rendement algal comparé à des installations conventionnelles comme une filière boues activées (BA) et un système dit basé sur la nature tel que le filtre planté de roseaux (FPR).

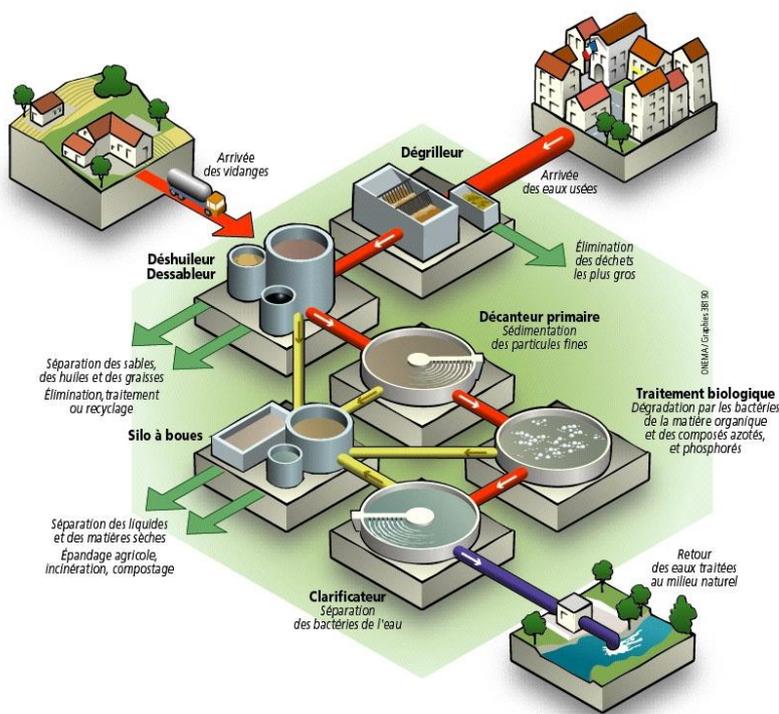
# Partie I : Bibliographie

## I.1. Place du CHRA en traitement des eaux usées

Dans cette partie, la filière conventionnelle d'épuration des eaux usées par boues activées est brièvement décrite. Des rappels sur les types de pollution ainsi que les paramètres usuels pour les mesurer et déterminer l'efficacité du traitement des eaux usées sont présentés. Cela permet d'introduire le chenal à haut rendement algal (CHRA) en tant que procédé biologique et d'en expliquer son fonctionnement.

### I.1.1. La STEU conventionnelle

L'assainissement collectif se déroule en plusieurs étapes : la collecte des eaux usées, le transport jusqu'à la station de traitement des eaux usées (STEU), le traitement et le rejet au milieu naturel (**Figure 3**).



**Figure 3.** Filière de traitement des eaux usées (Observatoire national des services publics d'eau et d'assainissement, 2009)

#### I.1.1.1. Les prétraitements et les traitements physico-chimiques

Si les procédés changent d'une station à une autre, en fonction de l'année de construction, des contraintes imposées par le lieu d'implantation et du milieu de rejet, les grandes lignes du traitement des eaux usées restent les mêmes. Ainsi, l'épuration conventionnelle commence par un prétraitement qui consiste à éliminer les éléments les plus grossiers en amont de la station :

- **Dégrillage** : les grilles retiennent les matières les plus volumineuses des eaux brutes.
- **Dessablage** : les sables et les graviers sont éliminés par décantation et aspirés par pompage.

- Dégraissage : de l'air est injecté pour faire remonter les graisses à la surface, qui sont ensuite raclées et éliminées.

Par la suite, les traitements primaires (physico-chimiques) reposent sur la décantation, parfois associée à la coagulation-floculation :

- Décantation primaire simple : les solides décantent pour former les boues primaires au fond d'un décanteur ou clarificateur. Les boues sont raclées et évacuées vers une trémie où elles sont extraites par pompage. La réduction de charge polluante atteint sur des eaux usées domestiques les ordres de grandeurs suivants (Canler, 2017) : 50 à 60% des MES, 25 à 30% de la DBO<sub>5</sub> et de la DCO, 5 à 10% de l'azote global et du phosphore.
- Décantation primaire améliorée : une élimination plus importante des MES et des colloïdes peut être atteinte via une coagulation-floculation. Après ajout de réactifs, les MES et les colloïdes forment des floccs qui sont plus faciles à éliminer. Cela améliore les abattements, notamment en ce qui concerne la matière organique, permettant potentiellement de mettre en place une redirection du carbone vers un digesteur anaérobie (Sancho et al., 2019).

En fonction du devenir des boues en excès produites (présence ou non d'une étape de digestion anaérobie sur la file boue, nécessité ou non d'une stabilisation des boues) et du type de traitement secondaire, l'étape de traitement primaire n'est pas toujours présente.

### *1.1.1.2. Les traitements biologiques intensifs et extensifs*

Les traitements secondaires (biologiques) sont mis en place pour traiter les composés dissous (la matière organique ou minérale soluble dans l'eau). Les mécanismes biologiques de certains microorganismes sont exploités pour dégrader la matière organique en matière minérale. Il s'agit à la base de phénomènes naturels se déroulant dans les masses d'eau où des microorganismes se développent et dégradent les polluants selon différentes voies métaboliques. Ce principe d'autoépuration a été repris par l'Homme dans le traitement biologique des eaux usées. Ainsi, les procédés mis en œuvre amplifient la transformation et la dégradation de la matière organique, voire des nutriments (N, P), que l'on observe en milieu naturel. On distingue les systèmes extensifs et intensifs.

Les procédés intensifs ont pour caractéristique d'occuper une surface au sol réduite, au prix le plus souvent de consommations d'énergie et/ou de réactifs importantes. Les techniques associées sont principalement :

- Des procédés à culture libre : procédé à boues activées conventionnel et ses variantes.
- Des procédés à culture fixée : les lits bactériens, les disques biologiques, et la biofiltration.

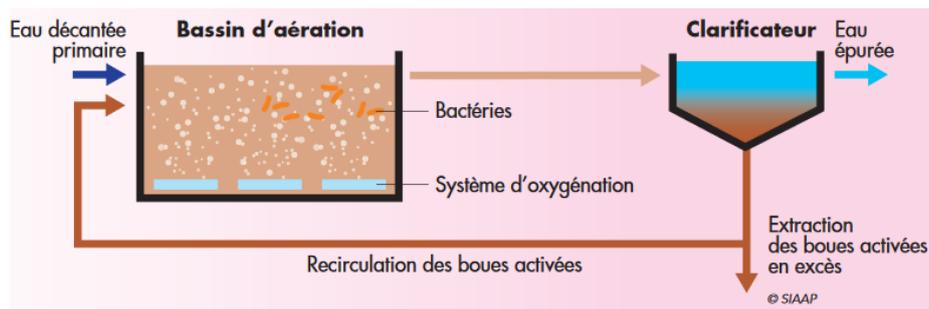
Les procédés extensifs occupent des surfaces plus importantes. Toutefois, le coût d'investissement pour ces technologies est en général moins élevé, et les conditions de fonctionnement plus simples permettent des économies d'énergie. Enfin, ces systèmes nécessitent moins de main d'œuvre que les systèmes intensifs (European Commission et al., 2003). On distingue principalement :

## Partie I : Bibliographie

- Les procédés à culture fixée sur support fin : infiltration-percolation, filtres plantés de roseaux.
- Les procédés à culture libre : lagunage naturel, lagunage à macrophytes, lagunage aéré.

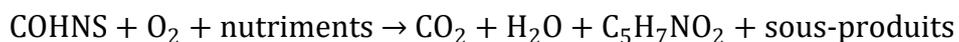
### 1.1.1.2.1. Le procédé à boues activées

Ce procédé intensif consiste à aérer dans un bassin un effluent au sein duquel une flore bactérienne se développe en dégradant les différentes formes de pollution (**Figure 4**). Un consortium de microorganismes, principalement des bactéries, est à l'œuvre. Des prédateurs de bactéries comme les protozoaires, les rotifères, nématodes etc. peuvent aussi croître et participer à la clarification de l'effluent. Les conditions du procédé vont favoriser le développement de certaines populations au détriment d'autres qui vont décliner voire disparaître. Ensuite, les eaux épurées et les boues activées ainsi produites sont séparées dans un clarificateur secondaire, et une partie des boues est renvoyée dans le bassin d'aération. Toutes tailles confondues, 44% des stations d'épuration privilégient le traitement par boues activées en France métropolitaine (Golla and Hocquet, 2011). Un procédé conventionnel dimensionné à très faible charge massique avec mise en place d'une stratégie de dénitrification et de déphosphatation peut atteindre sur des effluents à dominante domestique des abattements de l'ordre de 90-95% (DBO<sub>5</sub>), 80-90% (DCO), 85-95% (MES), 75-90% (NTK), 70% (NGL), PT < 2 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figure 4.** Schéma de fonctionnement d'un procédé par boues activées (Marcel and Pastor, 2012)

La réaction de dégradation de la matière organique par les boues activées peut s'écrire :



### Équation 1

Dans cette équation, COHNS représente la matière organique. C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> représente la biomasse produite (Laurent, 2020).

La communauté bactérienne des boues activées est constituée par :

- Les bactéries autotrophes aérobies (notamment *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*) qui convertissent l'azote ammoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en présence d'oxygène pour se développer et produire des nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) puis des nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (nitrification) ;
- Les bactéries hétérotrophes aérobies qui oxydent la matière organique biodégradable en présence d'oxygène ou en anoxie (présence de nitrates, dénitrification).

Les réactions bactériennes sont détaillées ultérieurement (voir paragraphe I.2.1. Les bactéries).

### I.1.1.2.2. Le lagunage naturel

Il s'agit d'un traitement biologique extensif. Les eaux usées transitent dans une série de bassins peu profonds appelés lagunes où différents mécanismes physiques, biologiques et chimiques interviennent dans la dégradation de la matière organique, des nutriments et des pathogènes. Le système reproduit les conditions des lacs et rivières en mettant en jeu la sédimentation des matières en suspension, la dégradation aérobie au sein du liquide et la dégradation anaérobie dans les sédiments déposés au fond de la lagune (Zouhir, 2008).

En lagunage conventionnel (dit naturel), on observe trois types de bassins successifs : le bassin anaérobie, le bassin facultatif et le bassin de maturation (Figure 5). Ceux-ci présentent des configurations variables (formes et profondeurs), mettant alors en jeu des microorganismes spécifiques.

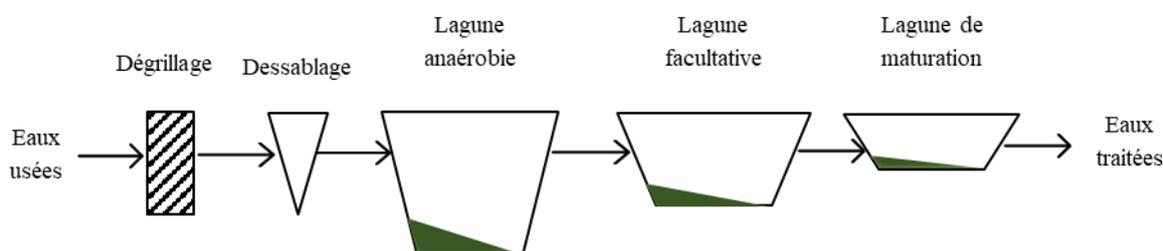


Figure 5. Schéma de principe du lagunage conventionnel (Sperling, 2007)

Le bassin anaérobie est caractérisé par une profondeur de 2 à 5 m et des temps de séjour de quelques jours. En absence d'oxygène, la matière organique est dégradée par hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse pour former du biogaz (méthane et dioxyde de carbone) et un digestat. Ensuite, le bassin facultatif d'une profondeur de 1 à 2 m combine des conditions anaérobies dans la couche inférieure et aérobie dans la partie supérieure (Figure 6). Les microorganismes aérobie et anaérobies abattent le restant de la matière organique.

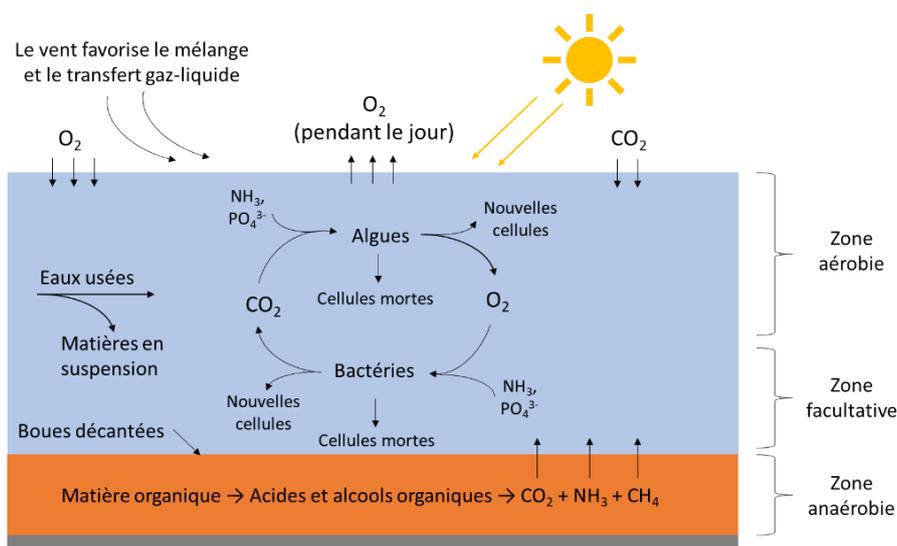


Figure 6. Schéma du fonctionnement d'une lagune facultative (adapté de (Tchobanoglous and Schroeder, 1985))

## Partie I : Bibliographie

En fin de filière, le bassin de maturation est conçu pour éliminer les pathogènes (bactéries, virus, kystes de protozoaires et œufs d'helminthes). Sa faible profondeur permet à la lumière du soleil et au rayonnement UV d'y pénétrer, favorisant dans le même temps la photosynthèse.

Au sein des lagunes facultative et de maturation, les microalgues produisent de l'oxygène et consomment le dioxyde de carbone libéré par les bactéries. Dépendante de la lumière du soleil avec la photosynthèse, la concentration en oxygène dissous est élevée la journée et faible la nuit. Les principaux mécanismes en jeu dans l'élimination des pathogènes sont une forte pénétration des UV, un pH et une concentration en oxygène dissous élevés (Sperling, 2007).

En sortie de procédé, 80-85% de la Demande Biochimique en Oxygène (DBO) et 70-83% de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) sont traitées (Sperling, 2007). Un rapport de l'ONEMA (Office national de l'eau et des milieux aquatiques) faisant un état des lieux du lagunage (Durot and Molle, 2015) rend compte de la qualité moyenne du rejet des lagunes naturelles (200-2000 EH) (EH signifie « équivalent habitant » et exprime la capacité d'une STEU soit  $60 \text{ g DBO}_5 \cdot \text{j}^{-1}$ ) en France (**Tableau 1**).

	MES		DCO		Azote Kjeldahl		Ptot	
	E	S	E	S	E	S	E	S
<b>Nombre de données</b>	222	225	222	224	211	215	206	207
<b>Moyenne (<math>\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}</math>)</b>	457.4	67.9	874.4	145	98.9	26.8	12.2	5.6
<b>Ecart-type (<math>\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}</math>)</b>	776.5	65.1	837.7	102.7	49.3	17.7	12.4	3.7
<b>Abattement moyen (%)</b>	85.2		83.5		73		54.1	

**Tableau 1.** Qualité moyenne du rejet des lagunages naturels français pour une capacité entre 200-2000 EH (E=entrée et S=sortie) (Autostep et Mesurestep données 2013) (Durot and Molle, 2015)

L'étude de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse (*Les procédés d'épuration des petites collectivités du bassin Rhin-Meuse - Élément de comparaison techniques et économiques*, 2007) présente des valeurs similaires et donne aussi une valeur pour l'azote global NGL (70% d'abattement). Les abattements relativement importants de l'azote global et du phosphore peuvent être expliqués par l'assimilation de ces nutriments, par la biomasse microalgale en particulier (**Figure 6**).

En Europe, le lagunage est généralement mis en place pour les petites agglomérations jusqu'à 2000 EH (Gruchlik et al., 2018), mais on le retrouve également pour des capacités plus importantes dans les pays en voie de développement, de par sa simplicité de construction et son faible coût (Ho et al., 2017).

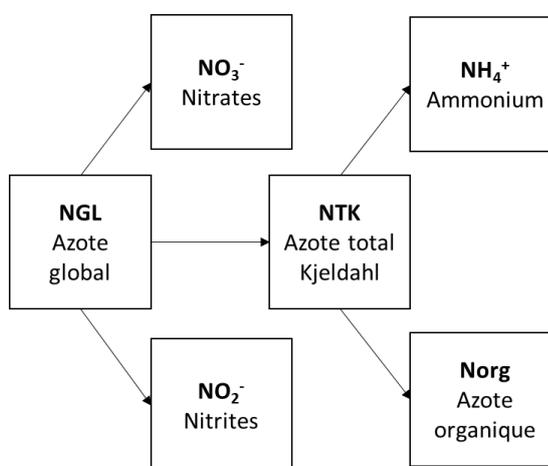
### 1.1.1.3. Les traitements tertiaires

Si les eaux usées sont rejetées dans une zone sensible ou si elles alimentent une zone de baignade, irriguent des terrains agricoles ou répondent à des besoins urbains (arrosage, fontaines publiques), des traitements complémentaires sont susceptibles d'être mis en place pour cibler notamment le phosphore résiduel, les micropolluants organiques ou minéraux, les pathogènes (Marcel and Pastor, 2012).

### I.1.2. Les pollutions carbonée, azotée et phosphorée

Face à la diversité des polluants et de leurs formes, des paramètres globaux ont été définis pour quantifier la pollution et évaluer les abattements des STEU. On parle de macro-polluants pour qualifier les trois groupes de pollution principalement présents dans les eaux et traités au sein des ouvrages : la pollution carbonée, azotée et phosphorée. Ceux-ci n'exercent pas le même impact sur l'environnement et nécessitent des traitements adaptés.

- La pollution carbonée fait référence à la matière organique. Elle est mesurée par deux paramètres : la Demande Biochimique en Oxygène à cinq jours ( $DBO_5$ ) et la Demande Chimique en Oxygène (DCO).
- La pollution azotée est divisée en azote réduit et azote oxydé (**Figure 7**).



**Figure 7.** Les formes de l'azote

L'azote réduit correspond à l'azote ammoniacal  $NH_4^+$ , majoritaire dans les eaux usées avec l'azote organique (inclus dans les protéines et surtout l'urée) (**Tableau 2**). Les formes oxydées de l'azote, les nitrites  $NO_2^-$  et les nitrates  $NO_3^-$ , sont peu présentes dans les eaux usées non traitées. Elles sont produites au cours des traitements dans la filière d'épuration.

N organique particulaire réfractaire	N organique soluble réfractaire	N organique soluble ammonifiable	N organique particulaire ammonifiable	N ammoniacal
2-3%	2%	5-15%	10-35%	50-75%

**Tableau 2.** Ordre de grandeur des fractions de l'azote en entrée de station exprimées par rapport à NTK (Deronzier et al., 2001)

- La pollution phosphorée s'analyse sous deux formes : le phosphore total, qui est la somme du phosphore particulaire et dissous, et les orthophosphates  $PO_4^{3-}$ , qui forment une grande partie du phosphore dissous.

Il est à noter que ces 3 formes de pollution peuvent être sous formes dissoute ou particulaire (voire colloïdale), d'où l'importance de qualifier les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVS) des eaux usées.

La composition reflète l'utilisation de l'eau en entrée : industrielle, domestique et agricole. Par convention et pour faciliter la définition de la capacité des ouvrages, les volumes et les flux de pollutions journaliers des effluents sont estimés en équivalents-habitants (EH), correspondant aux valeurs moyennes rejetées par habitant dans les eaux usées domestiques. Le **Tableau 3** donne les fourchettes de valeurs communément admises en France (Degrémont, 2004).

<b>DBO<sub>5</sub> (g.EH<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</b>	60
<b>DCO (g.EH<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</b>	120-150
<b>MES (g.EH<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</b>	20-90
<b>NTK (g.EH<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</b>	12-15
<b>PT (g.EH<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</b>	2.5-3

**Tableau 3.** Pollution par EH en France (Degrémont, 2004)

Le risque de rejeter un effluent sans avoir correctement éliminé l'azote et le phosphore est l'eutrophisation du milieu. Les deux éléments sont indispensables à la croissance des végétaux, mais une charge excessive en nutriments déclenche la prolifération incontrôlée d'algues nuisibles, de faibles valeurs d'oxygène dissous dans le milieu, le déclin des poissons, des changements indésirables de pH, et la production de cyanotoxine (Christenson and Sims, 2011). Les côtes bretonnes sont un exemple du problème écologique et sanitaire posé par les efflorescences algales (**Figure 8**). Comme on l'a vu précédemment, le traitement des effluents par lagunage naturel reproduit entre autres ce phénomène au sein d'ouvrages spécialement dédiés, afin de limiter son occurrence une fois les effluents rejetés au milieu naturel.



**Figure 8.** Prolifération d'algues vertes sur une plage de Saint-Brieuc (Pavard, 2019)

Pour limiter les impacts sur le milieu, des concentrations maximales en polluants ou des abattements minimum ont été fixés par le législateur ("Arrêté du 21 juillet 2015," 2015) (**Tableau 4** et **Tableau 5**).

Paramètre	Charge brute reçue par la station en $\text{kg.j}^{-1}$ de $\text{DBO}_5$	Concentration maximale à respecter, moyenne journalière	Rendement minimum à atteindre, moyenne journalière	Concentration rédhibitoire, moyenne journalière
DCO	< 120	$200 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$	60%	$400 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$
DCO	> 120	$125 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$	75%	$250 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$

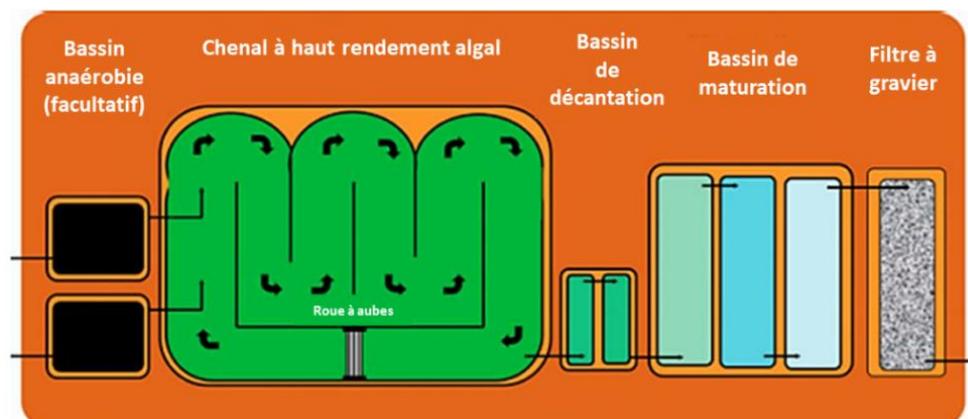
**Tableau 4.** Performances minimales de traitement attendues pour la DCO

Paramètre	Charge brute reçue par la station en $\text{kg.j}^{-1}$ de $\text{DBO}_5$	Concentration maximale à respecter, moyenne annuelle	Rendement minimum à atteindre, moyenne annuelle
NGL	> 600 et < 6000	$15 \text{ mg.L}^{-1}$	70%
NGL	> 6000	$10 \text{ mg.L}^{-1}$	70%
Ptot	> 600 et < 6000	$2 \text{ mg.L}^{-1}$	80%
Ptot	> 6000	$1 \text{ mg.L}^{-1}$	80%

**Tableau 5.** Performances minimales de traitement attendues pour les paramètres azote et phosphore, dans le cas des stations rejetant en zone sensible à l'eutrophisation

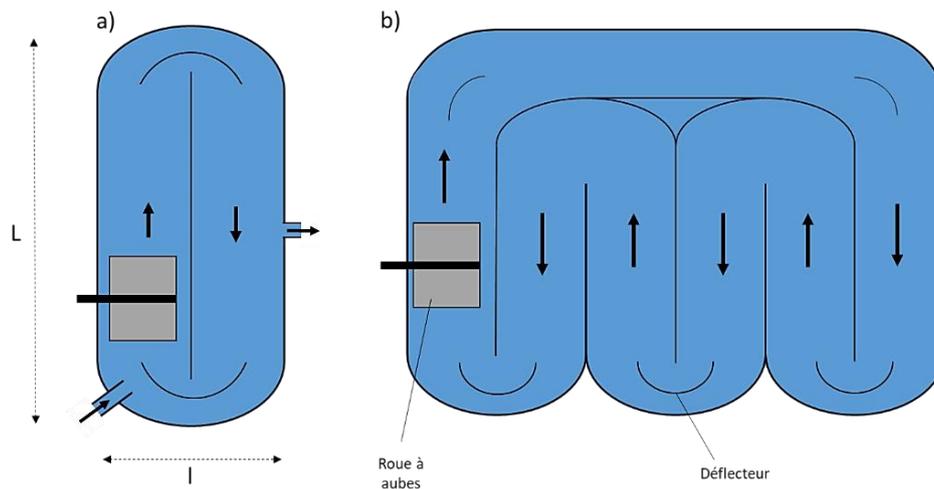
### I.1.3. Le chenal à haut rendement algal (CHRA)

En se basant sur les principes d'une lagune naturelle, une technique de lagunage avancée (Advanced Integrated Wastewater Pond Systems (AIWPS)) a été mise au point en Californie par le professeur William J. Oswald et ses collègues à partir des années 1950 (Oswald and Golueke, 1960). Le système est composé de quatre bassins en série : le bassin anaérobie, le bassin à haut rendement algal, le bassin de décantation des algues et le bassin de maturation (Figure 9). Après les premières implantations aux Etats-Unis, des systèmes ont été développés par exemple en Israël (Shelef and Azov, 1987), en France (Picot et al., 1992), au Maroc (Shelef and Azov, 1987), au Royaume-Uni (Fallowfield and Garrett, 1985), en Espagne (García et al., 2008) ou encore en Australie (Young et al., 2016).



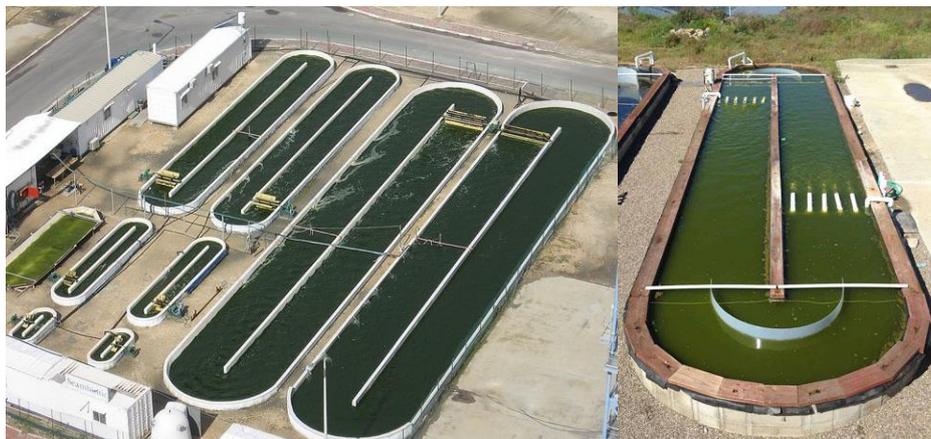
**Figure 9.** Schéma d'un AIWPS avec un bassin anaérobie couvert, un bassin à haut rendement algal, un bassin de décantation et un lit de granulat filtrant (R Craggs et al., 2014)

Dans l'AIWPS, le Chenal à Haut Rendement Algal (CHRA) a remplacé le bassin facultatif du lagunage classique. L'ouvrage est de forme oblongue et peut être constitué d'une boucle simple ou de boucles en série (Local Government Association of South Australia, 2020) d'une profondeur de 0.2 à 1 m et équipé d'une cloison centrale (Figure 10 et Figure 11). Un consortium de microalgues et de bactéries y est cultivé (voir paragraphe I.2. Le consortium microalgues-bactéries).



**Figure 10.** Schéma d'un chenal à boucle simple (a) et à boucles en série (b)

Même si plusieurs dispositifs de mélange – mélangeur à jet, pompe, airlift, table de mélange, écoulement gravitaire - sont possibles, la roue à aubes est généralement privilégiée (Benemann, 2013), car elle est mécaniquement simple et peut être installée à faible coût (Musgrove, 2017). Les eaux sont entraînées à une vitesse de circulation horizontale de  $0.15$  à  $0.3 \text{ m.s}^{-1}$  (R Craggs et al., 2014). Elle est supposée générer un mélange vertical qui permet une exposition fréquente des microalgues à la lumière et empêche la sédimentation de la biomasse. De plus, les cellules subissent moins de dommage qu'avec d'autres systèmes car les contraintes de cisaillement appliquées au fluide sont relativement faibles (Musgrove, 2017).



**Figure 11.** Chenaux à haut rendement algal en Israël (Kloosterman, 2011) et en Californie (Fields et al., 2021)

Il est possible d'injecter du dioxyde de carbone par barboteur de bulles, microbulleur (Caia et al., 2018), colonnes de carbonatation et puisards (Park and Craggs, 2011). Pour empêcher la formation de tourbillons et la sédimentation de la biomasse, des déflecteurs d'écoulement (en général, 1 ou 2 selon la largeur de l'ouvrage) peuvent être placés aux extrémités du chenal (Hadiyanto et al., 2013). Les zones mortes formées en bout de cloison centrale peuvent être réduites grâce aux déflecteurs (Ortiz et al., 2022; Sawant et al., 2019).

La conception d'un chenal se fait selon la profondeur, la largeur, la longueur, le volume et la surface (Yadala and Cremaschi, 2016), mais elle n'est encadrée par aucune directive officielle. Des recommandations sont émises par diverses études sur le ratio optimal longueur-largeur (L/l) (Pandey and Premalatha, 2017; Sawant et al., 2019). Ainsi, un rapport L/l supérieur ou égal à 10 est recommandé. Si la valeur est trop basse, les perturbations d'écoulement causées par les virages sont susceptibles d'affecter l'écoulement dans les sections droites du chenal. Le rapport surface-volume conseillé est de 1/hauteur ou 3.3-4 m<sup>-1</sup> pour les profondeurs habituelles (Posten and Walter, 2013).

### **I.1.4. Comparaison du CHRA avec d'autres systèmes de traitement**

Le CHRA peut être envisagé comme alternative au lagunage naturel et au procédé à boues activées. Ainsi, quelques études ont effectué une analyse multicritères des procédés de traitement en considérant : la surface occupée, les coûts de construction et de fonctionnement, les performances épuratoires.

Un CHRA nécessite environ 50 fois plus de surface que des boues activées, sans considérer la surface utilisée pour le traitement des boues en excès. La construction et l'exploitation coûtent respectivement deux fois et cinq fois moins que pour les boues activées (Craggs et al., 2011). Pour traiter un effluent de brasserie post-méthaniseur, le CHRA a consommé 66% moins d'énergie que les boues activées et le CHRA a généré 4 fois plus de biomasse, qui a assimilé 50% de l'azote contre 8.8% pour les boues activées. Les systèmes à boues activées produisent en général moins de biomasse et sont plus adaptés aux localités urbaines où l'espace est limité et où les terrains sont coûteux (Taylor et al., 2021).

Les performances des CHRA et des lagunes classiques ont été comparées dans plusieurs travaux (Buchanan, 2014; Buchanan et al., 2018; El Hamouri et al., 2003; Picot et al., 1992; Toumi et al., 2000). Les CHRA fournissent des abattements égaux ou supérieurs pour les polluants classiques et des abattements inférieurs pour les orthophosphates (Buchanan, 2014). D'après (Toumi et al., 2000), le CHRA est 1.3, 10 et 2 fois plus efficace pour éliminer respectivement le zinc, le cuivre et le plomb.

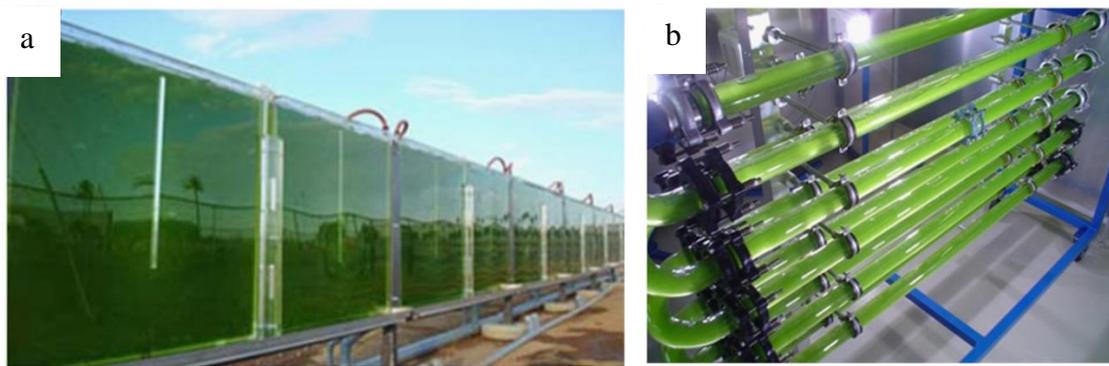
Comparé au lagunage naturel, le Temps de Séjour Hydraulique (TSH) dans le CHRA est réduit d'au moins 80% (Young et al., 2017). Ainsi, le système occupe moins d'espace avec une baisse estimée de 40% (El Hamouri et al., 2003) à 60% (Buchanan, 2014). (Picot et al., 1992) ont comparé 2 CHRA avec une installation comprenant les trois bassins successifs de lagunage conventionnel. Ils ont conclu que les performances épuratoires des deux systèmes sont similaires, mais que le chenal requiert cinq fois moins de surface occupée. Ainsi, les coûts de

## Partie I : Bibliographie

construction sont réduits de 25-50% par rapport à une lagune classique selon une estimation de (Buchanan, 2014).

L'avantage d'un lagunage naturel comparé à un CHRA est qu'il n'y a pas besoin de système d'agitation et de source de courant électrique. L'infrastructure peut être construite dans des zones reculées sans électricité et nécessite moins les passages fréquents d'un opérateur pour s'assurer du bon fonctionnement (Buchanan, 2014). L'installation de panneaux solaires pour faire fonctionner la roue à aubes est une possibilité.

Alternativement, les microalgues peuvent être cultivées au sein de photobioréacteurs. Classés en fonction de leur géométrie, les plus communs sont les photobioréacteurs plats, les photobioréacteurs tubulaires et les photobioréacteurs colonnes (**Figure 12**) (Bitog et al., 2011).



**Figure 12.** Photobioréacteur plat (a) et tubulaire (b) (Bitog et al., 2011)

La combinaison d'un photobioréacteur optimisé pour la culture algale et le traitement des eaux usées a déjà été considérée. Un CHRA et un photobioréacteur tubulaire ont été comparés en termes de production de biomasse et de performances épuratoires (Zouhayr Arbib et al., 2013). Le photobioréacteur a obtenu les meilleurs abattements pour tous les paramètres de pollution et a produit plus de biomasse. Le CHRA a produit  $8.3 \pm 1.4 \text{ gMES.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  contre  $21.8 \pm 0.3 \text{ gMES.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour le photobioréacteur. Ensuite, le CHRA a éliminé en moyenne  $65.1 \pm 2.9\%$  de l'azote total et  $58.8 \pm 1.2\%$  du phosphore total contre  $89.7 \pm 3.1$  et  $86.7 \pm 0.6$  pour le photobioréacteur. Toutefois, l'encrassement du photobioréacteur a entraîné l'arrêt du pilote, ce qui n'a pas été le cas du chenal.

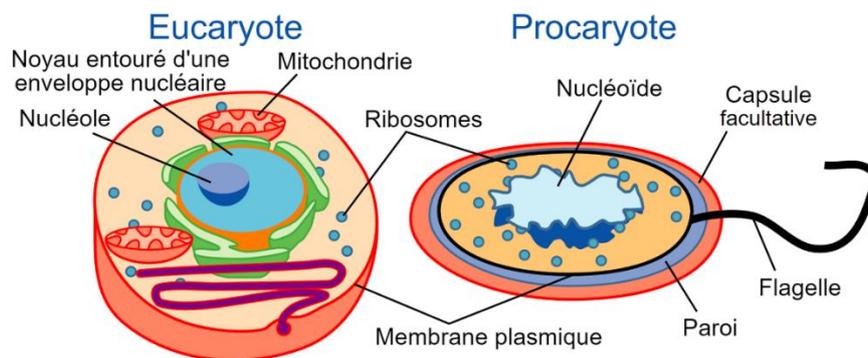
### I.1.5. Conclusion

**Malgré une emprise foncière supérieure aux procédés conventionnels de type boues activées, les chenaux à haut rendement algal présentent un potentiel intéressant pour le traitement des eaux usées avec des performances de traitement satisfaisantes, une consommation énergétique très réduite ainsi qu'une facilité de construction et d'exploitation.**

## I.2. Le consortium microalgues-bactéries

Précédemment, le chenal et son fonctionnement ont été expliqués à l'échelle du procédé. Dans cette partie, les mécanismes biologiques à l'œuvre sont détaillés en se focalisant sur les microorganismes présents et leurs interactions.

La cellule représente le premier niveau d'organisation dans les tissus vivants. On distingue les organismes unicellulaires (composés d'une unique cellule) et pluricellulaires (constitués de deux ou plusieurs cellules), ces derniers étant plus complexes. La structure d'une cellule comprend la membrane, le cytoplasme et le noyau. On peut différencier les procaryotes qui ont un noyau rudimentaire et les eucaryotes qui possèdent un noyau bordé d'une membrane (**Figure 13**).



**Figure 13.** Schéma d'une cellule eucaryote et procaryote (National Center for Biotechnology Information, 2005)

Ces classifications permettent notamment de différencier les microalgues et les bactéries qui sont abordées dans les parties suivantes. Ainsi, les microalgues peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, et les bactéries sont toujours unicellulaires. Dans certains cas, des espèces se regroupent de manière provisoire ou permanente pour former des colonies. Les microalgues (microalgues vertes, rouges et brunes) sont eucaryotes alors que les bactéries sont procaryotes.

### I.2.1. Les bactéries

#### I.2.1.1. Les métabolismes bactériens

Le métabolisme désigne l'ensemble des réactions biochimiques qui ont lieu dans la cellule (Jurtschuk, 1996). Le métabolisme comprend l'anabolisme (synthèse des molécules) et le catabolisme (dégradation des molécules).

Pour leur développement, les bactéries ont besoin de substrat (carbone), d'une source d'énergie, d'eau et de conditions favorables de température, de pH et d'O<sub>2</sub>. Selon les sources de substrat et d'énergie utilisées, on distingue différents métabolismes (**Tableau 6**). Lorsque l'énergie nécessaire est issue de la lumière comme lors de la photosynthèse, on parle de phototrophie. Quand l'organisme dégrade des composés chimiques pour produire de l'énergie, il est question de chimiotrophie.

En parallèle, en fonction de la source de carbone utilisée, on distingue :

## Partie I : Bibliographie

- Les espèces hétérotrophes, qui utilisent des substances organiques plus ou moins complexes comme source de carbone ;
- Les autotrophes, qui trouvent leur source de carbone dans le carbone minéral ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) ;
- Les mixotrophes, qui sont capables de basculer entre une source de carbone minéral et organique.

Source d'énergie		Source de carbone	
Lumière	Chimique	Inorganique	Organique
Phototrophie	Chimiotrophie	Autotrophie	Hétérotrophie

**Tableau 6.** Métabolismes des bactéries

Toutes les bactéries n'ont pas besoin d'oxygène, qui peut même être nocif pour certaines. On discerne alors plusieurs types respiratoires :

- Bactéries aérobies strictes, dépendantes de l' $\text{O}_2$  pour se développer. Dans cette catégorie, on trouve également des bactéries aérobies strictes anaérobies facultatives pouvant utiliser l'oxygène sous forme d' $\text{O}_2$  ou sous forme de nitrates  $\text{NO}_3^-$  ;
- Bactéries aéro-anaérobies, capables de se développer avec ou sans  $\text{O}_2$  ;
- Bactéries anaérobies aéro-tolérantes, réalisant la fermentation anaérobie même en présence d'oxygène ;
- Bactéries anaérobies strictes, tuées par l'oxygène.

### *1.2.1.2. Le traitement aérobie des eaux usées par les bactéries*

Les différents types de bactéries impliquées au sein des procédés conventionnels aérobies des eaux usées sont présentés ci-dessous, en fonction du type de pollution (carbonée, azotée et phosphorée).

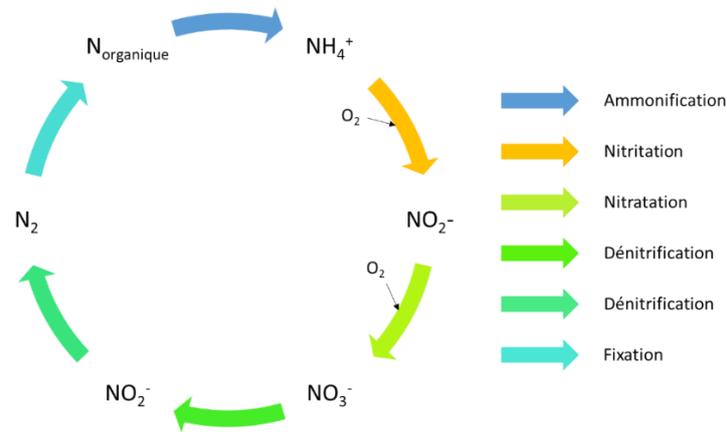
#### *1.2.1.2.1. Pollution carbonée*

Les bactéries hétérotrophes dégradent la pollution carbonée. Elles sont favorisées par des composés carbonés biodégradables (sucres, graisses, protéines) et la présence d'un accepteur terminal d'électrons : l'oxygène fourni par aération en milieu aérobie ou les nitrates en conditions anoxiques. La matière organique est convertie en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et en nouvelles bactéries (les boues en excès) (voir aussi paragraphe I.1.2. Les pollutions carbonée, azotée et phosphorée).

#### *1.2.1.2.2. Pollution azotée*

Les mécanismes de transformations de l'azote sont nombreux et impliquent différents microorganismes (**Figure 14**). L'azote organique  $\text{N}_{\text{org}}$  est notamment présent dans l'urée et se retrouve dans les déjections humaines. Lors de l'ammonification, les bactéries « ammonifiantes » transforment ces composés en azote ammoniacal  $\text{NH}_4^+$ , généralement suite à des réactions d'hydrolyse enzymatique. S'il n'est pas assimilé, l'azote ammoniacal est oxydé en deux étapes : en nitrites  $\text{NO}_2^-$  puis nitrates  $\text{NO}_3^-$  lors de la nitrification. Par dénitrification, en absence d'oxygène, les nitrates sont réduits en nitrite, puis en azote gazeux  $\text{N}_2$ . Les réactions

entrant en jeu dans les filières classiques d'assainissement sont ainsi principalement la nitrification et la dénitrification.

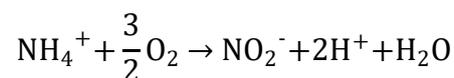


**Figure 14.** Les réactions de conversion de l'azote

### La nitrification

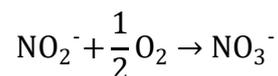
La nitrification se réalise en présence d'oxygène et est constituée de 2 étapes : la nitritation (l'oxydation de l'ammonium en nitrites) et la nitratation (l'oxydation des nitrites en nitrates). Les bactéries qui participent à la nitrification sont autotrophes aérobies : elles utilisent le carbone minéral (dioxyde de carbone) comme source de carbone et ont l'oxydation de l'azote ammoniacal ou des nitrites pour seule source d'énergie (Kim et al., 2019). En effectuant un bilan global, la nitrification de 1 kg d'azote ammoniacal nécessite environ 4.2 kg d'oxygène dont 80% seront inclus au sein des nitrates formés. Elle s'accompagne d'une diminution de l'alcalinité (liée à la fois à la génération de protons lors des réactions et la consommation du carbone minéral) et produit 170 g de bactéries nitrifiantes (Canler, 2017).

Lors de la nitritation, l'ammonium  $\text{NH}_4^+$  est oxydé en nitrite  $\text{NO}_2^-$  selon l'équation suivante (Rittmann and McCarty, 2001) :



#### Équation 2

Lors de la nitratation, les nitrites  $\text{NO}_2^-$  sont oxydés en nitrates  $\text{NO}_3^-$  selon l'équation suivante (Rittmann and McCarty, 2001) :



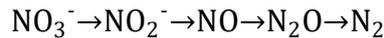
#### Équation 3

La nitritation est réalisée par des bactéries nitritantes du type *Nitrosomonas*. Les bactéries nitratantes du type *Nitrobacter* sont principalement responsables de la nitratation. Si ces deux genres sont principalement cités pour la nitrification, le processus peut être réalisé par une grande variété de bactéries (Pambrun, 2005). La nitrification est sensible au pH avec une

gamme optimale entre 7.2 et 8 et diminue significativement pour un pH inférieur à 6.8. La réaction consomme de l'alcalinité (Degrémont, 2004).

### La dénitrification

Les bactéries impliquées sont des hétérotrophes aérobies strictes anaérobies facultatives. Elles ont donc besoin de carbone organique. Ainsi, la dénitrification correspond à l'oxydation de la matière organique par les nitrates, qui seront donc réduits en N<sub>2</sub>. Les bactéries de type *Halobacterium*, *Methanomonas* et *Pseudomonas* sont capables de réaliser la dénitrification qui se déroule en plusieurs étapes :



#### Équation 4

Comme de l'alcalinité est générée lors de la dénitrification, le pH aura tendance à augmenter. La fourchette de pH optimale se situe entre 7 et 8.2 (Degrémont, 2004).

#### 1.2.1.2.3. Pollution phosphorée

Les microorganismes qui dégradent la pollution carbonée et azotée assimilent du phosphore au sein de leur structure cellulaire (membrane, ATP et ARN). Ainsi, le phosphore représente usuellement 1 à 2% de la matière volatile en suspension (MVS) de la biomasse générée (Comeau et al., 1986). La part de phosphore des eaux usées domestiques éliminée par cette voie représente un abattement d'environ 25% (Deronzier and Choubert, 2004).

Les bactéries déphosphatantes, dites accumulatrices de phosphore, classées dans le genre *Acinetobacter*, sont des bactéries hétérotrophes aérobies strictes. Elles peuvent assimiler de grandes quantités d'orthophosphates quand elles sont remises en contact avec l'oxygène après une carence. Pour promouvoir une déphosphatation biologique, il s'agit dès lors de mettre en place sur la filière une alternance de phases aérobie et anaérobie, le plus souvent séparées en utilisant deux bassins différents. Cela entraîne pour ces bactéries un stress (phase anaérobie) qui conduit à une surassimilation de phosphore (aérobie) et une diminution de la concentration en phosphates dans l'eau. Le phosphore accumulé dans les cellules bactériennes peut enfin être extrait du système via la biomasse des boues en excès (Marcel and Pastor, 2012). Une boue activée déphosphatante peut atteindre une teneur en phosphore organique de 8 à 10% sur la base de la MVS de la biomasse (Deronzier and Choubert, 2004). Une épuration biologique du phosphore permet de traiter 3.5 à 4.5 mg de P pour 100 mg de DBO<sub>5</sub> consommés en fonction des caractéristiques des eaux à traiter. Cette limite à 3.5% de la DBO<sub>5</sub> assure par voie biologique 50 à 60% d'élimination du phosphore. Ainsi, cette voie peut être combinée à une précipitation par ajout de réactifs pour augmenter les performances (Vachon et al., 1992).

### 1.2.2. Les microalgues

#### 1.2.2.1. Généralités

Les algues sont les organismes les plus communs dans les environnements aquatiques, formant un groupe très large et divers (Kim and Chojnacka, 2015). Les macroalgues désignent des algues assez grosses pour être vues à l'œil nu. Certaines peuvent atteindre 50 mètres. Elles sont

classées en trois groupes principaux : les algues brunes (*Phaeophyceae*), les algues vertes (*Chlorophyta*) et les algues rouges (*Rhodophyta*).

Les microalgues sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires microscopiques dont la taille varie d'un micromètre à quelques centaines de micromètres. Elles vivent individuellement ou en colonies plus ou moins structurées. On estime qu'il existe 72 500 espèces de microalgues, « les noms de 44 000 d'entre elles ont probablement été publiés et 33 248 noms ont été traités par AlgaeBase (juin 2012) » (Guiry, 2012). AlgaeBase est une base de données globale sur les algues fournissant des informations taxonomiques, nomenclaturales et distributionnelles (Guiry and Guiry, 2023). En fonction de leurs pigments, de leur cycle de vie et de leur structure, quatre catégories principales (en termes d'abondance) émergent : les diatomées (bacillariophycées), les algues vertes (chlorophycées), les algues bleues (cyanophycées ou cyanobactéries) et les algues dorées (chrysophycées) (Sheehan et al., 1998). Les microalgues sont composées d'environ 50% de carbone, 7-10% d'azote et 1% de phosphore en matière sèche (Richmond and Hu, 2013).



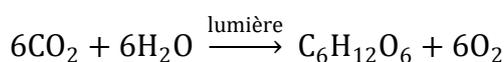
**Figure 15.** Microalgues unicellulaires (Savitsky, 2019) Ligne 1: *Caloneis amphisbaena*; *Coelastrum* sp.; *Cymatopleura* sp.; *Chlorella* sp.; Ligne 2: *Cosmarium formosulum*; *Pediastrum duplex*; *Gyrosigma*; *Scenedesmus dimorphus*. Ligne 3: *Cymbella* sp.; *Scenedesmus* sp.; *Characium* sp.; *Surirella* sp. Ligne 4: *Diatoma vulgare*; *Pediastrum boryanum*; *Trebouxia* sp.; *Nitzschia sigmoides*

D'une grande diversité de taille, de forme, de texture et de couleurs (**Figure 15**), les caractéristiques des microalgues sont couramment employées pour les identifier (Coltelli et al., 2013). Pour s'adapter à leur environnement, certaines espèces modifient leur morphologie comme *Scenedesmus* : le phénomène est appelé polymorphisme (Giraldo-Zuluaga et al., 2018). Sans écarter le polymorphisme, l'observation au microscope permet une première identification.

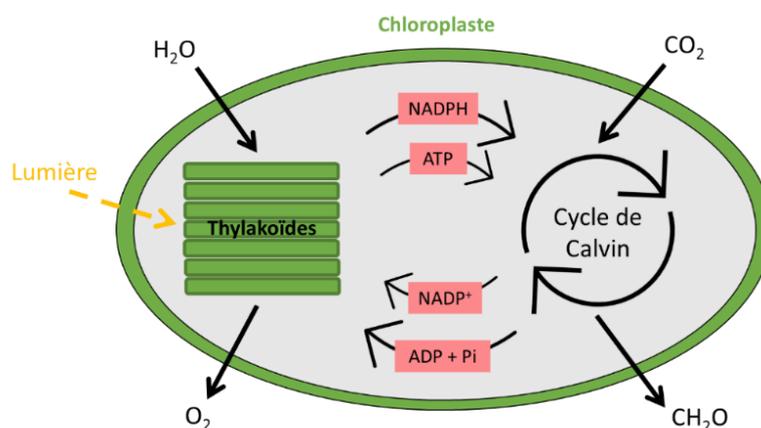
1.2.2.2. Métabolisme : photosynthèse et assimilation

Parmi les métabolismes décrits précédemment (paragraphe 1.2.1.1. Les métabolismes bactériens), les microalgues sont classifiées comme photoautotrophes : la source d'énergie est la lumière, celle de carbone le carbone minéral.

La photosynthèse comprend deux phases, la phase claire et la phase sombre (**Figure 16**). En phase claire, l'énergie de la lumière captée par la chlorophylle est convertie en énergie chimique, donnant l'ATP (adénosine-triphosphate), riche en énergie et le NADPH<sub>2</sub> (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), un réducteur biochimique. Durant la phase sombre ou cycle de Calvin qui se déroule dans le stroma du chloroplaste, le CO<sub>2</sub> est réduit en utilisant l'ATP et le NADPH<sub>2</sub> pour synthétiser des glucides (Masojídek et al., 2013). Le processus est résumé selon l'équation-bilan ci-dessous :

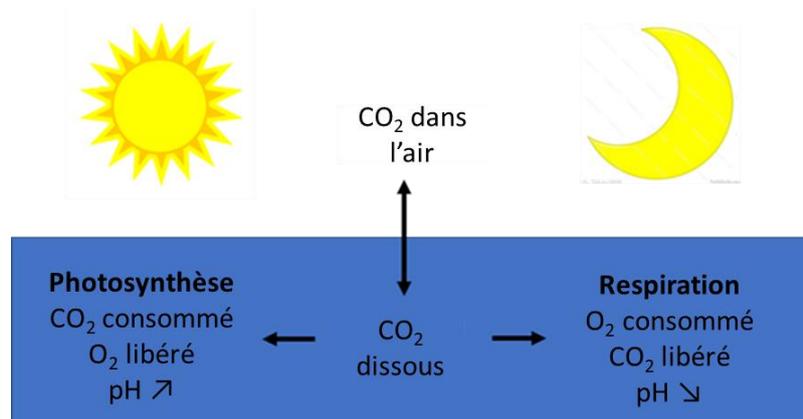


**Équation 5**



**Figure 16.** Schéma de la phase claire et de la phase sombre dans le chloroplaste

La photosynthèse et la respiration constituent des mécanismes complémentaires (**Figure 17**). Sous la lumière du soleil, les microalgues effectuent la photosynthèse, consommant du CO<sub>2</sub> dissous et libérant de l'O<sub>2</sub>. L'élimination du CO<sub>2</sub> et de ses formes dissoutes entraîne une augmentation du pH pendant la journée. La respiration a lieu la nuit. Les microalgues captent alors l'oxygène dissous et libèrent du CO<sub>2</sub>, entraînant une diminution du pH.



**Figure 17.** Schéma des mécanismes de photosynthèse et de respiration

Chez les microalgues, l'azote organique, dérivé des formes minérales (nitrite, nitrate, ammonium) ou organiques, se trouve dans les peptides, les protéines, l'ADN... La conversion de l'azote inorganique en azote organique se fait par assimilation en deux étapes : initialement, l'ion nitrate  $\text{NO}_3^-$  est transporté dans la cellule où l'enzyme nitrate réductase réduit le nitrate en nitrite. Puis, le nitrite est transporté dans le chloroplaste pour être réduit en ammonium par l'enzyme nitrite réductase. L'ammonium est ensuite incorporé sous forme organique comme glutamate (Sanz-Luque et al., 2015).

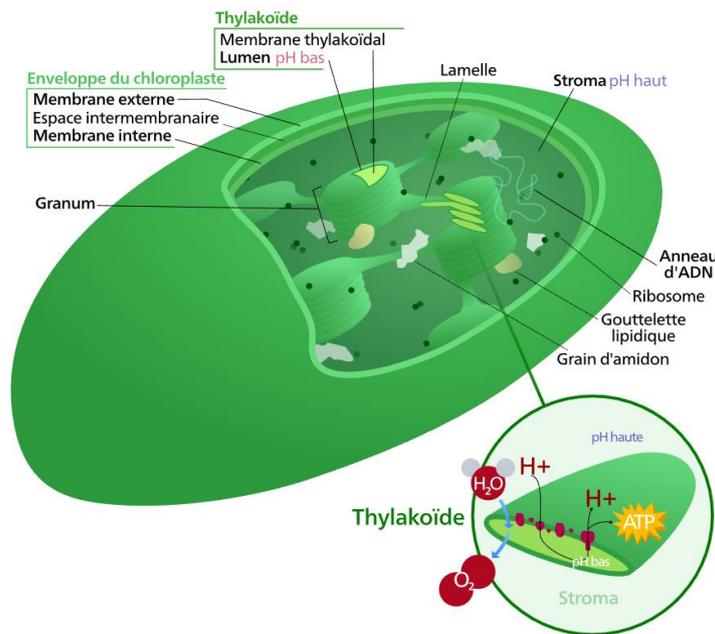
### 1.2.2.3. La structure des chloroplastes

Le siège de la photosynthèse se situe dans les membranes des thylakoïdes qui se trouvent dans les chloroplastes chez les cellules eucaryotes. Les cyanobactéries, étant procaryotes, n'ont pas de chloroplastes. La cyanobactérie elle-même se comporte comme un thylakoïde.

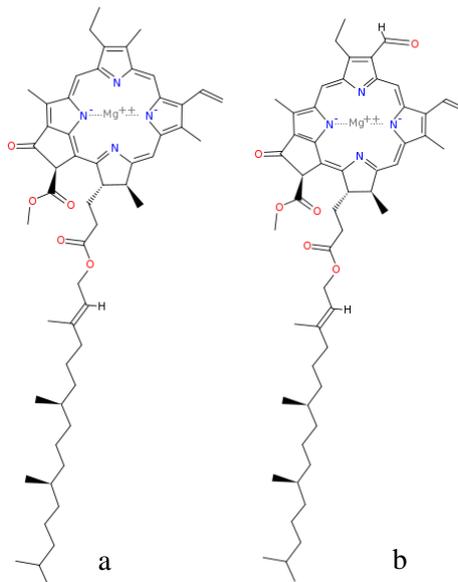
Un chloroplaste (

**Figure 18**) est constitué d'une enveloppe isolant le stroma. Dans le stroma, on trouve de l'ADN, des ribosomes pour synthétiser les protéines, des gouttelettes lipidiques, parfois des grains d'amidon et les thylakoïdes. Les thylakoïdes forment un ensemble de "sacs" aplatis. La chlorophylle est localisée dans la membrane des thylakoïdes. Elle est combinée à des protéines au sein des photosystèmes PSI et PSII qui sont organisés autour d'un noyau réactionnel avec des antennes collectrices de lumière.

La chlorophylle est un pigment vert avec un atome central de magnésium et une chaîne latérale hydrophobe. Il en existe plusieurs types : la chlorophylle a, b, c et d. Les microalgues contiennent en majorité de la chlorophylle a et, seules les microalgues vertes contiennent de la chlorophylle b (Carmo da Silva and Lombardi, 2020). En raison de leur structure différente (**Figure 19**), les chlorophylles a et b ont des spectres d'absorption différents : la chlorophylle a absorbe la lumière pour des longueurs d'onde entre 435 et 676 nm, et la chlorophylle b absorbe autour de 475-650 nm. Elles apparaissent vertes à l'œil humain, car elles n'absorbent pas la lumière verte (Lee et al., 2013). La chlorophylle peut être extraite de la biomasse algale dans des quantités de 0.5% à 1.5% (masse sèche) (Silva et al., 2020).



**Figure 18.** Schéma d'un chloroplaste (Ma, 2013)



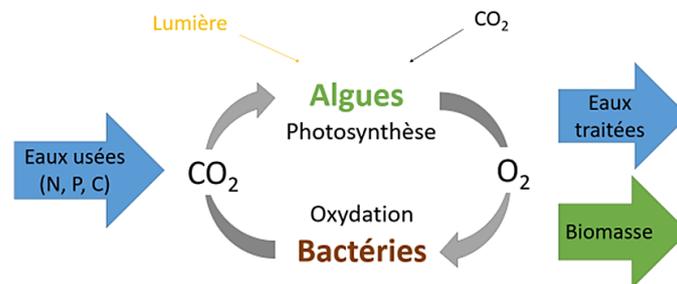
**Figure 19.** Structure de la chlorophylle a et b (Richfield, 2007)

### I.2.3. Les interactions microalgues-bactéries

En traitement des eaux usées, il est difficile de maintenir la pureté d'une culture de microalgues. Ainsi, des consortiums naturels ou artificiels de microalgues ou de microalgues et bactéries sont fréquemment mis en œuvre dans ce contexte (Gonçalves et al., 2017). En microbiologie, un consortium désigne des groupes co-existants de deux ou plusieurs espèces microbiennes (VerBerkmoes et al., 2009). Inspiré par les interactions entre les communautés microbiennes, le terme de consortium a été repris pour conceptualiser les interactions entre les microalgues et les bactéries dans les CHRA. L'association de microorganismes avec des métabolismes

différents et provenant de divers environnements permet de développer un système robuste qui résiste à différentes conditions environnementales et charges nutritives (Gonçalves et al., 2017).

Au sein d'un consortium microalgues-bactéries, par photosynthèse via la lumière du soleil, les microalgues convertissent le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et les nutriments présents (azote, phosphore) en biomasse et en dioxygène ( $\text{O}_2$ ). En parallèle, les bactéries utilisent l'oxygène libéré par les algues pour leur métabolisme conduisant à la dégradation des composés organiques et à l'oxydation de l'azote ammoniacal, tout en produisant les nitrates et le  $\text{CO}_2$  nécessaires aux algues. C'est le concept dit de "respiration photosynthétique" (**Figure 20**).



**Figure 20.** Interactions microalgues-bactéries en traitement des eaux usées

Les interactions microalgues-bactéries ne se limitent pas à un échange  $\text{CO}_2$ - $\text{O}_2$ . Les microorganismes interagissent directement ou indirectement via des mécanismes allant du commensalisme au mutualisme, au parasitisme ou à l'antagonisme (Unnithan et al., 2014). Ainsi, la culture de trois souches bactériennes *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Flavobacterium* avec des microalgues a montré que certaines étaient stimulées, d'autres inhibées ou non affectées par la présence des bactéries (Delucca and McCracken, 1977).

Le mutualisme est une relation dans laquelle deux ou plusieurs partenaires de différentes espèces bénéficient les uns des autres. La vitamine B12 fournie par une cyanobactérie à *Chlorella* sp. en échange d'acides aminés et de vitamines (Kong et al., 2022) est un exemple de mutualisme. Le commensalisme est une interaction qui ne bénéficie qu'à un partenaire. « Il y a une ligne très faible qui sépare le mutualisme et le commensalisme, et même le parasitisme, et les facteurs environnementaux peuvent déplacer une interaction d'un type à un autre (Fuentes et al., 2016) ». *Chlamydomonas reinhardtii* et la bactérie hétérotrophe *Mesorhizobium loti* ont des interactions qui illustrent le commensalisme. *C. reinhardtii* utilise la vitamine B12 produite par *M. loti*, mais la bactérie n'utilise pas le carbone organique libéré par la microalgue (Kazamia et al., 2012). Le parasitisme est une relation où une espèce parasite tire profit d'un hôte. Certaines bactéries parasitent les microalgues (M.-J. Kim et al., 2008), et inversement. 10% des espèces d'algues rouges connues sont parasites (Hancock et al., 2010). Lorsque les bactéries parasitent des microalgues, la cellule est lysée et la bactérie se sert des composés intracellulaires de l'algue comme substrats.

#### **I.2.4. Conclusion**

**L'association de microalgues et de bactéries au sein des CHRA peut permettre de mettre en jeu les différents métabolismes/réactions d'intérêt pour le traitement des eaux : consommation de matière organique par les bactéries hétérotrophes, assimilation du CO<sub>2</sub> par les microalgues, nitrification et dénitrification bactériennes, assimilation des nutriments. Ces réactions mettent en jeu des flux d'oxygène et mobilisent des protons ainsi que la production ou consommation d'alcalinité : cela doit permettre d'analyser la dynamique du consortium via le suivi de l'O<sub>2</sub> dissous et du pH. Ces interactions entre les microalgues et les bactéries expliquent la consommation énergétique réduite des CHRA, à travers la respiration photosynthétique. En revanche, les autres types d'interactions éventuelles ont été moins étudiées.**

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

Les parties précédentes ont mis en évidence le potentiel des CHRA pour le traitement des eaux usées. Ce dernier repose essentiellement sur les interactions entre microalgues et bactéries. Ainsi, les facteurs influençant ces deux types de biomasses sont à comprendre, voire à maîtriser pour tendre vers une optimisation du procédé. Cette partie présente les différents paramètres (conditions opératoires, composition de l'eau usée, facteurs environnementaux) susceptibles d'influencer les microalgues et les bactéries en termes de performances du traitement des eaux usées et en termes de valorisation de la biomasse produite (productivité, composition).

#### I.3.1. Les besoins nutritionnels

Cette partie aborde les espèces chimiques essentielles au développement du consortium : le carbone, l'azote, le phosphore, l'oxygène et les micronutriments. Les grandes classifications sont résumées dans le **Tableau 7** ci-dessous :

<b>Organique</b>	<b>Inorganique ou minéral</b>	<b>Dissous</b>	<b>Particulaire ou colloïdal</b>
Contient un atome de carbone	Ne contient pas d'atome de carbone (exception : CO, CO <sub>2</sub> )	Fraction qui passe un filtre de 0,45 µm	Fraction retenue sur un filtre de 0,45 µm

**Tableau 7.** Classification générale des espèces chimiques

Le CHRA constitue un traitement biologique qui peut être positionné (voir aussi paragraphe I.1. Place du CHRA en traitement des eaux usées) :

- Directement en aval des prétraitements (dégrillage, déshuilage, dessablage) ;
- En aval d'un bassin de décantation primaire ;
- En aval d'un procédé biologique à boues activées.

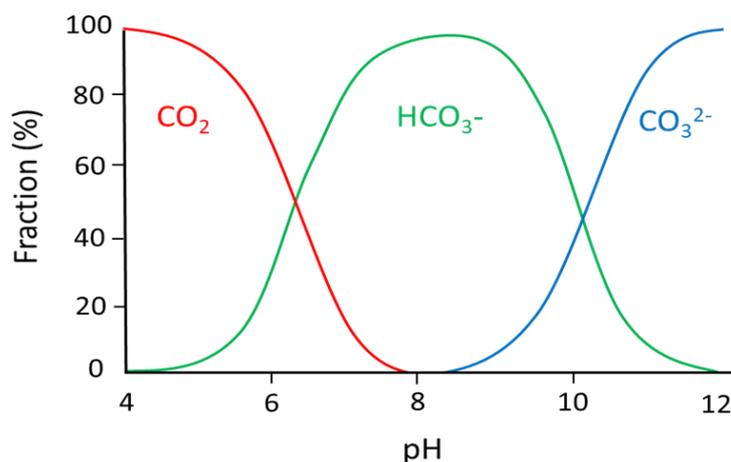
En fonction, les charges en polluants/nutriments seront donc plus ou moins sujettes à des variations temporelles et à des à-coups de charge qui surviennent lors d'un incident sur le réseau d'assainissement après un épisode pluvieux ou encore lorsque la population raccordée varie brutalement (zones touristiques) (Deronzier et al., 2001).

La concentration en nutriments de l'eau usée est un élément clé car elle permet de soutenir la production de biomasse et/ou d'agir comme facteur limitant pour contrôler la composition de la biomasse générée : avec la carence ou l'absence d'un nutriment, les microorganismes sont susceptibles de modifier leur métabolisme. Chez les microalgues, cela peut se traduire par un changement de composition biochimique lié à l'accumulation de glucides ou de lipides (Markou et al., 2012). Ainsi, pour orienter la production de lipides ou de glucides, limiter un nutriment est une technique abordable et facile à appliquer au sein d'une culture en conditions contrôlées. Elle est cependant complexe à mettre en œuvre avec des eaux usées réelles dont la composition varie. Il est donc essentiel d'étudier les quantités minimales d'un nutriment à fournir dans les cultures (Markou et al., 2012).

1.3.1.1. Le carbone

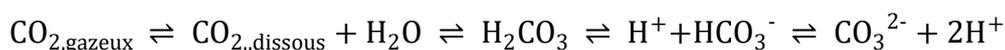
1.3.1.1.1. Généralités

En fonction du pH, le carbone minéral dissous se retrouve sous différentes formes :  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  (**Figure 21**). Le  $\text{CO}_2$  dissous se combine avec  $\text{H}_2\text{O}$  pour former de l'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Le  $\text{H}_2\text{CO}_3$  se décompose en bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  et en ions hydrogène  $\text{H}^+$  avec  $\text{pK}_a=6.34$  à  $25^\circ\text{C}$ .  $\text{HCO}_3^-$  peut se dissocier en ions carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  et en ions hydrogène  $\text{H}^+$  avec  $\text{pK}_a=10.33$  à  $25^\circ\text{C}$ . L'équilibre entre les formes ioniques du carbone inorganique est appelé l'équilibre des carbonates qui est donc influencé par le pH.



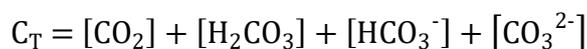
**Figure 21.** Répartition du carbone inorganique ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ ) en fonction du pH

Les équilibres acide-base des formes minérales dissoutes du carbone peuvent ainsi être résumés :



**Équation 6**

La somme des espèces de carbone minéral dissous est représentée par  $C_T$ , le carbone inorganique total :



**Équation 7**

Le carbone organique désigne l'ensemble des espèces carbonées (c.à.d. contenant un atome de carbone) autres que le carbone inorganique. Le carbone organique total (COT) est la somme des quantités de carbone contenu dans ces molécules. Il inclut le carbone organique dissous et le carbone organique particulaire.

En traitement des eaux usées, la DCO (Demande Chimique en Oxygène) est utilisée pour estimer la matière organique contenue dans un échantillon. Celle-ci est un mélange hétérogène de composés organiques biodégradables et réfractaires avec des structures variées. Ainsi, la DCO correspond à une mesure de la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique dans un effluent. Elle comprend également une part dissoute et une part particulaire.

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

En complément, la DBO<sub>5</sub> (Demande Biochimique en Oxygène à cinq jours) représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder, à l'aide de microorganismes, la matière organique en cinq jours dans un effluent. Elle correspond schématiquement à la part biodégradable de la DCO.

#### I.3.1.1.2. Besoins en carbone d'un CHRA

Pour rappel, les mécanismes de transformation du carbone à l'œuvre dans un consortium microalgues-bactéries sont l'oxydation bactérienne hétérotrophe pour le carbone organique (voir I.2.1.2. Le traitement aérobie des eaux usées par les bactéries) et la photosynthèse des microalgues pour le carbone inorganique (voir I.2.2.2. Métabolisme : photosynthèse et assimilation).

En général, les quantités suffisantes de DCO pour le métabolisme bactérien sont fournies au CHRA par les eaux usées. Selon le climat, il est recommandé qu'un chenal traite une charge organique entrante de 100–150 kg DBO<sub>5</sub>.ha<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> (Craggs et al., 2011).

En revanche, la productivité des microalgues et l'élimination des nutriments sont en grande partie limitées par le carbone minéral dissous (C<sub>T</sub>), notamment lors du pic de photosynthèse (Sutherland et al., 2021). Cette limitation par le C<sub>T</sub> est mise en évidence par un pH élevé la journée, comme les microalgues assimilent le carbone inorganique dissous, provoquant un déplacement de l'équilibre du système carbonate (Craggs et al., 2012). Dans la mesure où les eaux usées ont en général un rapport C/N plus faible (7/1) que la biomasse algale (15/1) (Park and Craggs, 2010), elles ne fournissent pas suffisamment de carbone pour l'élimination de l'azote (et du phosphore) par assimilation dans la biomasse algale (R Craggs et al., 2014). Le carbone peut alors être supplémenté par injection de CO<sub>2</sub>. Le pH peut ainsi être maintenu dans une gamme idéale (7.5-8.5) pour les microalgues et les bactéries (R Craggs et al., 2014).

L'étude basée sur un modèle numérique de (Casagli et al., 2021a) montre qu'une trop grande limitation en carbone minéral (alcalinité) était favorable à des émissions accrues de protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O), ce qui est susceptible de poser un problème environnemental majeur, vu le caractère très puissant de ce gaz à effet de serre.

Les microalgues absorbent préférentiellement le CO<sub>2</sub> par diffusion passive, tandis que l'assimilation du bicarbonate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> repose sur un transport actif. Dans la gamme de pH de 7 à 9 usuellement rencontrée dans les eaux usées, l'espèce majoritaire du carbone inorganique est HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Bien que le CO<sub>2</sub> soit préféré par les microalgues, le bicarbonate peut être transformé en CO<sub>2</sub> pour une absorption ultérieure. À un pH plus élevé, les ions carbonate constituent une forme non disponible pour l'absorption par les algues (Pedersen et al., 2013).

#### I.3.1.1.3. Impact d'un apport en dioxyde de carbone

En partant du postulat que dans un CHRA, les eaux usées fournissent la matière organique en quantités suffisantes pour les bactéries et que la limitation provient du carbone minéral dissous pour les microalgues, plusieurs chercheurs ont pris le parti d'injecter directement du dioxyde de carbone dans une culture de microalgues et de bactéries. De cette manière, les émissions gazeuses riches en CO<sub>2</sub> de certains procédés peuvent être valorisées, dans une logique d'économie circulaire. Ainsi, les études citées ci-dessous se concentrent sur les effets d'un

## Partie I : Bibliographie

apport de carbone minéral dissous (via le CO<sub>2</sub>) dans une culture de microalgues ou de microalgues-bactéries sur deux aspects :

- les performances de traitement en évaluant l'abattement des pollutions carbonées, azotées et phosphorées ;
- le consortium microalgues-bactéries en évaluant la production de biomasse.

Globalement, l'injection de dioxyde de carbone impacte les processus physico-chimiques d'élimination de l'azote (volatilisation) et du phosphore (précipitation), qui ont lieu en parallèle des mécanismes biologiques (la photosynthèse et l'oxydation) liés aux microalgues et aux bactéries.

En effet, l'ajout de CO<sub>2</sub> entraîne une diminution du pH, modifiant ainsi la spéciation des formes de l'azote et du phosphore (voir paragraphes suivants I.3.1.2. L'azote et I.3.1.3. Le phosphore). Par exemple, lors de l'étude menée par (Heubeck et al., 2007), du dioxyde de carbone a été injecté dans des cultures batch de microalgues-bactéries en intérieur et extérieur. Avec un apport en CO<sub>2</sub> (c.à.d. pH<8), NH<sub>4</sub>-N a été éliminé en 6 j. Dans le réacteur témoin sans CO<sub>2</sub> (c.à.d. pH>9 à J2, et pH>10.5 à J4), l'élimination de NH<sub>4</sub>-N a pris en 4 j. L'azote a été en partie éliminé par volatilisation. Par ailleurs, au 4<sup>ème</sup> jour, le phosphore dissous a avoisiné 1 mg.L<sup>-1</sup> dans le témoin contre 2 mg.L<sup>-1</sup> dans le réacteur avec CO<sub>2</sub>. Il est suggéré qu'une partie du phosphore a été précipité en phosphates, un processus qui se produit à pH élevé comme dans le témoin. L'hypothèse d'une assimilation plus importante des nutriments par la biomasse dans le témoin a été écartée, car la mesure de biomasse (quantifiée via les MES) a été inférieure.

Dans l'étude de (Mehrabadi et al., 2017), des cultures semi-batch en extérieur (eaux usées) ont été aérées avec des mélanges air et 0% (témoin), 0.5, 2, 5 et 10% CO<sub>2</sub>. Avec 0.5% CO<sub>2</sub>, le pH a varié entre 6.8 et 7.9. Dans le témoin, avec 0% CO<sub>2</sub>, le pH a varié entre 8.1 et 10.1. De façon similaire à (Heubeck et al., 2007), l'abattement de NH<sub>4</sub>-N a été plus important dans le réacteur témoin, car la volatilisation ammoniacale se produit à des pH>9 (Mehrabadi et al., 2017). De telles valeurs de pH n'ont pas été atteintes avec le CO<sub>2</sub>, car le pH a été maintenu sous 7.9.

Concernant le devenir des composés organiques, il a été suggéré qu'un pH élevé n'impactait pas la dégradation de la MO par les bactéries (Pipes, 1962). Ainsi, dans trois systèmes avec injection de CO<sub>2</sub> pur pour des pH 7, 8 et 9, la DCO a été éliminée à hauteur de 88±1%, 88±0%, 81±1%, et la réduction du COT a atteint 71±0%, 73±0% et 68±0%. Les abattements similaires des deux paramètres à différents pH ont indiqué que l'apport de CO<sub>2</sub> n'a pas influencé l'oxydation de la matière organique (Posadas et al., 2015). De la même façon, (Heubeck et al., 2007) ont conclu que l'ajout de CO<sub>2</sub> n'a pas influencé l'abattement de la DBO<sub>5</sub> (filtrée).

Si le CO<sub>2</sub> a des conséquences sur le procédé avec la modification du pH, plusieurs travaux ont aussi conclu que l'ajout de CO<sub>2</sub>, supposé limitant autrement, a bien amélioré la productivité des consortiums microalgues-bactéries cultivés en eaux usées. Par exemple, (Mehrabadi et al., 2017) ont établi une corrélation entre le taux de CO<sub>2</sub> et la productivité de la culture en été à température favorable. Aérer avec 10% CO<sub>2</sub> a augmenté la concentration de la biomasse (+54%) et sa teneur en Chl-a (+23%) comparé à la biomasse produite dans le témoin sans CO<sub>2</sub>. Dans une étude de (Sutherland et al., 2015a), le pH de deux cultures a été régulé à 6.5, 7, 7.5

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

et 8 par ajout de CO<sub>2</sub>. La production de biomasse a effectivement augmenté avec dans le meilleur cas une hausse de 82% des MVS et de 96% de la teneur en Chl-a à pH 6.5 comparé au contrôle. L'effet du CO<sub>2</sub> a également été examiné à pH 8 et 9 pour des cultures batch en extérieur (Uggetti et al., 2018). Après 6 jours, les concentrations en biomasse des cultures avec CO<sub>2</sub> ont atteint  $1.10^7$  et  $1.2.10^7$  cellules.mL<sup>-1</sup>, soit des résultats supérieurs de 66 à 100% aux témoins. Cependant, des tendances plus complexes à interpréter ont été rapportées pour une expérience similaire menée en alimentation continue. Les oscillations des concentrations de la biomasse ont alors été attribuées à la variabilité des eaux usées urbaines en entrée.

Divers travaux ont recensé les effets du CO<sub>2</sub> sur la composition biochimique d'une culture pure de microalgues, mais aucun consensus n'a été établi pour les consortiums microalgues-bactéries. De plus, les conditions opératoires varient d'une étude à l'autre, et d'autres facteurs limitants pouvant intervenir ne sont pas considérés. Dans le travail de (Mehrabadi et al., 2017) cité plus haut, des cultures semi-batch en extérieur (eaux usées) ont été aérées avec des mélanges air et 0 (témoin), 0.5, 2, 5 et 10% CO<sub>2</sub>. Ainsi, l'augmentation de la dose de 0.5 à 10% de CO<sub>2</sub> a eu un effet minime sur la composition de la biomasse avec un passage de 50.4±5.9% à 48.9±4.8% pour les protéines, de 18.6±1.7% à 19.5±2.8% pour les glucides et de 20.5±3.5% à 18.1±2.4% pour les lipides. Récemment, l'injection de gaz de combustion a été testée dans des CHRA traitant des eaux usées en extérieur (Lage and Gentili, 2023). Toutefois, l'absence de témoin sans CO<sub>2</sub> et de conditions contrôlées n'ont pas permis de conclusion sur l'impact réel sur un consortium.

**Un apport en CO<sub>2</sub> permet de dépasser la limitation en carbone minéral dissous dans les cultures de microalgues et de bactéries. Si le consortium n'est pas contraint par d'autres facteurs limitants, une supplémentation en CO<sub>2</sub> peut favoriser la croissance des microalgues sans influencer les bactéries responsables de la dégradation de la matière organique mesurée par DCO ou DBO<sub>5</sub>. L'impact d'un apport en CO<sub>2</sub> (ou carbone inorganique dissous) sur la réduction des nutriments (N et P) dans un CHRA va dépendre des principaux mécanismes impliqués : l'assimilation par le consortium, les processus biologiques ou les processus physico-chimiques régis par le pH comme la volatilisation ammoniacale ou la précipitation du phosphore. Il y a un manque de données consistantes sur l'effet du carbone inorganique sur la composition biochimique (lipides, glucides et protéines) de la biomasse produite.**

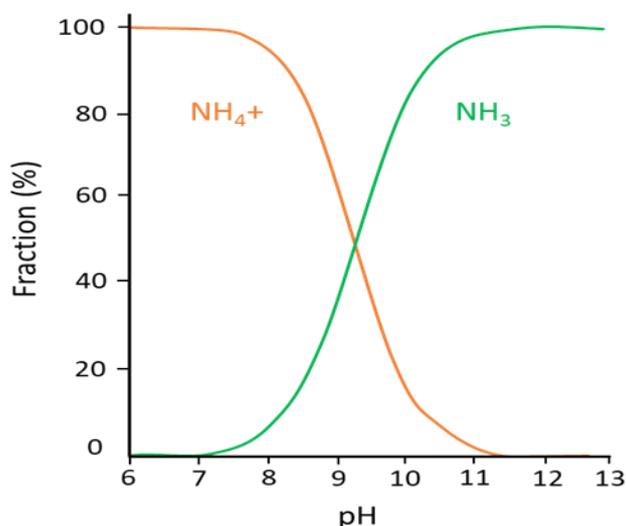
#### *1.3.1.2. L'azote*

##### *1.3.1.2.1. Généralités et les formes de l'azote*

L'azote constitue un des éléments chimiques essentiels du tissu vivant, avec l'hydrogène, l'oxygène, le carbone et le phosphore. Il se retrouve en diazote (N<sub>2</sub>) qui représente 78% de notre atmosphère et 99% de l'azote à l'échelle du globe, en passant par des formes qui peuvent être oxydées (NO<sub>x</sub>, N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou réduites (NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et d'autres formes organiques comme l'urée (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) (Peyraud et al., 2012).

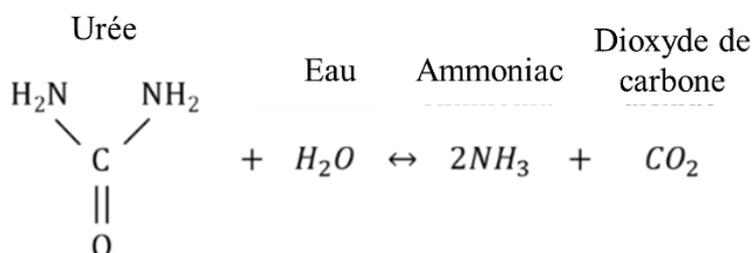
Dans les eaux usées urbaines, l'azote organique et ammoniacal sont majoritaires. L'ammonium NH<sub>4</sub><sup>+</sup> est la source d'azote préférentielle des microalgues en raison de son état réduit et de son assimilation énergétiquement favorable (Sanz-Luque et al., 2015). Il n'y a pas de technique

pour mesurer séparément les formes  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . La répartition entre les deux est dépendante du pH (**Figure 22**) dans la mesure où ces deux composés forment un couple acide/base dont la constante d'acidité ( $\text{pK}_a$ ) est de 9.25 à 25°C.



**Figure 22.** Répartition de l'ammoniac  $\text{NH}_3$  et de l'ammonium  $\text{NH}_4^+$  en fonction du pH

Abondante dans les excréta humains (urine), l'urée forme après hydrolyse de l'ammoniac  $\text{NH}_3$  (**Figure 23**), qui est assimilable par les microalgues. Toutefois, il peut être toxique à certaines concentrations qui dépendent des espèces. (Gutierrez et al., 2016) ont montré que *Neochloris oleoabundans* and *Dunaliella tertiolecta* sont inhibées à partir de 2.3 et 3.3  $\text{mgNH}_3.\text{L}^{-1}$  tandis que *Chlorella sorokiniana* et *Nannochloropsis oculata* ont toléré jusqu'à 16  $\text{mgNH}_3.\text{L}^{-1}$ .



**Figure 23.** Hydrolyse de l'urée (ammonification)

Au sein du CHRA, les mécanismes de transformation de l'azote sont :

- La nitrification (voir I.2.1.2. Le traitement aérobie des eaux usées par les bactéries) : l'oxydation de l'ammonium  $\text{NH}_4^+$  en nitrites  $\text{NO}_2^-$  et nitrates  $\text{NO}_3^-$  par les bactéries autotrophes ;
- L'assimilation par la biomasse (microalgues ou bactéries hétérotrophes) (cf. I.2.2.2. Métabolisme : photosynthèse et assimilation) ;
- La volatilisation sous forme d'ammoniac à pH élevé et avec une forte aération (Casagli et al., 2021a).

Le bilan en azote d'un chenal mettant en jeu un consortium microalgues-bactéries est variable selon les conditions de culture et les dynamiques saisonnières. À l'état stationnaire et sur 4

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

années de données, le bilan a attribué 43.5% de l'élimination de l'azote à une assimilation par la biomasse (Hafiane et al., 2003). Plus récemment, (Casagli et al., 2021a) ont investigué à l'aide d'un modèle numérique les flux d'azote émis par un CHRA pilote alimenté en digestat agricole : ils ont mis en évidence l'importance de la nitrification (56% de conversion de l'azote en moyenne annuelle) mais aussi l'occurrence significative de la volatilisation en printemps/été (qui exerce un impact environnemental non négligeable).

#### I.3.1.2.2. L'impact de la charge en azote

La croissance des bactéries nitrifiantes est liée à la dose d'azote reçue. La vitesse de croissance s'adapte donc plus ou moins rapidement à la charge d'azote à traiter (Deronzier et al., 2001). Des quantités élevées d'azote ammoniacal ( $>100-150 \text{ mgNH}_4\text{-N.L}^{-1}$ ) inhibent la nitrification et plus particulièrement la nitratisation, les bactéries assurant l'étape de nitratisation étant les plus sensibles aux variations des facteurs. Toutefois, de telles concentrations sont peu plausibles dans le traitement des effluents domestiques visant l'élimination de l'azote (Deronzier et al., 2001).

Chez les microalgues, limiter l'apport en azote a été la méthode la plus employée pour modifier la composition biochimique, car l'azote est principalement utilisé pour synthétiser les protéines. Quand l'azote devient limitant, la croissance des cellules est ralentie et l'assimilation du carbone via la photosynthèse continue, résultant en une accumulation accrue de glucides ou de lipides (Beuckels et al., 2015; Whitton et al., 2016). Ainsi, lors de la culture de *Tetraselmis suecica* F&M-M33, avec et sans carence en azote, la proportion est passée de 40.2% à 18.3% pour les protéines, de 10.2% à 36.8% pour les glucides et de 28.5% à 22.4% pour les lipides. Une carence en azote a donc réduit la part de protéines, a favorisé l'accumulation des glucides et a peu influencé les lipides (Niccolai et al., 2019). Cependant, (Beuckels et al., 2015) ont observé qu'avec des concentrations en azote plus faibles, la teneur en lipides est passée de 12 à 32-36% chez *Chlorella* et de 10 à 25-31% chez *Scenedesmus*.

La productivité de la biomasse est également fortement impactée par la carence en azote comme l'ont montré diverses études : au bout de 10 jours, une carence a fait chuter la concentration d'espèces marines : *M. reisseri* SIT04 de 1.29 à 0.4  $\text{g.L}^{-1}$  et de *S. obliquus* SIT06 de 1.83 à 0.6  $\text{g.L}^{-1}$  (Srinuanpan et al., 2018) La croissance de *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, une espèce d'eau douce, a été divisée par deux en enlevant la source de nitrate du milieu de culture (Pancha et al., 2014). De même, quand la dose de  $\text{KNO}_3$  est réduite de 5 à 0.2 mM, la concentration de *Chlorella vulgaris* est passée de 1.2  $\text{g.L}^{-1}$  à 0.4  $\text{g.L}^{-1}$  dans l'étude de (Lv et al., 2010).

De ce fait, l'influence de l'azote comme facteur limitant apparaît propre à chaque souche, indépendamment des conditions de l'expérience. L'étude citée après permet de mieux appréhender cette notion, car les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions. Ainsi, des espèces d'eau douce et marines cultivées en absence de  $\text{KNO}_3$  ont eu des réponses différentes (Breuer et al., 2012). 5 espèces ont eu une production de biomasse très inférieure et une production de TAG (lipides) très supérieure sans  $\text{KNO}_3$  comparée à la culture avec  $\text{KNO}_3$ . Chez *Dunaliella tertiolecta* et *Porphyridium cruentum*, la production de biomasse a été inférieure, mais la synthèse des TAG n'a pas varié. Chez *Isochrysis galbana* et *Nannochloris*

sp., la production de biomasse a stagné, et la production des TAG a augmenté les 6 premiers jours avant de chuter (Breuer et al., 2012).

**La charge en azote est susceptible de modifier la productivité de la culture ainsi que la composition de la biomasse produite. En culture pure de microalgues, les réponses de différentes souches à une carence en azote diffèrent. Dans le cas d'un consortium microalgues-bactéries traitant des eaux usées, cet aspect a été peu documenté.**

**Au-delà de la production et de la composition de la biomasse produite, l'efficacité en termes de traitement de l'azote des eaux usées et les potentielles émissions dans l'environnement (NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O) sont à prendre en compte pour analyser le système, notamment en considérant la dynamique entre les bactéries nitrifiantes et les microalgues.**

#### *1.3.1.3. Le phosphore*

Dans les eaux résiduaires, le phosphore se trouve sous forme minérale (orthophosphates, polyphosphates) ou organique (phospholipides, esters...). Les ions orthophosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) représentent 60 à 85% du phosphore total avec une quantité d'autant plus importante que le temps de séjour dans le réseau de collecte est long (Deronzier and Choubert, 2004).

Dans un CHRA, les processus de transformation du phosphore sont :

- L'assimilation par la biomasse (microalgues ou bactéries hétérotrophes) (voir I.2.1.2. Le traitement aérobie des eaux usées par les bactéries) ;
- La précipitation naturelle des phosphates au contact d'ions calcium, magnésium ou ferriques présents dans les eaux usées sous forme de complexes hydroxo-métalliques (Deronzier and Choubert, 2004). Les précipités les plus communs sont les phosphates de calcium (le dihydrogéné-phosphate de calcium à 6<pH<7 ou le phosphate tricalcique Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> pour 9<pH<12), de magnésium (pour pH>10, le phosphate de calcium coprécipite avec la magnésie) ou ferrique (pH=5.5) (Degrémont, 2004).

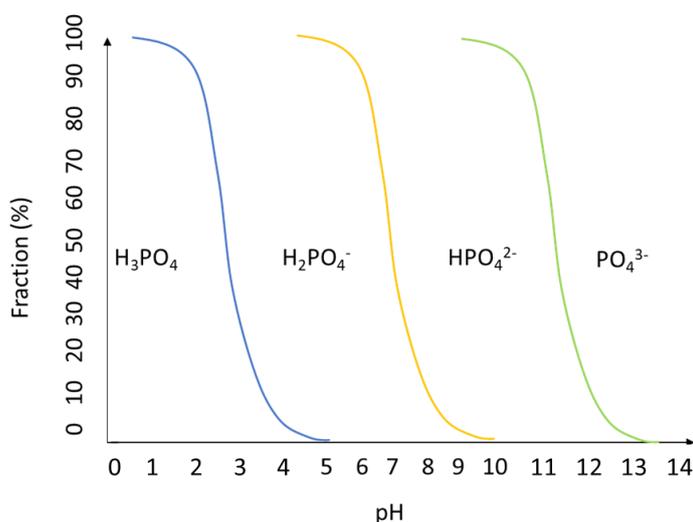
Dans un chenal en fonctionnement stationnaire avec des données sur 4 ans, (Hafiane et al., 2003) ont ainsi attribué 54% de l'élimination du phosphore dissous à l'assimilation par la biomasse et 46% à la précipitation sous forme de sels de phosphate.

Le phosphore minéral (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) (Figure 24) est la forme préférée par les microalgues (Su, 2021). Il est incorporé dans les acides nucléiques (ARN et ADN), l'ATP et les phospholipides pour les membranes. En excès, il peut être stocké sous forme de polyphosphates par les microalgues (Shebanova et al., 2017). Cette capacité à assimiler plus de phosphore que nécessaire, aussi présente chez certaines bactéries (voir I.2.1.2.3. ), est appelée suraccumulation.

Dans la nature, les orthophosphates sont considérés comme un facteur limitant à la croissance algale car, ils se lient facilement avec d'autres ions comme le fer ou les carbonates et précipitent (Pham, 2018). Face à une limitation de la source de phosphore (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), la production de *Chorella vulgaris* a diminué de 20% (Beuckels et al., 2015). De la même façon, l'absence de

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

$K_2HPO_4$  a fortement ralenti la croissance de *S. obliquus* comparé aux cultures où le réactif a été supplémenté (Hamouda and Abou-El-Souod, 2018). D'autre part, la composition biochimique des microalgues est influencée par la charge en phosphore. Cinq doses de  $K_2HPO_4$  (0.5/1/2.5/5/7.5 mgP.L<sup>-1</sup>) ont été testées sur *Chlorella* sp. par (Liang et al., 2013). La croissance de *Chlorella* sp. s'est améliorée jusqu'à 1 mgP.L<sup>-1</sup>, puis a baissé à des teneurs plus élevées. La teneur et la productivité en lipides ont augmenté de 0.5 mgP.L<sup>-1</sup> à 1 mgP.L<sup>-1</sup>. Avec plus de 1 mgP.L<sup>-1</sup>, le contenu et la productivité en lipides ont été réduits. La répartition des lipides (lipides neutres, glycolipides et phospholipides) a changé avec la concentration du phosphore. Lorsque la dose de  $K_2HPO_4$  est passée de 0.5 à 7.5 mgP.L<sup>-1</sup>, la part de glycolipides est passée de 9.5% à 4%, les lipides neutres de 11.5% à 6.5% et les phospholipides de 2% à 3.4%.



**Figure 24.** Répartition du phosphore inorganique en fonction du pH

#### I.3.1.4. Le ratio C:N:P

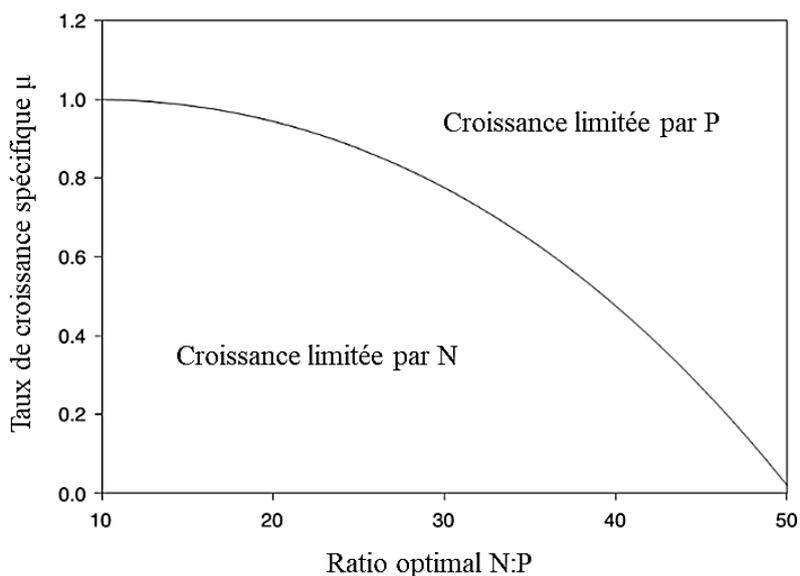
La biodégradabilité des eaux usées par voie biologique s'estime via le rapport DCO/DBO<sub>5</sub>. Ce dernier renseigne sur la fraction de MO qui peut être facilement biodégradée par les microorganismes parmi les matières organiques totales présentes dans les effluents. Plus le rapport est faible, plus les eaux usées sont facilement biodégradables, et inversement.

Pour autant, un effluent facilement biodégradable n'est pas forcément propice aux dégradations biologiques (Eme and Boutin, 2015). En effet, la croissance bactérienne indispensable au traitement se réalise dans des conditions nutritionnelles définies. La concentration des différents nutriments dans les eaux usées doit être équilibrée (ratio C:N:P) et correspondre aux besoins des bactéries qui se trouvent dans les boues activées (Winkler, 2015). Cet équilibre nutritionnel, représenté par le rapport DBO<sub>5</sub>:N:P (mg.L<sup>-1</sup>), nécessaire au traitement biologique par les bactéries est de 100:5:1 (Metcalf and Eddy, 1991). « Ceci signifie que l'abattement de 100 mg de DBO<sub>5</sub> s'accompagne d'une diminution de 5 mg d'azote et de 1 mg d'orthophosphate par assimilation (Canler and Perret, 2007) ». Toute carence d'un élément nutritif principal dans les eaux usées peut réduire l'efficacité du traitement.

Un ratio molaire C:N:P de 106:16:1 a été établi pour les microalgues marines, dénommé comme le ratio de Redfield (Redfield et al., 1963). Cependant, pour les espèces d'eau douce, le

rapport de Redfield est une exception plutôt qu'une règle avec des rapports molaires N:P oscillant entre 8:1 et 45:1 (Hecky et al., 1993; Whitton et al., 2016). « De plus, les microalgues peuvent ajuster leur contenu cellulaire en N et P selon les concentrations présentes dans les eaux avec l'accumulation de P influencée par l'apport externe de P et N tandis que l'accumulation de N est indépendante de P (Beuckels et al., 2015; Whitton et al., 2016) ».

Dans la pratique, le rapport atomique entre N et P chez les microalgues se situe entre 10 et 30 (**Figure 25**). Des eaux usées avec un rapport N:P inférieur à 10 suggère une limitation par N tandis que des valeurs au-dessus de 30 suggèrent une limitation par P (Sutherland et al., 2015b).



**Figure 25.** Evolution de la vitesse de croissance algale selon le ratio N:P (Richmond and Hu, 2013)

#### 1.3.1.5. L'oxygène

Bien qu'il compose 20% de l'atmosphère, l'oxygène est peu soluble dans l'eau, et sa solubilité diminue avec l'augmentation de la température et de la salinité. Dans les consortiums d'algues et de bactéries, l'oxygène libéré par les algues lors de la photosynthèse est utilisé pour la dégradation aérobie de la matière organique et la nitrification (voir I.2.1.2. Le traitement aérobie des eaux usées par les bactéries).

L'activité photosynthétique des algues durant la journée peut mener à une saturation en oxygène dissous (OD) de 200 à 300%. La sursaturation en  $O_2$  est bénéfique pour l'oxydation de la matière organique par les bactéries. Toutefois, des taux élevés en OD peuvent causer un stress oxydatif aux microalgues : l'enzyme RuBisCo qui fixe le carbone dans le cycle de Calvin-Benson, réagit plus avec l' $O_2$  qu'avec le  $CO_2$ , ce qui favorise la respiration au détriment de la photosynthèse (Gao et al., 2022). « De plus, des dérivés réactifs de l'oxygène peuvent s'accumuler dans les cellules, inhibant les processus métaboliques et endommageant une variété de composants cellulaires (Gao et al., 2022) ». Aérer la culture peut réduire la concentration en OD par dégazage de l'oxygène en excès. Il faut cependant maintenir une concentration suffisante en carbone inorganique dissous, par exemple en injectant du  $CO_2$  en parallèle (Kazbar et al., 2019). La sursaturation ne semble pas poser une problématique pour

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

les procédés de biodégradation, car les bactéries hétérotrophes consomment en continu l'oxygène (Muñoz and Guieysse, 2006).

En règle générale, pour les boues activées, le taux optimal d'oxygène dissous requis par les bactéries nitrifiantes se situe entre 2 et 3 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (Pham, 2018). Si le taux d'oxygène dissous n'est pas suffisant, il y a un déclin de l'activité des bactéries nitrifiantes. Comme l'oxygène dissous est fourni par les microalgues à des taux bien supérieurs, cette problématique ne se pose en général pas dans les CHRA, à part éventuellement la nuit.

#### I.3.1.6. Les micronutriments : magnésium, soufre et calcium

En plus des macronutriments comme le carbone, l'azote et le phosphore, le milieu de culture doit contenir des micronutriments essentiels tel que Mg, S, Ca, Na, Cl, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, B et Co (Markou et al., 2014).

##### I.3.1.6.1. Le soufre

La teneur en soufre des microalgues varie entre 0.15% et 1.6% (Grobbelaar, 2004). Bien que présent sous diverses formes, les microalgues assimilent le soufre sous forme de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Giordano et al., 2009). Peu d'études ont abordé l'élimination des sulfates par les microalgues ou par les consortiums microalgues-bactéries. *Oocystis* sp. a éliminé 32% des sulfates après 21 jours de culture (Mohammadi et al., 2018). La croissance de *Synechocystis* sp. PCC6803, une cyanobactérie d'eau douce, a été améliorée par ajout de sulfate dans le milieu de culture (Hughes et al., 2018).

##### I.3.1.6.2. Le magnésium

Le magnésium est un atome central de la molécule de chlorophylle et peut influencer l'activité de certaines enzymes photosynthétiques. C'est aussi un élément clé pour la synthèse des protéines, car il permet de stabiliser les ribosomes (Shaul, 2002). Comme pour les macronutriments, l'impact du magnésium est spécifique aux besoins de chaque espèce comme le montrent un certain nombre d'études.

Dans l'étude de (Tan et al., 2016), trois espèces ont été cultivées dans du digestat avec/sans ajout de P et de Mg. L'ajout de Mg a augmenté la production de 18% pour *C. vulgaris* ESP-6, de 42% pour *C. sorokiniana* FACHB-27 et de 101% pour *C. vulgaris*. Après apport de Mg, l'élimination de l'ammoniac est passée de 35% à 94% pour *C. vulgaris* ESP-6, de 57% à 93% pour *C. sorokiniana* FACHB-275 et de 88% à 96% pour *C. vulgaris*. Le magnésium a eu un effet positif sur la croissance des microalgues et la réduction de l'ammoniac dont l'ampleur a été dépendant de la souche (Tan et al., 2016).

En testant une concentration en MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O de 0.25 à 600 mg.L<sup>-1</sup>, la vitesse de croissance et la production finale de *S. obliquus* a été améliorée jusqu'à une concentration dans le milieu de 150 mg.L<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup>. Après ce palier, la croissance a stagné. De 150 à 300 mg.L<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup>, la teneur en lipides est passée de 38.9% à 54.6% (MS) de la biomasse, et elle a diminué à 40.2% à 600 mg.L<sup>-1</sup> (Esakkimuthu et al., 2016). Les ions Mg<sup>2+</sup> sont donc nécessaires à la croissance, mais le besoin en magnésium est spécifique à chaque espèce.

## Partie I : Bibliographie

Sans magnésium, la croissance de *C. vulgaris* et *S. obliquus* a été stoppée au bout de 9 jours et 12 jours. La hausse de la dose de Mg à 150 mg L<sup>-1</sup> a augmenté la production de biomasse de 33% pour *C. vulgaris* et de 36% pour *S. obliquus*. La teneur en lipides a été fortement influencée. Dans le contrôle, une teneur en lipides de 11.9% (*C. vulgaris*) et de 11.3% (*S. obliquus*) a été atteinte au bout de 21 jours. En doublant la dose de Mg, la teneur maximale en lipides a atteint 27% (*C. vulgaris*) et 26% (*S. obliquus*) en 15 jours (Gorain et al., 2013). Un manque de magnésium semble ainsi induire une baisse de la teneur en lipides dans la biomasse.

### 1.3.1.6.3. Le calcium

Les cellules algales contiennent au minimum, 0.04% en masse de Ca<sup>2+</sup>. L'effet des ions Ca<sup>2+</sup> a été étudié sur des microalgues comme *Scenedesmus* (Esakkimuthu et al., 2016) et *Chlorella* (Gorain et al., 2013), mais peu se sont intéressés aux consortiums microalgues-bactéries.

En augmentant de 0 à 25 mg.L<sup>-1</sup> de Ca<sup>2+</sup>, la croissance de *S. obliquus* a été améliorée, mais elle n'a pas été affectée de manière significative à des doses supérieures. Le calcium en surplus n'a pas été inhibiteur (Esakkimuthu et al., 2016). Une carence en calcium a réduit la production de *C. vulgaris* et de *S. obliquus* et a augmenté la teneur maximale en lipides de 11.9% à 40.3% (21 jours à 15 jours) chez *C. vulgaris* et de 11.3% à 37% (21 jours à 18 jours) chez *S. obliquus* (Gorain et al., 2013). Dans une culture microalgues-bactéries, une dose de CaCl<sub>2</sub> (0.1 nM) a légèrement amélioré l'abattement de la DCO de 11.9%, de l'azote total de 6.5% et du phosphore total de 1.2% comparé au contrôle (Tang et al., 2021).

Comme conclu précédemment pour les autres nutriments, l'influence du calcium est liée à la souche de microalgue et aux conditions de culture.

### 1.3.1.6.4. La salinité

La salinité est la teneur en sels dissous d'un milieu. L'effet d'un stress salin a été examiné sur des microalgues d'eau douce comme *Chlorella vulgaris* YH703 (Yun et al., 2019) et *Desmodesmus abundans* (Xia et al., 2014) et des microalgues marines (Ho et al., 2014).

La salinité influence la croissance des cellules. Par exemple, la concentration en NaCl jusqu'à 45 mM a amélioré la production de biomasse de *Chlorella vulgaris* YH703, qui a ensuite été réduite jusqu'à -64.6% à 200 mM de NaCl (Yun et al., 2019).

La salinité impacte également la composition de la biomasse. Une charge plus élevée de NaCl tend à augmenter la part de lipides et de glucides, et à réduire celle des protéines. Après 6 jours, la teneur en lipides de *Desmodesmus abundans* est passée de 23.8% à 34.6% en passant de 0 à 20 g.L<sup>-1</sup> de NaCl dans l'étude menée par (Xia et al., 2014). A 500 mM de NaCl, la teneur en lipides a augmenté de 92.9% (Yun et al., 2019). En plus d'influencer la teneur totale en lipides, la salinité (ajout de NaCl jusqu'à 117 g/L) a augmenté la part de lipides neutres chez *Dunaliella tertiolecta* (Azachi et al., 2002). Un stress altère la synthèse des acides gras pour produire plus d'acide gras monoinsaturés qui représentent une grande partie des lipides neutres utilisés pour le biodiesel (Hu et al., 2008a).

Selon l'espèce et son habitat, la salinité optimale pour favoriser l'accumulation des lipides varie. Ainsi, ajuster la dose de NaCl avec l'intensité lumineuse constituerait un moyen simple

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

et relativement peu coûteux pour augmenter davantage la production de lipides (Minhas et al., 2016).

#### I.3.2. Les paramètres environnementaux

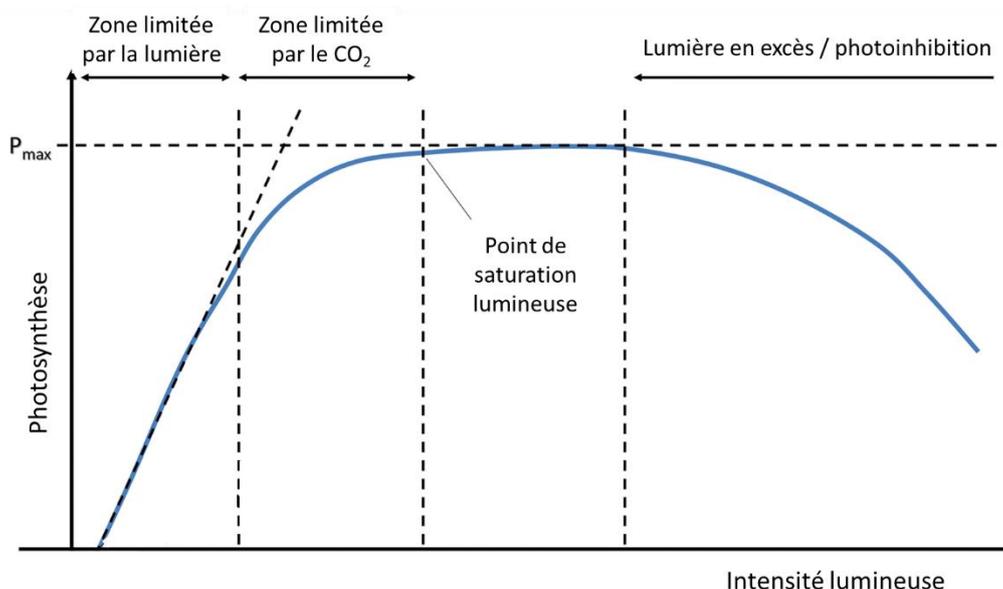
##### I.3.2.1. Le pH

L'influence du pH est complexe à déterminer car, elle s'étend à de nombreux facteurs : la forme chimique (spéciation) des nutriments, les mécanismes d'élimination liés, le métabolisme des microorganismes. Pendant la photosynthèse, le pH du CHRA augmente car les microalgues consomment le CO<sub>2</sub> plus vite qu'il n'est produit par les bactéries. A pH élevé, l'azote est éliminé par volatilisation comme ammoniac NH<sub>3</sub> et le phosphore peut précipiter en phosphates en général à pH 9-11 (voir paragraphes I.3.1.2. L'azote et I.3.1.3. Le phosphore) (Bunce et al., 2018).

Chaque espèce de microalgue a une gamme optimale de pH réduite, la majorité préférant un pH neutre (Lutzu, 2011). Des espèces se développant à des pH très bas ou très élevés ont aussi été recensées comme *Stichococcus bacillaris* ACUF158 et *Chlamydomonas acidophila* SAG 2045 cultivées à un pH<3 (Abiusi et al., 2022) ou encore *Chlorella sorokiniana* SLA-04 (Vadlamani et al., 2017). Les bactéries nitrifiantes ont un pH optimal entre 7.2 et 8.5, et elles peuvent s'adapter à un pH un peu plus basique ou un peu plus acide. En dessous de pH 6, la nitrification est inhibée (Deronzier et al., 2001).

##### I.3.2.2. La lumière

Basé sur une culture de microalgues, le fonctionnement du CHRA est très dépendant de la lumière. Le système est ainsi soumis aux variations météorologiques avec potentiellement un manque de lumière les jours de pluie et trop de lumière en été. Cette dépendance est liée aux microalgues, dont la force motrice de la photosynthèse est la lumière, en termes d'intensité et de longueur d'onde. Chez les microorganismes photosynthétiques, la cinétique de la photosynthèse augmente avec l'intensité lumineuse en raison de l'excitation accrue des électrons dans les photosystèmes (voir I.2.2.3. La structure des chloroplastes). Toutefois, au-delà d'une certaine intensité lumineuse, les photosystèmes deviennent saturés (saturation lumineuse) et la cinétique stagne. Pour des valeurs encore supérieures d'intensité lumineuse, où la vitesse de la photosynthèse chute, on parle de photo-inhibition (**Figure 26**).



**Figure 26.** Cinétique de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse (adapté de Benedetti et al., 2018)

Ainsi, la plupart des études sur l'influence de la lumière se concentrent sur l'intensité lumineuse et son optimisation qui varie selon les souches cultivées. En effet, certaines espèces croissent mieux sous de fortes intensités tandis que d'autres sont plus adaptées à des intensités modérées. Ainsi, la biomasse produite par *Desmodesmus* sp. a fortement augmenté avec l'intensité lumineuse, alors que les effets ont été plus modérés pour *C. vulgaris*, *S. obliquus* et *Ettlia pseudoalveolaris* (Nzayisenga et al., 2020). L'intensité lumineuse affecte également la composition biochimique des microalgues. Une hausse de l'intensité lumineuse a par exemple favorisé l'accumulation de lipides chez *Desmodesmus* sp. et *Scenedesmus obliquus* (Nzayisenga et al., 2020).

En plus de l'intensité lumineuse, le spectre lumineux a un effet sur le métabolisme des microalgues. En effet, les longueurs d'onde utilisées pour la photosynthèse s'étalent de 400 à 700 nm. Chaque espèce de microalgue absorbe différentes longueurs d'onde. Le principal pigment des microalgues vertes, la chlorophylle, absorbe la lumière dans les gammes 450-475 nm et 630-675 nm. Les caroténoïdes, une autre famille de pigments photosynthétiques, favorisent les longueurs d'onde entre 400-550 nm (Baer et al., 2016; Diaz-MacAadoo et al., 2022). Il est admis que la lumière rouge et la lumière bleue sont bénéfiques à la culture de microalgues en raison des pics correspondants au spectre d'absorption des algues (Baba et al., 2012; Baidya et al., 2021; Kim et al., 2013).

Au sein d'un CHRA, en fonction des conditions météorologiques (e.g. couverture nuageuse) et du mélange (forte lumière près de la surface et faible lumière loin de la surface), la biomasse n'est pas illuminée de manière uniforme (Sivakaminathan et al., 2020). Les gradients lumineux sont importants allant de niveaux photo-inhibiteur vers la surface, à des zones très sombres au sein de la culture. En effet, la lumière ne pénètre que les premiers centimètres du milieu (Kim et al., 2018). Le niveau d'eau dans le chenal a donc une influence (voir I.3.3.2. Le temps de

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

séjour hydraulique (TSH)). De plus, le phénomène est aggravé dans les cultures denses où les cellules sont soumises au phénomène d'auto-ombrage (Lucchetti, 2014).

La photosynthèse est gouvernée par deux réactions : la phase photochimique, qui est dépendante de la lumière, et la phase biochimique « sombre », qui est indépendante de la lumière. La phase dépendante de la lumière produit « l'ATP et la NADPH qui sont utilisés lors de la phase « sombre » pour synthétiser des molécules essentielles pour la croissance (Boutefas et al., 2006) » (voir I.2.2.2. Métabolisme : photosynthèse et assimilation). Ainsi, une exposition continue à la lumière peut être nocive pour les microalgues (Anderson, 2004). Dès lors, la durée du cycle jour/nuit est également à prendre en compte. 4 cycles jour/nuit de 8:16, 12:12, 16:8, et 24:0 ont été testés sur *C. vulgaris* et *Nannochloropsis* sp. Il a été conclu qu'une période jour/nuit de 16:8 était optimale pour la croissance algale (Gammanpila et al., 2015).

#### I.3.2.3. La température

Les diverses populations bactériennes et microalgales prospèrent dans des gammes de températures spécifiques. La température recommandée pour la croissance algale se situe entre 20-30°C (Eloka-Eboka and Inambao, 2017). Dépasser l'optimum thermique conduit à un stress thermique chez la cellule algale, qui peut réduire l'activité enzymatique, modifier des protéines photosynthétiques et, même, déclencher la production de protéines de stress (Nalley et al., 2018). Une étude de 26 espèces de microalgues montre que la réaction à la température varie selon les espèces, mais qu'au niveau des groupes, les cyanobactéries ont un optimum à (30.6 ± 2.3 °C), suivi par les chlorophytes (25.7 ± 0.1 °C) et les diatomées (24.0 ± 0.4 °C) (Nalley et al., 2018).

Une gamme similaire de température est préconisée pour les boues activées, notamment en ce qui concerne les bactéries autotrophes (nitrifiantes). Leur croissance est fortement impactée par la température avec une nitrification extrêmement ralentie sous 12°C. Au-delà de 35°C, on est susceptible d'observer une accumulation de nitrites liées à la croissance ralentie des bactéries oxydatrices des nitrites (Choubert, 2002).

La croissance du consortium étant affectée par la température, les performances de traitement des eaux usées sont aussi impactées. En extérieur, le CHRA est soumis aux changements de températures saisonniers, mais aussi entre le jour et la nuit. Actuellement, il n'y a pas d'études qui se concentrent sur l'influence de la température dans un CHRA, car les paramètres comme le TSH sont souvent modifiés pour pallier les changements saisonniers. De plus, les installations étant en extérieur, l'impact de la lumière est associé à celui de la température. Selon le climat, les variations de température saisonnières amènent à adapter les conditions opératoires avec par exemple des TSH plus longs en hiver et plus courts en été (Sutherland et al., 2020).

La température a également une influence importante sur la solubilité des différentes espèces chimiques. Ainsi, la solubilité de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans l'eau diminue avec l'augmentation de la température. A titre d'exemple, celle de l'oxygène dissous passe de 14.6

## Partie I : Bibliographie

mg.L<sup>-1</sup> à 0°C à 9.1 mg.L<sup>-1</sup> à 20°C. Cela peut donc affecter les phénomènes de transfert gaz-liquide.

### *1.3.2.4. Présence de prédateurs*

En tant que système ouvert, un chenal à haut rendement algal peut être contaminé par « des espèces qui supplantent l'espèce cultivée ou des prédateurs protozoaires qui broutent la biomasse (Cadoret and Bernard, 2008) ». Les protozoaires sont des microorganismes hétérotrophes avec des proies cibles bien distinctes, certains préférant les bactéries aux microalgues (Lampert and Sommer, 2007). Ainsi, s'il y a une compétition entre les microalgues et les bactéries pour les nutriments, l'action des protozoaires peut être bénéfique (Tejido-Nuñez et al., 2020). Cependant, dans les cultures de microalgues, le broutage par les ciliés, les amibes et autres zooplanctons constitue une problématique récurrente de plus en plus documentée (Day et al., 2017). Quand un milieu est très impacté par des prédateurs, le phénomène devient observable à l'œil nu avec une diminution de la coloration verte ou par une coloration brune de plus en plus intense à mesure que les microalgues meurent et que les prédateurs se développent (Day et al., 2017).

### **1.3.3. Les paramètres opérationnels**

Dans le fonctionnement d'un chenal, les principaux facteurs opérationnels sont la charge nutritive entrante, le temps de séjour hydraulique, la profondeur du chenal ainsi que la vitesse de mélange. La qualité du traitement des eaux usées recherchée ainsi que les conditions climatiques influencent le choix de ces paramètres. L'optimisation opérationnelle des CHRA pour une épuration efficace des eaux usées et une production de biomasse suffisante demeure encore un verrou, bien que ce type d'installation existe depuis plus de 50 ans (Sutherland et al., 2015a). En effet, il n'existe pas de guide de conception de référence concernant le traitement des eaux usées par microalgues.

#### *1.3.3.1. Le mélange*

Un mélange optimal améliore l'exposition de la biomasse à la lumière, empêche la sédimentation des cellules au fond du chenal et permet une distribution uniforme des nutriments (Meless Teshome, 2020a). Le mélange a principalement lieu à proximité de la roue à aubes et des virages. Le mélange vertical est un critère plus important que le mélange axial (Kumar et al., 2015). Toutefois, le mélange vertical est médiocre dans ces systèmes, en particulier dans les sections droites (Kumar et al., 2015). Il peut être amélioré en augmentant la vitesse de circulation au-delà des 0.15-0.3 m.s<sup>-1</sup> préconisés (Rupert Craggs et al., 2014). Mais, les contraintes de cisaillement excessives peuvent impacter les microalgues, entraînant une mortalité accrue, un taux de croissance et une viabilité cellulaire réduits, ou encore une lyse cellulaire (Muñoz and Guieysse, 2006).

Par conséquent, la technologie d'agitation doit être choisie pour maintenir un écoulement turbulent et limiter les contraintes de cisaillement (Rayen et al., 2019). La roue à aubes (**Figure 27**) est souvent préférée dans les chenaux, car elle permet une agitation relativement douce, efficace et peu coûteuse (Muñoz and Guieysse, 2006). Elle génère des tourbillons qui déplacent les algues du fond vers la surface (Kumar et al., 2015) et contribuent au mélange vertical. Cependant, la forme, l'alignement et le nombre de pales, la largeur et la longueur de la pale

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

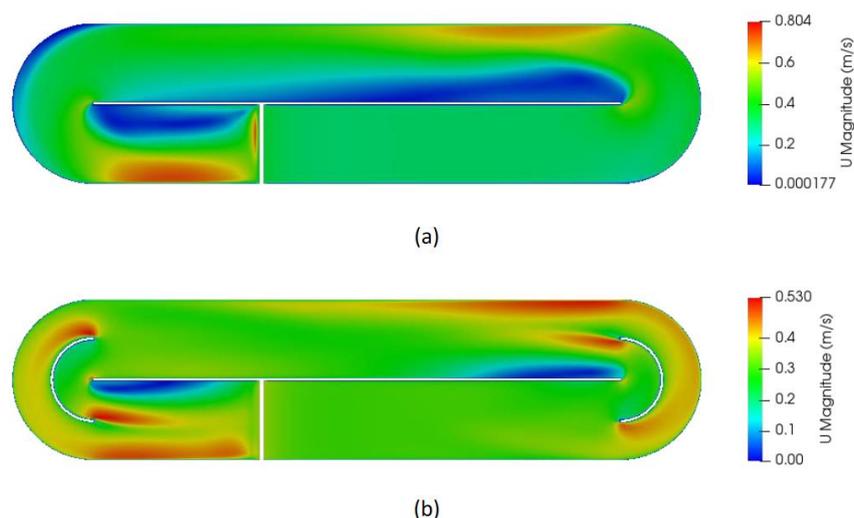
influencent grandement la vitesse d'écoulement et le transfert gaz-liquide d'oxygène (Hreiz et al., 2014). Pour une roue classique à pales rectangulaires, le jeu avec la surface libre varie avec le temps et le reflux. Pour réduire au minimum le jeu et le reflux, une lame doit toujours être immergée dans le liquide (Meless Teshome, 2020b). De la même manière, quand la partie immergée de la roue à aubes et la vitesse de rotation augmentent, le taux de transfert d'oxygène augmente tandis que l'efficacité d'aération diminue (Ahmad and Boyd, 1988). Il s'agit ainsi d'un élément de design important pour décider de la profondeur du liquide pour un diamètre de roue à aubes donné avec un certain nombre de pales (Meless Teshome, 2020b).

L'optimisation de la dynamique des fluides au sein du chenal peut diminuer la formation de « zones mortes » (Rayen et al., 2019). Ces zones mortes, qui dépendent de la géométrie et du mélange, peuvent provoquer des conditions anaérobies avec une libération de composés toxiques pour les microalgues. Un déflecteur (voir I.1.3. Le chenal à haut rendement algal (CHRA)) peut être ajouté à chaque extrémité du chenal pour égaliser le débit et diminuer la contrainte de cisaillement ainsi que les zones mortes dans le bassin. Malgré les améliorations apportées, les déflecteurs augmentent la consommation en énergie avec la friction ; leur implémentation doit donc être réfléchi (Mendoza et al., 2013).



**Figure 27.** Exemple de roue à aubes (Pappalardo, 2018)

Afin d'étudier ces impacts et optimiser l'hydrodynamique du système, la CFD (computational fluid dynamics/mécanique des fluides numérique) permet de simuler l'écoulement des fluides dans des conditions spécifiques définies aux limites du système. Le domaine fluide est discrétisé par l'intermédiaire d'un maillage. Les équations fondamentales (lois de conservation de la masse, de la quantité de mouvement et du transfert de chaleur) sont intégrées à l'aide d'algorithmes de discrétisation sur chaque cellule (Meless Teshome, 2020a). La CFD a montré qu'un rapport (Longueur/largeur) $>10$  donnait de meilleurs résultats en termes d'uniformité de vitesse et de contrainte de cisaillement (Hadiyanto et al., 2013). La modélisation du CHRA avec et sans déflecteurs (**Figure 28**) a également mis en évidence qu'ils réduisaient les zones mortes et uniformisaient l'écoulement (Meless Teshome, 2020).



**Figure 28.** Profils de vitesse sur une section horizontale dans le CHRA sans déflecteur (a) et avec déflecteur (b)

### 1.3.3.2. Le temps de séjour hydraulique (TSH)

Le temps de séjour hydraulique (TSH) correspond à :

$$TSH = \frac{Volume}{Débit\ entrée} = \frac{Hauteur * Surface}{Débit\ entrée}$$

#### Équation 8

Avec : le TSH en j, le volume en m<sup>3</sup>, le débit d'entrée en m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup>, la hauteur en m et la surface en m<sup>2</sup>

Pour un réacteur donné, le TSH peut être rectifié en modifiant la hauteur d'eau ou le débit d'entrée. La hauteur d'eau détermine aussi l'exposition de la culture à la lumière tandis que le débit d'entrée détermine la charge en matière organique et en nutriments que le système traite.

Pour une dépollution efficace, un temps de séjour hydraulique (TSH) entre 4 et 10 jours est préconisé (Local Government Association of South Australia, 2020). En hiver, des TSH plus longs (7-9 jours) sont choisis pour pallier une productivité plus faible et assurer un traitement efficace. En été avec des conditions plus favorables, des TSH courts (3-4 jours) sont privilégiés pour améliorer la productivité de la biomasse (Rupert Craggs et al., 2014). Toutefois, des TSH plus courts augmentent la charge nutritive en entrée du chenal, ce qui peut affecter les performances d'assainissement malgré une productivité algale plus élevée (Sutherland et al., 2014).

Une solution proposée pour maintenir les rendements épuratoires avec des TSH courts (équivalents à une charge élevée en nutriments) est d'opérer avec des CHRA en série. Deux lagunes en série (TSH de 4 j chacune) ont produit 191±41 kgMVS.j<sup>-1</sup> et ont traité une charge de 23±4 kg.j<sup>-1</sup> d'azote total inorganique dissous. Dans les mêmes conditions, un seul chenal (TSH de 8 j) a produit 127±18 kgMVS.j<sup>-1</sup> et a traité une charge de 17±4 kg.j<sup>-1</sup> d'azote total inorganique dissous (Sutherland et al., 2020).

### I.3. Les facteurs influençant le consortium microalgues-bactéries

Dans la thèse de (Pham, 2018) effectuée sur le même chenal que la présente thèse, des TSH de 4 et 8 j ont été testés dans le CHRA. Un TSH plus important a amélioré l'abattement de la DCO, et de façon plus modérée, l'élimination de l'azote de Kjeldahl. Toutefois, la hausse du TSH a pénalisé le traitement du phosphore (**Tableau 8**).

TSH	DCO (%)	NTK (%)	NGL (%)	PT (%)
4 jours	49.0 ± 25.2	78.9 ± 9.3	12.4 ± 16.0	13.9 ± 13.6
8 jours	75.0 ± 9.7	84.2 ± 9.8	1.0 ± 2.9	4.7 ± 7.9

**Tableau 8.** Abattement de la DCO, NTK, NGL et PT en fonction du TSH (Pham, 2018)

Ensuite, une concentration de biomasse à  $4.0 \pm 0.5 \text{ mgMES.L}^{-1}$  a été atteinte avec un TSH de 8 j contre  $2.5 \pm 0.4 \text{ mgMES.L}^{-1}$  avec un TSH de 4 j. Cependant, la productivité de la biomasse est demeurée stable ( $47 \text{ g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ ).

#### 1.3.3.3. L'âge des boues (ADB)

L'âge des boues (ADB) est défini comme le temps de séjour moyen de la biomasse dans le système :

$$ADB = \frac{\text{Biomasse présente}}{\text{Biomasse extraite}}$$

#### Équation 9

Avec : l'ADB en j, la biomasse présente en g, la biomasse extraite en  $\text{g.j}^{-1}$

Au sein d'un chenal où la biomasse est extraite du réacteur sans décantation préalable (épaississement), on peut alors en déduire :

$$ADB = \frac{MES * Volume}{MES * Débit extraction} = \frac{Volume}{Débit extraction} = \frac{Hauteur * Surface}{Débit extraction}$$

#### Équation 10

Avec : l'ADB en j, le volume en  $\text{m}^3$ , le débit d'extraction en  $\text{m}^3.\text{j}^{-1}$ , MES la concentration en MES de la suspension en  $\text{g.m}^{-3}$ , la hauteur en m et la surface en  $\text{m}^2$

L'âge des boues varie si la hauteur d'eau ou le débit d'extraction des boues (biomasse) sont modifiés. Sans recyclage de biomasse décantée en sortie du chenal, le débit d'extraction correspond au débit de sortie de l'eau traitée : l'ADB est alors égal au TSH. Si une extraction distincte est prévue, il convient de prendre en compte le débit d'extraction spécifique dans le bilan.

En génie des bioprocédés, l'ADB est lié au taux de croissance minimal des microorganismes et a un impact direct sur les espèces présentes : les populations (dominantes ou non) de microorganismes dépendent de l'ADB. Ainsi, la vitesse de croissance maximale des microalgues est estimée à  $1.5 \text{ j}^{-1}$  ( $25^\circ\text{C}$ ) (Gujer et al., 1999). La vitesse de croissance des bactéries nitrifiantes trouvée dans les boues activées est évaluée à  $0.63 \text{ j}^{-1}$  pour les AOB et  $1.1 \text{ j}^{-1}$  pour les NOB ( $20^\circ\text{C}$ ) (Gujer et al., 1999).

## Partie I : Bibliographie

En jouant sur les espèces présentes, l'ADB influence directement les performances épuratoires. Dans un CHRA avec un TSH de 6 j, un ADB plus important (6 à 12 j) a amélioré l'abattement du  $\text{N-NH}_4^+$  ( $89.1 \pm 6.6\%$  à  $98.2 \pm 2.0\%$ ),  $\text{P-PO}_4^{3-}$  ( $27.1 \pm 16.1\%$  à  $52.3 \pm 3.6\%$ ) et n'a pas influencé l'élimination de la DCO ( $89.1 \pm 6.6\%$  à  $91.9 \pm 2.3\%$ ) (Buitrón and Coronado-Apodaca, 2022).

De manière indirecte, l'ADB impacte la structure et les propriétés de sédimentation des floes de microalgues et de bactéries. Ainsi, un ADB plus important a été corrélé avec une vitesse de décantation plus rapide (Buitrón and Coronado-Apodaca, 2022). Une croissance rapide est associée à une charge de surface négative plus élevée qui empêche la biofloculation et la sédimentation (Valigore et al., 2012). La charge de surface des microalgues diminue pendant la phase de croissance stationnaire (Henderson et al., 2008), qui est une phase de croissance associée à des ADB plus longs.

**L'optimisation d'un CHRA en termes de traitement des eaux usées et de production de biomasse pour sa valorisation est réalisé en faisant varier différents paramètres plus ou moins maîtrisables en fonction des contextes. Pour une application sur site réel avec un affluent constitué d'eaux usées, il s'agira avant tout de définir le TSH et l'ADB adéquat en fonction des conditions de luminosité et de température. On pourra aussi jouer sur la profondeur qui modifiera aussi le TSH voire l'ADB.**

**La disponibilité du carbone (minéral et organique), de l'azote et du phosphore ainsi que d'autres micronutriments sont des modalités à évaluer, par exemple à travers les charges/concentrations à traiter.**

**Enfin, le comportement hydrodynamique au sein du chenal n'est pas un paramètre à négliger et peut significativement impacter la productivité et le bilan énergétique du système, notamment via l'influence sur l'exposition des cellules à la lumière et le transfert gaz-liquide.**

## I.4. La caractérisation de la biomasse

Si la biomasse produite dans les CHRA doit être valorisée, connaître sa composition est essentiel pour orienter le choix de conversion. La composition biochimique se résume en trois grandes classes de biomolécules : les protéines, les glucides et les lipides.

### I.4.1. La composition biochimique

La biomasse produite dans les CHRA est un mélange d'algues, de bactéries et de détritux accumulés. Elle est peu analysée, mais est typiquement composée de 70-90% d'algues (R Craggs et al., 2014). Le contenu énergétique de la biomasse dépend de la proportion de bactéries (17-22 kJ.g<sup>-1</sup>) et de microalgues (18-24 kJ.g<sup>-1</sup>), mais également de la composition des microalgues en protéines (24 kJ.g<sup>-1</sup>), en glucides (17 kJ.g<sup>-1</sup>) et en lipides (37 kJ.g<sup>-1</sup>). Il est possible d'augmenter la valeur énergétique en favorisant le ratio d'algues ou la fraction de lipides (Mehrabadi et al., 2017)

Les microalgues sont constituées de protéines (acides aminés), de lipides (acides gras), de glucides (carbohydrates ou sucres) et de pigments. La composition dépend de l'espèce et des conditions de culture (**Tableau 9**). Les principaux nutriments requis sont le carbone C, l'azote N et le phosphore P. Les besoins nutritionnels peuvent être estimés avec la formule chimique de la biomasse microalgale de Grobbelaar CO<sub>0.48</sub>H<sub>1.83</sub>N<sub>0.11</sub>P<sub>0.01</sub> (Grobbelaar, 2004). Dans un environnement favorable, le carbone photosynthétique dans les microalgues produit 30 à 50% de protéines, 20 à 40% de glucides et 8 à 15% de lipides (Wang et al., 2013).

Espèce	Protéines (%)	Glucides (%)	Lipides (%)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15	3

**Tableau 9.** Composition en protéines, glucides et lipides de différentes espèces de microalgues (% de matière sèche) (Trivedi et al., 2015)

## Partie I : Bibliographie

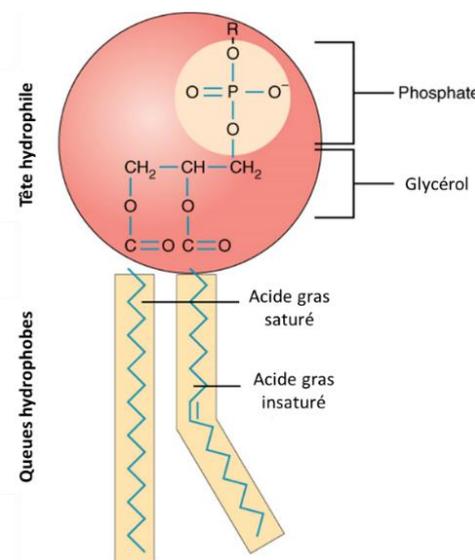
Les méthodes simples employées pour déterminer la composition sont souvent basées sur des travaux menés dans les années 50 (Bligh and Dyer, 1959; Dubois et al., 1956; Lowry et al., 1951), et certaines ont bénéficié d'améliorations et d'adaptations. Toutefois, peu d'études comparent rigoureusement chaque protocole (Laurens et al., 2012a). Il n'existe pas de procédure analytique standard pour la biomasse algale. Les compositions rapportées peuvent ainsi être trompeuses en raison d'une sous- ou surestimation des lipides, glucides ou protéines. Aussi, l'analyse d'une biomasse algale par huit chercheurs indépendants suivant un protocole standardisé a abouti à des résultats significativement différents (Laurens et al., 2012a).

### 1.4.1.1. Lipides

#### 1.4.1.1.1. Origine et rôle dans les cellules

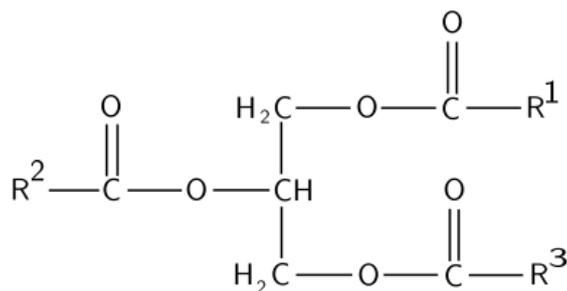
Les lipides sont des molécules organiques difficilement classables qui ont la caractéristique d'être insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme le benzène et le chloroforme. Ils englobent les graisses, les stérols, les mono-, di- et triglycérides et les phospholipides (Sizer and Whitney, 2013). Chez les microalgues, on distingue (Menegazzo and Fonseca, 2019) :

- les lipides membranaires (polaires ou hydrophiles avec une affinité pour l'eau et les solvants polaires) : les phospholipides (**Figure 29**) et les glycolipides ;

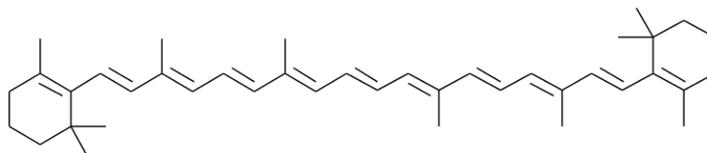


**Figure 29.** Structure d'un phospholipide (adapté en français) (OpenStax, 2016)

- les lipides de réserve (neutres et apolaires/hydrophobes, soit insolubles dans l'eau) : les triglycérides (TAG) (**Figure 30**) servant de réserve d'énergie à la cellule, les glycérides, les caroténoïdes (**Figure 31**) et les stérols.



**Figure 30.** Structure d'un triglycéride (Lennert, 2005)



**Figure 31.** Structure du B-carotène

La teneur en lipides des microalgues est typiquement comprise entre 20 et 50% (matière sèche) (Chisti, 2007), mais peut atteindre 90% (matière sèche) sous certaines conditions (Metting, 1996). Il est possible d'augmenter la teneur en lipides et plus spécifiquement en triglycérides par une limitation de l'apport en azote ou une augmentation de l'intensité lumineuse. Cependant, ces facteurs de stress ne peuvent pas être maintenus sur le long terme, car « ils mènent à un arrêt de la croissance, puis, après un laps de temps, à la reconsommation des lipides produits (Cadoret and Bernard, 2008). » Un équilibre entre croissance (donc sans carence) et production de lipides (avec un stress ralentissant la croissance) doit être étudié (Cadoret and Bernard, 2008).

Les méthodes les plus employées pour quantifier les lipides sont les méthodes gravimétriques (Bligh and Dyer, 1959), la chromatographie en phase gazeuse, la spectrophotométrie (Mishra et al., 2014), la spectrométrie de fluorescence avec un colorant lipophile (Chen et al., 2009; Elsey et al., 2007).

#### 1.4.1.1.2. Gravimétrie

La gravimétrie consiste en une extraction des lipides avec un solvant (en général des solvants organiques ou chlorés comme l'hexane ou le chloroforme) sur de la biomasse sèche. Les lipides étant polaires et apolaires, l'efficacité de l'extraction dépend de la polarité du solvant (Laurens et al., 2012a). D'autres composants (la chlorophylle, les pigments, les protéines et les glucides solubles) peuvent contaminer les lipides extraits et fausser les résultats. Après évaporation du solvant, le poids des lipides extraits est relevé pour déterminer la teneur en lipides.

Une quantité importante de biomasse et un séchage sont requis. L'utilisation de solvants dangereux comme le chloroforme et le méthanol soulève des questions par rapport à la sécurité et à l'environnement. Toutefois, cette méthode est rapide et ne nécessite pas d'instruments de mesure avancés (Laurens et al., 2012a). Elle peut être appliquée pour la transestérification des lipides en esters méthyliques d'acides gras qui peuvent être analysés par chromatographie en phase gazeuse (Biller and Ross, 2014; Lang et al., 2011; Pantami et al., 2020), par spectrométrie de masse (Danielewicz et al., 2011), par chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

(Donot et al., 2013; MacDougall et al., 2011) ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Sarpal et al., 2015). Ces techniques analytiques permettent une caractérisation plus poussée, mais les étapes d'extraction et de transestérification sont nombreuses et nécessitent un temps considérable (Elsey et al., 2007).

### 1.4.1.1.3. Spectrométrie de fluorescence

Il est possible de réduire la quantité d'échantillon et le temps de préparation par une mesure *in situ* des lipides des cellules (Elsey et al., 2007), notamment par fluorescence en ajoutant un colorant lipophile comme le rouge du Nil (Cooksey et al., 1987). La paroi cellulaire épaisse et rigide complique l'entrée du colorant dans les microalgues, ce qui nécessite l'appui d'un solvant comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Chen et al., 2009). Même si une corrélation a été établie entre la fluorescence et la teneur totale en lipides des microalgues (Alonzo and Mayzaud, 1999; Cooksey et al., 1987), la prudence est recommandée dans l'interprétation de la grandeur (Cooper et al., 2010). L'efficacité de perméation du colorant dépend des souches car l'épaisseur membranaire varie d'une espèce à l'autre. Les colorants fluorescents sont également sensibles au photoblanchiment (perte de fluorescence) lors d'une exposition à la lumière. Ainsi, la détermination par fluorescence est au mieux une analyse qualitative et n'est pas une méthode très efficace pour quantifier les lipides (Mishra et al., 2014). Pour une mesure plus précise, une courbe d'étalonnage est construite : l'intensité de fluorescence est corrélée à la teneur en lipides intracellulaires préalablement déterminée par gravimétrie ou chromatographie qui nécessite, comme abordé au paragraphe précédent, une extraction des lipides neutres avec des solvants dangereux (Bertozzini et al., 2011). Il est aussi possible d'étalonner en diluant un étalon, mais la procédure est peu fiable car il faut considérer « les interférences de fluorescence causées par le milieu algal et/ou les pigments et la chlorophylle (Bertozzini et al., 2011) ». Un « blanc » commun à toutes les biomasses algales est impossible, car le milieu où « les microalgues sont remises en suspension est variable en fonction de l'âge cellulaire, des cellules mortes, des substances sécrétées et de la salinité (Bertozzini et al., 2011) ».

### 1.4.1.1.4. Spectrophotométrie

Le dosage par la sulfo-phospho-vanilline (SPV) a été développé pour la première fois en 1937 par Chabrol et Charonnat (Chabrol and Charonnat, 1937) pour mesurer les lipides dans le sérum et a ensuite été modifié dans plusieurs travaux de recherche (Drevon and Schmit, 1964; Frings and Dunn, 1970). Il a aussi été adapté pour permettre une analyse à haut débit de petits échantillons à l'aide d'un lecteur de microplaques (Cheng et al., 2011; Inouye and Lotufo, 2006). Il se compose de deux étapes :

- une première réaction entre les lipides et l'acide sulfurique concentré à haute température (hydrolyse) ;
- une seconde réaction entre les produits dérivés et la vanilline avec de l'acide phosphorique (Anschau et al., 2017) suivie d'une mesure d'absorbance à 530 nm.

Concernant le mécanisme réactionnel, (Knight et al., 1972) a proposé la formation d'un ion carbonium (carbocation alkyle  $[-CH_2-C^+H-]$ ) lorsque les lipides insaturés réagissent avec l'acide sulfurique. (Johnson et al., 1977) ont suggéré un carbocation alcényle  $R_1-C^+H-$

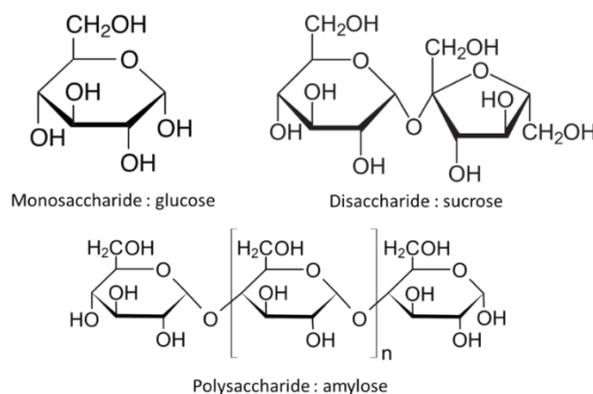
$\text{CH}=\text{CH}-\text{R}_2$  comme produit intermédiaire. Il est généralement admis que la présence d'une double liaison carbone-carbone est nécessaire pour que la réaction se produise. Cependant, des recherches supplémentaires sont requises car les composés saturés tels que les cérides et les triglycérides (TAG) ont réagi de manière inattendue (McMahon et al., 2013). Le protocole peut s'appliquer sur biomasse fraîche ou lyophilisée. Il ne requiert qu'une faible quantité d'échantillon, peu de temps (environ 1 h) et ne nécessite pas de solvants organiques (Anschau et al., 2017). L'un des intérêts majeurs est la faible spécificité : divers lipides peuvent être identifiés si des standards appropriés sont utilisés (McMahon et al., 2013).

(Mishra et al., 2014) ont adapté la méthode pour quantifier rapidement les lipides dans les microalgues. Les teneurs en lipides de cinq espèces obtenues par dosage à la SPV ont été comparées à celles obtenues par extraction et transestérification des lipides (Bligh and Dyer, 1959) suivies d'une chromatographie en phase gazeuse. Les valeurs étaient similaires avec des écarts inférieurs à 5% (Mishra et al., 2014). Le protocole est à présent largement appliqué pour surveiller la teneur en lipides et évaluer l'influence des conditions de culture sur la production de lipides (Gao et al., 2019; Hernández-García et al., 2019; Rodas-Zuluaga et al., 2021). Malgré l'acceptation générale, il manque des données de validation appropriées pour cette méthode avec la biomasse. Seul (Anschau et al., 2017) a proposé une validation basée sur plusieurs critères dont la limite de détection. La robustesse de la méthode a été évaluée à l'aide d'un plan factoriel incluant trois variables : le volume de SPV, le temps de réaction et la température. Les effets de matrice ont également été étudiés par ajouts dosés d'étalon dans des échantillons de biomasse.

#### 1.4.1.2. Glucides

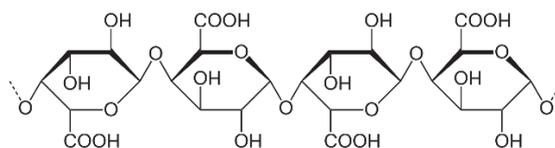
##### 1.4.1.2.1. Origine et rôle dans la cellule

Les glucides sont des molécules organiques composées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène de formule générique  $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$  classées en trois catégories (**Figure 32**) : les monosaccharides, les disaccharides et les polysaccharides. Les monosaccharides ou oses sont les sucres les plus simples avec trois à sept atomes de carbone et ne sont pas hydrolysables. Les disaccharides sont des combinaisons de deux monosaccharides. Les polysaccharides sont des combinaisons de plusieurs monosaccharides.



**Figure 32.** Structure du glucose (Yikrazuul, 2009), du sucrose (NEUROtiker, 2007) et de l'amylose (Mattern, 2009)

Selon leur fonction et leur place dans la cellule, les glucides peuvent être trouvés dans les plastides comme réserve (par exemple l'amidon) ou les membranes (Ho et al., 2013) ou encore être sécrétés comme exopolysaccharides (EPS). La membrane extérieure de la cellule varie d'une espèce à l'autre, mais est généralement composée de polysaccharides comme la pectine (**Figure 33**), l'agar et l'alginate. L'intérieur de la membrane des microalgues contient en majorité de la cellulose et d'autres composants comme l'hémicellulose et les glycoprotéines (Yamada and Sakaguchi, 1982). Les EPS produits, souvent appelés mucilages, servent en théorie de protections face aux fluctuations environnementales (Laroche, 2022). (Hongpattarakere et al., 2012) ont supposé que les EPS produits pendant la croissance protégeaient les microalgues de la dessiccation. Comme pour les lipides et les protéines, la synthèse et la production des glucides dépend de l'espèce de microalgue et des conditions de culture avec la température, la lumière, la disponibilité des nutriments. Sous stress, « le carbone des microalgues est alloué à des composés riches en énergie comme les lipides et les glucides (Ho et al., 2013). » La production de glucides, favorisée par un stress comme une carence en nutriments, impacte toutefois la croissance algale. Ainsi, un compromis doit être trouvé entre production de biomasse et de glucides (Chen et al., 2013).



**Figure 33.** Structure de la pectine (NEUROtiker, 2008)

#### 1.4.1.2.2. Analyse

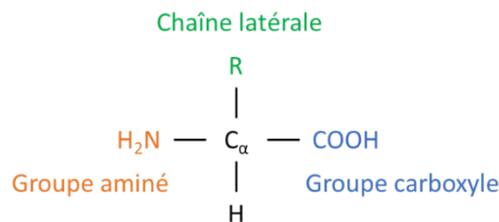
L'analyse des glucides repose en majorité sur des dosages colorimétriques avec la méthode à l'antrone (Yemm and Willis, 1954), la méthode phénol-acide sulfurique (Dubois et al., 1956), la méthode au résorcinol (Monsigny et al., 1988) et la méthode au MBTH (Dean Pakulski and Benner, 1992). Chaque protocole commence par l'ajout d'un acide fort (acide chlorhydrique ou sulfurique) pour hydrolyser les polysaccharides en monosaccharides. Les sucres simples sont ensuite déshydratés par l'acide : les pentoses (sucres avec 5 carbones) sont convertis en furfural, et les hexoses (sucres avec 6 carbones) en 5-hydroxyméthylfurfural. Ces dérivés forment avec un réactif (antrone, phénol ou résorcinol) un complexe coloré (Sørensen et al., 2018) dont l'absorbance est mesurée à 490 nm pour le phénol (Dubois et al., 1956), 520 nm pour le résorcinol (Monsigny et al., 1988), 630 nm pour l'antrone (Yemm and Willis, 1954) et 635 nm pour le MBTH (Dean Pakulski and Benner, 1992). En général, le glucose est utilisé comme étalon.

La méthode de Dubois est la plus utilisée à ce jour, car elle est peu coûteuse et produit une couleur stable comparé aux dosages de l'antrone et du résorcinol (Sørensen et al., 2018). La procédure a été appliquée à des microalgues (Ho et al., 2013; Laurens et al., 2012a; Templeton et al., 2012). Les lipides, les protéines et les pigments peuvent interférer et causer une sur ou sous-estimation (Templeton et al., 2012). Le dosage au MBTH (complexe bleuté) a été repris et testé sur de la biomasse algale (Van Wychen and Laurens, 2016), des microalgues marines (Mayers et al., 2018) et des algues rouges, vertes et marrons de Suède (Olsson et al., 2020). Les protéines n'interfèrent pas avec cette technique (Anthon and Barrett, 2002).

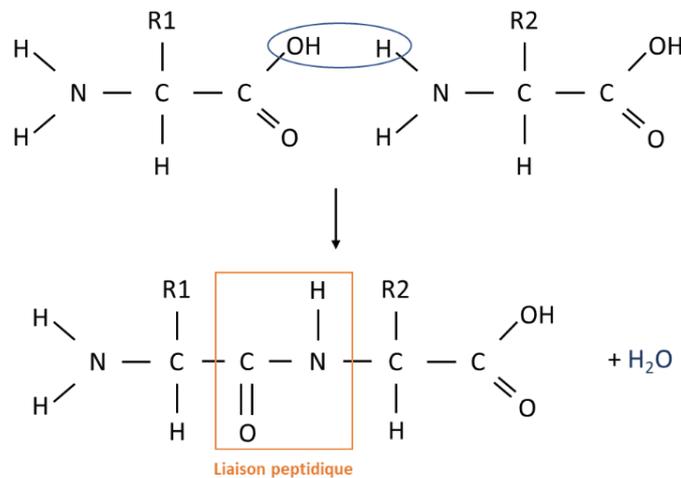
## I.4.1.3. Protéines

## I.4.1.3.1. Origine et rôle dans la cellule

Les protéines sont constituées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés reliées par des liaisons peptidiques covalentes. Les protéines sont aussi appelées polypeptides (Alberts et al., 2002). Il y a 20 types d'acides aminés dans les protéines en proportions variables à l'exception de la gélatine (National Research Council (US) Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowances, 1989). Un acide aminé est composé d'un atome de carbone central ( $C_{\alpha}$ ) relié à un groupe aminé ( $-NH_2$ ), un groupe carboxyle ( $-COOH$ ), un groupe latéral et un atome d'hydrogène (**Figure 34**). Lors de la déshydratation, les groupes aminés et carboxyle de deux acides aminés réagissent pour former une liaison peptidique et une molécule d'eau (**Figure 35**). Les chaînes latérales permettent une classification des acides aminés : polaires, apolaires, chargés, non chargés, avec un cycle aromatique (Alberts et al., 2002).



**Figure 34.** Schéma simplifié d'un acide aminé (Alberts et al., 2002)



**Figure 35.** Formation d'une protéine à partir de deux acides aminés (Alberts et al., 2002)

Les protéines sont trouvées dans différentes parties de la cellule comme le cytoplasme, le chloroplaste, les organelles et la membrane (Safi et al., 2015). Le pyrénoïde est un complexe protéique responsable de la fixation photosynthétique du dioxyde de carbone via l'enzyme Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) (Amorim et al., 2021).

## I.4.1.3.2. Analyse

Avant analyse, un prétraitement physique ou chimique est nécessaire pour extraire complètement les protéines. Elles peuvent ensuite être caractérisées par des méthodes

colorimétriques (Bradford, 1976; Lowry et al., 1951) ou par analyse des protéines brutes via la teneur en azote : « La teneur en protéines peut être estimée en multipliant la teneur en azote par 6.25. Ce facteur suppose que la teneur en azote des protéines est de 16% (Mariotti et al., 2008) ». Cependant, les protéines ont des teneurs en azote variables en raison de compositions différentes en acides aminés. De plus, les microalgues ont d'autres composants azotés comme les pigments, les acides nucléiques, les acides aminés libres et l'azote inorganique (nitrate, nitrite et l'ammoniac), ce qui mène à une surestimation des protéines (Barbarino and Lourenço, 2005). Les facteurs de conversion pour des macroalgues et des microalgues ont été situés entre 3.75 et 5.72 (Lourenço et al., 2004, 2002). Une comparaison du dosage colorimétrique (Lowry et al., 1951) et d'une analyse élémentaire CHNS multipliée par un facteur de 4.78 (Lourenço et al., 2004) a été appuyée par une analyse des acides aminés. « La conversion par 4.78 donne une meilleure approximation de la teneur en protéines comparé à la méthode de Lowry qui surestime le contenu en protéine de 45% (Laurens et al., 2012b) ».

« Les dosages colorimétriques reposent sur l'apparition d'un chromophore résultant soit de la liaison d'un colorant à une protéine, soit de la protéine impliquée dans une réaction d'oxydoréduction (González López et al., 2010). » Selon (Lowry et al., 1951), les protéines réagissent avec un premier réactif cuivrique alcalin (réactif de Lowry), puis avec le réactif de Folin-Ciocalteu composé de tungstate de sodium et de molybdate de sodium dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique (Villay, 2013). Les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) sont réduits et forment un complexe coloré bleu foncé dont l'absorbance est mesurée à 750 nm. Le bleu de Coomassie change de couleur quand il se lie avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés hydrophobes dans les protéines. La liaison est le résultat des forces de van der Waals et d'interactions hydrophobes (Compton and Jones, 1985). La forme cationique (libre) du colorant est rouge. La forme anionique (liée à une protéine) est bleue. La mesure d'absorbance se fait à 595 nm (Bradford, 1976). Les détergents, les flavonoïdes et des tampons protéiques basiques peuvent interférer (Compton and Jones, 1985). L'accessibilité des protéines et des acides aminés aromatiques au réactif de Folin ainsi que la pertinence de l'albumine de sérum bovin comme étalon ont montré les limites de ces techniques (Laurens et al., 2012a). Des composants peuvent parasiter les mesures par une augmentation ou une diminution de l'absorbance, car ils inhibent certains réactifs. La précipitation des protéines par ajout d'acide trichloracétique (TCA) permet de limiter ce phénomène (Barbarino and Lourenço, 2005).

### **I.4.2. L'activité biologique**

Dans cette thèse, la respirométrie est employée pour caractériser de manière plus poussée l'activité du consortium microalgues-bactéries. Elle permet de distinguer le rôle des microalgues et des populations bactériennes dans la production et la consommation d'oxygène.

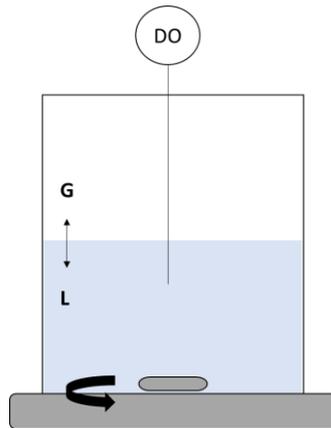
#### *I.4.2.1. Respirométrie*

##### *I.4.2.1.1. Généralités*

En traitement des eaux usées, les boues activées constituent une suspension floculée de matière organique et d'une population de microorganismes aérobie qui dégradent divers substrats via différents processus. La pollution biodégradable est majoritairement éliminée par oxydation.

Ainsi, la cinétique de consommation d'oxygène de la biomasse est un paramètre essentiel pour caractériser les boues activées et la réduction de la matière biodégradable (Spanjers, 2008).

La respirométrie se base sur la mesure d' $O_2$  dans la phase liquide. Le respiromètre est défini par la phase liquide, qui contient la biomasse, et la phase gazeuse, parfaitement mélangées (Loosdrecht et al., 2016). On trouve différents dispositifs plus ou moins complexes dans la littérature, mais un respiromètre peut consister en une simple enceinte agitée à température constante avec une sonde oxygène galvanique ou optique (**Figure 36**). La technique est simple à mettre en œuvre et peut durer de quelques minutes à plusieurs heures (Mainardis et al., 2021).



**Figure 36.** Schéma d'un respiromètre simple

Le système peut être ouvert ou fermé. Dans ce travail, on s'intéresse à la configuration fermée. Un échantillon de boues activées est prélevé et introduit dans un réacteur fermé aéré. Lors des essais respirométriques, différents protocoles sont appliqués avec variation des apports en substrat et de l'aération.

Dans le réacteur fermé, le bilan global en oxygène s'exprime de la manière suivante :

$$\frac{dO_2}{dt} = OTR - OUR$$

**Équation 11**

Où  $O_2$  est la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide ( $mg.L^{-1}$ ),  $t$  est le temps en secondes, OTR (Oxygen Transfer Rate) est le terme associé au transfert d'oxygène gaz-liquide ( $mg.L^{-1}.s^{-1}$ ) et OUR (Oxygen Uptake Rate) est le terme associé à la consommation d'oxygène par la biomasse ( $mg.L^{-1}.s^{-1}$ ). OTR peut être détaillé comme suit :

$$OTR = K_{la} * (O_{2,sat} - O_2)$$

**Équation 12**

Où  $K_{la}$  est le coefficient de transfert d'oxygène ( $s^{-1}$ ),  $O_{2,sat}$  est la concentration en oxygène dissous à saturation durant l'essai ( $mg.L^{-1}$ ) et  $O_2$  est la concentration en oxygène dissous ( $mg.L^{-1}$ ). La concentration à saturation  $O_{2,eq}$  peut être obtenue en aérant un milieu constitué d'eau claire jusqu'à atteindre une valeur d'oxygène dissous constante.

Ainsi, l'Équation 11 devient :

$$\frac{dO_2}{dt} = K_{la}(O_{2,sat} - O_2) - OUR$$

**Équation 13**

#### 1.4.2.1.2. Respiration endogène et exogène

Le terme OUR se sépare en deux composantes :  $OUR_{endo}$  (vitesse de consommation endogène) et  $OUR_{exo}$  (vitesse de consommation exogène).

$$OUR = OUR_{endo} + OUR_{exo}$$

**Équation 14**

En respirométrie, il y a une distinction entre respiration *endogène* et *exogène*. La respiration endogène est définie comme la consommation d'oxygène des microorganismes en l'absence de substrat. Les cellules utilisent alors leurs propres réserves, impliquant des phénomènes de décès et de lyse.

Lors de la respiration exogène, un composé qui perd des électrons est oxydé, et un composé qui gagne des électrons est réduit. Un composé carboné (organique) est oxydé en  $CO_2$ . L'oxygène est réduit en eau. L'oxydation d'un composé organique est réalisée par des bactéries hétérotrophes. Dans le cas de composés inorganiques comme l'ammonium  $NH_4^+$  et les nitrites  $NO_2^-$ , il est question de bactéries autotrophes où le  $CO_2$  dissous est la source de carbone. Elles sont désignées comme AOB (Ammonia Oxydizing Bacteria) et NOB (Nitrite Oxydizing Bacteria) (voir paragraphe I.2.1.1. Les métabolismes bactériens). L'énergie libérée pendant la respiration est utilisée pour « la croissance cellulaire et les fonctions de maintenance comme la reproduction, la mobilité cellulaire, l'activité osmotique, etc., le taux de respiration est lié au taux de ces processus (Loosdrecht et al., 2016) ».

L'Équation 13 devient alors :

$$\frac{dO_2}{dt} = K_{la}(O_{2,eq} - O_2) - OUR_{endo} - OUR_{exo}$$

**Équation 15**

#### 1.4.2.1.3. Résolution du bilan massique en oxygène

Dans un respiromètre simple, fermé (*batch*) et sans ajout de substrat, l'aération est mise en route jusqu'à ce que le milieu soit saturé en oxygène, puis elle est coupée pour obtenir la courbe de décroissance de la concentration en oxygène dissous (Spanjers, 2008). Le coefficient de transfert d'oxygène  $K_{la}$  s'annule et avec lui, le terme de transfert.  $OUR_{endo}$ , supposé constant, est dérivé de la pente de la courbe d'oxygène dissous.

$$\frac{dO_2}{dt} = -OUR_{endo}$$

**Équation 16**

Le terme de transfert peut ensuite être estimé. La culture est de nouveau aérée. Le taux en oxygène dissous augmente et tend vers la valeur de saturation. En traçant  $O_2$  en fonction de  $OUR + \frac{dO_2}{dt}$ , on obtient une droite de pente  $-\frac{1}{K_{la}}$  et d'ordonnée à l'origine correspondante à la concentration à saturation en oxygène dans les conditions de l'essai.

Les termes du bilan sont connus à part la vitesse de consommation exogène. Par ajout de substrat,  $OUR_{exo}$  peut être déterminé par la suite.

#### 1.4.2.2. Photorespirométrie

##### 1.4.2.2.1. Généralités

Sous l'appellation de photorespirométrie, la méthode a été appliquée à des cultures pures de microalgues (Decostere et al., 2013; Schwerna et al., 2017) et à des consortiums microalgues-bactéries en eaux usées (Flores-Salgado et al., 2021; Rossi et al., 2018; Sánchez-Zurano et al., 2020) (**Tableau 10**).

Microalgues - Bactéries	Enceinte	Milieu de culture	Respiromètre, Intensité ( $\mu E.m^2.s^{-1}$ ), Jour/Nuit (min), T ( $^{\circ}C$ ), pH (-)	Notes	Références
<i>Scenedesmus almeriensis</i> - Nitrifiantes et hétérotrophes	Flacon 1L-1.5L ; Colonne à bulles 300 mL ; CHRA 4.4 m <sup>3</sup> ; Réacteur cascade fine couche 1.4 m <sup>3</sup> ; Réacteur tubulaire 3 m <sup>3</sup>	Milieu Arnon et Allen ; Lixiviat de résidus de culture ; Eaux usées primaires ; Lisier	Fermé 80 mL I : LED J/N : 4/4 T : 24-25	Carence pour éliminer MO et NH <sub>4</sub> Aération entre j/n 4 cycles j/n de 4 min Ci = 0.5 g.L <sup>-1</sup>	(Sánchez-Zurano et al., 2020)
<i>Desmodesmus</i> et <i>Chlorella</i> - Hétérotrophes	CHRA 70L	Digestat liquide viticole	Fermé 5 mL I : LED J/N : 120/120 T : 25 pH : 7.5	Pas d'aération Milieu minéral BG11 modifié Biomasse centrifugée Ci = 187±10 mgMVS.L <sup>-1</sup>	(Flores-Salgado et al., 2021)
<i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. - Nitrifiantes et hétérotrophes	Réacteur 2L-75L ; CHRA 1 m <sup>3</sup>	Digestat liquide agricole et municipale	Ouvert 250 mL I : Fluorescent 40.8-59.2 J/N : 15/10	Aération Dilution avec milieu minéral	(Rossi et al., 2018)

<i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. - Hétérotrophes	CHRA 1 m <sup>3</sup>	Digestat liquide	Fermé 0.5 L I : Fluorescent et LED 110 µE/m <sup>2</sup> /s J/N : 10/20 T : 20°C pH : 8.5	Aération Milieu minéral Incubation 20h et acclimatation 30 min avant essai Biomasse centrifugée	(Rossi et al., 2020a)
---	--------------------------	---------------------	---	--	--------------------------

**Tableau 10.** Paramètres de culture, caractéristiques de la biomasse et paramètres de la photorespirométrie

Similaire à un respiromètre, le photorespiromètre est en verre ou autre matériau transparent et dispose aussi d'une source de lumière pour reproduire les périodes de jour et de nuit (**Figure 37**). On distingue deux types d'essai : la photorespirométrie *in situ* et la photorespirométrie externe.

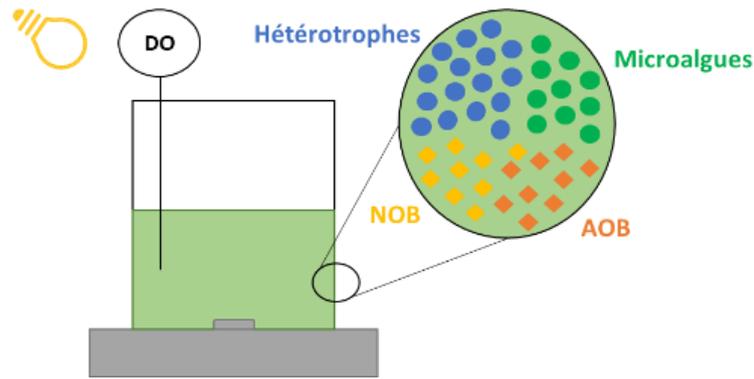
Une mesure *in-situ* de l'oxygène dissous dans la culture permet de considérer le chenal entier comme un photorespiromètre et de profiter de l'alternance naturelle jour/nuit en extérieur (Rossi et al., 2020b). Les conditions opératoires (température, pH, intensité lumineuse...) très variables dans les systèmes en extérieur rendent cependant l'exploitation des données difficile. On n'obtient que la respiration globale du consortium sans pouvoir détailler les contributions de chaque population de microorganismes.

Le protocole externe assure quant à lui une « standardisation » des conditions et des variations contrôlées pendant le test (Rossi et al., 2020b). Il permet de tester l'influence de paramètres précis comme la concentration des nutriments ou la durée du cycle jour/nuit.

Dans le cas d'une étude au laboratoire dans des conditions relativement contrôlées (notamment une bonne connaissance des flux d'alimentation en eaux usées et de leurs concentrations en polluants), il est plus aisé de mettre en œuvre une mesure *in-situ* : on s'affranchit alors du recours à un respiromètre externe et on se base sur le pilote existant pour lequel les données d'oxygène dissous doivent être mesurées en continu et corrélées aux paramètres de fonctionnement. De plus, le consortium n'est pas perturbé du fait du prélèvement et les incertitudes liées à ce dernier sont évitées. Ainsi, on peut caractériser les flux d'oxygène au sein du réacteur avec ses propriétés hydrodynamiques et de transfert gaz/liquide propres.

En fonction de l'objectif, on peut recourir à l'une ou l'autre des méthodes :

- Une mesure *in-situ* permet de déterminer les flux globaux d'oxygène et donc l'activité du consortium dans les conditions opératoires. Cela peut être facilité au laboratoire ;
- Une mesure en externe permet de discriminer plus finement les populations bactériennes et, en faisant varier les doses de substrat, l'intensité lumineuse, etc. de déterminer certains paramètres des modèles biocinétiques.



**Figure 37.** Schéma d'un photorespiromètre et des populations bactériennes et algales (Rossi et al., 2020b)

#### 1.4.2.3. Modélisation

Dans cette thèse, nous déterminerons et étudierons l'activité du consortium microalgues-bactéries en exploitant le canal comme photorespiromètre dont les processus biologiques seront modélisés.

Bien que les CHRA existent depuis des décennies, les mécanismes physiques, chimiques et biochimiques qui s'y déroulent, de même que les interactions microalgues-bactéries, sont moins compris que dans les systèmes conventionnels comme les procédés à boues activées. Pour ces derniers, le premier modèle issu d'un consensus de la communauté scientifique est l'*Activated Sludge Model N°1* (ASM1) (Henze et al., 1987) qui a été développé pour simuler les procédés de conversion biochimiques et physico-chimiques au sein des bassins d'aération. Le modèle a ensuite été repris et adapté en de nouvelles versions, notamment ASM2, ASM2d, et ASM3 (Gujer et al., 1999; Henze et al., 1999).

La modélisation des microalgues a été engagée pour une meilleure compréhension des microorganismes dans leur milieu naturel (Jørgensen, 1976; Steele, 1962), ou pour une optimisation en vue d'une production à l'échelle industrielle. Des revues récentes (Darvehei et al., 2018; Shoener, 2019) ont recensé les modèles disponibles pour simuler la croissance algale. En reprenant la structure des modèles ASM relatifs aux bactéries, un modèle ASM-A simulant la croissance des microalgues a été conceptualisé (Wagner et al., 2016). Plusieurs modèles se sont intéressés à l'influence de paramètres clés sur les microalgues comme la lumière (Nikolaou et al., 2016), l'oxygène dissous (López Muñoz and Bernard, 2021), les nutriments, le pH, le carbone minéral (Casagli et al., 2021a, 2021b). La lumière étant un facteur important dans la croissance des algues, des modèles ont été créés sur la relation photosynthèse-irradiance (P/I) et se distinguent en trois groupes en fonction des gradients de lumière et/ou la durée des cycles (Béchet et al., 2013; López Muñoz and Bernard, 2021).

La plupart des modèles sur les microalgues se basent, comme les modèles ASM, sur l'équation de Monod (Monod, 1949) qui relie la vitesse de croissance et la concentration du substrat (**Tableau 11**) :

Équation	Paramètres
$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right)$	$\mu$ : vitesse de croissance ( $j^{-1}$ ) $\mu_{max}$ : vitesse de croissance maximale ( $j^{-1}$ ) $K_S$ : constante de demi-saturation ( $g.m^{-3}$ ) $S$ : concentration du substrat ( $g.m^{-3}$ )

**Tableau 11.** Équation de Monod et ses paramètres

En incluant les bactéries et les microalgues, le modèle peut devenir très complexe car il faut prendre en compte tous les paramètres qui affectent les microorganismes (oxygène, CO<sub>2</sub>, carbone organique, pH, intensité lumineuse (Solimeno et al., 2017; Zambrano et al., 2016)). Un des premiers modèles développé pour décrire la croissance et la lyse des microalgues et des bactéries dans un CHRA est celui de (Buhr and Miller, 1983). La nitrification et la dénitrification ont été négligées (Buhr and Miller, 1983). Récemment, le modèle BIO\_ALGAE (Solimeno and García, 2019) a été conçu sur la base des River Water Quality Model 1 (RWQM1) (Reichert et al., 2001) et ASM3 (Iacopozzi et al., 2007) pour simuler les mécanismes des microalgues et des bactéries. Les précédents modèles se sont focalisés sur l'influence de la lumière sans considérer le carbone inorganique fourni par injection de CO<sub>2</sub> (Bitog et al., 2011). Toutefois, les CHRA sans apport externe de dioxyde de carbone sont limités en carbone (Buhr and Miller, 1983). Une avancée de BIO\_ALGAE est l'inclusion du carbone inorganique comme substrat limitant. Cela a été implémenté avec le facteur de correction  $K_{C,ALG}$  (constante de demi-saturation pour le carbone inorganique) dans l'équation de croissance des microalgues. La température, la photorespiration, les variations de pH, l'intensité lumineuse, l'atténuation de la lumière et le transfert gaz/liquide ont été considérés comme les principaux paramètres limitants (Solimeno et al., 2017). Il s'agit pour l'essentiel du modèle qui a été recodé et adapté pour représenter le comportement du chenal pilote étudié durant cette thèse par (Pham, 2018).

La structure du modèle de (Casagli et al., 2021b) diffère des précédents modèles évoqués sur plusieurs aspects : représentation des phénomènes de limitations non-pas simplement par la multiplication de termes de Monod mais par la loi minimale de Liebig (de Baar, 1994), sous-modèle de pH comprenant une spéciation chimique détaillée et mis en œuvre par un système de calcul algébrique, évaluation du processus d'évaporation et de son effet sur les composés dissous et en suspension.

### I.4.3. Conclusion

**Au cours de cette thèse, le parti pris a été de recourir à des méthodes aussi simples que possible pour caractériser la composition et l'activité de la biomasse. Que ce soient les méthodes colorimétriques pour la composition ou la photorespirométrie *in-situ*, des mises au point et la validation des méthodes ont été nécessaires.**

## I.5. La valorisation de la biomasse

Avec le changement de paradigme de la simple station de traitement des eaux usées vers la récupération de ressources des eaux usées, les procédés basés sur les microalgues font l'objet d'un intérêt croissant du fait de certains atouts :

- La sobriété énergétique du fait de l'absence d'aération mécanique du système (voir paragraphe I.2. Le consortium microalgues-bactéries) ;
- La récupération de nutriments (N, P) au sein de la biomasse ;
- La possibilité de valorisation énergétique de la biomasse produite ainsi que le captage de CO<sub>2</sub>.

### I.5.1. Les voies de valorisation de la biomasse

#### I.5.1.1. La valorisation agricole et alimentaire

La biomasse algale peut être valorisée dans de nombreux domaines. En agriculture, elle peut servir d'engrais pour fertiliser des sols pauvres, de manière similaire aux boues d'épuration issues de filières conventionnelles. Il faut toutefois s'assurer qu'elle ne contienne pas de métaux lourds ou d'autres polluants au risque de contaminer les sols (Muñoz and Guieysse, 2006).

Avec des teneurs pouvant atteindre celles de la viande, des œufs et du lait (Fleurence, 1999; Gouveia et al., 2008), les microalgues sont envisagées comme une source potentielle de protéines pour la nutrition de l'homme et de l'animal. En tant que premier maillon de la chaîne alimentaire (phytoplancton) pour les producteurs secondaires (poissons, crustacés...), les microalgues représentent le nutriment essentiel en aquaculture (Chader and Touzi, 2001). *Chlorella vulgaris* connaît un succès grandissant en tant que complément alimentaire grâce à sa teneur élevée en protéines (51-58% MS) et sa composition en acides aminés essentiels (Becker, 2007). En Europe, *Spirulina*, *Odontella*, *Chlorella* et *Tetrasalmis chuii* sont autorisées dans l'alimentation humaine (Gaudot et al., 2019). Cependant, la culture en eaux usées peut constituer un frein pour des raisons sanitaires, un possible manque d'acceptation du public ainsi que des exigences de qualité difficiles à garantir (Muñoz and Guieysse, 2006). Également sources de vitamines et de minéraux, les microalgues peuvent toutefois accumuler des éléments toxiques comme les métaux lourds. Des seuils stricts d'exposition ont été mis en place en Europe pour les métaux lourds, tels que le mercure, l'arsenic, le plomb et le cadmium, dans les aliments destinés à la consommation humaine (Bleakley and Hayes, 2017).

#### I.5.1.2. La valorisation énergétique en biocarburant

Face au changement climatique et l'épuisement des ressources fossiles, l'intérêt pour les énergies renouvelables s'est accru au fil des ans. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, malgré le potentiel des biocarburants, les carburants fossiles se sont imposés par leur facilité d'extraction (Voloshin et al., 2016). Aujourd'hui, le débat autour des émissions de CO<sub>2</sub> permet l'essor des biocarburants, ceux-ci étant considérés comme une alternative potentiellement pertinente aux fossiles. Le biocarburant peut servir d'additif ou de complément aux carburants fossiles. En 2020, le volume de biocarburants incorporé a atteint 8.5% du volume de carburants (essence et gazole) mis à la consommation en France (Ministère de la transition écologique, 2020).

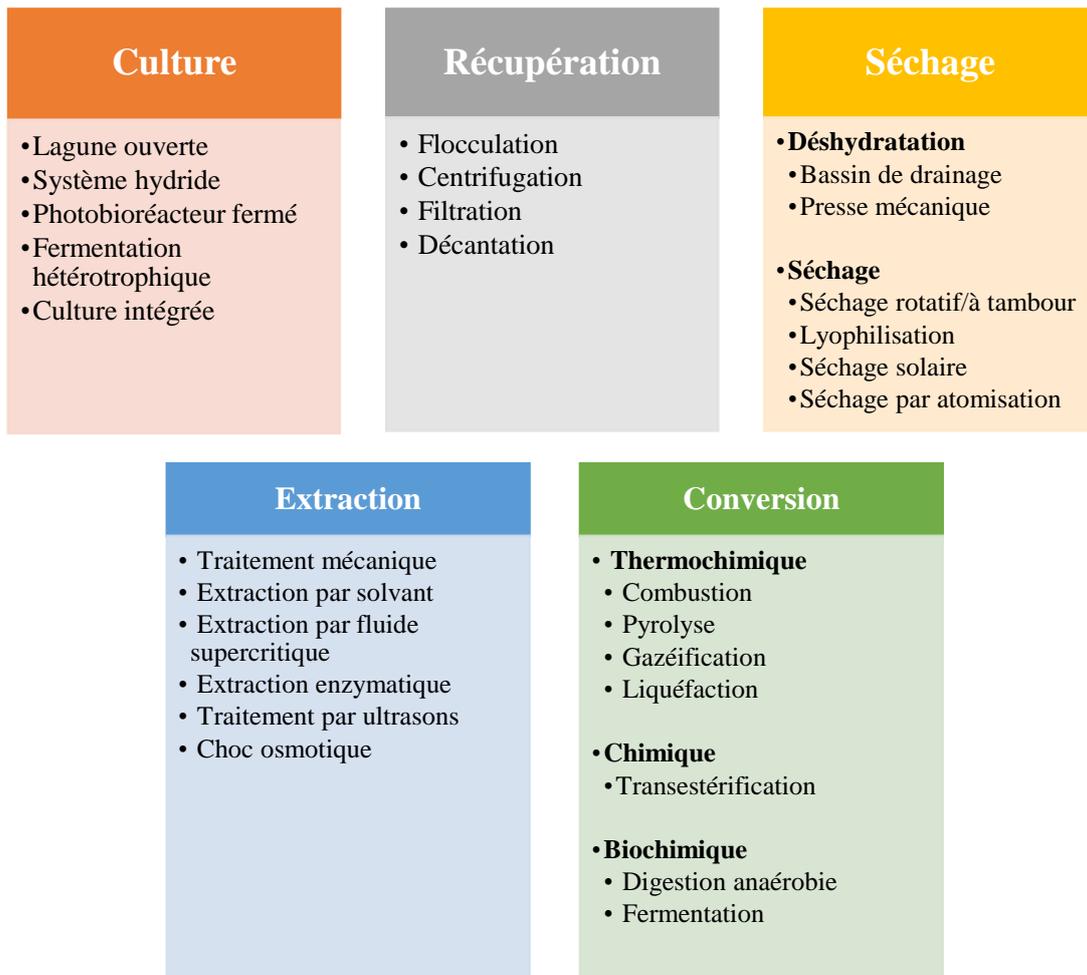
## Partie I : Bibliographie

Les biocarburants sont classifiés en plusieurs « générations » selon la matière première, les procédés utilisés et leur date d'apparition sur le marché mondial de l'énergie (Voloshin et al., 2016) :

- La « première génération » provient de cultures alimentaires à base de sucre (canne à sucre, betterave et sorgho), d'amidon (maïs, blé et orge) ou d'huile (colza, tournesol) (Moodley, 2021). Se démarquent alors la filière bioéthanol (principalement à partir de betterave et de blé) et la filière biodiesel (à partir de colza) (Departe and Ollivier, 2011). Au cours des dernières années, elles ont été remises en cause, car leur production génère une compétition pour des cultures normalement destinées à l'alimentation. Elles requièrent ainsi des terres arables et de l'eau douce pour l'irrigation ;
- Les biocarburants de « seconde génération » sont produits à partir de résidus agricoles et forestiers non comestibles, désignés comme biomasse lignocellulosique (Fokaides and Christoforou, 2016). L'utilisation de « déchet » est avantageuse, car il n'y a pas de terre, d'eau ou de fertilisant alloués spécifiquement pour produire du biocarburant. L'extraction des composants, en particulier de la cellulose, constitue l'étape problématique dans la chaîne (Voloshin et al., 2016) ;
- La « troisième génération » fait référence aux microalgues qui sont prometteuses, car elles peuvent produire de la biomasse en grandes quantités avec un taux de croissance rapide. Leur productivité peut être jusqu'à 50 fois supérieure à *Panicum virgatum*, la plante terrestre à la croissance la plus rapide (Demirbaş, 2006; Nakamura, 2006). La culture d'algues n'accapare pas des surfaces normalement exploitées pour les productions agricoles. En agriculture, les récoltes se font deux à quatre fois par an, ce qui limite l'apport de matière première pour la production de biocarburant. La biomasse algale peut quant à elle être fournie à longueur d'année. Enfin, les algues peuvent être cultivées en eaux usées ou salées, ce qui peut en réduire l'impact sur les réserves d'eau douce (Schenk et al., 2008).

Le besoin en carbone minéral des microalgues permettrait également de recycler les flux de CO<sub>2</sub> sortant de certains procédés. Un kg d'algues est équivalent à 1.88 kg de CO<sub>2</sub> capturé (Adamczyk et al., 2016). Toutefois, capturer le dioxyde de carbone n'est pas suffisant, il faut valoriser la biomasse algale avant qu'elle ne se décompose et génère à nouveau, de manière incontrôlée, du CO<sub>2</sub> et potentiellement du CH<sub>4</sub>. Dans ce dernier cas, le bilan des émissions de gaz à effet de serre serait impacté (le méthane a un effet de serre 25 fois plus important que le dioxyde de carbone).

Produire du biocarburant à partir de biomasse implique de considérer la chaîne dans son intégralité avec ses cinq étapes principales : la culture, la récupération, le séchage, l'extraction et la conversion en biocarburant (**Figure 38**). Pour déterminer la pertinence et les coûts d'une filière, il est nécessaire de prendre en compte les prétraitements, les réactifs indispensables, le fonctionnement et la maintenance des procédés. Pareillement, un bilan énergétique global de la voie « algues-à-biocarburant » doit englober tous les « entrants » et « sortants », même indirects (Ryan, 2009).



**Figure 38.** Chaînes potentielles de production de biocarburant à partir de biomasse algale (Ryan, 2009)

#### I.5.1.2.1. La récupération

Lors de cultures de microalgues, récupérer la biomasse constitue un défi en raison de la petite taille des cellules, de leur faible concentration, de la similitude de densité avec le milieu ainsi que des faibles vitesses de décantation. Cette étape représenterait ainsi 20-30% du coût de la biomasse algale (Mata et al., 2010; Narendra et al., 2010). Différentes approches ont été examinées pour séparer la biomasse du liquide, comprenant la coagulation, la flocculation, la flottation, la centrifugation et la filtration avec les points forts et faibles récapitulés dans le **Tableau 12**. Sur la base de six critères (la quantité et la qualité de la biomasse, le coût, le temps, les espèces et la toxicité), une revue des techniques de récupération a conclu que la flocculation et la décantation combinées était la meilleure option et la plus abordable (Singh and Patidar, 2018).

Méthode	Avantages	Inconvénients
Coagulation et floculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapide et simple</li> <li>• Applicable à grande échelle</li> <li>• Moins de dommages cellulaires</li> <li>• Appliqué à une vaste gamme d'espèces</li> <li>• Moins d'énergie</li> <li>• Auto et biofloculation peuvent être peu coûteuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réactifs peuvent être coûteux</li> <li>• Dépend du pH</li> <li>• Difficile de séparer le coagulant et la biomasse récupérée</li> <li>• Efficacité dépend du coagulant utilisé</li> <li>• Recyclage limité du milieu</li> <li>• Contamination minérale ou microbienne possible</li> </ul>
Flottation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Applicable à grande échelle</li> <li>• Peu coûteux et prend peu d'espace</li> <li>• Rapide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Besoin de tensioactifs</li> <li>• Flottation réactive à l'ozone coûteuse</li> </ul>
Filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taux de récupération élevé</li> <li>• Rentable</li> <li>• Pas de réactifs</li> <li>• Faible consommation d'énergie (filtre naturel ou pression)</li> <li>• Faible contrainte de cisaillement</li> <li>• Eau recyclée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lent avec pression ou vide requis</li> <li>• Peu adapté aux microalgues</li> <li>• L'encrassement et le remplacement des membranes augmentent les coûts de maintenance</li> <li>• Haute consommation d'énergie (filtre à vide)</li> </ul>
Centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapide et simple</li> <li>• Taux de récupération élevé</li> <li>• Applicable à petite échelle</li> <li>• Applicable à toutes les microalgues</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coûteux et forte demande énergétique</li> <li>• Coûts d'exploitation et de maintenance élevés</li> <li>• Approprié pour les produits à haute valeur ajoutée</li> <li>• Lent et coûteux à grande échelle</li> <li>• Risque de dommages cellulaires</li> </ul>

**Tableau 12.** Avantages et inconvénients des techniques de récupération (Abdelaziz et al., 2013; Barros et al., 2015; Singh and Patidar, 2018)

La décantabilité des microalgues peut être améliorée en les combinant avec des bactéries, ce qui rend la biofloculation possible (Fallahi et al., 2021). Pendant la biofloculation, de larges floes de bactéries et de microalgues se forment grâce à la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Arcila and Buitrón, 2017), et sédimentent par gravité sans l'emploi de floculants métalliques ou chimiques. Par exemple, l'ajout d'une fraction de boues activées de plus en plus importantes à une culture de microalgues (ratio algues/boues activées 10:1, 5:1, 1:1, 1:5) a accéléré la sédimentation (Su et al., 2012). Lors de la culture de *Chlorella vulgaris*, l'abattement des MES est passé de  $14.3 \pm 3.5\%$  à  $93.0 \pm 5.5\%$  entre un effluent stérilisé et un effluent non stérilisé avec des bactéries (Nguyen et al., 2019). Dans le CHRA, les bactéries sont naturellement présentes via les eaux usées, ce qui rend ce processus de biofloculation assez aisé à mettre en œuvre. Lors des précédentes expériences menées dans notre laboratoire,

l'ensemencement de la culture avec une combinaison de microalgues récupérées sur la paroi d'un clarificateur secondaire et des boues activées a permis d'obtenir des performances satisfaisantes de sédimentation sans ajout de réactif (Pham et al., 2021, 2019).

#### I.5.1.2.2. Le séchage

Après récupération, la biomasse doit être rapidement séchée pour éviter qu'elle ne se dégrade et prolonger la durée de conservation (Fasaei et al., 2018). Diverses méthodes de séchage ont été testées avec les principales listées dans le **Tableau 13**.

Méthode et principe	Avantages	Inconvénients
Séchage au soleil : Exposition directe au soleil	<ul style="list-style-type: none"> <li>Économique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grandes surfaces de séchage</li> <li>Lent</li> <li>Dépendant de la météo</li> <li>Surchauffe</li> <li>Changement de texture et de couleur</li> </ul>
Séchage par convection : Air chaud	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pratique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dégradation de la biomasse</li> </ul>
Séchage par atomisation : Gouttelettes en contact avec air chaud	<ul style="list-style-type: none"> <li>Séchage rapide et efficace</li> <li>Composé à haute valeur ajoutée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Energivore</li> </ul>
Lyophilisation : Congélation et mise sous vide de la biomasse	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biomasse de haute qualité</li> <li>Broyage simultané</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lent</li> <li>Coûteux</li> </ul>

**Tableau 13.** Avantages et inconvénients des méthodes de séchage (Kim and Kim, 2022)

Le séchage solaire est considéré comme la technique la plus simple et économique (Schmid et al., 2022). C'est un processus lent et peu énergivore qui requiert de grandes surfaces. Cependant, avec les problèmes de surchauffe associés, la biomasse peut être dénaturée et décolorée car la chlorophylle des microalgues est décomposée (Kim and Kim, 2022).

Lors du séchage par atomisation, le liquide est pulvérisé en gouttelettes vers le bas dans une colonne verticale et rentre en contact avec un courant d'air chaud pour évaporer l'eau. Cette méthode est choisie pour des composés à haute valeur ajoutée, mais les coûts de fonctionnement sont élevés (Milledge and Heaven, 2013).

Le séchage par convection consiste à faire passer un courant d'air chaud par convection à travers la biomasse comme dans un four (Bagchi et al., 2015), un micro-ondes (Villagràcia et al., 2016) ou un séchoir à tambour (Silva et al., 2019). La dénaturation des cellules algales peut être évitée en séchant dans une gamme de température optimale - comprise par exemple entre 60-80°C pour *Chlorella vulgaris* par séchage au four (Hosseinzand et al., 2018).

La lyophilisation consiste à éliminer l'eau d'un produit en associant le froid et le vide et se déroule en 2 étapes. La biomasse est d'abord congelée, puis mise sous vide. La pression

descend sous le point triple, l'eau passant de l'état solide à l'état de vapeur (sublimation). C'est une méthode de séchage douce qui donne un produit final sec et stable, mais elle n'est employée que lorsqu'il faut préserver les propriétés de la biomasse car le matériel est coûteux et la dépense énergétique élevée (Ryckebosch et al., 2011).

En parallèle des techniques conventionnelles de séchage, de nouvelles méthodes sont développées et appliquées à la biomasse algale : le séchage hybride qui combine solaire et air chaud (Schmid et al., 2022), le séchage flash (Ljubic et al., 2019), le séchage infrarouge (Ghnimi et al., 2019).

Concernant la composition de la biomasse obtenue, le procédé de séchage choisi n'a que peu d'impact. Dans l'étude de (Guldhe et al., 2014), le protocole de séchage (lyophilisation, convection et solaire) n'a pas eu d'impact significatif sur la teneur en lipides de *Scenedesmus* sp. après extraction. De la même façon, une étude de *Nannochloropsis* sp. avec un séchage au soleil, au four et par lyophilisation a conclu que la technique n'a pas influencé de manière significative les rendements lipidiques (Balasubramanian et al., 2013).

#### 1.5.1.2.3. L'extraction

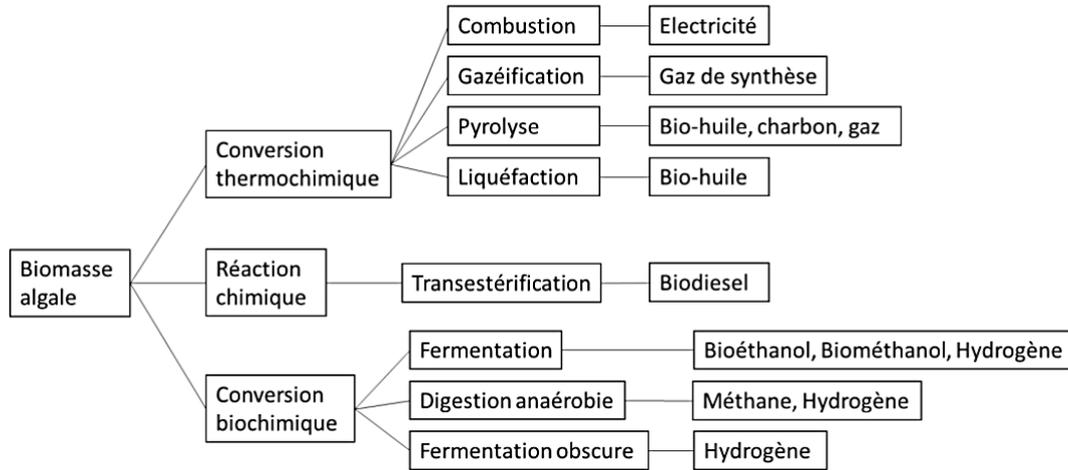
Avant la conversion, il faut extraire le contenu stocké dans les cellules protégées par une épaisse paroi. Les membranes doivent donc être rompues pour que les molécules d'intérêt soient accessibles aux solvants (Dejoye, 2013). La déstructuration cellulaire peut être mécanique ou non-mécanique (**Tableau 14**). Les caractéristiques de la biomasse comme sa teneur en eau vont orienter le choix de la technique.

<b>Technique non mécanique</b>	Acide ou base
	Enzyme
	Choc osmotique
<b>Technique mécanique</b>	Micro-ondes
	Autoclave
	Ultrasons
	Champs électriques pulsés

**Tableau 14.** Techniques de déstructuration cellulaire des microalgues (Dejoye, 2013)

#### 1.5.1.2.4. La conversion en biocarburant

Après récupération et prétraitement, la biomasse peut être convertie en biocarburant selon différents procédés dits thermochimique, chimique ou biochimique (**Figure 39**). Le choix de la conversion va s'appuyer sur la nature de la ressource et la quantité, la forme d'énergie voulue, l'aspect économique et l'application attendue (Brennan and Owende, 2010).



**Figure 39.** Voies de valorisation énergétique de la biomasse (Muñoz and Guieysse, 2006)

### I.5.2. Les conversions thermochimiques

La conversion thermochimique fait référence à la décomposition thermique d'un composé organique pour former du biocarburant et comprend la combustion, la gazéification, la liquéfaction et la pyrolyse (Ram and Mondal, 2022). La teneur en matière sèche de la biomasse algale doit être d'environ 80%, ce qui nécessite un séchage en amont.

#### I.5.2.1. La combustion

La combustion constitue une approche thermochimique, car il s'agit d'« une oxydation totale de la biomasse en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , qui correspond à une pyrolyse à haute température convertissant la biomasse en gaz, suivie d'une combustion des gaz (Déglise, 1982) ». La biomasse est décomposée en présence d'air dans un four, une chaudière ou une turbine à vapeur à plus de  $800^\circ\text{C}$  et convertie en gaz (Brennan and Owende, 2010). La combustion n'est possible que si le taux d'humidité est  $<50\%$  (Goyal et al., 2008). Les gaz produits doivent être utilisés immédiatement, car ils ne peuvent pas être stockés (Malcata et al., 2018). Cette technique nécessite de prétraiter la biomasse par séchage, hachage et broyage pour la densifier, ce qui augmente les coûts et la dépense énergétique et la rend peu adaptée à des matériaux humides. Quelques études se sont intéressées à la combustion de la biomasse algale seule comme *Chlorella vulgaris* (Chen et al., 2011), mélangée à du charbon (Gao et al., 2016; Tahmasebi et al., 2013) et à des résidus agricoles (López et al., 2013).

#### I.5.2.2. La pyrolyse

La pyrolyse est la décomposition thermique de la biomasse en absence d'air à des températures de  $380^\circ\text{C}$  à  $530^\circ\text{C}$ . Les produits formés sont des condensables (goudrons, huile de pyrolyse/bio-huile), des gaz non condensables ( $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{C}_x\text{H}_y$ ) et du charbon riche en carbone. La répartition et la composition des produits dépendent des conditions opératoires (Jendoubi, 2011). Une pyrolyse avec une vitesse de chauffe lente sur une longue durée va favoriser le charbon avec des quantités modérées de condensables. Une pyrolyse à vitesse de chauffe élevée sur une courte durée favorise les produits liquides. On distingue la pyrolyse lente et rapide (flash) (Maggi and Delmon, 1994). Il y a un intérêt pour l'huile de pyrolyse comme biocarburant, mais elle est instable thermiquement et se dégrade avec le temps. Elle a

## Partie I : Bibliographie

un faible pouvoir calorifique, un pH bas (environ 2) et une teneur en eau (25%) et en oxygène élevée (35%). Pour être utilisée comme biocarburant, elle nécessite d'être raffinée (Wertz, 2013).

La pyrolyse a été étudiée avec différentes espèces de microalgues (Gong et al., 2014), avec un catalyseur (Hu et al., 2014; Thangalazhy-Gopakumar et al., 2012) et combinée à des micro-ondes (Beneroso et al., 2013). Bien qu'elle soit adaptée à des biomasses sèches et pauvres en cendres comme le bois, la méthode est peu appropriée aux ressources humides.

### *1.5.2.3. La gazéification*

Lors de la gazéification, la biomasse est oxydée partiellement en présence d'oxygène ou d'air ou de vapeur d'eau à des températures élevées (800-1300°C) en un produit gazeux hautement inflammable (Varfolomeev and Wasserman, 2011). La gazéification se distingue de la pyrolyse, car le carbone est totalement converti en gaz sans production de liquide ou solide (en dehors des cendres). Aussi, elle se différencie de la pyrolyse seule, en absence d'agent oxydant, et de la combustion, qui se fait en présence abondante d'agent oxydant. Le gaz de synthèse ou « syngas » est constitué de CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et d'autres composés. Il peut être brûlé ou utilisé dans une étape de synthèse catalytique permettant la production de carburants liquides.

La matière organique doit avoir une teneur en eau inférieure à 10-15% (McKendry, 2002), sinon l'efficacité du procédé et le bilan énergétique sont impactés.

### *1.5.2.4. La liquéfaction*

La liquéfaction a lieu entre 250 et 400°C et à des pressions de 10 à 25-30 MPa avec une durée pouvant aller de quelques secondes à plusieurs dizaines de minutes (Han et al., 2019). L'avantage de cette technique est que la biomasse algale humide (teneur en eau de 80%) est directement convertie en bio-huile sans séchage (Goswami et al., 2019). Des additifs peuvent être introduits pour favoriser la réaction. L'eau est le solvant le plus utilisé pour la liquéfaction. Le procédé permet ainsi d'obtenir « des composés organiques hydrophobes, regroupés sous la dénomination de bio-huile qui est ensuite raffinée, un résidu solide appelé char, une phase aqueuse contenant de la matière organique sous forme de composés polaires dissous, et une phase gazeuse minoritaire et principalement formée de CO<sub>2</sub> ». Plusieurs paramètres comme la température, la pression, la durée, la nature et la composition de la biomasse, et l'utilisation de catalyseur affectent le rendement en bio-huile dans la liquéfaction de la biomasse algale (Han et al., 2019).

## **I.5.3. La conversion chimique : la transestérification**

### *1.5.3.1. Le biodiesel*

Les paramètres à considérer en priorité pour caractériser un biodiesel sont la qualité de l'inflammation (indice de cétane), les propriétés d'écoulement à froid et la stabilité à l'oxydation (Hu et al., 2008b).

L'indice de cétane est un paramètre important pour évaluer la qualité d'un carburant pour un moteur Diesel. Sur une échelle de 0 à 100, il détermine la capacité d'un carburant à s'auto-enflammer quand il est injecté dans le moteur Diesel. Plus l'indice de cétane est élevé,

meilleure est la capacité d'auto-inflammation du carburant. Le biodiesel a un meilleur indice de cétane que le diesel conventionnel. « Ses propriétés sont très similaires au diesel dérivé du pétrole. Son utilisation met en évidence des émissions réduites de particules, de monoxyde de carbone CO et d'oxyde de soufre SO<sub>x</sub>, mais des émissions plus importantes d'oxyde d'azote NO<sub>x</sub> (Sheehan et al., 1998) ». En France en 2020, le biodiesel représente 64% des volumes de biocarburants incorporés dans les carburants (Ministère de la transition écologique, 2020).

Le profil des acides gras influence les caractéristiques du biocarburant. Ainsi, leur degré de saturation améliore la stabilité à l'oxydation et l'indice de cétane, mais donne des propriétés à basse température médiocres. Un biodiesel avec beaucoup d'acides gras polyinsaturés (AGPI) a de meilleures caractéristiques d'écoulement à froid, mais il est plus sensible à l'oxydation, et donc plus instable (Hu et al., 2008b).

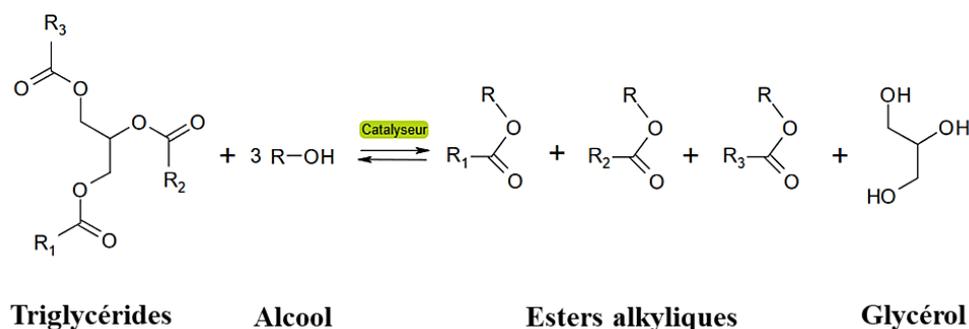
### *1.5.3.2. Les triglycérides*

Parmi les lipides, les triglycérides, autrement appelés triacylglycérols ou TAG, sont les molécules d'intérêt pour le biodiesel produit par transestérification (voir paragraphe I.4.1.1. Lipides). Les TAG sont constitués d'une molécule de glycérol et de trois acides gras identiques ou différents. Les acides gras sont désignés par la lettre C et deux chiffres : le premier est pour le nombre d'atomes de carbone et le second est pour le nombre de doubles liaisons (Deshmukh et al., 2019). Ce sont des chaînes carbonées allant de 4 à 22 atomes de carbone. Sans doubles liaisons, les acides gras sont saturés (AGS). Avec une ou plusieurs doubles liaisons, il s'agit respectivement d'acides gras monoinsaturés (AGMI) ou d'acides gras polyinsaturés (AGPI).

Dans des conditions favorables, les acides gras sont synthétisés par les microalgues, en priorité pour l'estérification en lipides membranaires à base de glycérol (Hu et al., 2008a). Toutefois, face à un stress, les microalgues modifient leur métabolisme pour favoriser la production et l'accumulation des lipides neutres, principalement sous forme de triacylglycérol (TAG) (Hu et al., 2008a), ceux-ci servent de forme de stockage de carbone et d'énergie. Les acides gras les plus synthétisés par les microalgues ont des longueurs de chaîne allant de C16 à C18 (Hu et al., 2008a).

### *1.5.3.3. La réaction de transestérification*

Lors de la transestérification schématisée ci-dessous (**Figure 40**), les triglycérides sont mélangés à froid à un alcool (en général, le méthanol) en présence d'un catalyseur acide ou basique. Les trois chaînes d'acides gras se séparent du glycérol pour se fixer sur l'alcool, produisant ainsi du glycérol et du biodiesel (esters méthyliques d'acides gras (EMAG)). Les trois étapes qui s'enchaînent sont : la conversion des triglycérides en diglycérides suivie de la conversion des diglycérides en monoglycérides, qui sont convertis en glycérol. La réaction n'étant pas totale, quelques produits intermédiaires peuvent se retrouver dans la composition finale (Richard, 2011). Pour éliminer les deux étapes séparées d'extraction et de transestérification des lipides et ainsi simplifier le procédé, une transestérification dite directe ou *in-situ* sur des microalgues, en utilisant l'alcool pour extraire et transestérifier les lipides, a été étudiée (Mohamadzadeh Shirazi et al., 2017; Wahlen et al., 2011). Le bien-fondé de la transestérification de la biomasse algale repose sur la technologie employée, la stratégie choisie et le rapport bénéfice/coût du système (Eloka-Eboka and Inambao, 2017).



**Figure 40.** Réaction de transestérification de triglycérides avec un alcool (R-OH) avec R1, R2 et R3 des groupements alkyles présents dans les acides gras (Richard, 2011)

La transestérification peut être catalytique, non-catalytique ou enzymatique. D'une part, une réaction non-catalytique se fait en phase supercritique avec des dépenses supplémentaires en énergie pour atteindre de telles conditions. D'un autre côté, les enzymes ont un coût élevé, peuvent être inhibées par l'eau et l'alcool et ont des cinétiques de réaction lentes. Ainsi, la transestérification avec catalyseur est en général privilégiée.

Les catalyseurs peuvent être classés en plusieurs catégories : acide ou basique, hétérogène ou homogène. Les catalyseurs hétérogènes (solides) acides (les zéolites échangeuses de protons, les oxydes métalliques ZrO<sub>2</sub> et SnO) ou basiques (les zéolites échangées avec des cations, les oxydes alcalino-terreux CaO, MgO, ZnO, les sels de métaux immobilisés et hydroxydes) peuvent être facilement séparés du milieu réactionnel et avoir une durée de vie plus ou moins longue. Réutiliser le catalyseur hétérogène permet de diminuer les dépenses de la chaîne en termes de production et de traitement. Ils ont, en règle générale, un coût d'achat plus élevé que les catalyseurs homogènes (Richard, 2011).

Les catalyseurs homogènes sont les plus employés, ceux-ci incluant l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pureté 98%), l'acide chlorhydrique HCl (pureté 35%), l'hydroxyde de potassium KOH et l'hydroxyde de sodium NaOH (Tien Thanh et al., 2022). Les catalyseurs homogènes basiques sont actifs à des températures modérées et ont un coût raisonnable (Richard, 2011). En présence d'acide gras libres (les acides gras sont qualifiés de « libres » lorsqu'ils ne sont pas fixés à d'autres molécules), ils peuvent former des savons (saponification), ce qui impacte le rendement de la transestérification et complique la séparation et la purification des esters. Les catalyseurs homogènes acides ont l'avantage de ne pas donner lieu à une saponification. Ils sont cependant corrosifs pour les installations, ont un temps de réaction plus long (au-delà de 3h) et nécessitent une température supérieure à 100°C (Richard, 2011).

#### 1.5.3.4. Le biodiesel à partir de microalgues et bactéries

Plusieurs espèces de microalgues ont été placées dans des configurations variées (carence/abondance en nutriments, carence en azote, conditions hétérotrophes) pour déterminer leur teneur et leur productivité lipidique. Mais, seules quelques-unes ont été cultivées en eaux usées (Olguín, 2012). Bien qu'elles soient nombreuses, il n'est pas réellement pertinent de citer des études traitant des microalgues seules, car les rendements rapportés sont supérieurs aux consortiums microalgues-bactéries. En général, les expériences ont été menées en

photobioréacteurs dans des conditions contrôlées, et ne sont pas représentatives du système envisagé dans cette thèse.

Outre l'intérêt des consortiums pour traiter les eaux usées, la combinaison des microorganismes produit une biomasse plus riche en lipides. Par exemple, la culture en eaux usées de *Chlorella vulgaris* et de boues activées dans des réacteurs SBR a montré que les microalgues et bactéries ont presque doublé le rendement en lipides ( $0.14 \text{ g.L}^{-1}$ ) comparé aux microalgues seules (Leong et al., 2018). Par ailleurs, les boues activées seules ont atteint  $0.08 \pm 0.02 \text{ glipides.gMES}^{-1}$  contre  $0.28 \pm 0.02 \text{ glipides.gMES}^{-1}$  pour les microalgues (Leong et al., 2018). Le phénomène est observé dans d'autres études (Hu et al., 2023). Ainsi, la transestérification de biomasse microalgues-bactéries (cultivée en eaux usées synthétiques) a fourni les meilleurs AG (acide pentadécanoïque, palmitique, stéarique et oléique) pour le biodiesel. La proportion d'acide oléique (47.4%) a été plus élevée que dans la biomasse algale seule (24%), ce qui est bénéfique car l'acide oléique est particulièrement recherché pour le biodiesel (Hu et al., 2023). En suivant, la transestérification *in-situ* de granulés de *Scenedesmus* FACHB-416-boues activées a abouti à un rendement en biodiesel de  $66.2 \pm 1.1 \text{ mg.gMES}^{-1}$ , qui est supérieur aux boues activées  $35.4 \pm 1 \text{ mg.gMES}^{-1}$  (Liu et al., 2018).

#### I.5.4. Les conversions biochimiques

Parmi les conversions biochimiques, la fermentation alcoolique et la digestion anaérobie décrites ci-dessous ont des similarités : ce sont des procédés où des microorganismes décomposent sans oxygène des macromolécules en molécules simples. Pour éviter la confusion, les éléments clés qui permettent de différencier les deux sont résumés dans le **Tableau 15** ci-dessous.

Procédé	Digestion anaérobie	Fermentation
Microorganismes impliqués	Bactéries / archées	Levures
Étapes	Hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse, méthanogénèse	Glycolyse et fermentation
Produits	Biogaz ( $\text{CO}_2$ et $\text{CH}_4$ ) et digestat	Ethanol et $\text{CO}_2$

**Tableau 15.** Différences entre la fermentation alcoolique et la digestion anaérobie

##### I.5.4.1. La fermentation alcoolique

###### I.5.4.1.1. Le bioéthanol

L'éthanol ou l'alcool éthylique est de formule :  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  ou  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ . En France, la betterave à sucre et les céréales (blé, maïs) sont les principales biomasses employées pour la production de bioéthanol (Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires, 2022). Le bioéthanol est habituellement incorporé à l'essence pour améliorer les émissions de gaz polluants (Hossain et al., 2015). Il contient 35% d'oxygène, ce qui réduit les émissions de particules et d'oxydes d'azote lors de sa combustion (Demirbas and Demirbas, 2010). En France, il est introduit dans les essences commerciales en mélange (Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires, 2022) :

## Partie I : Bibliographie

- De manière systématique dans le SP95-E5 (5%) et le SP95-E10 (10%)
- À haute teneur dans le carburant superéthanol E85, qui contient entre 65 et 85% en volume d'éthanol

En 2020, l'éthanol représente 19% des volumes de biocarburants incorporés dans les carburants (Ministère de la transition écologique, 2020).

### 1.5.4.1.2. Les glucides

Lors de la fermentation, les composés transformés sont les glucides. Ceux-ci (voir paragraphe I.4.1.2. Glucides) englobent une large gamme de sucres, d'amidons et de fibres. Les composés d'intérêt chez les microalgues sont l'amidon, le glycogène et la cellulose, trois polymères naturels du glucose. Certaines espèces sont dotées d'une paroi cellulaire riche en cellulose qui peut servir pour la production d'éthanol. Les microalgues ont l'avantage de ne pas contenir de lignine, un composant difficile à dégrader et non fermentable. Quelques microalgues comme *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* et *Spirulina* (**Tableau 16**) peuvent stocker l'amidon et le glycogène en grandes quantités (jusqu'à 50% de matière sèche) (Ueda et al., 1996). Les teneurs annoncées sont indicatives, car elles dépendent de la souche et des conditions de culture.

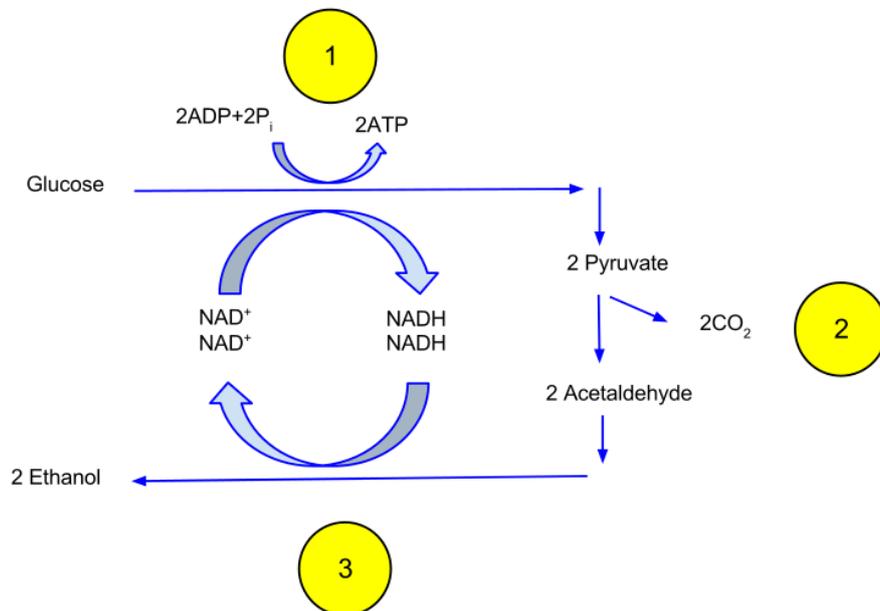
Espèce de microalgue	% amidon après extraction (g.gMES <sup>-1</sup> )	Référence
Algue verte NKG 121701	>50.0	(Matsumoto et al., 2003)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	53.0	(Kim et al., 2006)
<i>C. reinhardtii</i> UTEX2247	45.0	(Hirano et al., 1997)
<i>C. reinhardtii</i>	17.0	(Spolaore et al., 2006)
<i>Chlorella vulgaris</i>	12.0–17.0	(Spolaore et al., 2006)
<i>C. vulgaris</i>	37.0	(Hirano et al., 1997)
<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8262	21.5	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8485	27.0	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>Synechococcus</i> sp.	15.0	(Spolaore et al., 2006)
<i>Chlorococcum</i> sp. TISTR8583	26.0	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8982	13.3	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>S. acuminatus</i> TISTR 8457	7.3	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>S. acutiformis</i> TISTR 8495	16.4	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>S. arcuatus</i> TISTR 8587	12.9	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>S. obliquus</i> TISTR 8522	23.7	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>Nostoc</i> sp. TISTR 8872	30.7	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>N. maculiforme</i> TISTR 8406	30.1	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>N. piscinale</i> TISTR 8874	17.4	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>Oscillatoria</i> sp. TISTR 8869	19.3	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>O. jatorvensis</i> TISTR 8980	9.7	(Rodjaroen et al., 2007)
<i>Spirulina fusiformis</i>	37.3–56.1	(Rafiqul et al., 2003)

**Tableau 16.** Teneur en amidon des microalgues (John et al., 2011)

## I.5.4.1.3. Les réactions d'hydrolyse et de fermentation

L'amidon dans les chloroplastes ou la cellulose dans la paroi cellulaire ne sont pas directement fermentescibles (Jacob-Lopes et al., 2018). Ainsi, avant d'être fermentés, les glucides sont décomposés en sucres simples (glucose) par hydrolyse chimique (acide ou basique) ou enzymatique. « L'hydrolyse acide est rapide, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, mais avec l'acidité, les sucres peuvent être dégradés en composés indésirables et inhiber la fermentation. L'hydrolyse enzymatique est lente et coûteuse, mais plus respectueuse de l'environnement et peut conduire à de meilleurs rendements en sucres sans produits indésirables (Ho et al., 2013) ».

Lors de la fermentation alcoolique (**Figure 41**), des enzymes appelées zymases transforment le glucose en éthanol. En général, *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée (Demirbas and Demirbas, 2010). La réaction est effectuée en milieu anaérobie à 30°C.



**Figure 41.** Réaction de fermentation alcoolique (Davidcarmack, 2013)

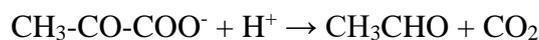
La réaction décrite dans la **Figure 41** se décompose en trois étapes :

1. Le glucose est décomposé en deux pyruvates par la réaction de glycolyse



#### Équation 17

2. L'énergie de ces réactions exothermiques est utilisée pour lier les phosphates inorganiques à l'ADP et convertir le NAD<sup>+</sup> en NADH. Le pyruvate est ensuite décomposé en acétaldéhyde et dégage du CO<sub>2</sub>



#### Équation 18

3. L'acétaldéhyde est réduit en éthanol et le NADH est réoxydé en NAD<sup>+</sup>



### Équation 19

Enfin, une distillation permet de récupérer et concentrer l'éthanol en éliminant l'eau et les autres impuretés (John et al., 2011).

#### 1.5.4.2. La digestion anaérobie

##### 1.5.4.2.1. Le biogaz

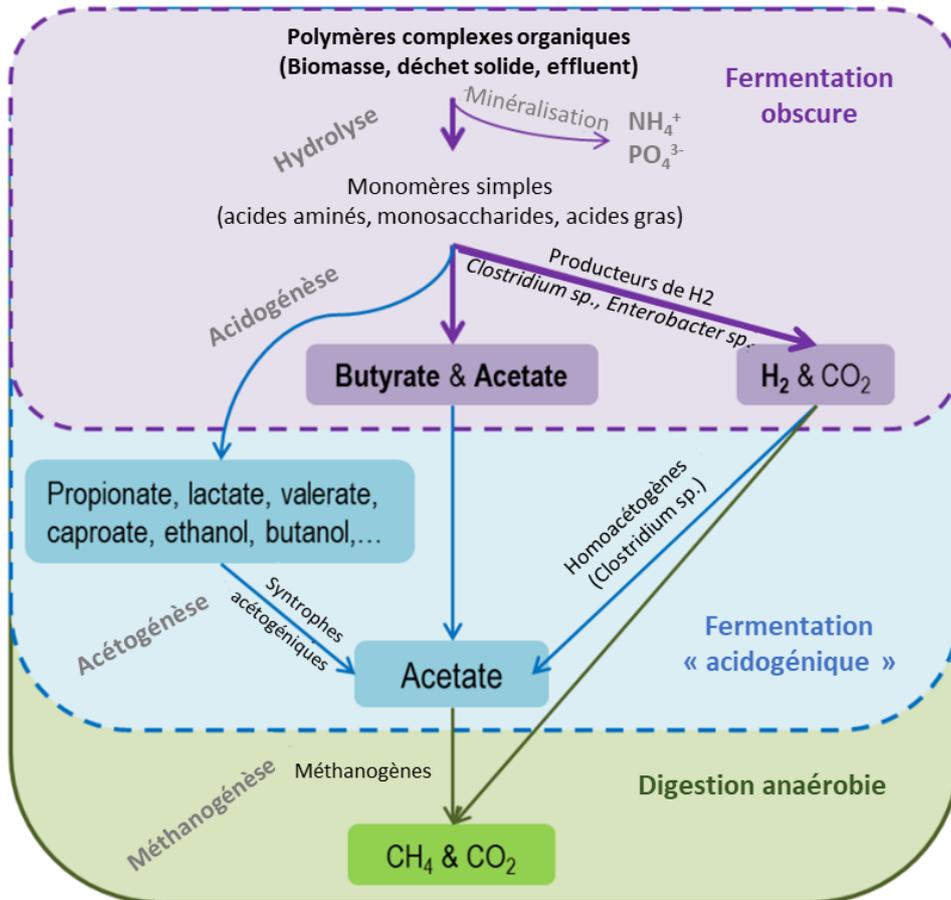
Le biogaz est un gaz naturel et renouvelable qui résulte de la décomposition de matière organique en absence d'oxygène. 1 m<sup>3</sup> de biogaz correspond à 0.5-0.6L d'essence ou 6kWh. Le mélange est composé de 50 à 60% de méthane (CH<sub>4</sub>), 40 à 50% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et de petites quantités de vapeur d'eau, de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), d'ammoniac et autres gaz (Anukam et al., 2019). En règle générale, si la biomasse est riche en lipides, 70% de CH<sub>4</sub> est attendu ; en protéines, 64% de CH<sub>4</sub> est attendu ; en glucides, 50% de CH<sub>4</sub> est attendu (Buswell and Neave, 1930). Le mélange gazeux est enfin destiné à des multiples usages (ADEME, 2021) :

- Après traitement, biométhane injecté dans le réseau de gaz. En France, en 2021, le biométhane représente 0,92% de la consommation de gaz naturel (Syndicat des énergies renouvelables et al., 2021)
- Combustible de moteur à cogénération pour produire de la chaleur et de l'électricité ;
- Combustible de chaudière pour générer de la chaleur
- Carburant pour les automobiles (bio Gaz Naturel Véhicule : bioGNV)

##### 1.5.4.2.2. La réaction

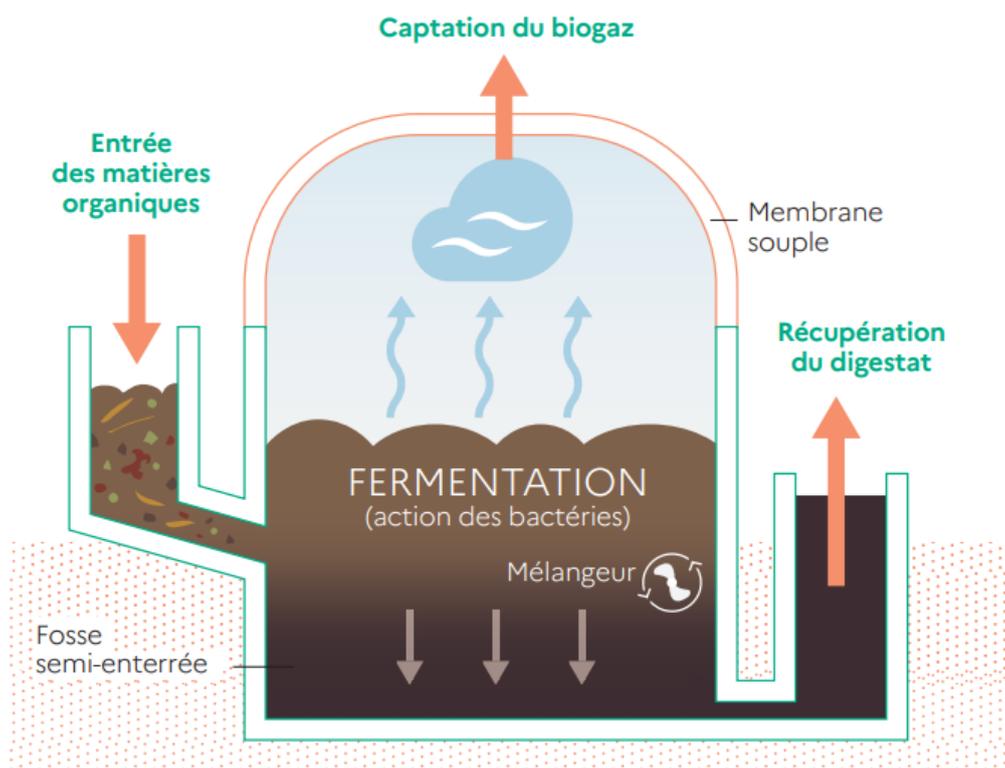
La digestion anaérobie correspond à la dégradation de biomasse en absence d'oxygène par des microorganismes qui mène à la formation de biogaz. Aussi appelée méthanisation, elle peut être séparée en 4 étapes : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (**Figure 42**).

- Pendant l'hydrolyse, les polymères organiques (glucides, lipides, protéines) sont dégradés en molécules plus simples (sucres, acides gras, acides aminés) par des bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium* sp., et des espèces anaérobies facultatives comme *Acetobacter* sp. ou *Streptococcus* sp.
- Lors de l'acidogénèse, les bactéries acidogènes ou fermentatives (*Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. et *Clostridium* sp.) convertissent ces composés en acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate), en alcools (éthanol, butanol), en acides organiques (lactate) en dihydrogène, en dioxyde de carbone et en ammoniac
- Les bactéries acétogènes les décomposent ensuite en acide acétique, dihydrogène et dioxyde de carbone
- Quand la méthanogénèse a lieu, les bactéries méthanogènes produisent alors du méthane



**Figure 42.** Liens entre la fermentation obscure, la fermentation « acidogénique » et la digestion anaérobie (Turon, 2015)

Il s'agit d'un processus qui a naturellement lieu dans certains milieux (marais...) ou peut être mis en place dans des installations dédiées appelées digesteur ou méthaniseur (Ministère de la transition énergétique, 2022) (**Figure 43**). Le mélange est chauffé à 35°C ou plus (entre 25 et 40°C, le procédé est dit mésophile, entre 40 et 65°C, il est dit thermophile) et agité en continu pour éviter la formation de couches. Le biogaz formé s'accumule au-dessus de la surface et peut par exemple être stocké dans le toit flexible au-dessus du réservoir. Un digesteur secondaire peut être situé en aval du digesteur principal. Le temps de séjour varie de 15 à 30 jours (Alepu, 2016). Une fois le processus terminé, le digestat (substrat dégradé) est pompé dans des réservoirs de stockage jusqu'à ce qu'il puisse être utilisé, en général comme fertilisant.



**Figure 43.** Schéma simplifié d'un méthaniseur (ADEME, 2021)

#### 1.5.4.2.3. Le substrat

Différentes matières organiques peuvent être utilisées, sauf les composés ligneux considérés comme récalcitrants et difficiles à dégrader (Kamperidou and Terzopoulou, 2021). La sélection est importante, car le rendement en méthane n'est pas le même.

Le rapport C/N idéal d'un substrat pour la digestion anaérobie se situe entre 20 et 35 (Punal, 2000). Peu de travaux se sont intéressés à la digestion de biomasse microalgues-bactéries (Béji et al., 2022; Hernández et al., 2013). Par exemple, au bout de 30 jours, la digestion du lisier sans floccs de microalgues-bactéries a produit plus de méthane que la digestion du lisier avec les floccs ( $726.7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$  de lisier,  $245.6 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$  de lisier+floccs) (Béji et al., 2022). Les références suivantes concernent principalement la biomasse microalgale, à défaut de résidus de microalgues et de bactéries. Bien que toute biomasse puisse être fermentée, la biomasse algale a un rapport C/N faible à cause de la forte teneur en protéines, ce qui équivaut à d'importantes quantités d'azote susceptibles d'inhiber les bactéries à cause de la formation d'ammoniac  $\text{NH}_3$ . De nombreuses études ont été recensées sur la biomasse microalgale en tant que substrat (**Tableau 17**). Une stratégie consiste à combiner la biomasse algale à un substrat riche en carbone (co-digestion). Par exemple, la co-digestion d'algues brutes *Scenedesmus* sp. et de lisier de porc a permis d'augmenter la production de méthane de  $0.163 \text{ m}^3 \cdot \text{gMVS}^{-1}$  (digestion d'algues brutes) à  $0.245 \text{ m}^3 \cdot \text{gMVS}^{-1}$  (Astals et al., 2015).

Espèce de microalgue	Méthane produit	Charge	Référence
<i>Arthrospira maxima</i>	173 mL.gVS <sup>-1</sup>	500 mg.TS.L	(Inglesby and Fisher, 2012)
<i>A. platensis</i>	481 mL.gVS <sup>-1</sup>	2000 mg.TS.L	(Mussgnug et al., 2010)
<i>Blue green algae</i>	366 mL.gVS <sup>-1</sup>	281.96 mg.VS.L	(Rui et al., 2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	587 mL.gVS <sup>-1</sup>	2000 mg.TS.L	Mussgnug et al., 2010)
<i>Chlorella kessleri</i>	335 mL.gVS <sup>-1</sup>	2000 mg.TS.L	Mussgnug et al., 2010)
<i>Chlorella</i> sp., <i>Pseudokirchneriella</i> sp. et <i>Chlamydomonas</i> sp.	0.28– 0.60 m <sup>3</sup> /kg/VS	402 mgVS	(De Schampelaire and Verstraete, 2009)
<i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i>	170– 320 mL g <sup>-1</sup> VS	1.44– 2.89 g.VS.L	(Golueke et al., 1957)
<i>Chlorella vulgaris</i>	403 mL g <sup>-1</sup> VS	2 g.VS.L	(Lü et al., 2013)
<i>C. vulgaris</i>	286 mL g <sup>-1</sup> VS	5000 mg.VS.L	(Lakaniemi et al., 2011)
<i>C. vulgaris</i>	240 mL g <sup>-1</sup> VS	1000 mg.VS.L	[6]
<i>C. vulgaris</i>	0.40–0.45 L	2677–6714 mg (COD)	(Sánchez Hernández and Travieso Córdoba, 1993)
<i>Dunaliella</i>	440 mL g <sup>-1</sup> VS	910 mg.VS.L	(Chen, 1987)
<i>D. salina</i>	505 mL g <sup>-1</sup> TS	2000 mg.TS.L	Mussgnug et al., 2010)
<i>D. tertiolecta</i>	24 mL g <sup>-1</sup> VS	5000 mg.VS.L	(Lakaniemi et al., 2011)
<i>Durvillea Antarctica</i>	492 mL g <sup>-1</sup> VS	3000 mg.dry.TS.j	Zamalloa et al., 2012)
<i>Euglena gracilis</i>	485 mL g <sup>-1</sup> VS	2000 mg.TS.L	Mussgnug et al., 2010)
<i>Macroystis pyrifer</i> et <i>Durvillea Antarctica</i> (50% mélange)	540 mL g <sup>-1</sup> VS	3000 mg.dry.TS.j	Zamalloa et al., 2012)
<i>Macroystis pyrifer</i>	545 mL g <sup>-1</sup> VS	3000 mg.dry.TS.j	Zamalloa et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.35 L g <sup>-1</sup> COD	1.3±0.4 – 5.8±0.9	(Zamalloa et al., 2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	287 mL g <sup>-1</sup> VS	2000 mg.TS.L	Mussgnug et al., 2010)
<i>S. obliquus</i>	240 mL g <sup>-1</sup> VS	2000 mg.VS.L	(Zamalloa et al., 2012)
<i>Scenedesmus</i> sp.	170 mL g <sup>-1</sup> COD	1000 mg.COD.L	(González-Fernández et al., 2012)

<i>Scenedesmus</i> sp. et <i>Chlorella</i> sp.	16.3–15.8 ft <sup>3</sup>	7.8–9.2 ft <sup>3</sup> .lb (VS)	(Golueke et al., 1957)
<i>Scenedesmus</i> sp. et <i>Chlorella</i> sp.	143 mL g <sup>-1</sup> VS	4000 mg.VS.L	(Yen and Brune, 2007)
<i>Spirulina</i> Leb 18	0.79 g/L	72000 mg.L.TS	(Costa et al., 2008)
<i>S. maxima</i>	0.35–0.80 m <sup>3</sup>	20–100 kg.m <sup>3</sup> (VS)	(Samson and LeDuyt, 1986)
<i>S. maxima</i>	320 mL.gVS <sup>-1</sup>	910 mg.VS.L	(Chen, 1987)
<i>Tetraselmis</i>	0.25–0.31 L.g VS <sup>-1</sup>	2000 mg.VS	(MARZANO et al., 1982)

**Tableau 17.** Production de méthane de la digestion anaérobie de biomasse microalgale (Ward et al., 2014)

Une autre possibilité est d'augmenter le rapport C/N en modifiant les conditions de culture pour que les microalgues produisent et stockent des composés carbonés (glucides). Ainsi, Markou et al. (2013) ont augmenté le contenu en glucides d'*Arthrospira platensis* avec une carence en phosphore. Après digestion anaérobie, ils ont observé qu'une augmentation des glucides améliorerait les rendements en biogaz (Markou et al., 2013). L'hypothèse est que les glucides sont produits comme composés de réserve à l'intérieur de la cellule et moins comme composés de structure dans la paroi cellulaire. Bien que les glucides aient un potentiel en méthane plus faible que les protéines et les lipides, s'ils sont produits en tant que composés de réserve, ils seraient plus facilement disponibles pour les bactéries que les protéines et les lipides dans la paroi cellulaire (Passos et al., 2014).

#### 1.5.4.3. La fermentation obscure

##### 1.5.4.3.1. Le biohydrogène

Lors de sa combustion, le biohydrogène libère uniquement de la vapeur d'eau et de l'énergie. Il contient la plus importante teneur en énergie 142 kJ.g<sup>-1</sup> de tous les combustibles connus. Selon (Menia et al., 2019), les parts de production d'hydrogène par différents procédés sont les suivantes :

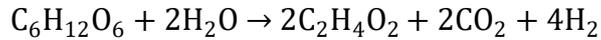
- 40% de l'hydrogène à partir de gaz naturel
- 30% à partir de pétrole lourd et de naphta
- 18% à partir de charbon
- 4% à partir de l'électrolyse de l'eau
- 1% à partir de la biomasse

L'hydrogène produit est utilisé comme carburant pour un moteur à combustion interne ou comme carburant pour les piles à combustible. L'un des enjeux est de promouvoir la production d'hydrogène à partir de sources renouvelables : biomasse, électrolyse utilisant une électricité générée elle-même par une source renouvelable/décarbonée.

##### 1.5.4.3.2. La réaction

La fermentation obscure consiste en une digestion anaérobie partielle en absence de lumière qui s'appuie sur les deux premières étapes : l'hydrolyse et l'acidogenèse (**Figure 42**). Il s'agit

en fait de la digestion anaérobie d'un substrat organique avec pour but de produire du dihydrogène H<sub>2</sub>, tandis que l'objectif de la méthanisation est de produire du biogaz. En théorie, un rendement de 4 mol H<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> d'hexose est produit avec de l'acide acétique comme sous-produit (Singh and Sarma, 2022) :



### Équation 20

Des populations bactériennes diversifiées produisent de l'hydrogène comme *Clostridium* sp., *C. pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. thermocellum*, et *C. paraputrificum*, des bactéries anaérobies strictes et *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., des bactéries facultatives (Singh and Sarma, 2022). Pour favoriser le dihydrogène qui est un produit intermédiaire de la digestion, les conditions opératoires peuvent être ajustées pour inhiber les bactéries acétogènes et méthanogènes (François-Lopez, 2016).

La plupart des méthanogènes croissent dans une gamme de pH entre 7 et 8, tandis que les bactéries productrices d'hydrogène peuvent survivre dans une gamme de pH plus large (Park et al., 2009). Un contrôle du pH lors de la fermentation obscure améliore la production d'hydrogène (J. K. Kim et al., 2008). D'autres options sont envisageables comme le prétraitement de l'inoculum ou un temps de séjour court. Un temps de séjour de 6 à 12h est plus favorable à la formation de dihydrogène sinon la croissance des méthanogènes est favorisée (François-Lopez, 2016). A 0°C et à 1 atm, le rendement stœchiométrique d'hydrogène à partir de biomasse est de 33–397.8 mLH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> (Argun and Kargi, 2011).

La production d'H<sub>2</sub> par voie fermentaire n'a pas atteint l'échelle industrielle, même si on la retrouve dans les filières de fermentation de fruits et légumes, d'effluents de sucrerie et de laiterie. Ainsi, beaucoup de recherches actuelles visent à comprendre et piloter les interactions entre micro-organismes producteurs et consommateurs d'H<sub>2</sub>, améliorer les productivités et les rendements qui demeurent faibles, et enfin à la coupler à d'autres procédés pour convertir la totalité de l'énergie contenue dans les substrats organiques (Latrille et al., 2017). Cela permet de tendre vers le concept de bioraffinerie.

#### I.5.4.3.3. Le substrat

Aucune étude n'a rapporté la production de biohydrogène à partir de floccs de microalgues-bactéries par fermentation obscure. Toutefois, la fermentation obscure de biomasse microalgale à faible teneur en lipides a été plus amplement étudiée. Ainsi, une production de 105-133 mLH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> avec *Microcystis* sp. (l'algue bleue Taihu) comme substrat a été enregistrée dans des conditions mésophiles (Yan et al., 2010). D'autre part, après un prétraitement alcalin, la digestion de *Scenedesmus* sp. à 37°C génère 45.5-46 mLH<sub>2</sub>.gVS<sup>-1</sup> (Yang et al., 2010).

### **I.5.5. Conclusion**

**Les filières de valorisation de la biomasse produite dans les CHRA sont multiples et n'ont pas toutes le même degré de maturité technologique. Concernant les conversions en biocarburant, les voies nécessitant un séchage préalable de la biomasse extraite (conversion thermochimique par voie sèche en particulier : combustion, pyrolyse, gazéification) ne paraissent pas pertinentes. En effet, l'importante demande en énergie du séchage annule les bénéfices apportés par la valorisation énergétique (Deniel, 2016). Il faudrait ainsi opter pour des méthodes alternatives permettant la production de biocarburants par conversion thermochimique à partir de ressources humides (Jendoubi, 2011). Les voies les plus prometteuses (transestérification en biodiesel, digestion anaérobie, fermentation obscure) sont dépendantes de la composition du substrat : en fonction des technologies, les données fournies se réfèrent souvent à de la biomasse microalgale pure et assez peu d'études s'intéressent aux consortiums microalgues-bactéries cultivés à partir d'eau usée. Il est ainsi important d'explorer le potentiel de ces biomasses en fonction des conditions de cultures particulières mises en place dans ce contexte.**

## **I.6. L'Analyse du Cycle de Vie (ACV)**

Afin d'évaluer le bien-fondé du procédé CHRA et des potentielles voies de valorisation associées, il est important d'évaluer les différents impacts environnementaux en considérant l'ensemble de la chaîne. Pour cela, l'Analyse du Cycle de Vie (ACV) apparaît comme un outil pertinent d'aide à la décision.

### **I.6.1. Généralités**

L'analyse du cycle de vie est définie comme « analyse du berceau à la tombe ou du berceau au berceau pour évaluer les impacts environnementaux associés à toutes les étapes de la vie d'un produit, allant de l'extraction des matières premières au traitement, à la fabrication, à la distribution et à l'utilisation des matériaux (Muralikrishna and Manickam, 2017) ». La méthode a été normalisée au niveau international par les normes ISO (14040 à 14044) ("ISO 14044," 2006). Elle se déroule en 4 phases :

1. Définition des objectifs et le champ d'étude : il faut définir l'unité fonctionnelle
2. Analyse de l'inventaire : inventaire du cycle de vie (ICV) inventaire des flux de matière et d'énergie entrants et sortants associés à chaque étape (émissions polluantes et extraction des matières premières)
3. Evaluation des impacts : on utilise un logiciel ACV
4. Interprétation

L'ensemble du cycle est pris en compte et différentes catégories d'impact sur l'environnement sont considérées. « Au départ outil d'évaluation de l'impact des produits manufacturés, l'ACV est de plus en plus adoptée dans le domaine des productions du secteur primaire, comme le biodiesel produit à partir de microalgues (Collet et al., 2014) ».

### **I.6.2. Application au traitement des eaux usées**

Dans le domaine des eaux usées, l'ACV demeure un outil assez nouveau. En effet, elle a été plus utilisée pour évaluer des solutions environnementales liées au cycle de vie des produits (Pasciucco et al., 2023). Toutefois, il est possible d'envisager les eaux usées comme un « produit » plutôt que comme un « déchet », car les nutriments peuvent être récupérés. Ainsi, le changement de paradigme lié à la valorisation des ressources, telles que la réutilisation des eaux usées, l'énergie et les engrais, ont favorisé l'application de l'approche ACV au domaine des eaux usées (Pradel et al., 2016).

En général, les auteurs créent divers scénarios pour comparer des unités de traitement entre elles. Ainsi, une ACV sur trois systèmes de traitement (les boues activées (BA), un CHRA et une ZHA zone humide artificielle) pour une petite collectivité a été réalisée par (Garfi et al., 2017) sur le logiciel *SimaPro*®8 avec la méthode ReCiPe. Dans cette étude, sept indicateurs d'impact ont été considérés : Epuisement des métaux, Epuisement des ressources fossiles, Changement climatique, Destruction de la couche d'ozone, Acidification des milieux, Eutrophisation en eau douce et en mer. Les techniques alternatives sont les plus respectueuses de l'environnement tandis que le traitement conventionnel a obtenu un score médiocre en raison d'une consommation électrique élevée et de l'utilisation de réactifs. Selon le critère,

l'impact environnemental des BA est entre 2 et 5 fois supérieur à celui des procédés alternatifs. Le CHRA et la ZHA ont présenté des scores environnementaux similaires.

- Pour les filières extensives, l'infrastructure et l'exploitation sont responsables respectivement de 25-35% et de 35-65% de l'impact total d'Épuisement des ressources fossiles, la Destruction de la couche d'ozone, l'Acidification des milieux, l'Eutrophisation en eau douce et en mer. L'infrastructure est essentiellement due au fort besoin en matières premières pour la construction et au grand terrain requis. Ces observations sont cohérentes avec d'autres études (Machado et al., 2007). Si l'occupation d'espace est un critère de premier ordre, il faut opter pour la ZHA qui a une empreinte réduite dans ce domaine de  $3.5 \text{ m}^2 \cdot \text{EH}^{-1}$  contre  $6 \text{ m}^2 \cdot \text{EH}^{-1}$  pour le chenal.
- Concernant le Changement climatique, l'infrastructure et l'exploitation ont représenté 50% de la totalité de l'impact pour le CHRA. Dans le cas du FPR, l'infrastructure, l'exploitation et les émissions ont participé de manière équivalente à l'impact global.

Du point de vue des coûts, les boues activées se sont avérées 2 à 3 fois plus chères que les technologies extensives. Le CHRA est apparu comme l'alternative la moins coûteuse suivi par le FPR et les BA (Garfi et al., 2017).

Le champ d'étude peut être élargi à la valorisation de la biomasse produite et les potentielles voies de conversion après le CHRA. L'ACV d'un CHRA associé à une valorisation de la biomasse en biogaz et en fertilisant a été réalisée pour être comparée à une BA de petite capacité (Arashiro et al., 2018). La production de biogaz s'est montrée moins impactante pour l'environnement dans les catégories d'impact de Changement climatique, Destruction de la couche d'ozone, Pic d'ozone et Épuisement des ressources fossiles. Le CHRA combiné à la production de fertilisant est plus économique que la production de biogaz. Le chenal pourrait « accroître la durabilité et la rentabilité du traitement des eaux usées dans les petites communautés, en particulier si elles sont mises en œuvre dans des régions à climat chaud et couplées à la production de biofertilisants (Arashiro et al., 2018) ».

Pour jauger les impacts environnementaux de biocarburant produit à partir d'un consortium de microalgues et de bactéries, des études ont choisi l'ACV comme approche et différents scénarios : par exemple un CHRA en traitement secondaire ou tertiaire et une valorisation énergétique (Li et al., 2022), une conversion en biodiesel par transestérification, liquéfaction hydrothermale ou pyrolyse et une digestion anaérobie avec ou sans prétraitement (Sun et al., 2019), une conversion en biodiesel ou en butanol (Wu et al., 2019).

### **I.7. Conclusions générales**

Classé comme filière intensive, le chenal à haut rendement algal demande une forte emprise au sol comparé à des systèmes d'épuration classiques comme les boues activées. Les performances de traitement des eaux usées rapportées sont satisfaisantes avec un besoin énergétique réduit et une mise en œuvre relativement simple de l'infrastructure.

Au sein du chenal, un consortium de microalgues et de bactéries est le principal acteur du traitement des eaux usées. La combinaison de différents microorganismes permet de faire appel

à diverses voies métaboliques et réactions d'intérêt pour l'épuration : consommation de matière organique par les bactéries hétérotrophes, assimilation du CO<sub>2</sub> par les microalgues, nitrification et dénitrification bactériennes, production de l'O<sub>2</sub> par photosynthèse, assimilation des nutriments. Ces mécanismes mobilisent des flux d'oxygène et des protons ainsi que la consommation ou production d'alcalinité et deviennent des indicateurs de la dynamique du consortium. Ces interactions entre les microalgues et les bactéries expliquent la faible demande en énergie des CHRA, à travers la respiration photosynthétique. Toutefois, d'autres interactions potentielles restent à investiguer.

Parmi les facteurs influençant les microalgues et les bactéries sont recensés les besoins nutritionnels, les paramètres environnementaux et opérationnels. Dans les eaux usées, la concentration en polluants est un élément fondamental qui permet de soutenir la production de biomasse et/ou d'agir comme facteur limitant pour en contrôler la composition biochimique avec la carence ou l'absence d'un nutriment. L'apport nutritionnel exerce ainsi une influence sur les rendements épuratoires du CHRA. Ensuite, le pH, la lumière et la température constituent des facteurs essentiels qui vont jouer sur l'efficacité des mécanismes biologiques comme la photosynthèse ou l'oxydation bactérienne. Enfin, à l'échelle du procédé, des améliorations restent possibles d'un point de vue opérationnel sur les CHRA via la technologie de mélange, le temps de séjour hydraulique ou l'âge des boues.

En aval du CHRA, la biomasse produite, qui est un mélange de microalgues et de bactéries, présente un potentiel de valorisation intéressant et pluriel. Si l'on considère les conversions en biocarburant, les procédés qui requièrent un séchage préalable du substrat (conversion thermochimique par voie sèche en particulier : combustion, pyrolyse, gazéification) ne paraissent pas pertinents. La demande énergétique induite par le séchage annule les bénéfices apportés par une valorisation énergétique (Deniel, 2016). Il faudrait ainsi opter pour des méthodes alternatives permettant la production de biocarburants par conversion thermochimique à partir de ressources humides (Jendoubi, 2011), notamment la transestérification en biodiesel, la digestion anaérobie et la fermentation obscure. Ces procédés sont souvent appliqués à de la biomasse microalgale pure et moins de travaux s'intéressent aux consortiums microalgues-bactéries cultivés à partir d'eau usée. Or, leur efficacité dépend dans une grande mesure de la composition biochimique du substrat. L'investigation de ces biomasses en fonction des conditions de cultures particulières mises en place dans le contexte des eaux usées apparaît indispensable

Enfin, dans le but de juger la pertinence d'une filière de traitement par CHRA, il est important d'évaluer les différents impacts environnementaux en considérant l'ensemble de la chaîne. Pour cela, l'Analyse du Cycle de Vie (ACV) apparaît comme un outil pertinent d'aide à la décision.

## Partie II : Matériels et Méthodes

Dans cette section, la démarche expérimentale globale est présentée avec :

- Les deux systèmes expérimentaux : les photobioréacteurs séquentiels avec injection de dioxyde de carbone et en suivant le CHRA ;
- Le fonctionnement des pilotes et les conditions opératoires étudiées ;
- Les méthodes analytiques pour mesurer la production de biomasse et sa composition biochimique (protéines, glucides, lipides) ;
- La détermination des rendements épuratoires via les paramètres classiques de pollution
- Le suivi de l'activité du consortium par l'acquisition des données d'oxygène et leur modélisation pour diverses modalités dans le CHRA ;
- Une analyse du cycle de vie du chenil pour examiner la pertinence de cette voie de traitement des eaux usées en se basant sur nos données expérimentales et la littérature.

### II.1. Pilotes expérimentaux

#### II.1.1. Inoculum de microalgues et bactéries

Les réacteurs utilisés ont été inoculés en biomasse de la même façon. La préparation de l'inoculum a suivi la méthode proposée par Su et al. (2011). L'inoculum algal consiste en un mélange de microalgues vertes collectées en brossant la paroi d'un clarificateur secondaire d'une station de traitement des eaux usées (Rosheim, 67560). La biomasse a ensuite été stockée dans une bouteille et transportée au laboratoire dans les 2 h suivant la collecte. Au laboratoire, la biomasse a été lavée à l'eau distillée puis laissée à reposer pendant 1 h. Le surnageant a été jeté et la biomasse décantée a été récupérée pour servir d'inoculum algal. Il n'y a pas eu de stérilisation (Su et al., 2011). La bio-floculation par ajout de boues activées améliore la décantation de la biomasse (Ummalya et al., 2017). Ainsi, l'inoculum bactérien était constitué de boue activée prélevée dans un bassin d'aération de la même station de traitement. La suspension a été stockée dans une bouteille et transportée au laboratoire dans les 2h. Elle a été laissée au repos durant 1h, puis le surnageant a été éliminé et la boue activée décantée a été utilisée comme inoculum bactérien (Su et al., 2011).

Le rapport entre l'inoculum microalgal et bactérien a été basé sur les MES. Le rapport idéal est 1:1 (Pham, 2018). Le volume de l'inoculum d'algues et de bactéries à injecter pour le démarrage du réacteur a été dilué (**Équation 21**) pour atteindre une concentration initiale dans le réacteur de  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ .

$$MES_{inoculum} V_{inoculum} = MES_R V_R \leftrightarrow V_{inoculum} = \frac{MES_R V_R}{MES_{inoculum}}$$

#### Équation 21

Avec :

- $MES_R$  : MES du réacteur ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- $V_R$  : volume du réacteur (L)
- $MES_{inoculum}$  : MES de l'inoculum ( $\text{g.L}^{-1}$ )

- $V_{\text{inoculum}}$  : volume d'inoculum (L)

### II.1.2. Eaux usées synthétiques

Les eaux usées synthétiques servant de milieu de culture ont été préparées selon la recette décrite ci-après, certaines modifications ayant pu être apportées pour évaluer l'influence de la charge en azote, par exemple.

Pour les études menées au laboratoire, l'utilisation d'eaux usées synthétiques par rapport au prélèvement d'eaux réelles présente certains avantages :

- une composition fixée en termes de carbone et de nutriments ;
- l'approvisionnement en eaux usées réelles peut être problématique (temps, transport, manipulation) ;
- les eaux usées synthétiques ne sont pas contaminées par des pathogènes ou des bactéries, ce qui a été un élément déterminant en contexte COVID-19 (restrictions d'usage au laboratoire pour les effluents réels).

Le coût de fabrication d'un effluent synthétique peut constituer un frein, mais en prenant en compte le transport, la manipulation et le stockage des eaux usées réelles, les eaux usées synthétiques s'avèrent être ici une solution économique. Cependant, les eaux usées synthétiques ne sont pas totalement représentatives des eaux usées réelles (O'Flaherty and Gray, 2013) qui ont une composition qui varie en fonction des saisons, de la localisation, du réseau d'assainissement...

Durant cette étude, l'eau usée synthétique standard a été préparée selon la composition de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (OECD, 2001). Les produits utilisés et leurs concentrations sont listés dans le **Tableau 18**.

Produit	Concentration
Extrait de viande (Viandox <sup>®</sup> )	1 mL.L <sup>-1</sup>
Peptone	160 mg.L <sup>-1</sup>
Urée CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	30 mg.L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28 mg.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4 mg.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 mg.L <sup>-1</sup>
NaCl	7 mg.L <sup>-1</sup>

**Tableau 18.** Produits et concentrations dans les eaux usées synthétiques

Pendant l'étude de la CHRA, la composition a été modifiée pour reproduire la variabilité des eaux usées réelles. Les changements sont détaillés lors de la présentation des modalités de fonctionnement (paragraphe II.1.4.3.2. Composition des eaux usées entrantes). Il n'y a pas de MES, donc ça s'apparente à une EU en sortie de décanteur.

### II.1.3. Photobioréacteurs séquentiels avec CO<sub>2</sub>

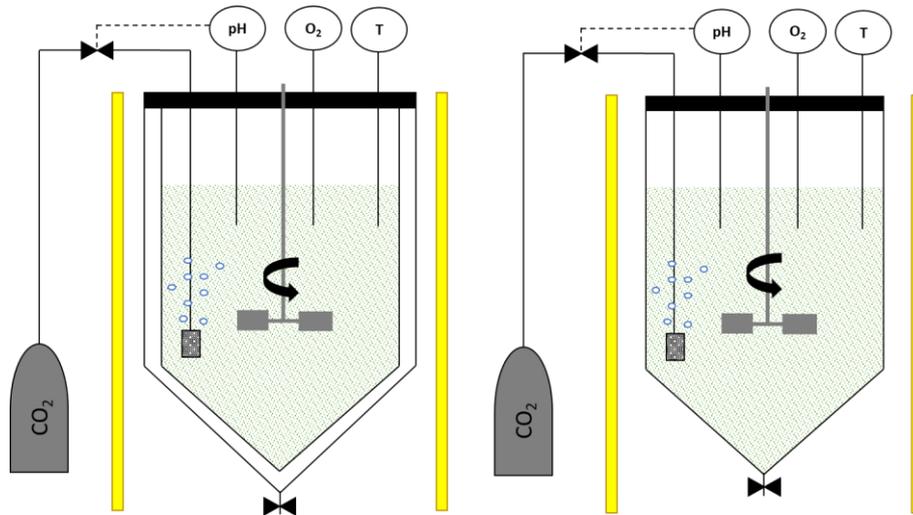
#### II.1.3.1. Descriptif

Les essais ont été menés en intérieur, au laboratoire. Les photobioréacteurs consistent en des réacteurs en verre transparent de forme cylindro-conique (**Figure 44**). Le premier photobioréacteur R1 était à simple enveloppe, le second R2 était muni d'une double enveloppe (**Figure 45**). Le volume utile était de 15 L.



**Figure 44.** Photo du photobioréacteur à double enveloppe

Le mélange était assuré en continu par des agitateurs à pales plates (turbine de Rushton) à une vitesse de 150 rpm. Les réacteurs étaient éclairés par 8 LED émettant une lumière blanche de (température de couleur de 4000K, puissance de 8W et intensité lumineuse de 900 lumens) placés autour de chaque réacteur. L'intensité lumineuse mesurée avec un luxmètre à la paroi du réacteur était de 12-15 klux (approximativement  $168\text{-}250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de rayonnement photosynthétique actif). Une alternance jour/nuit de 12h/12h a été implémentée et gérée avec une prise programmable. Le pH (Mettler Toledo InPro3100i/SG/120), la température et l'oxygène dissous (Mettler Toledo InPro6860i/12/12mA) ont été mesurés en continu. Le kit d'injection de CO<sub>2</sub> (JBL ProFlora m2003) est constitué d'une sonde pH, d'un boîtier tactile pour régler les paramètres et d'une bouteille de gaz. Au fond du réacteur, le dioxyde de carbone a été injecté à un débit fixe par un diffuseur de type poreux connecté à la bouteille. Quand le pH dépassait 7.5, le CO<sub>2</sub> était injecté jusqu'à ce que la valeur revienne la consigne.



**Figure 45.** Schéma des photobioréacteurs (double et simple enveloppe) avec les kits d'injection de CO<sub>2</sub>

### II.1.3.2. Fonctionnement : alimentation et extraction

Le photobioréacteur a fonctionné comme un SBR (Sequencing Batch Reactor) (**Figure 46**). La durée d'un cycle était de 48h. La concentration en biomasse ciblée était de 2 g.L<sup>-1</sup> de MES. Ainsi, tous les 2 jours, les MES ont été mesurées et une partie de la culture en suspension ( $V_{\text{extrait}}$ ) a été extraite pour garder la concentration à 2 g.L<sup>-1</sup> (**Équation 22**). Pour une meilleure compréhension, une valeur des MES<sub>mesure</sub> de 2.2 g.L<sup>-1</sup> a ici été choisie en exemple. Ceci a constitué l'étape 1 d'extraction de la biomasse en excès.

$$V_{\text{extrait}} = \frac{M_{\text{extraite}}}{\text{MES}_{\text{mesure}}} = \frac{V_R * (\text{MES}_{\text{mesure}} - \text{MES}_{\text{cible}})}{\text{MES}_{\text{mesure}}} = \frac{15 * (2.2 - 2)}{2.2} = 1.36 \text{ L}$$

### Équation 22

Avec :

- $V_{\text{extrait}}$  : volume de biomasse extrait (L)
- $M_{\text{extraite}}$  : biomasse à extraire (g MES)
- $\text{MES}_{\text{mesure}}$  : concentration en MES mesurée dans le réacteur (g.L<sup>-1</sup>)
- $\text{MES}_{\text{cible}}$  : concentration en MES visée dans le réacteur (g.L<sup>-1</sup>)
- $V_R$  : volume du réacteur (L)

Le volume extrait (1.36 L dans l'exemple) a été utilisé pour déterminer les paramètres physico-chimiques de l'eau (voir paragraphes II.2.1.1. et II.2.2. ). Il a été filtré pour mesurer les MES et les MVS de la culture. Une partie de la biomasse filtrée a été récupérée pour analyser sa composition en termes de protéines, lipides et glucides. Les protocoles analytiques correspondants sont détaillés dans le paragraphe II.2.1.3. Composition biochimique.

Après cette phase d'extraction, l'agitation a été stoppée et la biomasse laissée à sédimenter pendant 45 min.

## Partie II : Matériels et Méthodes

Le temps de séjour hydraulique (TSH) était fixé à 4 jours. Ainsi, le volume d'eaux usées synthétiques à renouveler tous les deux jours a été déterminé :

$$TSH = \frac{V_R}{Q_{vidangé}} = 4 j \leftrightarrow Q_{vidangé} = \frac{V_R}{TSH} = \frac{15}{4} = 3.75 L.j^{-1} \text{ (soit 7.5 L tous les 2 j)}$$

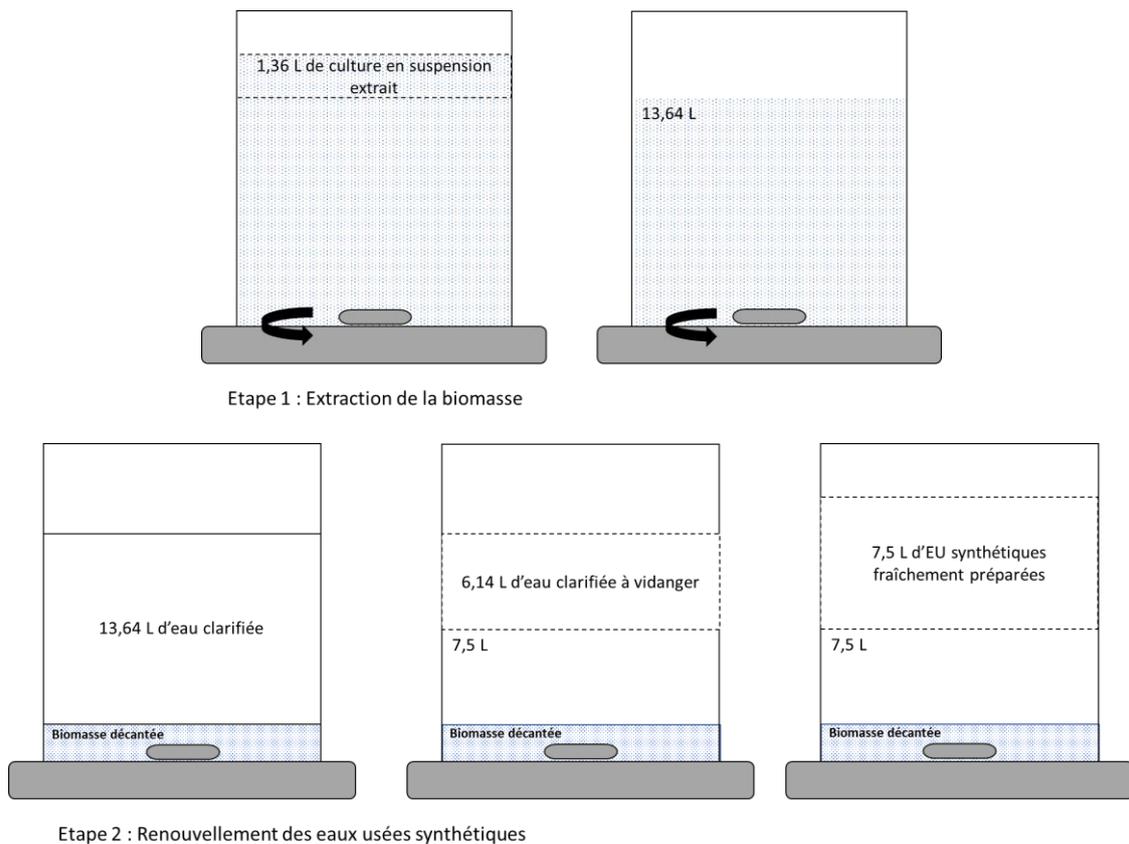
### Équation 23

Avec :

- TSH : temps de séjour hydraulique (j)
- $V_R$  : volume du réacteur (L)
- $Q_{vidangé}$  : débit vidangé moyen ( $L.j^{-1}$ )

Dans le volume à vidanger (7.5 L tous les 2 jours), le volume de biomasse en suspension extrait pendant l'étape 1 (1.36 L) a été pris en compte. Ainsi, dans cet exemple, 6.14 L de surnageant ont été vidangés ( $V_{vidangé} = 7.5 - 1.36 = 6.14 L$ ).

Enfin, 7.5 L d'eaux usées synthétiques fraîchement préparées ont été ajoutés avant de remettre l'agitation en marche.



**Figure 46.** Fonctionnement du photobioréacteur séquentiel lors des phases d'extraction et de vidange

### II.1.3.3. Modalité : le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>

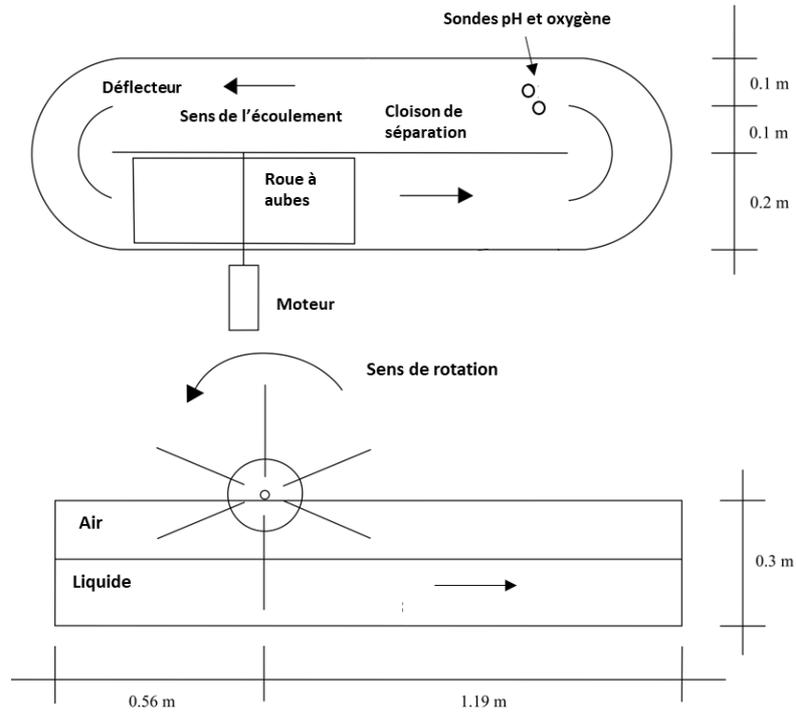
Les deux photobioréacteurs ont été exploités du 16/10/2020 au 01/04/2021, soit 167 jours de fonctionnement. Un éclairage permanent a été fourni jusqu'au 04/11/2020 (J19). Ensuite, l'éclairage avec cycles de 12h a été appliqué. Les deux cultures ont fonctionné un certain laps de temps sans ajout de dioxyde de carbone pour acclimater le consortium et acquérir suffisamment de données sans CO<sub>2</sub>. Le kit d'injection de CO<sub>2</sub> a ensuite été mis en place le 13 janvier dans le réacteur R1 (soit J89) et le 22 février dans le réacteur R2 (J129). R1 a opéré 2 mois avec le CO<sub>2</sub>, et R2 a fonctionné 1 mois avec le CO<sub>2</sub>.

Les eaux usées ont un ratio C/N plus faible que la biomasse algale (Park and Craggs, 2010) : il y aurait donc une limitation par le carbone. L'apport de CO<sub>2</sub> doit permettre de pallier cette limitation. La quantité injectée est déterminée par le pH dont la consigne a été réglée à 7.5 dans la gamme optimale pour les microalgues et les bactéries (Rupert Craggs et al., 2014). Lorsque la valeur mesurée par la sonde pH a dépassé 7.5, la vanne de régulation s'est ouverte et le CO<sub>2</sub> a été diffusé à débit fixe dans le photobioréacteur. La vanne s'est fermée quand le pH est revenu sous la consigne.

### II.1.4. Chenal à haut rendement algal (CHRA)

#### II.1.4.1. Descriptif

Le système consiste en un chenal oblong (type *raceway*), fabriqué en plastique (Plexiglas<sup>®</sup>) transparent (**Figure 47**, **Figure 48**). La configuration était à boucle simple séparée par une cloison centrale et terminée par un virage à 180° avec présence d'un déflecteur. L'agitation a été assurée par une roue à aubes entraînée par un moteur à courant continu à balais (DMN37K, 24V, Nidec Servo Corporation, Japon), contrôlé par un bloc d'alimentation réglable (ISO-TECH IPS303DD, Royaume-Uni). Les pâles de la roue ont été conçues pour occuper toute la section transversale du chenal, minimisant ainsi l'espace entre la pale et la paroi. La présence de six pâles améliore l'efficacité de la roue et diminue les à-coups au niveau du moteur (Anderson, 2004).

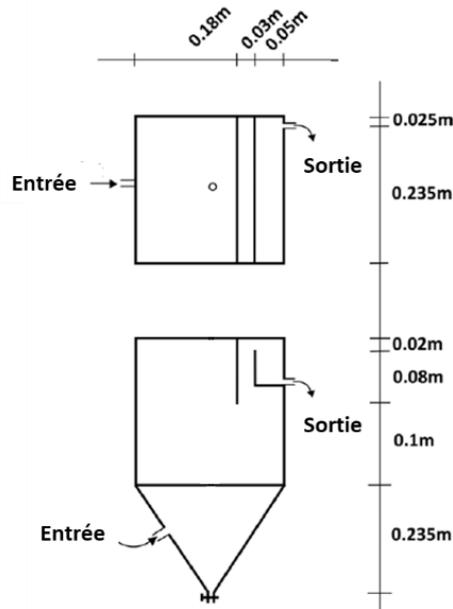


**Figure 47.** Schéma (vue de côté et de haut) du chenal (Pham, 2018)

Le dimensionnement et la géométrie du chenal et du décanteur présentés sur les **Figure 47** et **Figure 49** résultent d'études précédentes (Pham et al., 2018). La surface mouillée totale était de  $0.72 \text{ m}^2$ . Pendant l'exploitation, la hauteur liquide a été fixée à 11.5 cm, soit un volume utile de 86L.



**Figure 48.** Photo du chenal à haut rendement algal avec le décanteur



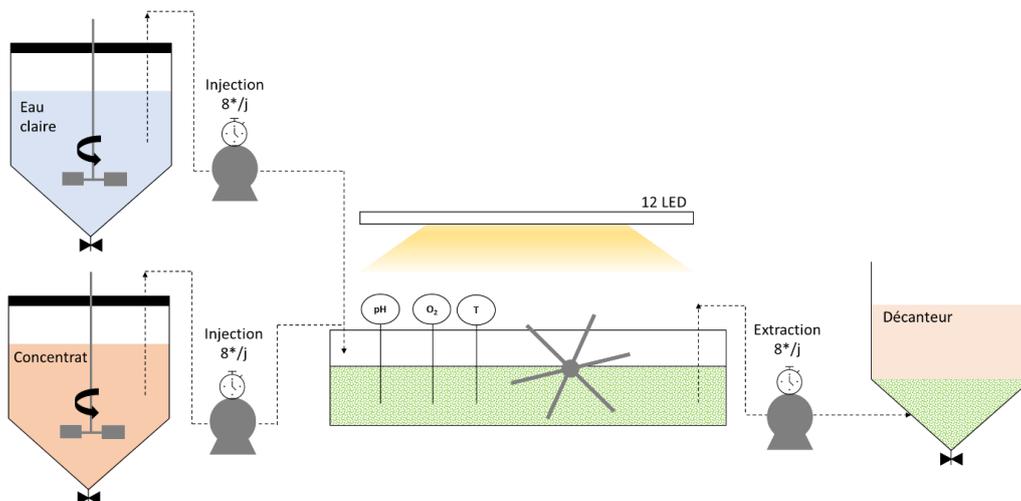
**Figure 49.** Schéma (vue de haut et de côté) du décanteur (Pham, 2018)

Un décanteur (**Figure 49**) a été positionné comme sortie pour récupérer les eaux traitées. Le niveau d'eau dans le décanteur déterminait le niveau d'eau dans le CHRA. La surface totale était de  $0,055 \text{ m}^2$ . Le volume utile était de  $16,5 \text{ L}$ .

L'éclairage a été assuré par 12 tubes LED (température de couleur de 4000K, puissance de 8W et intensité lumineuse de 900 lumens) émettant une lumière blanche suspendus au-dessus du chenal à une distance verticale de 1 m. Le cycle jour/nuit de 14h/10h a été géré avec une prise programmable. L'oxygène dissous ( $\text{O}_2$  Sensor Mettler Toledo InPro 6860i), le pH (Mettler Toledo InPro3100i/SG/120) ainsi que la température ont été mesurés en continu à des points fixes du chenal.

#### II.1.4.2. Fonctionnement

##### II.1.4.2.1. Alimentation



**Figure 50.** Schéma du CHRA avec les cuves d'eau claire et de concentrat et le décanteur

Les eaux usées synthétiques ont été préparées selon la formule décrite précédemment (voir paragraphe II.1.2. Eaux usées synthétiques). Afin de limiter la fermentation et d'assurer une durée de conservation suffisante dans la cuve d'alimentation, elles ont été concentrées d'un facteur 10 et ont été gardées dans une cuve agitée (15L) comme concentrat. Ce concentrat a été renouvelé tous les 5 jours. Une cuve d'eau claire a permis de diluer le concentrat au moment de l'injection, à l'aide d'une pompe péristaltique (**Figure 50**).

La culture a été alimentée à un débit fixe par une pompe péristaltique (Masterflex L/S Standard Digital Pump System) toutes les 3 h pendant 13 min, soit 8 injections par jour. Si nécessaire, le débit a été modifié en fonction des modalités testées. La suspension du chenal s'écoulait gravitairement vers le décanteur où la biomasse sédimentait et le surnageant (les eaux traitées) était récupéré par surverse. Le décanteur a permis de maintenir un niveau d'eau constant (11.5 cm) dans le chenal.

Avec un temps de séjour hydraulique de 5 j, les volumes de concentrat et d'eau claire à injecter dans le chenal chaque jour sont :

$$V_{alim} = \frac{V_{CHRA}}{TSH} = \frac{85.7}{5} = 17.2 \text{ L.j}^{-1}$$

$$V_{alim} = V_{concentrat} + V_{eau\ claire}$$

$$V_{concentrat} = \frac{V_{alim}}{Dilution} = \frac{17.2}{10} = 1.72 \text{ L.j}^{-1} \text{ de concentrat}$$

$$V_{eau\ claire} = V_{alim} - V_{concentrat} = 17.2 - 1.72 = 15.5 \text{ L.j}^{-1} \text{ d'eau claire}$$

#### Équation 24

En considérant une fréquence d'injection de 8 fois par jour et une durée d'injection de 13 min (0.22 h), les débits instantanés des pompes d'eau claire et de concentrat sont :

$$V_{eau\ claire, injection} = \frac{V_{eau\ claire}}{Fréquence} = \frac{15.5}{8} = 1.94 \text{ L. injection}^{-1}$$

$$Q_{pompe, eau\ claire} = \frac{V_{eau\ claire}}{Durée} = \frac{1.94}{0.22} = 8.8 \text{ L. h}^{-1}$$

$$V_{concentrat, injection} = \frac{V_{concentrat}}{Fréquence} = \frac{1.7}{8} = 0.21 \text{ L. injection}^{-1}$$

$$Q_{pompe, concentrat} = \frac{V_{concentrat}}{Durée} = \frac{0.21}{0.22} = 0.97 \text{ L. h}^{-1}$$

#### Équation 25

Avec :

- $V_{CHRA}$  : volume du chenal (L)
- $V_{alim}$  : volume total journalier d'alimentation (L.j<sup>-1</sup>)

- $V_{\text{concentrat}}$  : volume journalier d'alimentation en concentrat ( $L.j^{-1}$ )
- $V_{\text{eau claire}}$  : volume journalier d'alimentation en eau claire ( $L.j^{-1}$ )
- TSH : temps de séjour hydraulique (j)
- $V_{\text{concentrat,injection}}$  : volume de concentrat ajouté à chaque injection ( $L.injection^{-1}$ )
- $V_{\text{eau claire,injection}}$  : volume d'eau claire ajouté à chaque injection ( $L.injection^{-1}$ )
- Durée : durée d'une injection d'eau usée (h)
- $Q_{\text{pompe,concentrat}}$  : débit instantané de la pompe de concentrat pendant une injection ( $L.h^{-1}$ )
- $Q_{\text{pompe,eau claire}}$  : débit instantané de la pompe d'eau claire pendant une injection ( $L.h^{-1}$ )

#### II.1.4.2.2. Extraction de la biomasse en excès

La biomasse en excès a été extraite selon deux protocoles en fonction des modalités d'étude (**Tableau 19**).

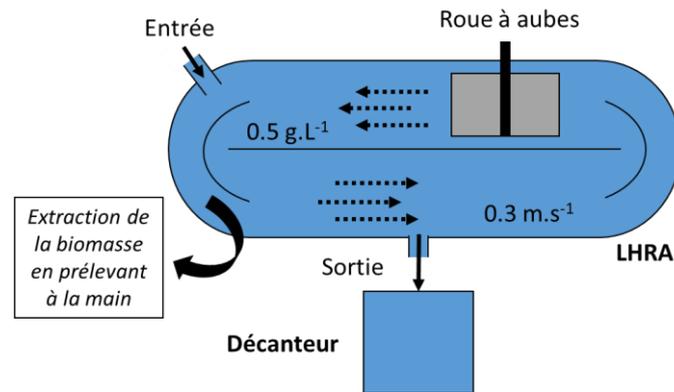
Date	Extraction	Paramètre
05/11/21 – 20/04/22	Manuelle	Concentration fixée à $0.5 \text{ g.L}^{-1}$
20/04/22 – 08/11/22	Pompe	Variation de l'ADB

**Tableau 19.** Protocoles d'extraction

Du 05/11/2021 au 20/04/2022, la concentration en biomasse a été fixée à  $0.5 \text{ gMES.L}^{-1}$  au sein du chenal. Si la valeur de concentration en MES était supérieure, un certain volume de culture était prélevé manuellement et laissé au repos. La biomasse décantée était jetée et le surnageant réintroduit dans le chenal. Le calcul est réalisé de manière similaire au photobioréacteur séquentiel (**Équation 22**).

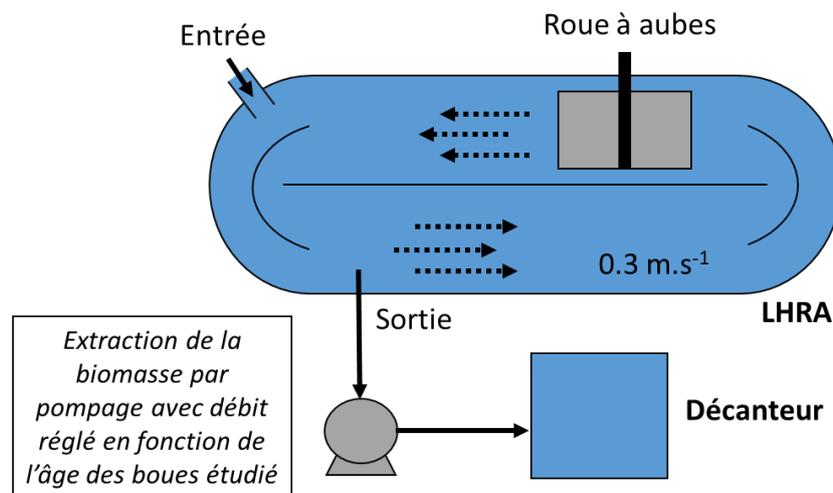
Les fonctions premières du décanteur ont ainsi été la collecte/séparation des eaux traitées et le maintien du niveau d'eau dans le chenal. Concernant le bilan matière sur le système, le débit sortant du chenal était censé participer à l'extraction de la biomasse en excès et ainsi limiter l'extraction « à la main » décrite ci-dessus pour maintenir la concentration ciblée. Ainsi, en théorie, la biomasse récupérée dans le décanteur devait correspondre au produit du volume d'eau usées injecté et des MES mesurées dans la culture. Pour le vérifier, deux mesures ont été faites (13/12/2021 au 17/12/2021 et 02/01/2022 au 06/01/2022). Le décanteur a été déconnecté de la culture et son contenu a été filtré. Le filtre a été placé au four à  $105^{\circ}\text{C}$ , puis pesé. La masse mesurée de biomasse était largement inférieure à la masse calculée en théorie. Dans ces conditions, le bilan matière théorique n'étant pas respecté, les calculs de productivité ont été corrigés sur cette période en considérant une masse moyenne de biomasse accumulée dans le décanteur à  $1.055 \text{ gMES.j}^{-1}$ .

Ce phénomène peut s'expliquer comme suit : pendant cette période, le décanteur était connecté au chenal, mais peu de biomasse y était collectée. En effet, la canalisation entre le chenal et le décanteur était perpendiculaire à l'écoulement du fluide (**Figure 51**). Vu les vitesses rapides d'écoulement dans le chenal comparé au débit transitant dans le tube de sortie de faible section (diamètre  $< 1 \text{ cm}$ ), les floes de biomasse n'étaient que très peu entraînés vers le décanteur.



**Figure 51.** Configuration du CHRA pendant l'extraction manuelle

Pour pallier cette problématique et mieux maîtriser le bilan matière, du 20 avril au 8 octobre 2022, une pompe péristaltique a été installée entre le chenal et la lagune pour « forcer » la sortie du mélange biomasse/eau usée traitée vers le décanteur (**Figure 52**). Le fort débit instantané imposé permet un meilleur entraînement de la biomasse vers le décanteur. Le volume journalier ainsi extrait était égal à celui d'entrée. Ainsi, le TSH et l'âge des boues (ADB) ont pu être modifiés en changeant en même temps les débits d'alimentation et de sortie. Les calculs correspondants sont détaillés dans la partie suivante. L'extraction a eu lieu juste avant l'injection d'eaux usées synthétiques, soit 8 fois par jour. Le décanteur a récupéré les eaux traitées et la biomasse.



**Figure 52.** Configuration du CHRA pendant l'extraction par pompage

#### II.1.4.3. Modalités

Le chenal a fonctionné du 5 novembre 2021 au 8 octobre 2022. Au cours de cette période, les modalités d'exploitation ont varié pour étudier l'effet de la vitesse de mélange de la roue à aubes, de la composition de l'entrée (azote et carbone) et de l'âge des boues (**Tableau 20**). Suite aux différents changements de modalité, un temps minimum équivalent à 3 fois le temps de séjour hydraulique a été laissé avant d'interpréter les données, afin de permettre au système de s'équilibrer.

Date	Modalité	Composition des EU	Biomasse dans le CHRA, TSH, ADB	Objectif
21/11-03/12	Vitesse haute	Standard	Biomasse = 0.5 g.L <sup>-1</sup> TSH = 4.7 j ADB variable	Baisser la dépense en énergie de la roue à aubes
03/12-31/12	Vitesse basse			Simuler la variabilité des EU
01/01-01/04	Azote	Sans urée		
01/04-25/04	Nouvelle culture			
25/04-10/06	TSH = ADB = 5j	Standard	Biomasse variable TSH = ADB = 5 j	Sélectionner des espèces à croissance rapide
10/06-24/06	Nouvelle culture			
24/06-26/09	Matière organique et ADB = 8 j	Sans viandox et ½ de peptone	Biomasse variable TSH = ADB = 8 j	Simuler la variabilité des EU
27/09-08/11	Matière organique et ADB = 5 j	Sans viandox et ½ de peptone	Biomasse variable TSH = ADB = 5 j	Simuler la variabilité des EU

**Tableau 20.** Chronologie des conditions opératoires testées dans le CHRA

#### II.1.4.3.1. Vitesse de rotation de la roue à aubes

Plusieurs combinaisons de niveau d'eau, de vitesse de rotation de la roue et de débit d'entrée ont déjà été appliquées dans le chenal pour étudier les effets sur le mélange, le temps de séjour et le transfert gazeux (Pham et al., 2018). En se basant sur cette étude, trois tensions ont été choisies au niveau de l'alimentation électrique de la roue pour représenter un mélange faible (3.5V pour 0.2±0.0A) et fort (7V pour 0.3±0.1A). Les vitesses correspondantes de rotation de la roue étaient 5.6±0.4 rpm et 11.6±0.9 rpm. Cette modalité a été testée pour réduire la dépense énergétique de la roue à aubes et voir son impact sur le fonctionnement du chenal, notamment au niveau du transfert gaz-liquide.

#### II.1.4.3.2. Composition des eaux usées entrantes

La composition des eaux usées synthétiques (voir paragraphe II.1.2. Eaux usées synthétiques) en entrée a été modifiée. Dans un premier temps, l'urée a été retirée. La concentration initiale était 30 mg.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (7 mg.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N). Dans un second temps, l'extrait de viande a été enlevé et la quantité de peptone a été divisée par deux. La dose initiale de l'extrait de viande était 1 mL.L<sup>-1</sup>, et la dose de peptone était de 160 mg.L<sup>-1</sup>. Le **Tableau 21** résume la composition de l'entrée standard, sans urée, avec la moitié de peptone et sans extrait de viande. L'objectif était de simuler la variabilité des eaux usées réelles en changeant la charge en azote et en DCO. La « qualité » de l'extrait de viande a été variable d'un flacon à l'autre, d'où les fluctuations de la DCO entre « Standard » et « Sans urée ».

Entrée	Standard	Sans urée	Sans viandox + 1/2 peptone
DCO (mg.L <sup>-1</sup> )	337	455	131
TN (mgN.L <sup>-1</sup> )	85.9	46.1	34.9
NTK (mgN.L <sup>-1</sup> )	83.6	44.2	32.2
Ammonium (mgNH <sub>4</sub> -N.L <sup>-1</sup> )	14.7	21.5	16.8
Nitrites (mgNO <sub>2</sub> -N.L <sup>-1</sup> )	0.1	0.3	0.1
Nitrates (mgNO <sub>3</sub> -N.L <sup>-1</sup> )	2.2	1.6	2.6
Norg (mgN.L <sup>-1</sup> )	68.9	22.7	15.4
Phosphore total (mgP.L <sup>-1</sup> )	12.5	20.7	7.3
DCO/N/P	27/6.9/1	22/2.2/1	18/4.8/1

**Tableau 21.** Composition des eaux usées synthétiques entrantes

#### II.1.4.3.3. Age des boues

Avant le 20 avril 2022, en raison de la configuration de la sortie du chenal gravitaire, l'ADB était variable (**Figure 51**). L'extraction de la biomasse par voie manuelle avait pour objectif un maintien de la concentration en biomasse fixée à 0.5 g.L<sup>-1</sup>.

A partir du moment où le débit de sortie du chenal a été imposé via une pompe péristaltique, l'âge des boues (ADB) est devenu un paramètre opérationnel aisé à maîtriser et faire varier. Il était dès lors égal au temps de séjour hydraulique. Il a été modifié en changeant le débit d'extraction de la pompe mise en place (**Figure 52**) à partir du 20 avril 2022 (ainsi que le débit d'alimentation) (**Équation 26**). Deux âges des boues ont été testés : 5 et 8.2 jours (**Tableau 22**).

$$ADB = \frac{Q_{\text{extraction}}}{V_{LHRA}}$$

**Équation 26**

Avec :

- ADB : âge de boues (j)
- $Q_{\text{extraction}}$  : volume journalier d'extraction/sortie (L.j<sup>-1</sup>)
- $V_{CHRA}$  : volume du chenal (L)

Date	ADB	$Q_{\text{extraction}}$	Fréquence	$T_{\text{extraction}}$	$Q_{\text{pompe}}$
25/04/2022 – 10/06/2022	5 jours	16 L.j <sup>-1</sup>	8 fois.j <sup>-1</sup>	3 min	0,665 L.min <sup>-1</sup>
24/06/2022 – 24/09/2022	8.2 jours	9.2 L.j <sup>-1</sup>	8 fois.j <sup>-1</sup>	3 min	0,383 L.min <sup>-1</sup>

**Tableau 22.** Paramètres opératoires pour les différents âges des boues

## II.2. Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques ci-dessous ont été appliquées pour les photobioréacteurs et le CHRA.

### II.2.1. Biomasse

#### II.2.1.1. MES et MVS

Les Matières En Suspension (MES) et les Matières Volatiles En Suspension (MVS) ont été mesurées selon les normes Afnor ("Afnor NF EN 872," 2005) en triplicat. Des filtres en fibres de verre (Whatman, GF/C) ont été placés à l'étuve à 105°C pendant 2h, puis dans le dessiccateur pour refroidir. Le filtre a été pesé et la masse a été notée  $M_1$ . Un échantillon de culture a été prélevé et a été filtré avec un kit de filtration sous vide et une pompe. Le filtre avec la biomasse a été placé à l'étuve à 105°C au minimum 4h, puis dans le dessiccateur jusqu'à refroidir à température ambiante. L'ensemble a été pesé, la masse a été notée  $M_2$ . Les MES ont été déterminées :

$$MES = \frac{M_2 - M_1}{V_{filtré}}$$

#### Équation 27

Avec : les MES en  $g.L^{-1}$ , les masses M en g et le volume filtré en L

Le filtre avec la biomasse a ensuite été placé à l'étuve à 550°C au minimum 4h, puis dans le dessiccateur pour refroidir. Il a été pesé, la masse a été notée  $M_3$ . Les Matières Volatiles En Suspension (MVS) ont été calculées :

$$MVS = \frac{M_3 - M_2}{V_{filtré}}$$

#### Équation 28

Avec : les MVS en  $g.L^{-1}$ , les masses M en g et le volume filtré en L

#### II.2.1.2. Productivité et productivité cumulée

##### II.2.1.2.1. Photobioréacteur

Pour les photobioréacteurs, la productivité comprend la biomasse produite dans la culture et la biomasse extraite manuellement à chaque cycle. Ainsi, elle a été déterminée comme :

$$P_{cycle\ i} = P_{culture} + P_{extrait}$$

$$P_{cycle\ i} = [V_{culture} * (MES_{cycle\ i} - MES_{cycle\ i-1})] + [V_{extrait} * MES_{cycle\ i}]$$

#### Équation 29

Avec :

- $P_{cycle\ i}$  : productivité lors d'un cycle (gMES)
- $V_{culture}$  : volume de la culture (L)

## Partie II : Matériels et Méthodes

- $V_{\text{extrait}}$  : volume extrait (L)
- MES en  $\text{g.L}^{-1}$

La productivité cumulée  $P_{\text{cumulée,réacteur}}$  correspond à la productivité  $P_{\text{cycle } i}$  et la somme des productivités antérieures :

$$P_{\text{cumulée,réacteur}}(\text{mg/j}) = P_{\text{cycle } i} + P_{\text{cycle } i-1}$$

### Équation 30

#### II.2.1.2.2. CHRA

Dans le chenal, l'équation de la productivité a changé en fonction du mode d'extraction manuel ou par pompage décrit précédemment.

Du 05/11/2021 au 20/04/2022, la productivité inclut la biomasse produite dans la culture, la biomasse accumulée dans le décanteur et la biomasse extraite manuellement pour maintenir la concentration dans la culture à  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ . La productivité de biomasse  $P_{j1}$  est décrite comme :

$$P_{j1} = P_{\text{culture}} + P_{\text{décanteur}} + P_{\text{extraction,manuelle}} \\ = [V_{\text{culture}} * (\text{MES}_j - \text{MES}_{j-1})] + [1.055 * \Delta_{\text{temps}}] + [V_{\text{extrait}} * \text{MES}_j]$$

### Équation 31

Du 20/04/2022 au 08/11/2022, la productivité inclut la biomasse produite dans la culture et la biomasse extraite par pompage dans le décanteur. La productivité de biomasse  $P_{j2}$  est décrite comme :

$$P_{j2} = P_{\text{culture}} + P_{\text{extraction,pompe}} = [V_{\text{culture}} * (\text{MES}_j - \text{MES}_{j-1})] + [V_{\text{extrait}} * \text{MES}_j]$$

### Équation 32

Avec :

- la productivité de biomasse  $P_{j1}$  et  $P_{j2}$  en g
- le volume  $V_{\text{culture}}$  et  $V_{\text{extrait}}$  en L
- les MES en  $\text{g.L}^{-1}$
- la biomasse accumulée dans le décanteur en moyenne  $1.055 \text{ en g.j}^{-1}$
- le pas de temps entre les mesures de MES  $\Delta_{\text{temps}}$  en jours

Enfin, dans les deux cas, la productivité cumulée  $P_{\text{cumulée,CHRA}}$  correspond à la productivité  $P_j$  et la somme des productivités antérieures :

$$P_{\text{cumulée,CHRA}} = P_j + P_{j-1}$$

### Équation 33

#### II.2.1.3. Composition biochimique

Pour déterminer la composition de la biomasse (protéines, glucides et lipides), différents protocoles ont été testés puis validés pour une application sur le long terme. Un échantillon de biomasse a été prélevé régulièrement, lyophilisé et stocké au congélateur pour déterminer la

composition en termes de protéines (dosage de l'azote Kjeldahl), lipides (Farinacci and Laurent, 2023) et glucides (Dubois et al., 1956). Les protocoles adaptés et les résultats obtenus sont présentés dans la partie III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse.

### II.2.2. Traitement des eaux usées

Pour évaluer les performances d'épuration, les eaux usées en entrée et sortie ont été analysées avec des kits micro-méthodes (Macherey-Nagel) pour la DCO, les formes de l'azote, ions  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) et le phosphore total. Chaque échantillon a été filtré et dilué si nécessaire pour entrer dans la gamme de mesure (**Tableau 23**).

Paramètre	Filtration	Dilution	Gamme de mesure
DCO	Non	Non	15-160 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$
Ammonium	0.45 $\mu\text{m}$	Non	0.04-2.3 $\text{mgNH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$
Nitrites	0.45 $\mu\text{m}$	10 *	0.003-0.46 $\text{mgNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$
Nitrates	0.45 $\mu\text{m}$	10 *	0.3-22 $\text{mgNO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$
Azote global	0.45 $\mu\text{m}$	10 *	1.0-16 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$
Phosphate total	0.45 $\mu\text{m}$	20 *	0.2-5 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$

**Tableau 23.** Micro-méthodes pour les analyses physico-chimiques

L'abattement des polluants a été calculé :

$$R = 100 * \left(1 - \frac{C_{\text{sortie}}}{C_{\text{entrée}}}\right)$$

#### Équation 34

Avec : l'abattement R en %, la concentration en entrée et en sortie des nutriments en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

### II.2.3. Activité du consortium de microalgues et de bactéries

Les mécanismes biologiques à l'œuvre dans le CHRA sont caractérisés par des flux d'oxygène dissous entre les microorganismes. Dans le consortium, les algues libèrent l'oxygène essentiel à l'oxydation bactérienne, et dans le même temps, les populations bactériennes produisent le  $\text{CO}_2$  indispensable à la photosynthèse. D'autre part, le transfert de l'oxygène entre les phases gaz et liquide participe au bilan sur l'oxygène dans le chenal. La question scientifique est donc la suivante : « Peut-on estimer quantitativement l'activité des microalgues et des bactéries via la mesure d'oxygène dissous dans le chenal ? ». Pour répondre à cette problématique, l'approche a été la suivante :

- L'oxygène dissous a été mesuré en continu dans le système ;
- Les données expérimentales ont été simulées selon un modèle simplifié qui identifie la consommation et la production d'oxygène dues aux microorganismes et le transfert d'oxygène gaz-liquide.

II.2.3.1. Modélisation

Le modèle de (Buhr and Miller, 1983) a été simplifié et implémenté dans le logiciel AQUASIM version 2.1 (Reichert, 1994). L'oxygène dissous a été modélisé pour chaque modalité testée dans le chenal. Le solveur d'optimisation de paramètres intégré à AQUASIM (méthode sequant) a été utilisé pour caler les paramètres du modèle sur les différentes périodes.

Quelques simplifications ont été introduites dans le modèle. Les microalgues, les bactéries hétérotrophes et nitrifiantes ont été considérées :

- La concentration en microalgues n'est pas représentée dans le système mais simplement le taux de production d'oxygène maximal ( $OPR_{max}$ ), pondéré par des termes de Monod sur le  $CO_2$  et l'azote total ainsi qu'une fonction on/off représentant la présence ou absence de lumière ( $L(t) = 0$  ou  $1$  selon absence ou présence de lumière) ;
- La consommation d'oxygène par respiration exogène des bactéries autotrophes et hétérotrophes a été globalisée (le modèle présenterait sinon trop de degrés de liberté au regard des données expérimentales disponibles pour le calage). L'objectif n'étant pas d'évaluer la concentration en bactéries, le paramètre de calage est donc le produit du taux de croissance maximal et de la concentration en bactéries  $\mu_{B,max}X$  (considéré constant sur l'échelle de temps considérée) ;
- Le terme de respiration endogène  $OUR_{endogène}$  englobe les microalgues et les bactéries et est supposé constant sur l'échelle de temps considérée ;
- Le transfert d'oxygène est modélisé selon la théorie du double-film (Lewis and Whitman, 1924).

Les cinétiques et stœchiométrie des processus biologiques et physiques impliqués sont décrits dans le **Tableau 24** (matrice de Gujer). Les valeurs et les unités des paramètres du modèle sont listées dans le **Tableau 25**.

Processus	Oxygène dissous $O_2$	Substrat S	Cinétique
Photosynthèse (Croissance des microalgues)	+ 1		$OPR_{max} * \frac{CO_2}{K_C + CO_2} * \frac{N_t}{K_N + N_t} * L(t)$
Respiration exogène (Croissance des bactéries hétérotrophes + autotrophes)	- (1-Y)/Y	- 1/Y	$\mu_{B,max}X * \frac{S}{K_S + S} * \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} * \frac{N_t}{K_N + N_t}$
Respiration endogène	- 1		$OUR_{endogène}$
Transfert gaz-liquide	+ 1		$k_{La,O_2}(O_{2,sat} - O_2)$

**Tableau 24.** Cinétiques du modèle

Les flux d'oxygène correspondants deviennent respectivement :

- **Bactéries**

$$OUR_{exogène} = -\frac{-(1-Y)}{Y} \mu_{B,max} X * \frac{S}{K_S + S} * \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} * \frac{N_t}{K_N + N_t}$$

**Équation 35**

- **Microalgues**

$$OPR = OPR_{max} * \frac{CO_2}{K_C + CO_2} * \frac{N_t}{K_N + N_t} * L(t)$$

**Équation 36**

- **Mortalité**

$$OUR_{endogène}$$

**Équation 37**

- **Transfert gaz-liquide**

$$OTR = k_{La,O_2}(O_{2,sat} - O_2)$$

**Équation 38**

Paramètre	Description	Unité
t	Temps	j
T	Température	°C
L(t)	Lumière ON/OFF avec alternance jour/nuit	/
Injection	Injection ON/OFF d'eaux usées synthétiques	/
F	Débit d'entrée : <i>Injection * Q (m³/h) * 24 (h)</i>	m³/j
CO <sub>2,0</sub>	Concentration en C minéral à l'entrée	mgCO <sub>2</sub> /L
S <sub>0</sub>	Concentration en substrat à l'entrée	mgDBO <sub>5</sub> /L
OUR <sub>exogène</sub>	Respiration exogène des bactéries hétérotrophes	mgO <sub>2</sub> /L/h
OUR <sub>endogène</sub>	Respiration endogène des bactéries et des microalgues	mgO <sub>2</sub> /L/h
S	Concentration en substrat organique	mgDBO <sub>5</sub> /L
X	Concentration en bactéries	mg/L
O <sub>2</sub>	Concentration en oxygène dissous	mgO <sub>2</sub> /L
O <sub>2,sat</sub>	Concentration en oxygène à saturation : <i>0.0045*T<sup>2</sup>-0.3636*T+14.504</i>	mgO <sub>2</sub> /L
N <sub>t</sub>	Concentration en azote minéral total	mgN/L
CO <sub>2</sub>	Concentration en CO <sub>2</sub> dissous	mgC/L
Y	Rendement de croissance des bactéries	0.4 g bactéries/mg DBO consommée

Kc	Constante de demi-saturation du carbone minéral	0.044 mgCO <sub>2</sub> /L
Kn	Constante de demi-saturation de l'azote	0.014 mgN/L
K <sub>O2</sub>	Constante de demi-saturation de l'oxygène	0.256 mgO <sub>2</sub> /L
Ks	Constante de demi-saturation du substrat	10 mgDBO <sub>5</sub> /L
K <sub>La,O2</sub>	Coefficient de transfert de l'oxygène	j <sup>-1</sup>

**Tableau 25.** Paramètres du modèle

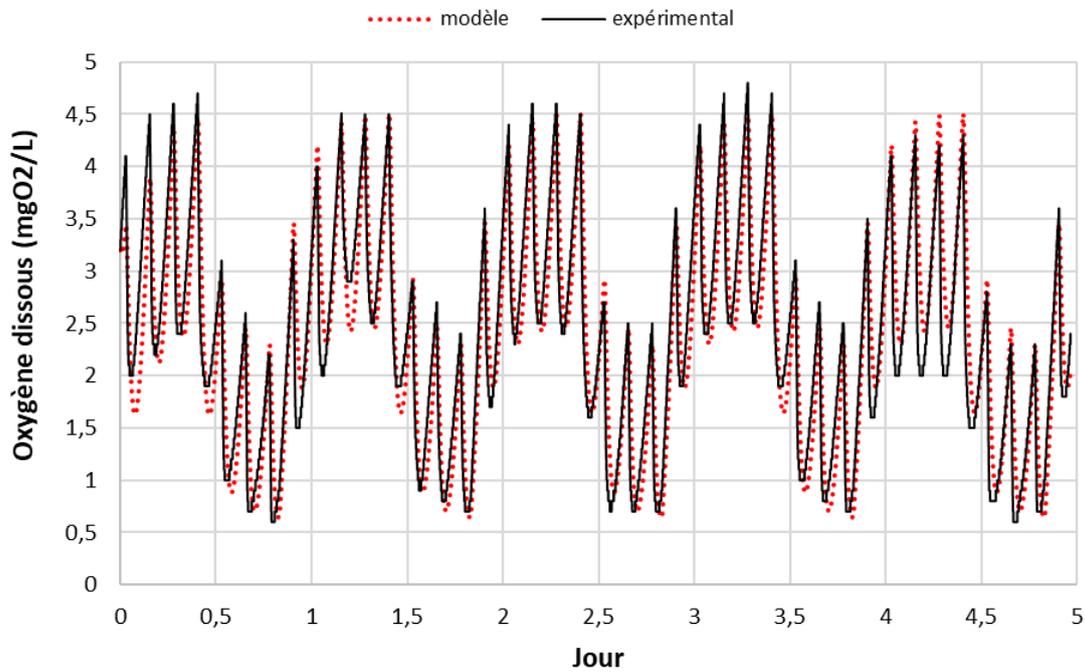
Les données expérimentales d'oxygène dissous ont été importées et ont été séparées en 2 périodes de 4 et 5 j. La constante de demi-saturation Ks a été fixée à 20 mg.L<sup>-1</sup>, une valeur donnée dans le modèle ASM1 (Henze et al., 1999). Ensuite, trois paramètres  $\mu_{B,max}X$ ,  $OPR_{max}$  et  $OUR_{endo}$  ont été calés en fonction de ces données. Pour s'assurer de la validité du calage, plusieurs calages ont été lancés avec différentes valeurs initiales de  $\mu_{B,max}X$ ,  $OUR_{endo}$  et  $OPR_{max}$  (**Tableau 26**), pour chaque jeu de données (pour s'assurer de la robustesse du calage, ce qui a permis d'éviter des phénomènes de minimums locaux avec des valeurs potentiellement aberrantes des paramètres)

$\mu_{B,max}X$	$OPR_{max}$	$OUR_{endo}$
300	300	300
100	100	100
200	200	50
50	200	200
200	50	200
10	10	10
80	30	150
500	40	5
2	180	60
700	80	200

**Tableau 26.** Valeurs initiales de  $OPR_{max}$ ,  $OUR_{endogène}$  et  $\mu_{B,max}X$ 

Le jeu de valeurs obtenues a été calé :

- Par un test statistique du  $\chi^2$  avec une valeur de  $\chi^2$  la plus faible possible sous réserve que les valeurs soient biologiquement possibles,
- Visuellement par comparaison de la courbe expérimentale et du modèle (exemple sur la **Figure 53**). Un jeu de données indépendant a été également utilisé pour chaque modalité afin de valider les paramètres obtenus.



**Figure 53.** Exemple de données d'oxygène dissous expérimentales et simulées

#### II.2.3.2. Détermination expérimentale du $k_{LaO_2}$

L'oxygène dissous est un paramètre fondamental dans des procédés biologiques comme le CHRA. Au sein du consortium microalgues-bactéries, les microalgues produisent l'oxygène nécessaire à l'oxydation bactérienne, et en parallèle, les bactéries hétérotrophes libèrent le dioxyde de carbone utilisé pendant la photosynthèse. En plus des microorganismes, le transfert de l'oxygène entre l'air et le liquide a une grande influence sur le processus. Le coefficient de transfert  $k_{LaO_2}$  est dépendant de l'hydrodynamique du système, qui est en grande partie le résultat du mélange via la roue à aubes. Ce terme de transfert a constitué une donnée de base pour le modèle présenté ci-dessus et la démarche de calage associée : le coefficient de transfert doit être déterminé expérimentalement et fixé.

Le protocole expérimental, réalisé en eau claire, a consisté à amener l'oxygène dissous proche de zéro (par ajout de sulfite de sodium avec du chlorure de cobalt, le catalyseur). Ensuite, l'agitation a été mise en marche jusqu'à ce que la valeur d'oxygène dissous soit à l'équilibre. Grâce à un bilan massique simplifié sur l' $O_2$  (OPR et OUR ont été éliminés par absence de bactéries ou de microalgues en eau claire). Après intégration de l'**Équation 38**, la valeur de  $k_{LaO_2}$  a été estimée avec la méthode des moindres carrés pour ajuster les données simulées avec les données expérimentales.

$$O_2(t) = O_{2,sat} - (O_{2,sat} - O_{2,ini}) \exp(-k_{La,O_2}t)$$

#### Équation 39

Avec :  $O_2(t)$ , la concentration en oxygène mesurée à l'instant  $t$ ,  $O_{2,sat}$ , la concentration en oxygène à saturation, et  $O_{2,ini}$ , la concentration en oxygène initiale.

L'expérience a été réalisée dans le CHRA avec de l'eau claire en circuit fermé. La sonde employée (O2 Sensor InPro 6860i) a été la même qui a mesuré les données en continu dans la culture, et elle a été calibrée avant chaque essai. Le niveau d'eau était 11.5 cm, soit un volume de 86L dans le chenal. Les deux vitesses de rotation testées ont correspondu à des tensions de 3.5V et 7V pour le moteur connecté à la roue à aubes. Le catalyseur, le chlorure de cobalt ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) et le sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) ont été ajoutés en début d'essai. La quantité de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a été calculée comme suit :

$$[\text{Co}] = 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \rightarrow [\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 2.017 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} (g) = \frac{2.017 * V_{\text{CHRA}}}{1000}$$

Si 8 kg de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  peuvent absorber 1 kg d'oxygène dissous (OD), la quantité à ajouter de sulfite de sodium a été déterminée :

$$\text{Na}_2\text{SO}_3 (g) = \frac{8 * [\text{OD}] * V_{\text{CHRA}}}{1000}$$

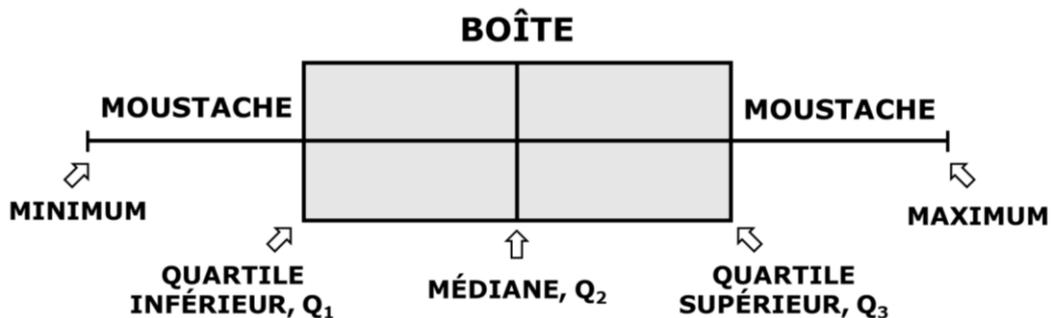
Au final, les masses de réactifs sont 0.173 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  et 5.8 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

Les données expérimentales combinées à la méthode des moindres carrés du solveur Excel ont donné une valeur de  $\text{kLaO}_2$  de  $12.2 \text{ j}^{-1}$  à vitesse basse et  $27.4 \text{ j}^{-1}$  à vitesse haute.

#### II.2.4. 4. Analyse statistique

##### II.2.4.1. Boîtes à moustaches

Les boîtes à moustache ou Box-plot (**Figure 54**) permettent de représenter graphiquement la variabilité d'un jeu de données. Le minimum, le 1er quartile (25%), la médiane M (50%), le 3ème quartile (75%) et le maximum sont figurés. Les extrémités de la boîte représentent l'intervalle interquartile qui englobe 50% de la distribution des données. Les limites supérieure et inférieure (les moustaches) sont calculées comme :  $1,5 \times$  intervalle interquartile.



**Figure 54.** Schéma d'une boîte à moustaches (Gouvernement du Canada, 2021)

## II.3. Analyse du Cycle de Vie (ACV)

### II.3.1. Logiciel ACV4E

ACV4E est un logiciel d'approche simplifiée de l'Analyse du Cycle de Vie (ACV) des systèmes d'assainissement développé par Irstea (désormais INRAE) dans le cadre d'une collaboration avec l'ONEMA. L'unité complète peut être modélisée avec le réseau de collecte, le procédé d'épuration et la filière des boues produites. L'échelle visée est pour les petites et moyennes collectivités (jusqu'à 10 000 équivalents-habitants environ).

Le logiciel est divisé en quatre compartiments ("Logiciel ACV4E - Structure," 2016) :

- Une base de données « Réseaux » qui donne les éléments pour créer un réseau de collecte.
- Une base de données « Stations » qui fournit des modèles de stations à boues activées, filtres plantés de roseaux, lagunage (jusqu'à 10 000 EH). Le bilan matière, le devenir des boues, les consommables ainsi que la consommation d'énergie globale peuvent être modifiés.
- Un générateur de scénarios d'assainissement pour combiner les réseaux de collecte et les stations d'épuration.
- Un calculateur d'impacts environnementaux basé sur la méthode Recipe. Il résulte en 18 indicateurs d'impacts. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes ou peuvent être exportés dans un tableau Microsoft Excel.

Les indicateurs d'impacts environnementaux sont les suivants : Changement climatique, Destruction de la couche d'ozone, Acidification des milieux, Eutrophisation en eau douce, Eutrophisation en mer, Émissions toxiques pour l'homme, Pic d'ozone (oxydations photochimiques), Formation de particules fines, Émissions toxiques en milieu terrestre, Émissions toxiques en eau douce, Émissions toxiques en mer, Radioactivité, Occupation de terres cultivables, Occupation d'espace urbain, Disparition d'espace naturel, Épuisement des ressources en eau, Épuisement des métaux, Épuisement des ressources fossiles.

### II.3.2. Description des filières

Quel que soit la filière étudiée, le choix a été réalisé de modéliser le traitement des effluents d'une collectivité de 1500 EH. En moyenne, le rejet journalier citoyen est de soit  $60 \text{ gDBO}_5 \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{EH}^{-1}$ , ce qui donne en entrée une charge organique de  $90 \text{ kgDBO}_5 \cdot \text{j}^{-1}$ . Toutefois, comme la station se situe en zone rurale, on se base sur le rejet journalier rural de  $50 \text{ gDBO}_5 \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{EH}^{-1}$ . Ensuite, on considère ici qu'un Français (un EH) rejette en moyenne  $150 \text{ L} \cdot \text{j}^{-1}$ .

- La station est dimensionnée pour :  $90 \cdot 10^3 / 50 = 1800$  habitants en zone rurale française
- Le volume journalier est de :  $1800 \cdot 0,15 = 270 \text{ m}^3 \cdot \text{j}^{-1}$
- La concentration en  $\text{DBO}_5$  correspond à :  $90 \cdot 10^6 / 270 \cdot 10^3 = 333.5 \text{ mgDBO}_5 \cdot \text{L}^{-1}$

Les charges polluantes entrantes sont résumées dans le **Tableau 27**.

	<b>Charge</b> (m <sup>3</sup> .j <sup>-1</sup> ou kg.j <sup>-1</sup> )	<b>Concentration</b> (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Charge hydraulique</b>	270	/
<b>DBO<sub>5</sub></b>	90	333.5
<b>DCO</b>	216	800
<b>NTK</b>	18	66.7
<b>PT</b>	3,6	13.3

**Tableau 27.** Charges et concentrations à traiter par la station de 1500 EH

Trois filières sont comparées :

- Une filière par procédé conventionnel à boues activées ;
- Une filière par filtre planté de roseaux à écoulement vertical ;
- Une filière avec un CHRA.

Ainsi, le chenal est comparé à la filière de type intensif la plus courante et avec une filière extensive également très répandue.

#### II.3.2.1. Filière boues activées

Le traitement secondaire (ou biologique) se déroule dans un réacteur aéré. Le procédé est dimensionné à très faible charge avec nitrification + dénitrification. Il n'y a pas de traitement spécifique du phosphore d'implémenté ici. La biomasse produite constitue la boue activée qui est séparée par décantation puis est recyclée dans le bassin d'aération. Le surplus de boues produites est conduit vers la file de traitement des boues.

Le traitement des boues se fait sur des lits de séchage plantés de roseaux. Ce procédé a été choisi car on se situe dans le cas d'une petite collectivité. Le rhizocompostage est composé d'un massif filtrant constitué de couches de sable de granulométries différentes qui reposent sur un radier ceinturé de parois en béton. Sur le massif, des roseaux sont plantés et forment un réseau de racines (rhizomes). Les boues sont épandues sur la surface des lits selon des cycles alternant des périodes de repos et d'alimentation. Lors de l'application des boues, les rhizomes favorisent le drainage des percolats, l'aération du milieu. À long terme, cela permet une stabilisation des boues via un processus de compostage (Boutin et al., 2010).

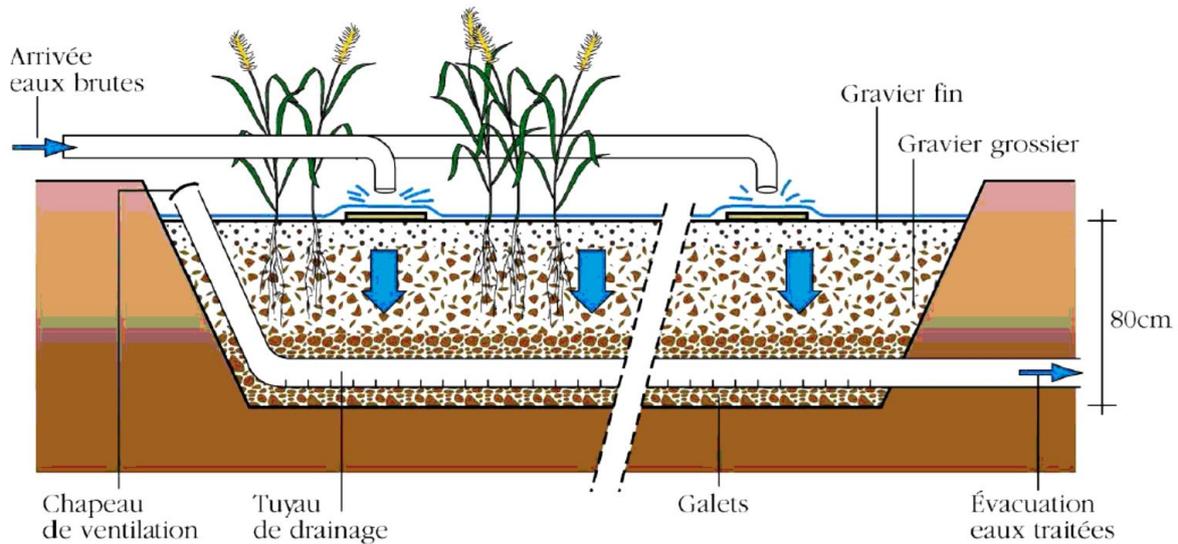
#### II.3.2.2. Filière filtre planté de roseaux (FPR)

Appartenant aux traitements biologiques à cultures fixées sur supports fins, un filtre planté de roseaux (**Figure 55**) est composé d'au moins deux étages en série avec (Boutin et al., 2010) :

- Une couche filtrante qui retient les MES en surface où des boues s'accumulent ;
- Une couche de transition qui empêche la migration vers la couche inférieure ;
- Une couche drainante pour drainer les eaux qui s'écoulent au sein du massif filtrant.

Le premier étage est constitué de 3 couches de gravier et le second étage de 3 couches de sable. Les deux étages sont plantés des mêmes espèces de roseaux (*Phragmites Australis*) (Risch and Boutin, 2010). Chaque étage comprend 3 ou 2 filtres en parallèle. Cela permet pour chacun une phase d'alimentation par bâchées successives (3-4 j) suivie d'une phase de repos (6-8 j). Le rôle

de l'alimentation par bâchées est de favoriser l'aération du système en profondeur en alternant phases de « flaquage » et drainage.



**Figure 55.** Schéma d'un filtre à écoulement vertical (Risch and Boutin, 2010)

#### II.3.2.3. Filière CHRA

Le traitement biologique est réalisé dans un chenal où les eaux usées sont mélangées via une roue à aubes. Par photosynthèse via la lumière du soleil, les microalgues convertissent le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et les nutriments présents (azote, phosphore) en biomasse et en dioxygène ( $\text{O}_2$ ). En parallèle, les bactéries utilisent l'oxygène libéré par les algues pour leur métabolisme conduisant à la dégradation des composés organiques et à l'oxydation de l'azote ammoniacal, tout en produisant les nitrates et le  $\text{CO}_2$  nécessaires aux algues.

### II.3.3. Objectifs et champ de l'étude

Durant cette phase, les objectifs et le champ de l'étude sont cadrés. L'objectif principal de cette étude est de comparer les impacts environnementaux des différentes technologies de traitement des eaux usées décrites ci-dessus.

Pour rappel, l'Unité Fonctionnelle est la performance quantifiée d'un système de produits destinée à être utilisée comme unité de référence dans une analyse du cycle de vie ("ISO 14040," 2006). L'objectif est le traitement des eaux usées pour une petite collectivité de moins de 1500 EH. Dans le rapport de (Risch and Boutin, 2011), l'unité fonctionnelle choisie est le « **kg de DBO<sub>5</sub> traité par jour** ».

Le périmètre inclut l'exploitation et l'entretien de la station, le curage et l'épandage des boues (**Figure 56**), et la filière optionnelle de rhizocompostage qui ne s'applique qu'au procédé à BA. La construction et l'infrastructure n'ont pas été prises en compte dans les impacts environnementaux.

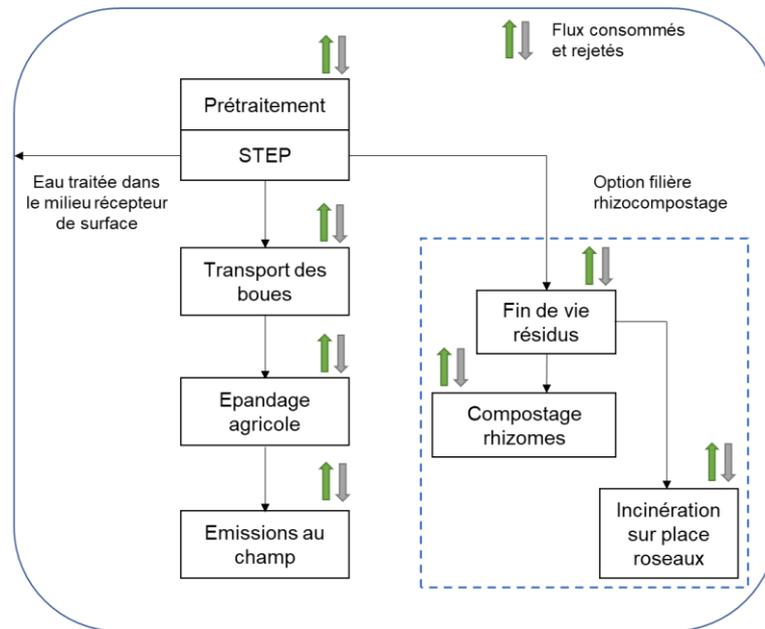


Figure 56. Périmètre du système (adapté de ((Risch et al., 2012))

### II.3.4. Inventaire de la filière CHRA

La collecte de données d'inventaire a été réalisée pour les boues activées et le filtre planté de roseaux dans deux rapports (Boutin et al., 2010; Risch and Boutin, 2010) et comprend :

- L'exploitation de la station (consommation électrique, réactifs, roseaux et entretien des filtres, curage des boues et opérations journalières)
- Les rejets (air et eau) déterminés par le bilan matière

Les rapports détaillent les types et les quantités de matériau, les opérations impliquées pour la construction et le démantèlement de la station, et également le fonctionnement et l'entretien du site. Dans le logiciel ACV4E, il est possible de modifier : la consommation électrique, les pathogènes, le devenir des boues, le bilan matière, les consommables et interventions, et les réactifs. Pour les filières « Boues activées » et « FPR », aucun compartiment n'a été modifié à part la fin de vie des boues où le scénario a été modifié pour 100% d'épandage avec une distance de transport de 20 km. La consommation électrique de la filière BA est fixée à  $345.9 \text{ kWh.j}^{-1}$  et la production des boues est définie à  $526 \text{ kg.j}^{-1}$  en matière brute (siccité de 30% soit  $158 \text{ kg MS.j}^{-1}$ ). Pour le FPR, la consommation électrique est fixée à  $2.7 \text{ kWh.j}^{-1}$  et la production des boues est définie à  $126.2 \text{ kg.j}^{-1}$  en matière brute (siccité de 25% soit  $31.5 \text{ kg MS.j}^{-1}$ ).

ACV4E contient une base prédéfinie de données des filières de traitement. Pour modéliser le CHRA, le choix a été fait de se baser sur les données d'une lagune naturelle et d'adapter les valeurs pertinentes à celles du chenal. L'inventaire de l'infrastructure du CHRA n'a pas été réalisé, et c'est pour cela que la construction et l'infrastructure n'ont pas été prises en compte dans le calcul des impacts environnementaux. Le bilan matière et la fin de vie des boues ont été modifiés en accord avec nos données expérimentales, et les pathogènes et la consommation électrique en fonction de la bibliographie. Sur le site web, un tableur Excel « Fichier d'aide à la réalisation des bilans » est disponible pour faciliter le bilan matière sur les entrées et sorties

de l'azote, du phosphore, du carbone, des composés traces organiques et des éléments traces métalliques, et aider à la conversion d'un bilan matière en  $\text{g.EH}^{-1}.\text{j}^{-1}$  en bilan matière en %.

La composition de l'entrée choisie par (Risch and Boutin, 2011) a été gardée pour le CHRA. Les abattements moyens obtenus avec nos EU standard à vitesse basse (voir paragraphe III.3.1.1.2. Traitement des eaux usées) ont été appliqués pour estimer la composition de l'effluent de sortie (**Tableau 28**).

Paramètre	Entrée ( $\text{g.m}^{-3}$ )	Entrée ( $\text{g.j}^{-1}.\text{hab}^{-1}$ )	Sortie ( $\text{g.m}^{-3}$ )	Sortie ( $\text{g.j}^{-1}.\text{hab}^{-1}$ )
DCO	800	120.0	34.7	5.2
<b>Ctot</b>	<b>300.0</b>	<b>45.0</b>	<b>34.7</b>	<b>5.2</b>
N-NH <sub>4</sub>	50	7.5	2.0	0.3
N-NO <sub>2</sub>	0	0.0	1.3	0.2
N-NO <sub>3</sub>	0	0.0	38.7	5.8
Norg tot	16.7	2.5	2.0	0.3
<b>Ntot</b>	<b>66.7</b>	<b>10.0</b>	<b>44.0</b>	<b>6.6</b>
P-PO <sub>4</sub>	10.7	1.6	7.3	1.1
P-Part	2.7	0.4	0.7	0.1
<b>Ptot</b>	<b>13.3</b>	<b>2.0</b>	<b>8</b>	<b>1.2</b>

**Tableau 28.** Composition des eaux usées en entrée et en sortie en  $\text{g.m}^{-3}$  et en  $\text{g.j}^{-1}.\text{hab}^{-1}$

En dehors des abattements en pollution acquis pendant l'exploitation du chenal, peu de données sont recensées sur les émissions dans l'air et les boues des CHRA. Des hypothèses ont donc été réalisées pour compléter le bilan matière.

#### II.3.4.1. Carbone

On considère un abattement moyen expérimental de 88.5% de la DCO. Par analogie avec une boue activée, 76.1% du carbone éliminé de l'eau sont émis sous forme de CO<sub>2</sub>, 0.4% sont émis sous forme de CH<sub>4</sub> et 23.5% sont émis dans les boues (carbone organique) (*Bilans matière des stations d'épuration modélisées pour ACV4E : hypothèses et calculs*, 2018).

#### II.3.4.2. Azote

Pour un système de traitement basé sur des microalgues, les émissions de N<sub>2</sub>O représentent 0.13-0.57% de l'azote total entrant (Plouviez and Guieysse, 2020). Ici, 0.57% a été retenu comme facteur d'émission. Il est à noter que ce facteur d'émission est variable et fait encore l'objet de recherches pour en comprendre les paramètres d'influence (Casagli et al., 2021a).

Le dégagement d'azote sous forme d'ammoniac NH<sub>3</sub> a été considéré négligeable, car le pH n'a jamais été supérieur à 8 dans notre installation. Un pH élevé (>9) favorise la forme NH<sub>3</sub> et son dégagement.

On a considéré que le reste de l'azote est émis sous forme de diazote N<sub>2</sub>. Une dénitrification a pu avoir lieu dans le système lorsque la concentration en O<sub>2</sub> diminue la nuit et surtout dans le décanteur qui récupère l'effluent de sortie riche en nitrates ensuite dégazés sous forme de diazote. Le système n'était pas agité, et la concentration en oxygène dissous très faible.

## Partie II : Matériels et Méthodes

L'azote organique présent dans la biomasse a été déterminé en divisant la teneur en protéines par le coefficient 6.25.

### II.3.4.3. Phosphore et micropolluants

Dans l'effluent de sortie, le phosphore total est réparti à 95% en phosphate et à 5% en phosphore organique. Pour la biomasse, le phosphore total se retrouve à 58% sous forme de pentoxyde de phosphore ( $P_2O_5$ ) et à 42% sous forme de phosphore organique (*Bilans matière des stations d'épuration modélisées pour ACV4E : hypothèses et calculs*, 2018).

Le bilan sur les micropolluants n'a pas été modifié et correspond aux résultats du projet AMPERES pour une lagune naturelle (Catel et al., 2016).

Le **Tableau 29** résume le bilan matière ainsi effectué sur les flux entrants et sortants de carbone, d'azote, de phosphore et de micropolluants du chenal.

ENTREE (g.EH <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )		SORTIE (%)			TOTAL	
		Air	Eau	Boue		
7.5	N-NH4		2.5	0.0	N-NH4	
2.5	N-org		2.8	11.1	N-org	
0	N-NO2		2.1	0.0	N-NO2	
0	N-NO3		58.3	0.0	N-NO3	
	N-NH3	0			N-NH3	
	N-NO	0			N-NO	
	N-N <sub>2</sub> O	0.6			N-N <sub>2</sub> O	
	N-N <sub>2</sub>	22.6			N-N <sub>2</sub>	
10	<i>N Tot. Entrée</i>	23.2	65.7	11.1	100.0	<i>N Tot, Sortie</i>
0.4	P-org		3.2	14.9	P-org	
1.6	P-PO4		61.4		P-PO4	
0	P-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			20.5	P-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	
2	<i>P Tot. Entrée</i>		64.6	35.4	100.0	<i>P Tot, Sortie</i>
	C-CO <sub>2</sub>	67.3			C-CO <sub>2</sub>	
	C-CH <sub>4</sub>	0.4			C-CH <sub>4</sub>	
45	C-inerte		11.5	20.8	C-org	
0	C-DBO <sub>5</sub>		0	0	C-inerte	
45	<i>C Tot. Entrée</i>	67.7	11.5	20.8	100.0	<i>C Tot, Sortie</i>
3.60E-05	Cd	0	15.0	85.0	Cd	
7.20E-05	Hg	50	15.0	42.5	Hg	
1.85E-03	Ni	0	85.2	15.0	Ni	
1.17E-03	Pb	0	15.0	85.0	Pb	
1.19E-04	Co	0	85.0	15.0	Co	
4.68E-04	As	0	85.0	15.0	As	
8.82E-04	Mo	0	50.0	50.0	Mo	
2.47E-02	Zn	0	15.0	85.2	Zn	
1.02E-02	Ba	0	50.0	50.0	Ba	
9.72E-03	Cu	0	15.0	85.0	Cu	
1.96E-03	Cr	0	15.0	85.1	Cr	
3.24E-04	V	0	84.9	15.0	V	
1.80E-04	Dichlorométhane	87.8	12.0	0.0	Dichlorométhane	
5.40E-06	Simazine		100.0	0.0	Simazine	
3.96E-05	2,4-dichlorophénol	0	48.0	52.0	2,4-dichlorophénol	

**Tableau 29.** Bilan matière du CHRA

II.3.4.4. Boues

Pour la fin de vie des boues, on a fait l’hypothèse de 100% d’épandage avec une distance de transport de 20 km. Pour la production des boues, avec la charge hydraulique standard de 0.016 m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup>, 1.055 g.j<sup>-1</sup> de boues ont été produits par le chenal pilote (voir Résultats). En extrapolant avec un volume journalier de 270 m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup>, 77.4 kg.j<sup>-1</sup> de boues sont produits. On considère ici une siccité de 23% en supposant une déshydratation par sacs filtrants (Van Den Hende et al., 2016). Cette valeur est à prendre avec précaution : elle est basée sur la production de biomasse lors des expérimentations conduites durant les présents travaux. Or, le chenal était alimenté en eaux usées synthétiques qui ne contiennent pas de matières particulières. Aussi, la charge organique (DCO) des EU synthétiques est plus faible que les EU considérées dans ACV4E. La production de boues est donc potentiellement sous-estimée.

II.3.4.5. Consommation électrique

La consommation électrique a également été adaptée pour que le chenal ait la même charge hydraulique en entrée (270 m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup>) que les autres systèmes. Dans l’ACV de (Garfí et al., 2017), une consommation de 0.25 kWh par m<sup>3</sup> d’eau traitée a été renseignée. Ainsi, la consommation électrique supposée du CHRA est 67.5 kWh.j<sup>-1</sup>.

II.3.5. Impacts environnementaux

À partir de l’inventaire, les impacts environnementaux sont estimés en utilisant des modèles. Ces modèles font le lien entre les émissions, les consommations, les activités et des pressions (classification en « catégories » ou *midpoints*), puis entre des pressions et des impacts environnementaux finaux (classification en « atteintes » ou *endpoints*) (Delavaud et al., 2021). Les résultats sont donnés dans une métrique d’équivalence pour que les impacts soient comparables (Figure 57).

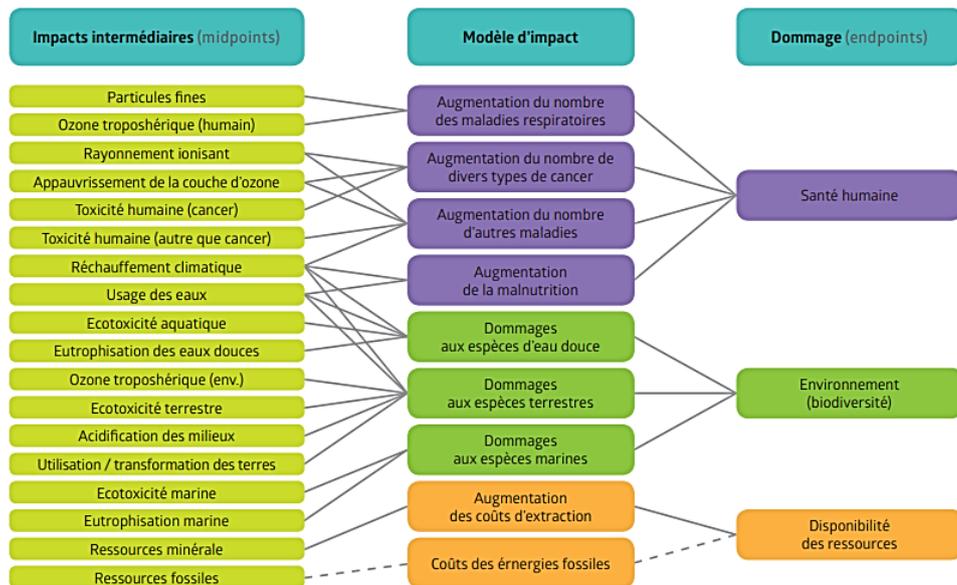


Figure 57. Impacts et dommages environnementaux de la méthodologie ReCiPe2016 (adapté de (Huijbregts et al., 2017) dans le rapport (Delavaud et al., 2021))

La méthode choisie dans ACV4E est ReCiPe (Notice et aide du logiciel ACV4E, 2018). Les facteurs de dommages (approche *endpoint*) sont basés sur des facteurs d’agrégation imprécis

ou manquant de transparence (Danic et al., 2014). La distinction *midpoint* et *endpoint* est essentielle dans l'évaluation des impacts. On choisit ainsi une approche *midpoint* pour notre cas d'étude.

Les indicateurs et leurs unités fournis par le logiciel sont résumés dans le **Tableau 30**. Le critère « Occupation d'espace urbain » a été écarté car il est impacté en totalité par l'infrastructure des installations qui n'est pas considérée dans ce cas d'étude. L'évaluation des impacts se fera uniquement sur les indicateurs *midpoints*.

<b>Indicateur</b>	<b>Unité</b>
Changement climatique	kg CO <sub>2</sub> eq
Destruction de la couche d'ozone	kg CFC-11 eq
Acidification des milieux	kg SO <sub>2</sub> eq
Eutrophisation en eau douce	kg P eq
Émissions toxiques pour l'homme	kg 1.4-Dichlorobenzène eq
Pic d'ozone	kg COVNM eq
Formation de particules fines	kg PM10 eq
Émissions toxiques en milieu terrestre	kg 1.4-Dichlorobenzène eq
Émissions toxiques en eau douce	kg 1.4-Dichlorobenzène eq
Radioactivité	kg U235 eq
Occupation de terres cultivables	m <sup>2</sup> a
Disparition d'espace naturel	m <sup>2</sup>
Épuisement des ressources en eau	m <sup>3</sup>
Épuisement des métaux	kg Fe eq
Épuisement des ressources fossiles	kg pétrole eq

**Tableau 30.** Impacts environnementaux et unités fournis par ACV4E

## Partie III : Résultats et discussion

### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse

L'un des objectifs du présent travail est l'évaluation du potentiel d'un consortium de microalgues/bactéries en tant que biomasse compatible avec la production de biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération. À cette fin, il est fondamental de pouvoir caractériser la composition biochimique avec des méthodes simples permettant un suivi régulier et peu coûteux. Ainsi, avant d'analyser la biomasse produite par les photobioréacteurs ou le CHRA, les méthodes d'analyse des lipides et des glucides de la littérature ont été évaluées sur des échantillons commerciaux de *Chorella* et *Spirulina*. La quantification des protéines a été sous-traitée au laboratoire d'étude des eaux (LEE) de l'ENGEES, qui avait déjà établi un protocole (analyse de l'azote total de Kjeldahl). Les valeurs obtenues ont été comparées à celles du fournisseur ainsi qu'à une analyse gravimétrique (pour les lipides) effectuée par un laboratoire externe accrédité COFRAC. Ceci a permis de valider les méthodes et de les transposer à la biomasse produite lors des différentes expérimentations. Pour chaque technique, les méthodes et produits utilisés, la réaction et la validation des méthodes sont expliqués dans les sections suivantes.

#### III.1.1. Dosage des lipides

*Note : Cette section fait l'objet d'un article publié : J. Farinacci ; J. Laurent (2023), Critical assessment of the sulfo-phospho-vanillin method to quantify lipids in freeze-dried microalgae, Journal of Applied Phycology, <https://doi.org/10.1007/s10811-023-02930-3>*

Comme pour de nombreux dosages colorimétriques avec des matrices complexes, une couleur de fond, une turbidité ou encore des interférences lors de la réaction peuvent générer des erreurs de quantification. Cet aspect n'a pas encore été considéré de manière exhaustive pour des échantillons de microalgues. L'objectif est d'évaluer la robustesse de l'essai existant (Mishra et al., 2014) en mettant l'accent sur trois aspects : les ajouts dosés pour les effets matrice, l'essai de compensation pour l'absorbance de fond et le temps de réaction.

##### III.1.1.1. Réactifs et échantillons

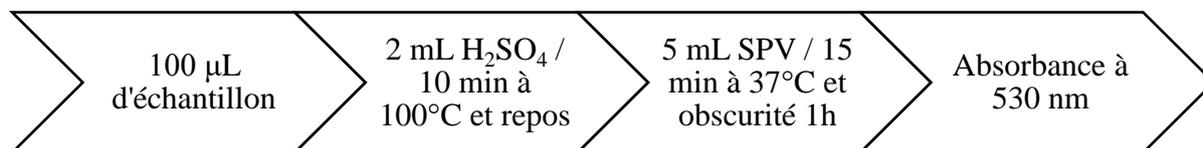
L'acide sulfurique (98%), l'acide orthophosphorique (85%), la vanilline (99%) et l'acide oléique (99%) ont été achetés chez Carl Roth (Karlsruhe, Allemagne). L'éthanol (96%) a été acheté chez VWR (Radnor, Pennsylvanie, USA). L'huile de colza de la marque Carrefour Bio a été achetée dans une épicerie locale.

La sulfo-phospho-vanilline (SPV) a été préparée en ajoutant 0.6 g de vanilline dans 10 mL d'éthanol, 90 mL d'eau distillée et 400 mL d'acide phosphorique à 85%. Le mélange a été stocké dans l'obscurité. Le réactif a été préparé le jour même où les dosages ont été effectués.

Les biomasses analysées étaient des échantillons commerciaux de microalgues utilisées comme compléments alimentaires. Elles ont été achetées en ligne sur le site du fournisseur Végétopie ([www.vegetopie.com](http://www.vegetopie.com), Arles, France). Les microalgues choisies étaient *Spirulina* et *Chlorella vulgaris*. Elles ont été lyophilisées et réduites en poudre.

Comme référence, la teneur en lipides a été déterminée par le laboratoire accrédité (COFRAC) Larebron (Illkirch-Graffenstaden, France) avec une méthode gravimétrique interne ML AR1024 basée sur un traitement à l'acide chlorhydrique, une extraction à l'éther de pétrole et une pesée. La mesure en triplicat a donné  $6.3 \pm 0.5$  g de lipides par 100 g de *Spiruline* et  $9.5 \pm 0.8$  g de lipides par 100 g de *Chlorelle*.

#### III.1.1.2. Protocole



**Figure 58.** Protocole d'analyse des lipides (Mishra et al., 2014)

Le protocole expérimental (**Figure 58**) est basé sur (Mishra et al., 2014). Une solution mère de microalgues à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  a été préparée avec de l'eau distillée. Des volumes (25 à 100  $\mu\text{L}$ ) de solution mère ont été ajoutés dans des tubes à essai et complétés avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 100  $\mu\text{L}$ . 2 mL d'acide sulfurique ont été ajoutés. Le tube à essai a été chauffé à  $100^\circ\text{C}$  pendant 10 min et laissé refroidir à température ambiante. 5 mL de SPV ont été ajoutés pour obtenir la couleur rose. Le tube a été chauffé à  $37^\circ\text{C}$  pendant 15 min, puis stocké pendant 1 h dans l'obscurité. L'échantillon a été versé dans une cuvette jetable semi-micro pour mesurer l'absorbance à 530 nm avec un spectrophotomètre UV-VIS (UV-3100PC, VWR).

#### III.1.1.3. Étalonnage

Dans la littérature, l'étalon est sélectionné selon la nature de l'échantillon analysé. Par exemple, six étalons (huile de colza, huile de maïs, huile de tournesol, huile de lin, cholestérol et huile de foie de morue) ont donné des courbes d'étalonnage avec une pente moyenne significativement différente (Cheng et al., 2011). Avec les microalgues, plusieurs étalons ont été testés (**Tableau 31**).

Échantillon	Méthode	Étalon	Référence
<i>Chlorella vulgaris</i> UTEX 259, <i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 2805, <i>Chlorella</i> <i>minutissima</i> UTEX 2341, <i>Chlorella</i> sp. NC64A	Micro- plaques	Huile de maïs	(Cheng et al., 2011)
<i>Ettlia</i> sp., <i>Monoraphidium</i> sp., <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i>	Tube	Huile de colza	(Mishra et al., 2014)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31 (ATCC 20888), <i>Thraustochytrium</i> sp. PRA 296, <i>Thraustochytrium</i> sp. AMCQS5-5, <i>Schizochytrium</i> sp. DT3	Tube	Huile de schizochytrium	(Byreddy et al., 2016)
<i>Amphidinium carterae</i> , <i>Heterocapsa triquetra</i> , <i>Prorocentrum minimum</i> , <i>P.</i>	Tube	Huile de colza	(Park et al., 2016)

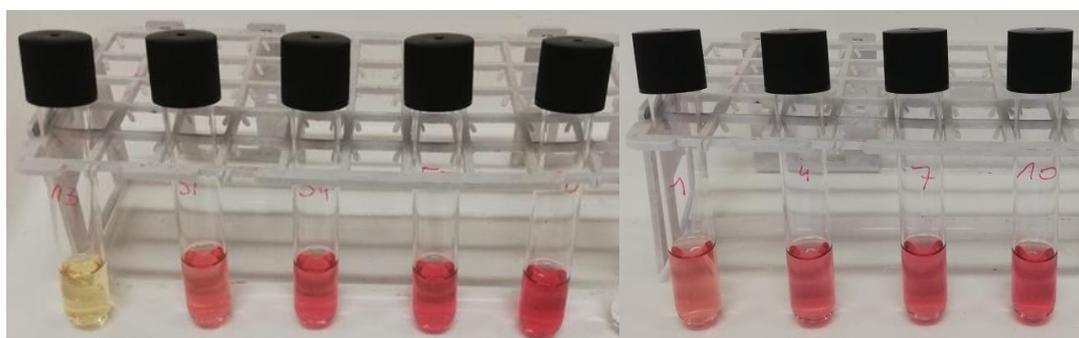
### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse

<i>micans, Alexandrium minutum, Oxyrrhis marina, Scrippsiella trochoidea, Ostreopsis cf. ovata, Lingulodinium polyedrum, Dunaliella tertiolecta, Thalassiosira sp.</i>			
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296, <i>Chlorella vulgaris</i> CPCC90	Tube	Acide oléique et acide palmitique	(Anschau et al., 2017)

**Tableau 31.** Etudes utilisant la méthode SPV avec la nature de l'échantillon et l'étalon utilisé

En raison du mécanisme de réaction supposé de la méthode SPV, le type d'acides gras (degré de saturation, présence de doubles liaisons ou de groupes hydroxyle libres) a un impact sur les résultats en termes d'absorbance (Johnson et al., 1977; Knight et al., 1972). En outre, des travaux antérieurs ont montré que les composés saturés tels que les esters de cire et les triglycérides (TAG) présentaient une réactivité inattendue (McMahon et al., 2013). Ainsi, la précision de la méthode dépend de l'étalon de référence (Patel et al., 2019). Les lipides des microalgues sont caractérisés par des acides gras saturés et monoinsaturés (Sharma et al., 2012). « Comme dans le tissu végétal des plantes, les algues vertes contiennent principalement des acides gras C16 et C18 avec un fort degré d'insaturation (Thompson, 1996). » En effet, *C. vulgaris* and *S. obliquus* sont composées en grande partie d'acides gras C16 et C18, semblables aux huiles végétales (Huang et al., 2016). Ainsi, comme dans d'autres études (Anschau et al., 2017; Chen et al., 2018; Mishra et al., 2014; Palmer et al., 2021; Park et al., 2016), l'huile de colza et l'acide oléique ont été utilisés comme étalons.

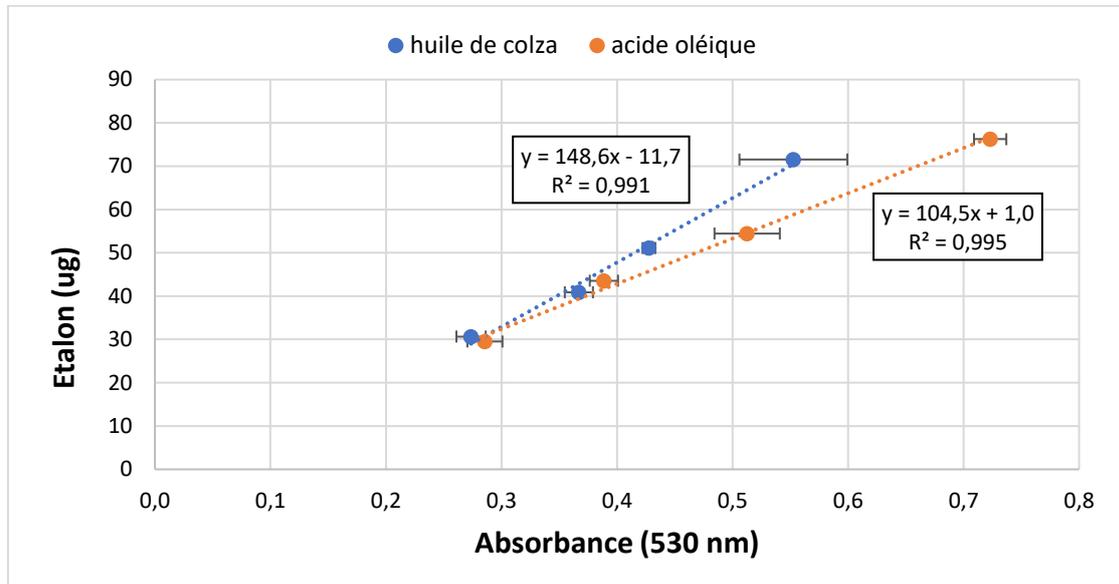
Pour chaque étalon testé, une solution mère d'étalon a été préparée en dissolvant l'étalon dans l'éthanol (Knight et al., 1972) à 1 g.L<sup>-1</sup>. Différents volumes de solution mère étalon (0 à 70 µL) ont été ajoutés dans des tubes à essai. Ensuite, de l'éthanol a été ajouté pour atteindre 100 µL dans le tube. Les mesures ont été faites en triplicata. La réaction SPV décrite le paragraphe III.1.1.2. Protocole a été réalisée sur tous les échantillons (**Figure 58**). Comme attendu, la couleur rose s'est intensifiée à mesure que la quantité d'étalon (acide oléique ou huile de colza) a augmenté (**Figure 59**).



**Figure 59.** Etalonnage avec 0, 27, 40, 50, 70 µL d'acide oléique (gauche) et 30, 40, 50, 70 µL d'huile de colza (droite)

Les courbes d'étalonnage ont été tracées avec l'absorbance moyenne (530 nm) en abscisse et la quantité d'étalon en ordonnée (**Figure 60**). Une relation linéaire entre la quantité d'étalon et l'absorbance a été mise en évidence avec un coefficient de détermination R<sup>2</sup> de 0.995 pour

l'acide oléique et de 0.991 pour l'huile de colza. Selon l'analyse de régression, les erreurs types des pentes pour l'huile de colza et l'acide oléique sont respectivement 10.2 (6.9%) et 5.2 (5%)  $\mu\text{g}/\text{unité d'absorbance}$ .

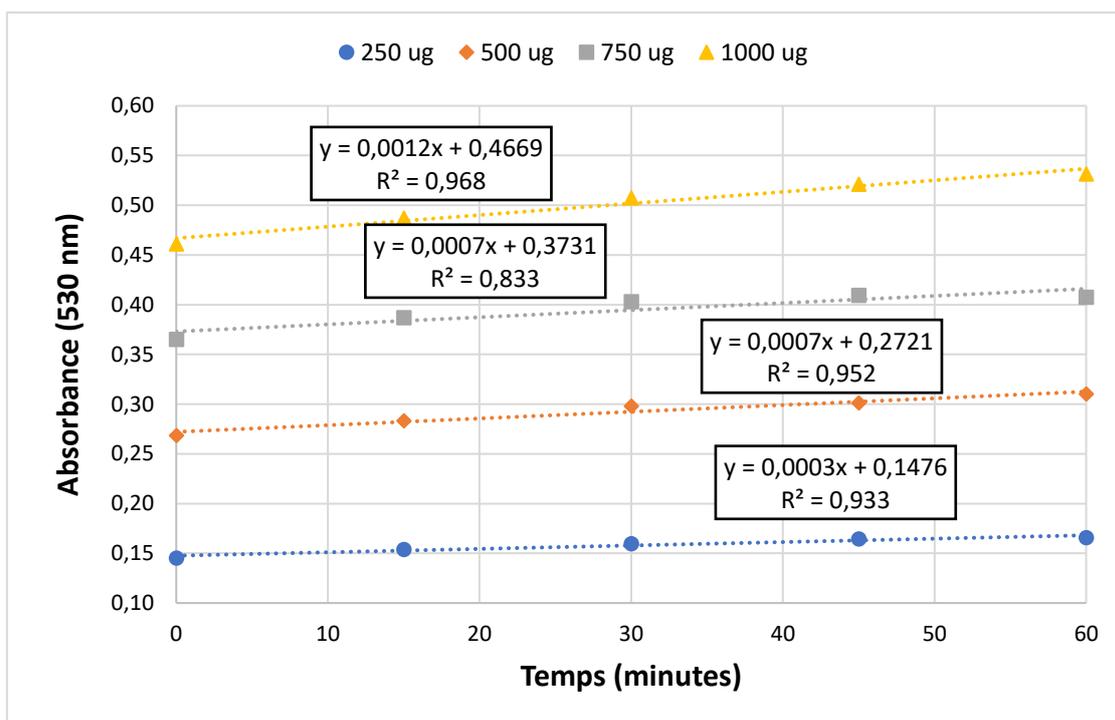


**Figure 60.** Courbes d'étalonnage avec l'acide oléique et l'huile de colza

#### III.1.1.4. Le temps de réaction

(Anschau et al., 2017) ont étudié l'impact du temps de réaction avec leur étalon (acide oléique) comme échantillon et ont relevé l'absorbance toutes les 15 min pendant 1 h. Ils ont remarqué que l'absorbance restait stable après 30 min. Une durée de stockage de 45 minutes avait alors été maintenue comme défini par (Knight et al., 1972). Dans notre cas, l'absorbance a été mesurée toutes les 15 min jusqu'à 60 min après ajout de SPV, et ce pour des quantités croissantes de *Chlorella* (250, 500, 750, 1000  $\mu\text{g}$ ) et non d'étalon (**Figure 61**).

### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse



**Figure 61.** Évolution de l'absorbance dans le temps pour différentes masses de Chlorelle

Pour chaque quantité de *Chlorelle*, l'absorbance n'est pas restée stable et a augmenté avec le temps jusqu'à 12% par rapport au temps 0 (**Tableau 32**), même si les tubes ont été laissés dans l'obscurité entre chaque relevé. La quantité de *Chlorelle* ajoutée n'a pas semblé influencer cette évolution de l'absorbance car les valeurs ont augmenté de manière similaire : +4-5% au bout de 15 min, +7-8% au bout de 30 min... La quantité de *Chlorelle* a tout de même donné, comme attendu, des valeurs initiales d'absorbance différentes. Pour les analyses ultérieures, la durée a été fixée à 1 h. Il est obligatoire de maintenir le temps de réaction constant pour les étalonnages et les dosages.

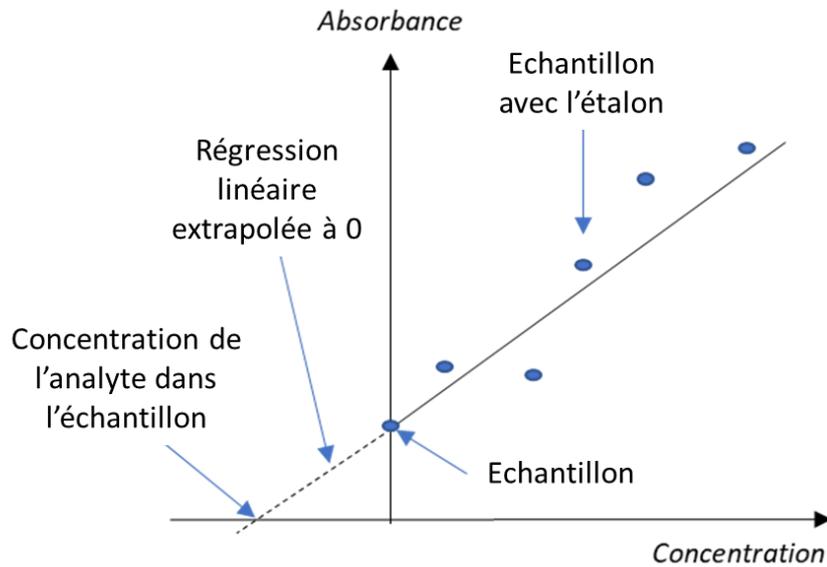
	Hausse (%) de l'absorbance à ...			
	15 min	30 min	45 min	60 min
<b>Chlorelle 250 µg</b>	4.9	8.1	11.0	11.5
<b>Chlorelle 500 µg</b>	4.2	8.5	9.4	12.0
<b>Chlorelle 750 µg</b>	4.3	7.5	8.9	10.5
<b>Chlorelle 1000 µg</b>	4.0	7.1	9.3	10.9

**Tableau 32.** Hausse de l'absorbance dans le temps pour différentes quantités de *Chlorelle*

#### III.1.1.5. Les ajouts dosés

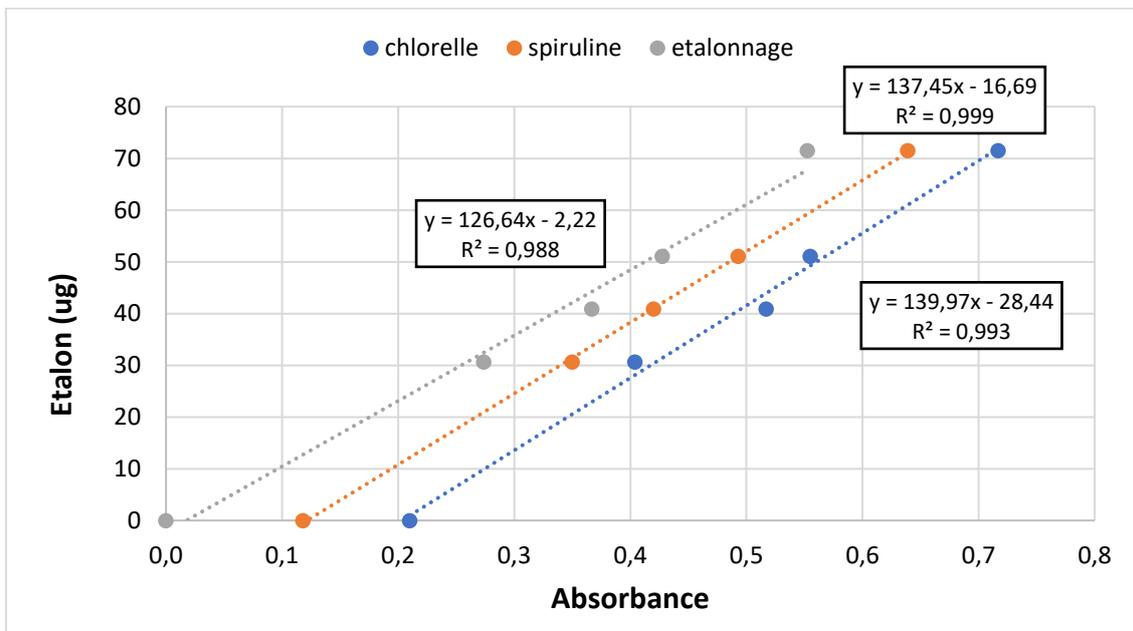
Dans l'échantillon, les composés d'intérêt (l'analyte) sont les lipides, le reste constituant la matrice. Celle-ci peut affecter la qualité du dosage, ce qui est appelé « effet matrice » : des interférences avec les réactions en jeu sont susceptibles d'induire une réponse différente en termes d'absorbance. Pour investiguer ces interférences potentielles (évaluation de la sélectivité de la méthode), la procédure par ajout dosé peut être utilisée. Des quantités variables d'analyte (l'étalon) sont ajoutées à une masse fixe d'échantillon. La régression linéaire est ensuite

extrapolée pour une absorbance nulle, et l'intersection avec l'axe des ordonnées correspond à la quantité d'analyte dans l'échantillon (**Figure 62**).



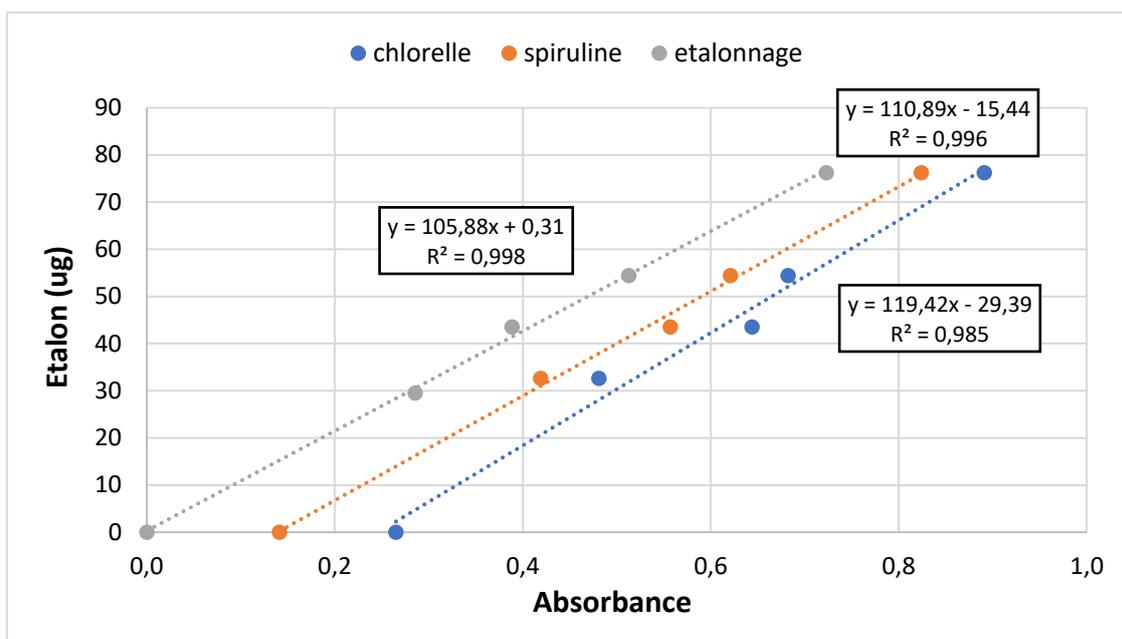
**Figure 62.** Effet matrice sur l'absorbance par ajouts dosés

Dans les tubes à essai, une quantité fixe de microalgue (300 µg, soit 30 µL de la solution mère de microalgues dans l'eau déminéralisée) a été introduite alors qu'une quantité variable d'étalon (30 à 70 µg) a été ajoutée. Le protocole avec la SPV a été réalisé, puis l'absorbance a été mesurée. L'absorbance à 530 nm a ensuite été tracée en fonction de la quantité d'étalon ajouté (**Figure 63**, **Figure 64**).



**Figure 63.** Ajouts dosés avec l'huile de colza

### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse



**Figure 64.** Ajouts dosés avec l'acide oléique

Une relation linéaire entre la quantité d'étalon et l'absorbance à 530 nm a été déterminée. Les pentes obtenues ont été comparées à celles de l'étalonnage. Pour l'huile de colza, les pentes déterminées par étalonnage et par ajouts dosés avec Chlodelle et Spiruline étaient respectivement de 126.64, 139.97 et 137.45  $\mu\text{g}/\text{unité d'absorbance}$ . Compte tenu de l'écart-type des pentes compris entre 2 et 7%, la différence entre l'étalonnage classique et les ajouts dosés peut être considérée comme négligeable : la méthode ne subit pas d'effet matrice significatif. Elle peut donc être considérée aussi sélective que précédemment montré (Anschau et al., 2017).

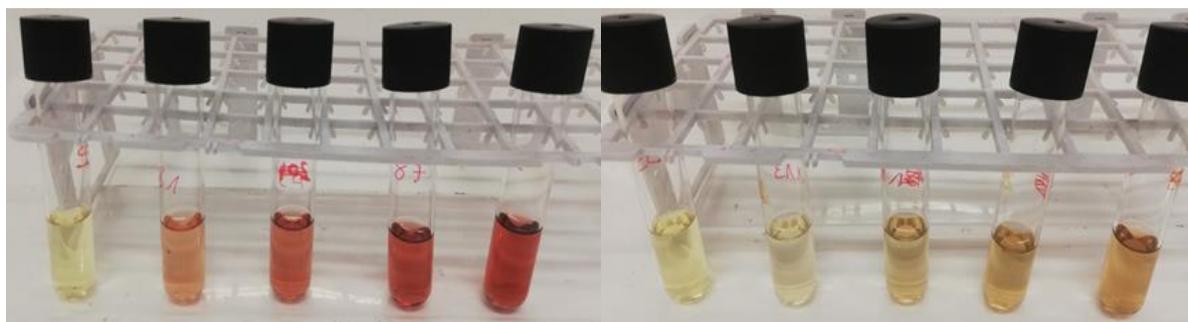
#### III.1.1.6. Blanc de réactifs et essais de compensation

Un blanc de réactif est un mélange de réactifs sans échantillon/étalon qui est remplacé par de l'eau. 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée ont été ajoutés au tube à essai et les étapes du protocole ont été suivies. L'absorbance à 530 nm était de 0.017. Par la suite, elle a été soustraite aux valeurs d'absorbance pour correction.

En raison de leur couleur, le solvant, les réactifs ou la matrice peuvent interférer avec la lecture de l'absorbance après réaction. Pour étudier ce point, un essai de compensation a été réalisé. Celui-ci consiste, en parallèle du dosage classique, à préparer des tubes contenant l'échantillon (0 à 1000  $\mu\text{g}$  de *Spiruline* et de *Chlodelle*) et les réactifs sans la vanilline (uniquement l'acide phosphorique) : cela est donc supposé empêcher le développement de la couleur rose lors de la réaction. Ces tubes ont dès lors suivi chaque étape du protocole.

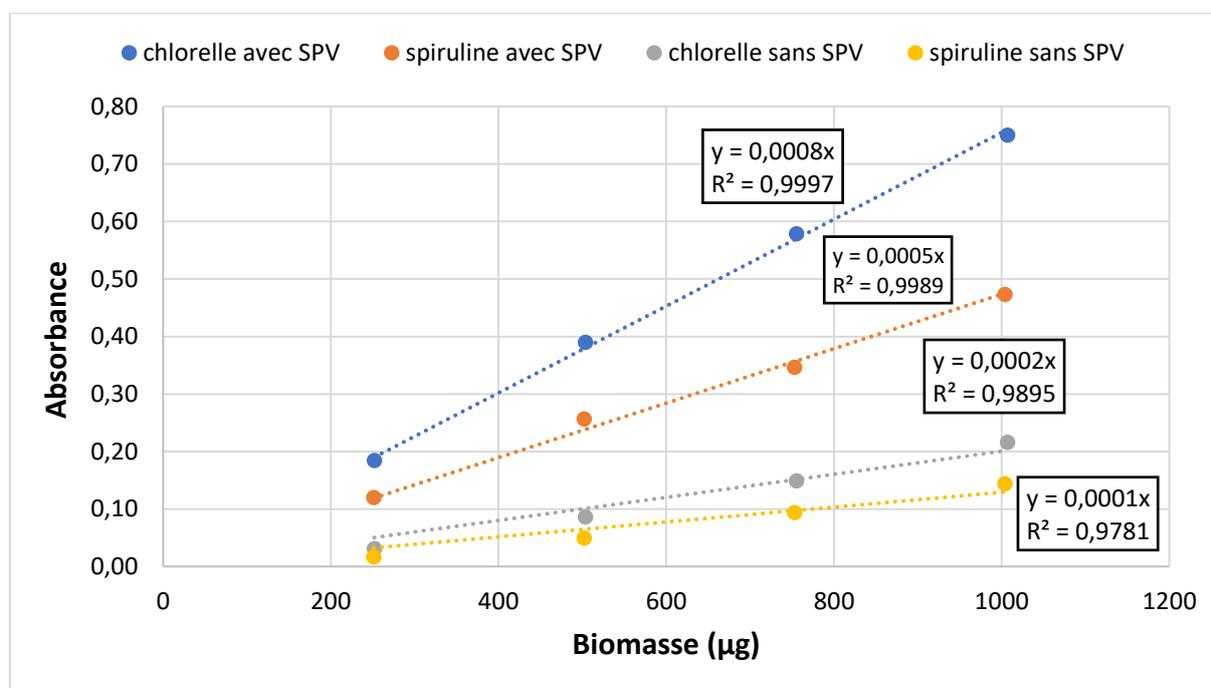
Cet essai et le dosage ont été réalisés pour les échantillons de *Spiruline* et *Chlodelle* lyophilisées en suspension dans l'eau distillée. Deux solutions mères ont été préparées à une concentration de 10.04  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la Spiruline et 10.07  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour la Chlodelle. Dans des tubes à essai, des aliquots de 25, 50, 75 et 100  $\mu\text{L}$  de solution mère de microalgues ont été dilués avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 100  $\mu\text{L}$ , qui a subi une réaction SPV. Pour évaluer l'impact de la couleur de l'échantillon sur l'absorbance, le protocole a été réalisé deux fois pour chaque quantité de biomasse : un tube à essai avec tous les réactifs et un deuxième tube à essai avec

tous les réactifs sauf la vanilline. Comme observé avec les étalons, la couleur rose s'est intensifiée à mesure que la concentration en microalgues a augmenté (**Figure 65 – Gauche**).



**Figure 65.** Essai de compensation avec (gauche) et sans (droite) vanilline pour *Chlorelle*

Comme attendu, avec la vanilline, une relation linéaire entre la quantité de microalgues et l'absorbance à 530 nm a été bien établie avec des coefficients de détermination  $R^2 > 0,99$  (**Figure 66**).

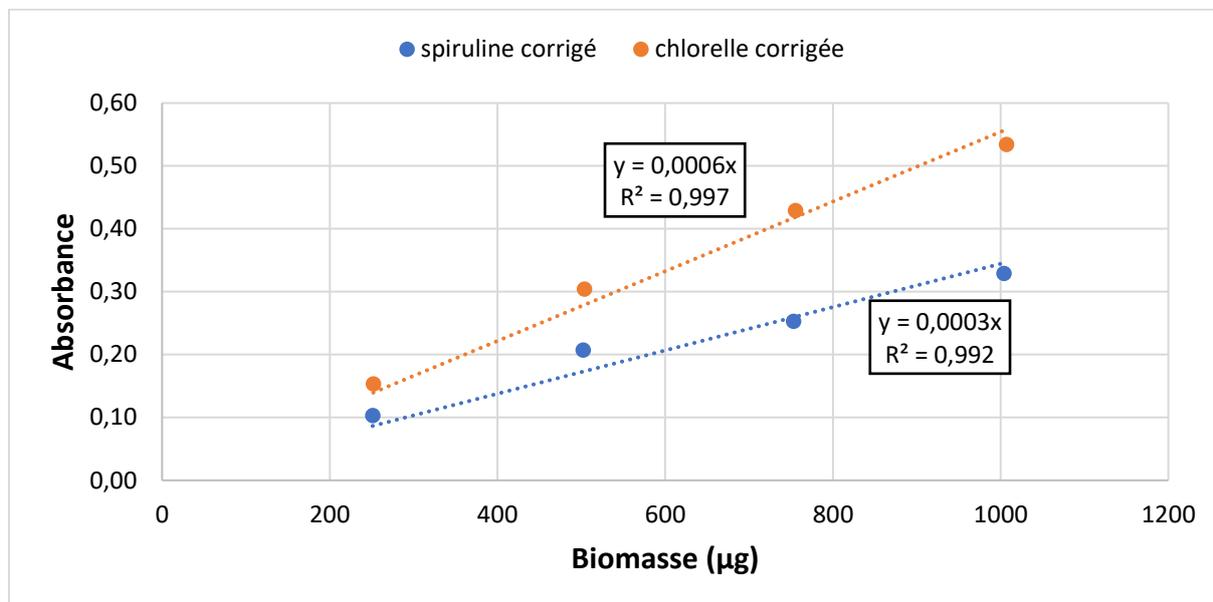


**Figure 66.** Absorbance en fonction de la quantité de microalgues avec et sans vanilline

Cependant, d'autres substances contenues dans les microalgues ont généré une absorbance à 530 nm, même sans vanilline (**Figure 65 – Droite**) : ainsi, l'absorbance a également augmenté avec la quantité de microalgues, atteignant jusque 0,21 avec *Chlorelle*. Le développement de couleur a été principalement observé lors de la première étape du protocole (digestion acide). Ce phénomène n'a jamais été rapporté et quantifié de cette manière pour la caractérisation d'échantillons de microalgues avec la méthode SPV. Seules deux publications récentes mentionnent des mesures d'absorbance effectuées sur le même tube, avant et après l'ajout de phospho-vanilline, pour des échantillons de zooplancton de crustacés (Pinger et al., 2022), de cerveau de porc et d'*E. Coli* (Bailey et al., 2022). De plus, ces deux méthodes diffèrent légèrement de celle employée dans la présente étude : ici, l'absorbance a été mesurée dans deux

### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse

tubes séparés. Dans le premier tube, de la phospho-vanilline a été ajoutée alors que dans le second, seul de l'acide phosphorique a été ajouté. L'absorbance de fond mesurée pour le second tube doit être soustraite de l'absorbance déterminée avec la vanilline. La valeur corrigée a ensuite été tracée en fonction de la quantité de microalgues (**Figure 67**). Cette correction pourrait être nécessaire lors de la réalisation du test SPV sur des échantillons de biomasse de microalgues, afin d'éviter une surestimation de la teneur en lipides.



**Figure 67.** Absorbance corrigée par l'essai de compensation en fonction de la quantité de microalgues

#### III.1.1.7. Discussion

Les teneurs en lipides de la Chlorelle et de la Spiruline ont été calculées avec un étalonnage classique, par ajouts dosés et essai de compensation pour être comparées à la composition déterminée avec la méthode gravimétrique par le laboratoire (**Tableau 33**).

Microalgue	Méthode gravimétrique (%)	Étalon	Étalonnage conventionnel (%)	Ajouts doses (%)	Étalonnage avec compensation (%)
<i>Spiruline</i>	6.3±0.5	Huile de colza	5.6±0.4 (n=4)	5.6±0.2 (n=5)	4.5±0.5 (n=4)
		Acide oléique	5.1±0.2 (n=4)	5.2±0.7 (n=5)	4.2±0.6 (n=4)
<i>Chlorelle</i>	9.5±0.8	Huile de colza	9.1±0.5 (n=4)	9.6±1.2 (n=5)	7.1±0.3 (n=4)
		Acide oléique	8.0±0.2 (n=4)	10.2±1.9 (n=5)	6.4±0.5 (n=4)

**Tableau 33.** Teneur en lipides selon différentes méthodes de quantification

Pour l'étalonnage, l'absorbance à 530 nm est mesurée pour 300 µg de Chlorelle et Spiruline. La quantité de lipides est calculée avec les équations de la courbe d'étalonnage (**Figure 60**). Pour

les ajouts dosés, l'intersection avec l'axe des ordonnées correspond à la teneur en lipides dans 300 µg de *Chlorelle* et *Spiruline*. Les quantités de lipides déterminées ainsi sont respectivement de : 16.7 µg (*Spiruline*) et 28.4 µg (*Chlorelle*) avec l'huile de colza (**Figure 63**) et 15.4 µg (*Spiruline*) et 29.4 µg (*Chlorelle*) avec l'acide oléique (**Figure 64**). Pour l'essai de compensation, l'absorbance à 530 nm est corrigée en retirant l'absorbance en absence de vanilline. La quantité de lipides est déterminée avec les équations des courbes d'étalonnage. La teneur en lipides est calculée en divisant la quantité de lipides par la quantité de biomasse.

Bien que le laboratoire externe ait employé l'extraction par solvant pour quantifier les lipides, les valeurs obtenues avec la SPV ont été similaires. Cela confirme que la méthode SPV constitue un outil fiable pour la quantification des lipides. Cependant, les résultats obtenus à l'aide des trois méthodes d'étalonnage diffèrent dans une certaine mesure les uns des autres. Certaines hypothèses pourraient expliquer ces tendances :

- L'incertitude inhérente à la méthode doit être prise en compte. Des facteurs tels que le pipetage de faibles volumes pendant le test (Bailey et al., 2022), les fluctuations de lecture du spectrophotomètre, la qualité de la régression linéaire de l'étalonnage, etc. ont évidemment affecté la dispersion globale des résultats. Ceci est particulièrement significatif dans cette étude car les teneurs en lipides des échantillons étaient assez faibles.
- Le choix de l'étalon a un impact significatif comme cela a été démontré précédemment dans la littérature. Dans la présente étude, la différence entre l'acide oléique et l'huile de colza a entraîné jusqu'à 1% de différence dans le contenu estimé en lipides. L'acide oléique a donné les valeurs les plus proches des valeurs gravimétriques.
- La méthode de correction par essai de compensation (mesure avec et sans ajout de vanilline) a conduit à des valeurs plus faibles que les valeurs non corrigées (étalonnage conventionnel). Ceci est attendu puisque l'absorbance de l'essai de compensation a été soustraite. Cependant, cela a conduit à une sous-estimation des valeurs par rapport à l'analyse gravimétrique. Ce n'était pas le cas avec la méthode par ajouts dosés qui a donné les résultats les plus proches de celle-ci. Contrairement à d'autres études utilisant une correction par essai de compensation (Bailey et al., 2022; Pinger et al., 2022), le blanc d'échantillon a été effectué ici en analysant un deuxième tube à essai où de l'acide phosphorique a été ajouté mais pas de vanilline. Il convient ici de rappeler que le mécanisme de réaction de la méthode SPV est seulement hypothétique dans la littérature (Johnson et al., 1977) : pendant la deuxième phase, le chromophore rose est supposé être généré par la réaction de la vanilline avec le carbonium lipidique généré pendant l'hydrolyse acide. Ici, l'acide phosphorique augmente l'absorbance du milieu, même sans vanilline. Ceci suggère un mécanisme de réaction supplémentaire pendant cette phase du protocole SPV. En effet, des études antérieures ont déjà souligné que le mécanisme de réaction n'est pas entièrement compris (par exemple, (McMahon et al., 2013))

### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse

**La quantification des lipides dans les microalgues lyophilisées à l'aide de la méthode SPV a été réalisée selon trois méthodes : étalonnage conventionnel, ajouts dosés et essai de compensation. Une couleur de fond suite à l'hydrolyse acide et à l'ajout d'acide phosphorique a interféré avec le dosage comme le prouvent les essais de compensation. Sur les échantillons de biomasse étudiés, cela a conduit à une différence allant jusqu'à 37%. Ces résultats suggèrent que le mécanisme de réaction de la méthode SPV doit encore être investigué. Il est donc recommandé pour les futures études utilisant ce protocole d'effectuer une correction de l'absorbance de fond soit en mesurant l'absorbance avant et après l'ajout de phospho-vanilline, soit en effectuant des ajouts dosés.**

#### III.1.2. Les glucides

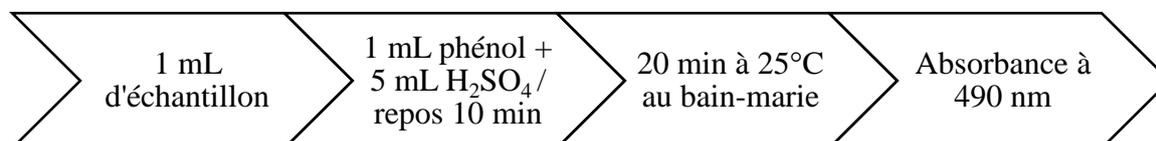
Les glucides ont été quantifiés par la méthode développée par (Dubois et al., 1956), qui est encore utilisée pour caractériser des microalgues (Haris et al., 2022; Ramírez-Romero et al., 2023).

##### III.1.2.1. Réactifs et échantillons

L'acide sulfurique (95.5%), le phénol (99.5%, cristaux) et le glucose (98%) ont été achetés chez Carl Roth (Karlsruhe, Allemagne). La solution de phénol (5% m/m) a été préparée sous hotte en dissolvant 10 g de phénol dans 200 mL d'eau distillée.

Les biomasses analysées sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe III.1.1.1. Réactifs et échantillons.

##### III.1.2.2. Protocole

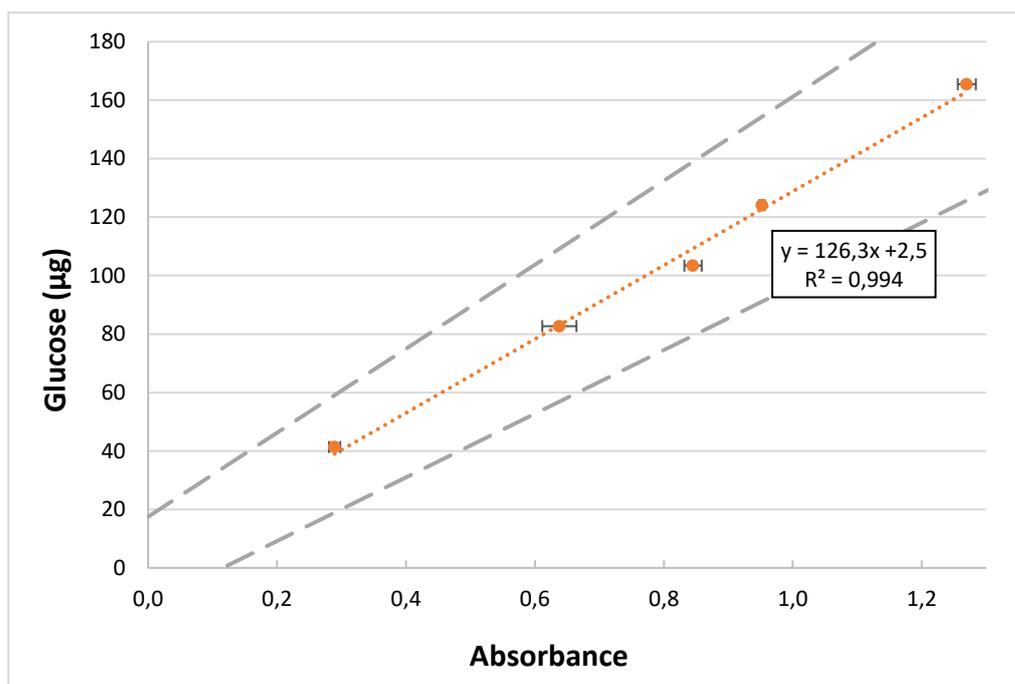


**Figure 68.** Protocole d'analyse des glucides (Dubois et al., 1956)

Le protocole (**Figure 68**) a commencé par la préparation d'une solution mère de microalgues ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) avec de l'eau distillée. Des volumes (0.5 à 1 mL) de la solution mère ont été pipetés dans des tubes à essai et complétés avec de l'eau distillée pour atteindre 1 mL. Ensuite, 1 mL de la solution de phénol, puis 5 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés. L'échantillon a été laissé au repos 10 minutes. Le tube à essai a été placé au bain-marie à  $25^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes. Une coloration jaune-orangé a été observée. L'échantillon a été versé dans une cuvette jetable semi-micro pour mesurer l'absorbance à 490 nm avec un spectrophotomètre UV-VIS (UV-3100PC, VWR).

##### III.1.2.3. Étalonage

La solution étalon mère de glucose ( $0.2 \text{ g.L}^{-1}$ ) a été préparée en ajoutant 50 mg de glucose dans 250 mL d'eau distillée. Dans des tubes à essai, des volumes de solution étalon mère (0.2 à 1 mL) ont été ajoutés et complétés avec de l'eau distillée jusqu'à 1 mL. Les analyses ont été faites en triplicat et ont suivi le protocole expliqué dans la partie précédente.



**Figure 69.** Courbe d'étalonnage avec le glucose

La courbe d'étalonnage a été tracée avec l'absorbance moyenne (490 nm) en abscisse et la quantité d'étalon en ordonnée (**Figure 69**). Les intervalles de confiance à 95% ont également été ajoutés. Une relation linéaire entre la quantité de glucose et l'absorbance a été établie avec un coefficient de corrélation  $R^2$  de 0,994. Selon l'analyse de régression, l'erreur-type de la pente est 5.5 µg glucose/unité d'absorbance.

**La méthode de Dubois ne génère pas ou très peu d'absorbance de fond lors de la digestion acide. Il s'agit d'une méthode éprouvée déjà utilisée pour quantifier les glucides sur de nombreuses matrices, notamment les boues activées (Laurent et al., 2011, 2010, 2009). Le choix de l'étalon s'est porté sur le glucose à des fins de comparaison avec les données de la littérature. Un étalonnage conventionnel est donc approprié.**

### III.1.3. Les protéines

Les protéines ont été quantifiées par mesure de l'azote de Kjeldahl effectuée par une méthode interne du Laboratoire d'Etude des Eaux de l'ENGEES. La teneur en azote a ensuite été multipliée par 6.25 pour obtenir la teneur en protéines. Ce facteur suppose que la teneur en azote des protéines est de 16% (Mariotti et al., 2008). Toutefois, les teneurs en azote des protéines varient avec leur composition en acides aminés. Aussi, les microalgues contiennent d'autres espèces azotées comme les pigments, les acides nucléiques, les acides aminés libres et l'azote inorganique (nitrate, nitrite et l'ammoniac). Pour des macroalgues et des microalgues, d'autres facteurs de conversion ont été situés entre 3.75 et 5.72 (Lourenço et al., 2004, 2002). La facteur de conversion de 6.25 demeure quand même employé, de manière empirique, dans le domaine (Wang et al., 2021). Par ailleurs, le protocole de (Lowry et al., 1951) a également été testé, mais la première technique a été retenue des questions de coût, de temps et de sécurité.

### III.1. Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse

#### III.1.3.1. Réactifs et échantillons

L'acide sulfurique concentré (98%) et le catalyseur ont été achetés chez Carl Roth (Karlsruhe, Allemagne).

Les biomasses analysées sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe III.1.1.1. Réactifs et échantillons.

#### III.1.3.2. Protocole

Le dosage a été réalisé selon la méthode Kjeldahl (ISO 5663:1984, 1984).

### III.1.4. Discussion

Les méthodes ont été appliquées sur *Spiruline* et *Chlorelle* dont les compositions ont été indiquées par le fournisseur (**Tableau 34**). Les teneurs expérimentales en g d'étalon par g d'échantillon ont été converties en % et comparées à celles du fournisseur pour valider les méthodes choisies : le protocole de (Dubois et al., 1956) pour les glucides, la mesure de l'azote de Kjeldahl pour les protéines et le protocole de SPV décrit plus haut pour les lipides.

	<i>Spiruline</i> (f)	<i>Spiruline</i> (e)	<i>Chlorelle</i> (f)	<i>Chlorelle</i> (e)
<b>Lipides (%)</b>	0.8	4	1.8	6.5
<b>Glucides (%)</b>	12.8	12.1	10.7	14
<b>Protéines (%)</b>	65.3	63.8	64.5	60.2
<b>Cendres (%)</b>	/	6.6	/	5.9
<b>Inconnu (%)</b>	21.1	13.5	23	13.4
<b>Total connu (%)</b>	78.9	86.5	77	86.6

**Tableau 34.** Composition de *Spiruline* et *Chlorelle* avec f : fournisseur et e : expérimental

Globalement, les compositions fournisseur et expérimentale sont similaires pour les deux microalgues avec une teneur importante en protéines suivie par les glucides et les lipides. La part d'inconnu a été plus importante chez le fournisseur, car les cendres n'ont pas été mesurées. Les teneurs en protéines via l'azote de Kjeldahl et celles de Vegetopie ont un écart inférieur à 5%. Comme les valeurs sont si proches, on peut supposer que la même méthode a été employée. La part de glucides affiche un écart de 5.5% pour *Spiruline*, et un écart de 30.8% pour *Chlorelle* avec le fournisseur. La différence peut s'expliquer par le fait que la composition donnée sur l'emballage est représentative d'un lot à un moment donné, et n'a pas été mesurée en continu. Ainsi, l'échantillon peut avoir une composition légèrement différente de celle avancée par le fournisseur. La méthode de (Dubois et al., 1956) apparaît satisfaisante pour déterminer les glucides sur des microalgues. La teneur en lipides semble avoir été sur ou sous-estimée. Les teneurs expérimentales sont bien supérieures à celles du fournisseur. Les résultats obtenus par le laboratoire Larebron pour les lipides (**Tableau 33**)  $6.3 \pm 0.5\%$  (*Spiruline*) et  $9.5 \pm 0.8\%$  (*Chlorelle*) semblent indiquer que les valeurs du fournisseur ont été sous-estimées. Pour rappel (voir paragraphe III.1.1.7. Discussion), le protocole avec la SPV a été conclu comme fiable pour quantifier les lipides.

### III.1.5. Conclusion

**La validation des méthodes analytiques a été réalisée sur des échantillons de microalgues lyophilisées commerciales *Chlorelle* et *Spiruline*. Les protocoles choisis se sont avérés satisfaisants et fiables étant donné la proximité des données expérimentales et du fournisseur. La linéarité, la sélectivité, la répétabilité ont particulièrement été investigués en ce qui concerne les lipides, ce protocole étant moins établi dans la littérature. Pour les futures analyses de lipides, un essai de compensation est recommandé pour corriger l'absorbance et éviter la surestimation des lipides.**

### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>

Dans cette partie, des photobioréacteurs à l'échelle pilote fonctionnant en mode séquentiel (voir paragraphe II.1.3. Photobioréacteurs séquentiels) ont été mis en œuvre avec pour évaluer :

1. Le fonctionnement en mode séquentiel d'un consortium microalgues/bactéries cultivé dans un photobioréacteur. Les flux d'azote seront notamment évalués au regard du potentiel de nitrification/dénitrification dans le système.
2. L'impact de l'ajout de dioxyde de carbone sur le procédé en analysant la dynamique du pH et de l'oxygène dissous, la productivité du consortium et sa composition biochimique, ainsi que les performances de traitement des eaux usées, en faisant l'hypothèse que le carbone inorganique est limitant

Les paramètres de dimensionnement et d'exploitation sont sensiblement identiques à ceux appliqués sur le chenal dans les études suivantes (voir partie III.3. ). Le fonctionnement en mode séquentiel doit cependant mener à des conditions physico-chimiques différentes avec des variations plus marquées, notamment pour l'oxygène dissous.

Pendant les 5 mois de fonctionnement, il y a eu quelques dysfonctionnements sur les pilotes. Au démarrage, de J1 à J10, les eaux usées synthétiques ont été malencontreusement préparées deux fois plus concentrées qu'attendu. Les quantités ont été corrigées par la suite. La période de J68 à J82 correspond à la fermeture de l'ENGEES (congés de fin d'année) où aucun échantillon n'a pu être prélevé. La période de J129 à J136 correspond à un dysfonctionnement des deux pilotes : l'agitation s'est arrêtée pendant 3 jours suite à une coupure de courant, et aucune extraction de biomasse n'a été réalisée pendant ce temps.

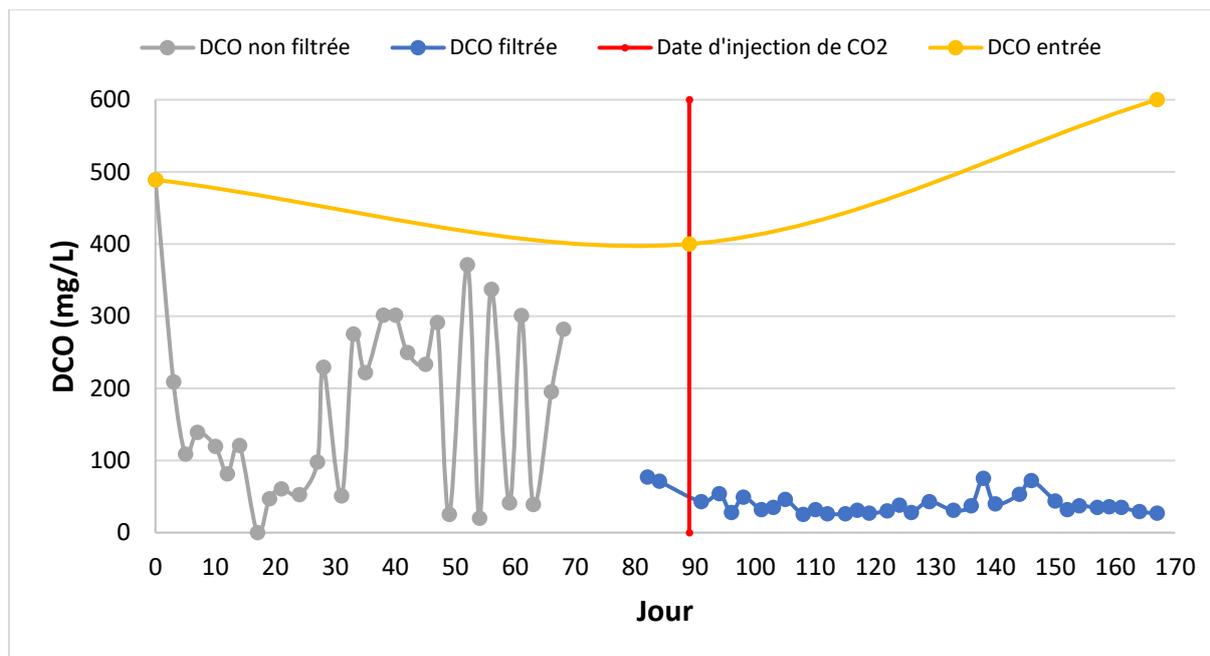
#### III.2.1. Traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées dans les photobioréacteurs a été évalué en mesurant les paramètres suivants sur le surnageant après chaque vidange : la DCO, les formes de l'azote (NTK, ions  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), du phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et l'alcalinité. Le temps de séjour hydraulique était de 4 j.

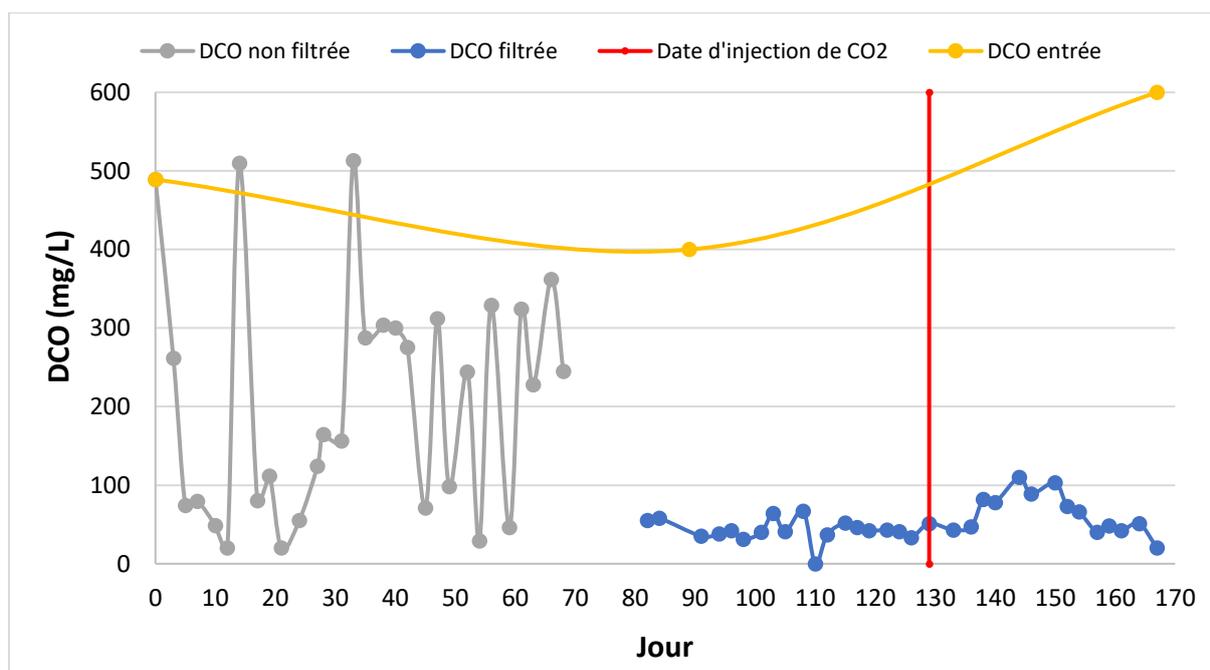
Face aux fluctuations de la DCO en sortie au bout de 2 mois, l'hypothèse, que 30 minutes de décantation n'étaient pas suffisantes et que des MES étaient encore présents, a été formulée. La procédure d'échantillonnage a été modifiée. Avant J70, les eaux usées ont été prélevées comme suit : les eaux usées ont décanté 30 minutes pour éliminer les MES, le surnageant a été congelé sans être filtré jusqu'à analyse. Après J70, le protocole a été le suivant : le surnageant a décanté 30 minutes, puis a été préalablement filtré et congelé jusqu'à analyse.

Ainsi, la variabilité des résultats due au changement de protocole de prélèvement a orienté la représentation des données non sur la base du temps, mais sous forme de box-plot avant et après la mise en place du dioxyde de carbone (II.2.4.1. Boîtes à moustaches). Un graphique sous forme de nuages de points dans le temps a été choisi pour la DCO pour illustrer la perturbation des données par les MES. Ensuite, le box-plot a été adopté pour les composés azotés et phosphorés, car il permet une lecture et une compréhension plus facile des résultats.

III.2.1.1. La DCO



**Figure 70.** Évolution de la DCO dans R1



**Figure 71.** Évolution de la DCO dans R2

Les et **Figure 70** et **Figure 71** illustrent l'évolution de la Demande Chimique en Oxygène en sortie de système (le surnageant récupéré après la vidange). Dans les deux photobioréacteurs, l'élimination de la DCO a été très variable les deux premiers mois d'exploitation, allant de 47 mg.L<sup>-1</sup> à 275 mg.L<sup>-1</sup> en sortie de R1 et de 20 mg.L<sup>-1</sup> à 513 mg.L<sup>-1</sup> en sortie de R2. Les 30 premiers jours, cette variabilité peut se justifier par la période d'acclimatation du consortium combinée à des MES très variables. De plus, les eaux usées ont été deux fois plus concentrées jusqu'à J10. La concentration en MES a été stabilisée au bout d'un mois, ce qui a ensuite permis

### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>

de mettre en place l'extraction et les prélèvements de biomasse en excès (maintien à 1 g.L<sup>-1</sup>). De plus, la différence de prélèvement et de traitement des échantillons avant et après J70 peut également expliquer les fluctuations de la DCO. En effet, avant J70, les eaux usées ont été prélevés comme suit : les eaux usées ont décanté 30 minutes pour éliminer les MES, le surnageant a été congelé sans être filtré jusqu'à analyse. Les variations de la DCO en sortie ont été causés par la présence de MES dans le surnageant : la DCO particulaire a été prise en compte en plus de la DCO dissoute. La décantation de 30 minutes a été plus ou moins efficace, et à certaines occasions, n'a pas suffi à débarrasser l'échantillon des floes de biomasse. La méthode de prélèvement a donc été modifiée : les eaux usées ont décanté 30 minutes, le surnageant a été préalablement filtré et congelé jusqu'à analyse. Pour mieux se référer à l'activité biologique du consortium, on s'est référé à la DCO filtrée. En perspective, un suivi détaillé pourrait être effectué pour caractériser les propriétés de sédimentation de la biomasse, déterminer la durée optimale de décantation pour éliminer efficacement les MES de l'échantillon.

Après J82, le traitement de la DCO s'est globalement stabilisé sous le seuil de 50 mg.L<sup>-1</sup> dans les deux cultures. Dans l'un comme l'autre, les valeurs sont passées sous 50 mg.L<sup>-1</sup> à partir de J89 quand les échantillons ont été préalablement filtrés. La filtration a amélioré la qualité des échantillons, mais a rendu difficile l'interprétation des résultats dans R1, car le kit CO<sub>2</sub> a été mis en place au même moment. L'interprétation a été plus simple pour le photobioréacteur R2, car le dioxyde de carbone a été injecté plus tard à J129. À certaines périodes, les mesures ont été supérieures à 50 mg.L<sup>-1</sup> : à J138 et J146 dans R1 et de J138 à J154 dans R2. Le phénomène dans R2 peut être expliqué par l'installation du kit CO<sub>2</sub> à J129. De plus, à J144 et J150, les vidanges n'ont pas été correctement effectuées.

	Avant CO <sub>2</sub>		Après CO <sub>2</sub>	
	DCO (mg.L <sup>-1</sup> )	R (%)	DCO (mg.L <sup>-1</sup> )	R (%)
<b>R1</b>	*	*	37.9 ± 12.3 (n=31)	92.2 ± 2.5
<b>R2</b>	42.9 ± 14.5 (n=19)	91.2 ± 3.0	63.7 ± 26.3 (n=14)	87.0 ± 5.4

**Tableau 35.** Concentration moyenne de la DCO et abattement moyen R en sortie de R1 et R2 avant-après injection de CO<sub>2</sub> (\*la DCO et l'abattement en sortie de R1 avant CO<sub>2</sub> n'ont pas été calculés, car les échantillons non filtrés ont rendu les mesures trop variables)

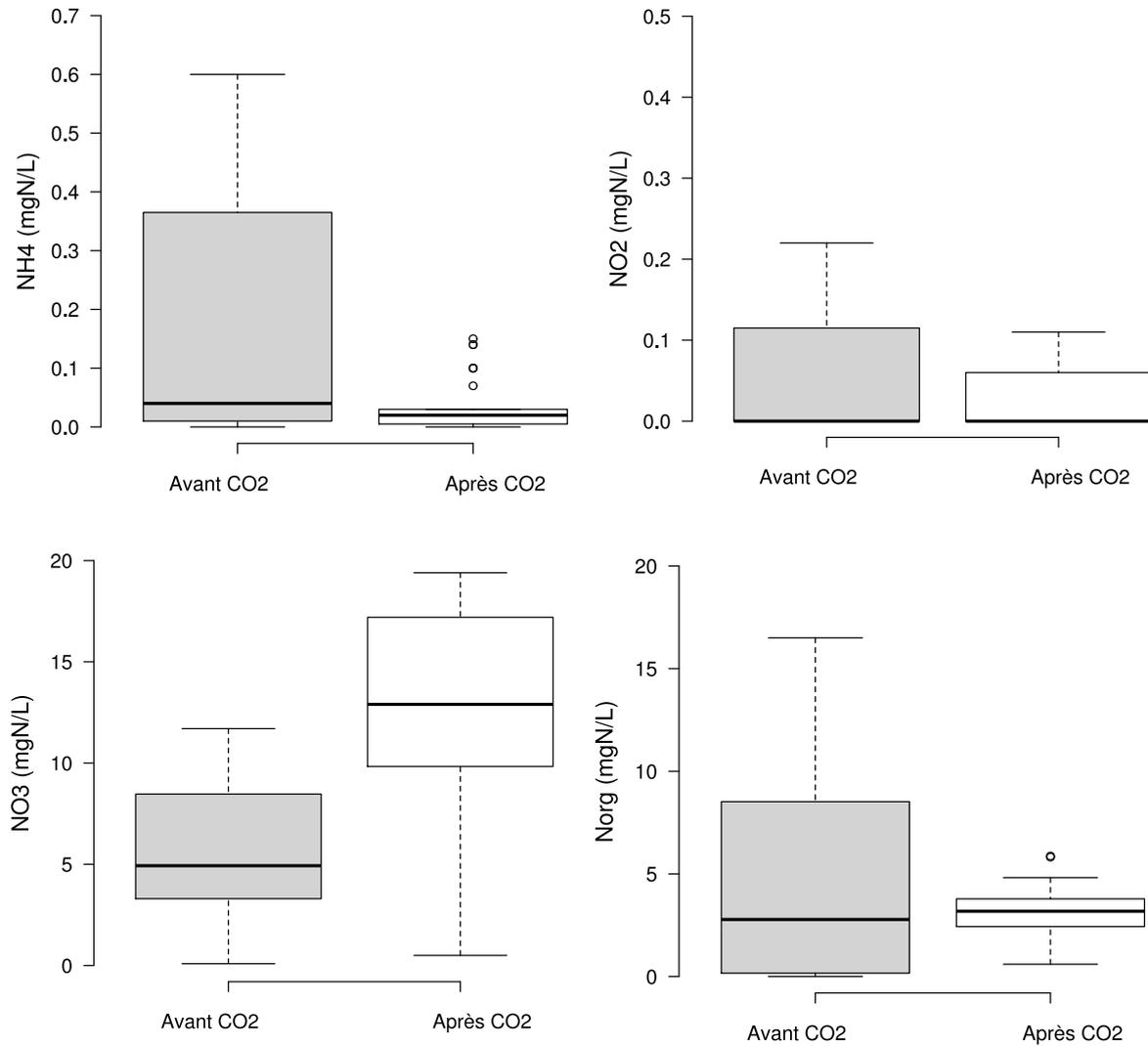
Les moyennes avec écarts-types (**Tableau 35**) attestent de l'efficacité du traitement de la DCO dans R1 et R2. Dans les deux photobioréacteurs, les abattements du même ordre de grandeur (>90%) avec des écarts-types faibles ont été atteints. Avec l'injection de dioxyde de carbone, l'élimination de la matière organique ne s'est pas améliorée dans R2. L'apport de CO<sub>2</sub> n'a pas semblé avoir un effet significatif dans la réduction de la DCO. Les valeurs obtenues sont en accord avec la littérature. En effet, avec un dispositif expérimental similaire au nôtre, un consortium de microalgues et bactéries a traité 82.3% de la DCO d'eaux usées synthétiques (Mojiri et al., 2022). Il est nécessaire de rappeler que le nombre de données collectées avant et après l'apport du CO<sub>2</sub> dans chaque réacteur a été différent.

#### III.2.1.2. L'azote

Dans les eaux usées synthétiques en entrée, l'azote global NGL a consisté en 91.7% d'azote organique (provenant de l'urée et de l'extrait de viande), 6.7% de nitrates et 1.6% d'ammonium.

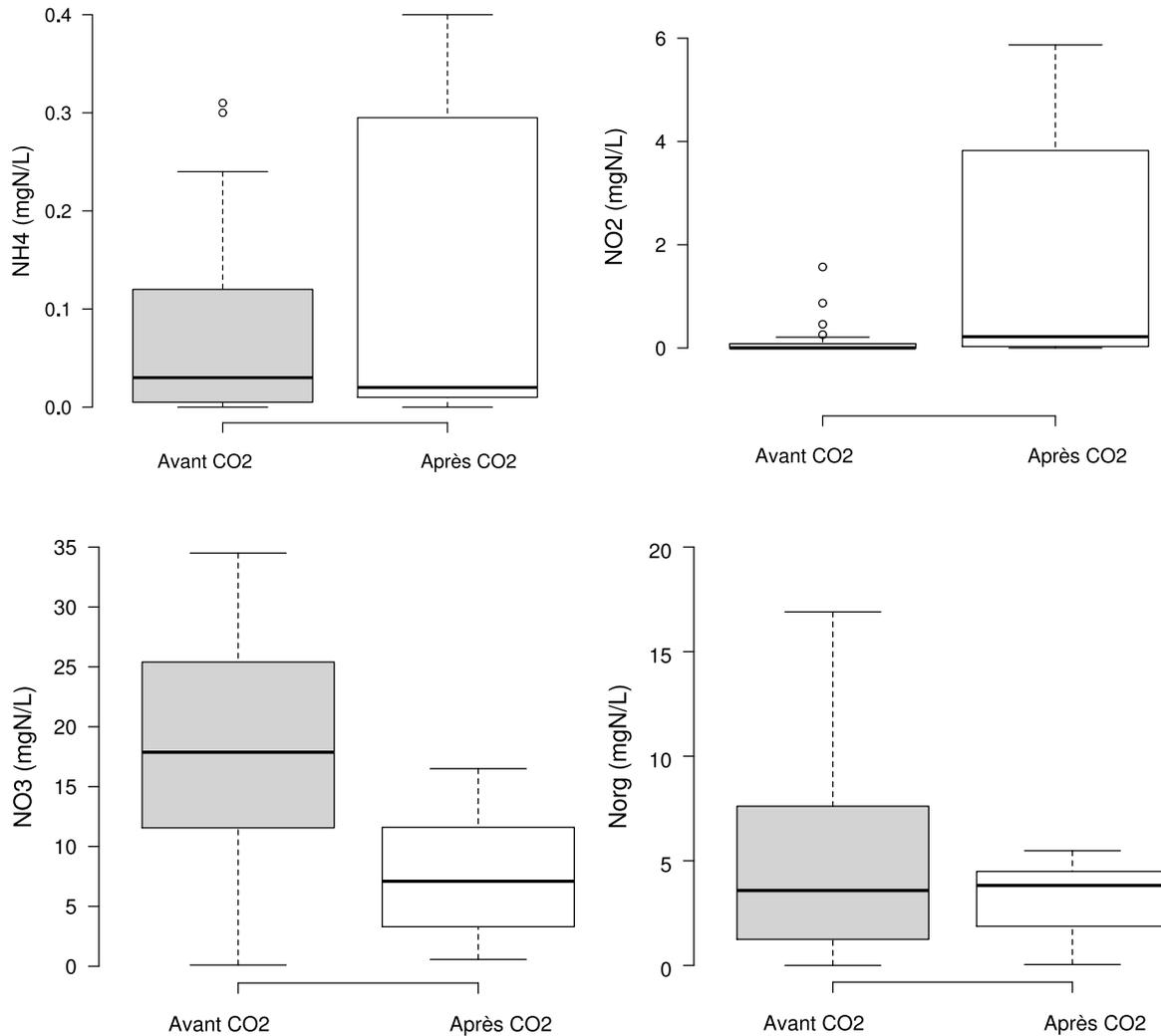
### Partie III : Résultats et discussion

L'analyse des espèces en sortie a permis d'identifier les principaux mécanismes en jeu dans la conversion de l'azote. Les **Figure 72** et **Figure 73** présentent l'évolution des formes de l'azote en sortie de R1 et R2 sous forme de box-plot. Pour rappel, en entrée :  $\text{NGL} = 49.2 \text{ mgN/L}$  ;  $\text{NTK} = 45.9 \text{ mgN/L}$  ;  $\text{NO}_2^- = 0 \text{ mgN/L}$  ;  $\text{NO}_3^- = 3.3 \text{ mgN/L}$  et  $\text{NH}_4^+ = 0.8 \text{ mgN/L}$ .



**Figure 72.** Formes de l'azote (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Norg) en sortie de R1

### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>



**Figure 73.** Formes de l'azote (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Norg) en sortie de R2

Dans R1 (**Figure 72**), la modification du protocole d'échantillonnage a eu lieu à quelques jours d'intervalle avec la mise en place du kit CO<sub>2</sub>. L'écart interquartile plus étalé autour de la médiane montre que les données ont été plus dispersées avant CO<sub>2</sub>, particulièrement pour les ions ammonium, nitrates et l'azote organique, en raison de la méthode d'échantillonnage. Ainsi, l'hétérogénéité des données a été attribuée au protocole de prélèvement et à la période d'acclimatation, plutôt qu'à l'absence de l'apport en CO<sub>2</sub> dans la catégorie « Avant CO<sub>2</sub> ». Dans R2 (**Figure 73**), l'implémentation du dioxyde de carbone a été plus tardive à J129. Interpréter les effets potentiels du CO<sub>2</sub> a donc été plus simple car, l'influence de la méthode de prélèvement est moindre.

Comme observé avec la DCO, les concentrations en azote global (somme des nitrites, des nitrates et de l'azote de Kjeldahl) ont été variables durant toute la durée de l'expérience. Le premier mois, cette variabilité peut s'expliquer par la période d'acclimatation du consortium associée à des MES très variables. Parmi les composés azotés en sortie, les ions ammonium ont été mesurés en petites quantités dans les deux photobioréacteurs indépendamment du dioxyde de carbone, ce qui montre une nitrification efficace. Ensuite, les quantités de nitrites NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ont été infimes (Q3=0.06 mgN/L) sur l'ensemble de la campagne de mesure dans R1 (**Figure 72**).

Une fois un régime relativement permanent établi, une majeure partie de l'azote a été convertie en nitrates  $\text{NO}_3^-$  en fin de cycle, ce qui témoigne d'un important processus de nitrification dans R1. Cependant, les quantités de nitrites plus importantes ( $Q_3=3.83 \text{ mgN/L}$ ) dans R2 ont mis en lumière un mécanisme d'accumulation de nitrites (**Figure 73**). Le phénomène peut s'expliquer par une période à J129 où l'agitation a été stoppée accidentellement et la biomasse a sédimenté pendant 3 jours. De plus, l'extraction de biomasse n'ayant pas été effectuée par la suite, la biomasse (bactéries autotrophes notamment) a été affectée et le système a mis un certain temps à retrouver des performances stables..

Les rendements sur l'azote global ont été relativement importants (**Tableau 36**), témoignant d'une potentielle dénitrification : les faibles teneurs en oxygène en début de cycle associées à une concentration en substrat organique élevée (cf. Suivi du pH et de l'oxygène dissous) ont en effet pu fournir des conditions favorables à une dénitrification par la flore bactérienne hétérotrophe. Ça a notamment été le cas lors du dysfonctionnement observé entre J129 et J136.

	Avant $\text{CO}_2$		Après $\text{CO}_2$	
	NGL ( $\text{mgN.L}^{-1}$ )	R (%)	NGL ( $\text{mgN.L}^{-1}$ )	R (%)
R1	$13.6 \pm 10.8$ (n=31)	$72.4 \pm 21.9$	$17.1 \pm 8.4$ (n=31)	$65.3 \pm 17.1$
R2	$21.2 \pm 8.0$ (n=48)	$56.9 \pm 6.8$	$13.5 \pm 6.8$ (n=14)	$72.6 \pm 13.8$

**Tableau 36.** Concentration moyenne de l'azote global NGL et abattement moyen R en sortie de R1 et R2 avant-après injection de  $\text{CO}_2$

Les performances épuratoires moyennes (**Tableau 36**) ont reflété les fluctuations de traitement affichées par la **Figure 72** et la **Figure 73**. Les écarts-types élevés ont limité la portée de ces interprétations. En France, la réglementation impose, hors contraintes locales plus strictes, un seuil maximum de  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  pour NGL en sortie ou un rendement minimum de 70% ("Arrêté du 21 juillet 2015," 2015). Les données présentées ici se rapprochent de ces exigences.

Dans le photobioréacteur R1, l'élimination de l'azote global a semblé peu affectée par l'apport en  $\text{CO}_2$ . En effet, les abattements avant-après  $\text{CO}_2$  ont été du même ordre de grandeur, malgré des écarts-types importants. Cela rejoint la conclusion formulée pour la production de biomasse selon laquelle le  $\text{CO}_2$  n'a pas eu d'effet significatif sur R1, car la productivité a été identique tout au long de l'expérience (voir III.2.3. Productivité de la biomasse). Dans R2, avec la mise en place du  $\text{CO}_2$ , le seuil de  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  a été franchi et le rendement d'élimination a donc aussi augmenté de manière assez significative. Ces observations ont concordé avec le raisonnement amené par la productivité de biomasse, où le dioxyde de carbone a bénéficié au consortium microalgues-bactéries cultivé dans R2 : en complément de la dénitrification, la plus forte production de biomasse constatée a pu amener une assimilation de l'azote plus importante. Par conséquent, les abattements constatés de l'azote global, associés à leur variabilité, suggèrent trois mécanismes possibles :

- Une dénitrification lorsque la teneur en oxygène dissous a baissé. Après la vidange, une période anoxique de quelques heures a eu lieu (cf. III.2.2. Suivi du pH et de l'oxygène dissous) où une dénitrification a pu se produire en absence d'oxygène, avec un nouvel

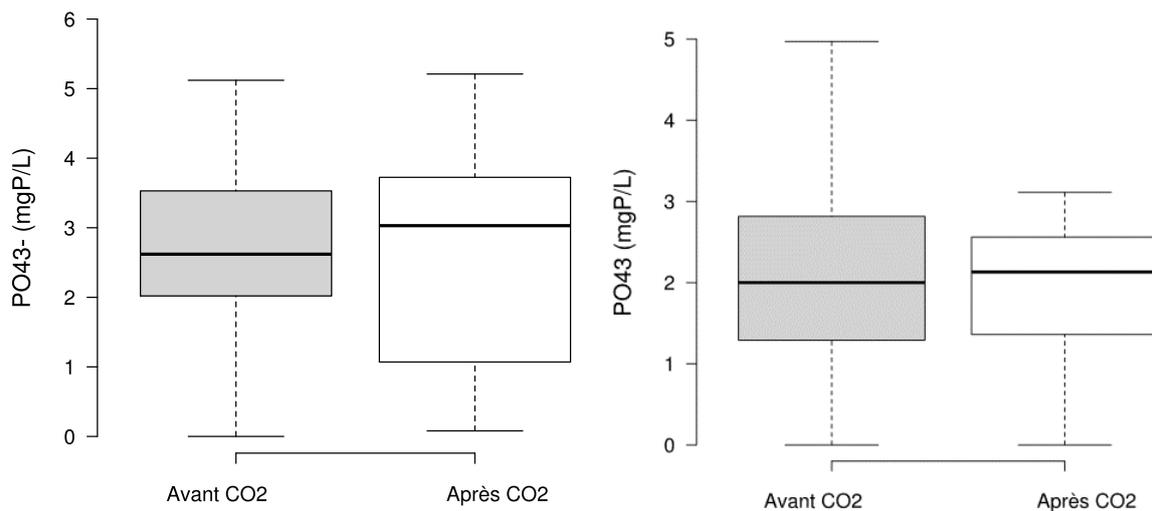
### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>

apport en matière organique par les eaux usées synthétiques fraîchement préparées et une partie des nitrates du cycle précédent la vidange.

- Une assimilation par la biomasse. Une fois par semaine, la biomasse a été récupérée et l'azote de Kjeldahl (NTK) a été mesuré pour déterminer la part d'azote assimilé. En moyenne, la biomasse a assimilée  $1.38 \pm 0.14 \text{ mgN.L}^{-1}.\text{cycle}^{-1}$  dans R1 et  $2.41 \text{ mgN.L}^{-1}.\text{cycle}^{-1}$  dans R2. En entrée, l'azote global des eaux usées s'est élevé à  $49.2 \text{ mgN.L}^{-1}$ . La biomasse a assimilé en moyenne 2.8% d'azote dans R1 et 4.9% d'azote dans R2. L'assimilation a donc été un phénomène minoritaire mais un peu plus important dans R2.
- Une volatilisation (stripping) de l'azote ammoniacal à pH élevé. Cependant, cette dernière a été certainement limitée, notamment après mise en place du CO<sub>2</sub>, car le pH a alors été maintenu sous 8.3.

#### III.2.1.3. Le phosphore

Dans les eaux usées synthétiques entrantes, le phosphore a été essentiellement apporté par l'hydrogénophosphate de potassium K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Les graphiques présentent l'évolution des orthophosphates PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> en sortie de R1 et R2 sous forme de box-plot (**Figure 74**).



**Figure 74.** Orthophosphates en sortie de R1 (gauche) et de R2 (droite)

Comme pour l'azote global, les concentrations des orthophosphates relevées après chaque vidange ont été variables dans les deux cultures. Après l'injection de CO<sub>2</sub>, les concentrations ont fluctué avec moins d'amplitude dans R2 que dans R1. En effet, l'écart interquartile est plus resserré autour de la médiane Q2 dans R2 ( $1.36 < Q2 < 2.56$ ) que dans R1 ( $1.07 < Q2 < 3.73$ ). Cette stabilité peut être expliquée par la productivité de biomasse plus élevée dans la culture R2, et donc une assimilation plus importante.

L'élimination du phosphore a été très satisfaisante dans les deux photobioréacteurs avec des abattements moyens à hauteur de 80% (**Tableau 37**). Le traitement n'a pas semblé plus efficace dans R1 que dans R2. Les performances ont été plus variable dans R1 avec des écarts-types plus importants. Dans R1, l'ajout de CO<sub>2</sub> n'a pas semblé impacter l'élimination des orthophosphates avec en sortie des concentrations moyennes quasi-identiques. Pareillement,

dans R2, l'abattement n'a pas varié après l'injection de dioxyde de carbone. En sortie de station, en zone sensible à l'eutrophisation et hors contraintes locales plus strictes, les performances minimales attendue sur le PT sont 2 mg.L<sup>-1</sup> ou un rendement de 80% ("Arrêté du 21 juillet 2015," 2015). Les valeurs présentées ici se rapprochent de ces critères, et ce sans ajout de réactif supplémentaire ou de mise en place de systèmes spécifiques (comme une zone anaérobie pour la déphosphatation biologique).

	Avant CO <sub>2</sub>		Après CO <sub>2</sub>	
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mgP.L <sup>-1</sup> )	R (%)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mgP.L <sup>-1</sup> )	R (%)
<b>R1</b>	2.7±1.4	79.3±10.7	2.6±1.6	79.1±12
<b>R2</b>	2.0±1.1	84.3±8.6	2.1±0.6	83.9±4.7

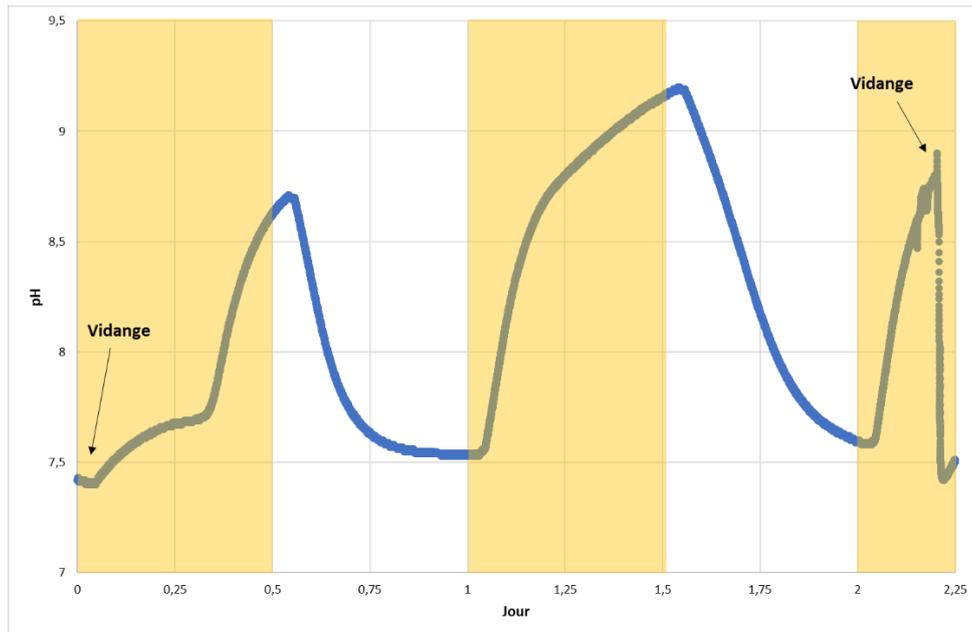
**Tableau 37.** Concentration moyenne des orthophosphates et abattement moyen R en sortie de R1 et R2 avant-après injection de CO<sub>2</sub>

La précipitation des phosphates et l'assimilation par la biomasse sont ici les seules voies possibles de conversion du phosphore. Le pH a été maintenu à 7.5 avec le dioxyde de carbone. L'absence d'impact observé avant-après CO<sub>2</sub> sur les résultats (ou avant-après régulation du pH) indique que la précipitation qui se déroule préférentiellement à pH élevé, n'a pas été la principale voie d'élimination du phosphore dissous.

### III.2.2. Suivi du pH et de l'oxygène dissous

Le pH et l'oxygène dissous ont été mesurés en continu dans les photobioréacteurs pour suivre la dynamique du consortium microalgues-bactéries. En effet, l'oxygène dissous constitue un indicateur d'activité des microalgues qui le produisent par photosynthèse, et des bactéries qui le consomment pour oxyder les polluants.

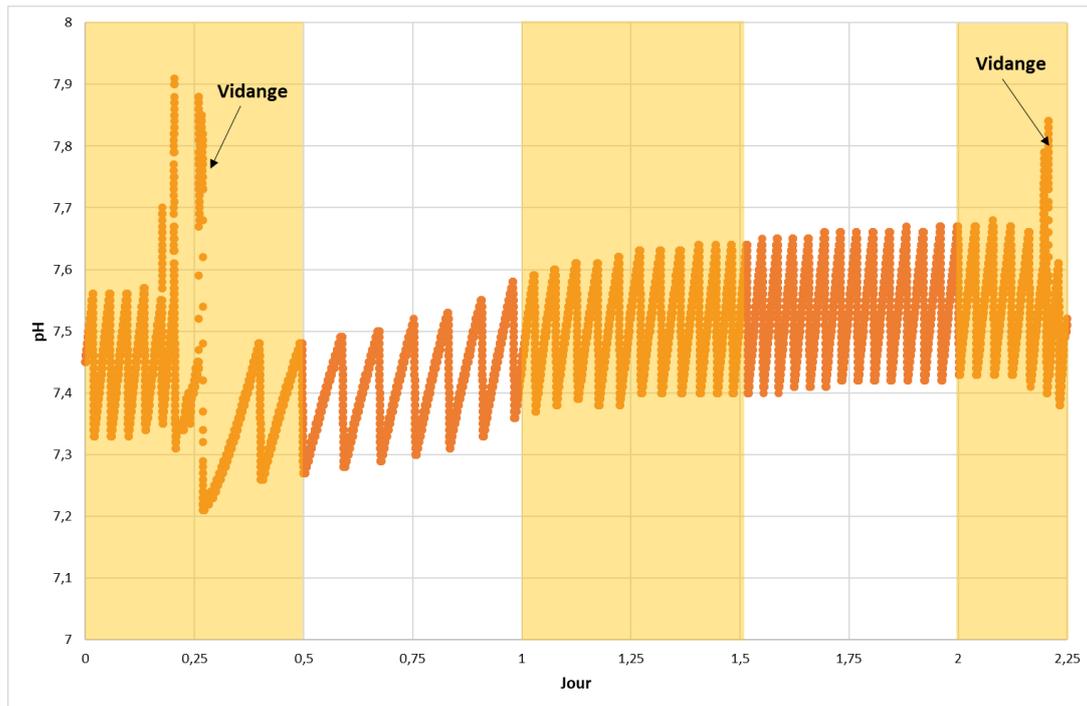
Des données du photobioréacteur R2 ont été sélectionnées pour illustrer le comportement caractéristique de la culture sur un cycle entre deux vidanges (la première a été faite à t=0 et la seconde à t=2.25) avant et après l'injection de CO<sub>2</sub>. Les **Figure 75** et **Figure 76** présentent les évolutions de pH dans le réacteur avant et après injection de CO<sub>2</sub> sur un cycle. De manière similaire, les **Figure 77** et **Figure 78** montrent les variations du taux en oxygène dissous en absence et en présence de CO<sub>2</sub> sur un cycle. Les vidanges et les périodes de lumière ont été mises en évidence sur les graphiques.



**Figure 75.** Évolution du pH avant l'injection de CO<sub>2</sub> (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière)

En absence de dioxyde de carbone (**Figure 75**), la tendance du pH peut être décrite comme suit :

- A J0, immédiatement après la vidange : le pH a chuté après la vidange et l'apport d'eaux usées synthétiques fraîchement préparées.
- De J0 à J0,5 : le pH a augmenté jusqu'à 8,7 avec la photosynthèse. En effet, les microalgues actives avec la lumière ont consommé le CO<sub>2</sub> produit par les bactéries et libéré de l'oxygène. On note une augmentation plus lente jusqu'à environ J0,35 : l'impact de la photosynthèse est en partie compensé par les phénomènes d'oxydation bactérienne (nitrification notamment).
- De J0,5 à J1 : lors de la période obscure, la photosynthèse a été stoppée alors que l'activité bactérienne s'est poursuivie avec l'utilisation de l'O<sub>2</sub> et la production du CO<sub>2</sub> qui s'est accumulé dans le milieu d'où la réduction du pH de 8,7 à 7,54.
- De J1 à J1,5 : il y a eu une hausse du pH de 7,54 à 9,2 liée à la photosynthèse (soit la consommation du CO<sub>2</sub> par les microalgues). L'augmentation a été plus marquée, car les substrats sont devenus limitant pour l'oxydation bactérienne.
- De J1,5 à J2 : pour cette seconde période obscure, une chute de pH a été enregistrée de 9,2 à 7,6. L'oxydation bactérienne résiduelle ainsi que l'absorption du CO<sub>2</sub> atmosphérique qui s'accumule peuvent expliquer ce phénomène.
- De J2 à J2,25 : avec la seconde période éclairée, le pH a de nouveau augmenté jusqu'à 8,8 jusqu'à la vidange à J2,25.



**Figure 76.** Évolution du pH après l'injection de CO<sub>2</sub> (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière)

En présence de CO<sub>2</sub> (**Figure 76**), le pH a varié autour de 7,5 car, le dioxyde de carbone a été fréquemment injecté pour ramener les valeurs autour de cette consigne.

- De J0,5 à J1 : pendant la nuit, 6 pics d'injections ont été dénombrés.
- De J1 à J1,5 : la fréquence d'injection a augmenté (11 pics) car, avec la photosynthèse, le CO<sub>2</sub> a été consommé par les microalgues, ce qui a fait augmenter le pH et nécessité d'ajouter du CO<sub>2</sub> plus fréquemment pour compenser d'autant plus que l'activité bactérienne était ralentie avec la limitation en substrat.
- De J1,5 à J2 : 13 pics d'ajout de CO<sub>2</sub> ont eu lieu. La fréquence d'injection a été stable car, la photosynthèse s'est arrêtée.
- De J2 à J2,25 : le dioxyde de carbone a été injecté jusqu'à la vidange un peu avant J2,25.

En absence de CO<sub>2</sub>, le pH a varié avec plus d'amplitude de 7,4 à 9,2. La mise en place du CO<sub>2</sub> a permis comme attendu de maintenir le pH dans une gamme ( $\pm 0,2$ ) autour de 7,5. Les fréquences d'injection de CO<sub>2</sub> suivent bien les tendances d'augmentation et diminution du pH observées sans ajout de CO<sub>2</sub> durant les différentes phases.

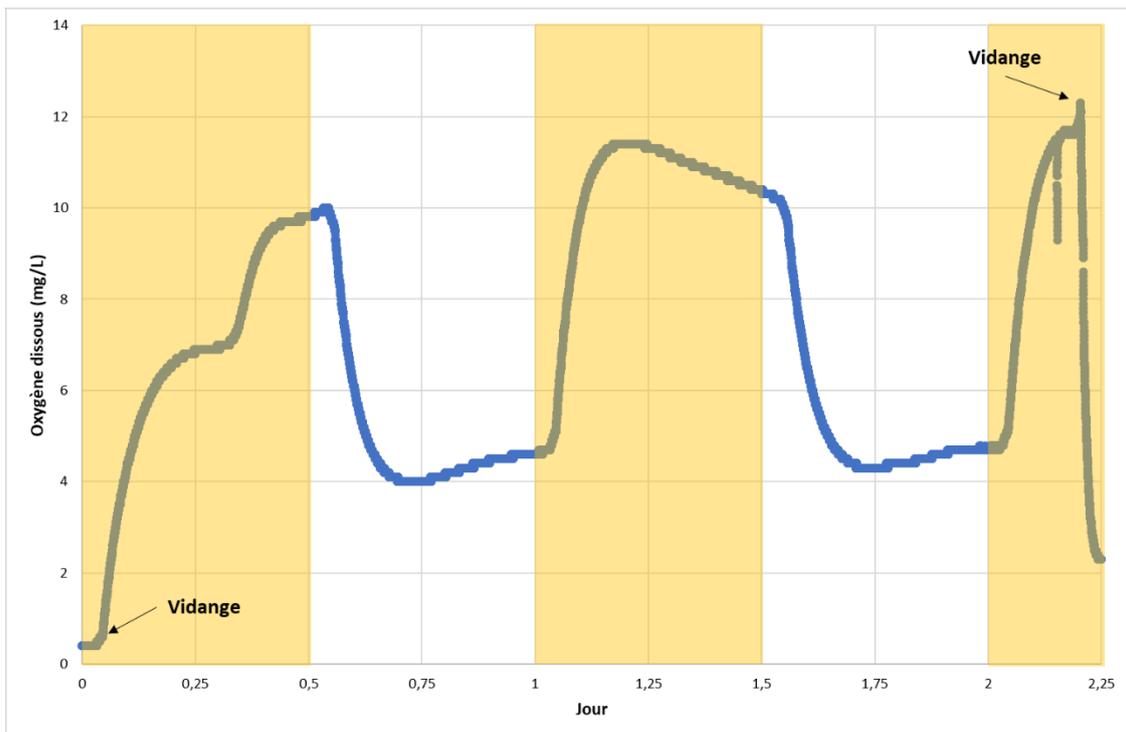
Le second paramètre suivi, l'oxygène dissous, a également été influencé par la mise en place de la régulation de pH via l'ajout de dioxyde de carbone. Avant l'ajout de CO<sub>2</sub> (**Figure 77**), la tendance peut être décrite comme suit :

- De J0 à J0,5 : après la vidange, l'oxygène dissous a atteint 0 mg.L<sup>-1</sup>, car l'oxydation bactérienne du nouveau substrat injecté a pris le dessus. L'oxygène a ensuite rapidement augmenté, car l'activité photosynthétique a démarré. De manière similaire aux évolutions de pH, on a observé un plateau de J0,25 à J0,35 correspondant à un équilibre

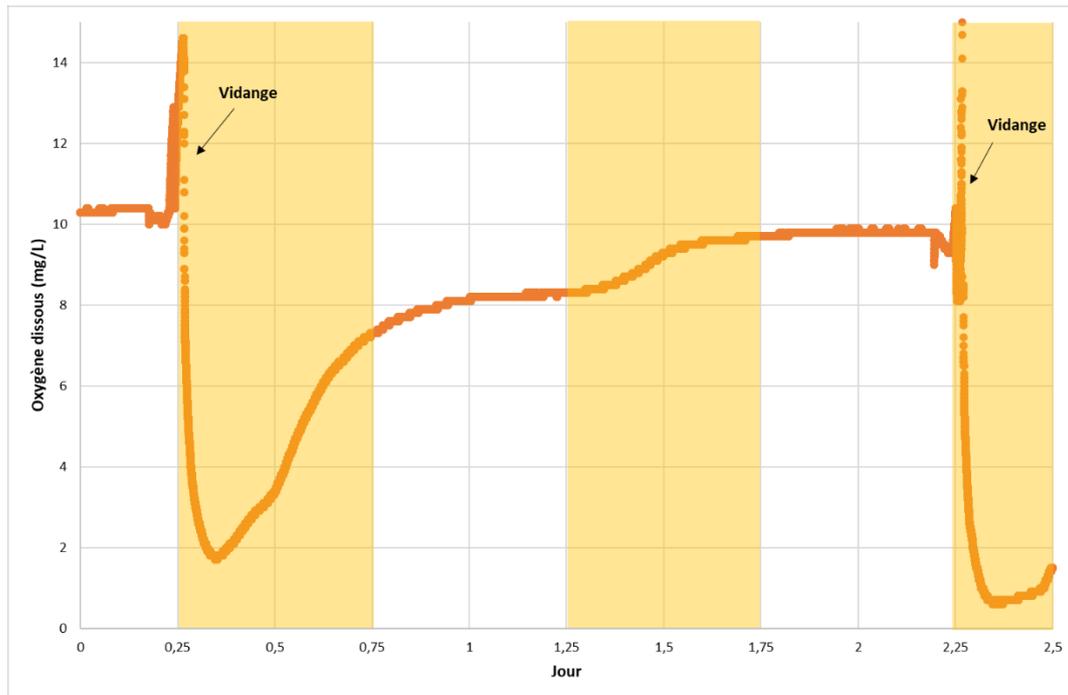
### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>

entre consommation et production d'oxygène. Une fois l'activité bactérienne ralentie du fait de la limitation en substrat, l'oxygène a continué d'augmenter jusqu'à une valeur proche de la saturation (10 mg.L<sup>-1</sup>, 19°C).

- De J0.5 à J1 : avec la période obscure, la photosynthèse s'est arrêtée, ce qui explique la chute de l'oxygène dissous de 10 à 4 mg.L<sup>-1</sup>. La concentration n'a plus chuté à partir de J0.75, correspondant à un équilibre entre la consommation bactérienne (limitée par le substrat et probablement proche de la respiration endogène) et le transfert gaz-liquide d'oxygène.
- De J1 à J1.5 : avec la lumière, la photosynthèse des microalgues a repris et est devenue de plus en plus prédominante avec une augmentation de l'oxygène dissous jusqu'à 11.4 mg.L<sup>-1</sup>. A J1.25, la concentration en oxygène a commencé à diminuer, indiquant une limitation/inhibition de la photosynthèse : les mécanismes de respiration sont devenus alors plus significatifs par rapport à la production d'oxygène.
- De J1.5 à J2 : durant la nuit, la production d'O<sub>2</sub> a été stoppée alors que l'activité des bactéries a continué, ce qui est marqué par une diminution de la concentration de 10 à 4 mg.L<sup>-1</sup>, similaire à ce qui est observé lors de la 1<sup>ère</sup> période obscure.



**Figure 77.** Évolution de l'oxygène dissous avant l'injection de CO<sub>2</sub> (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière)



**Figure 78.** Evolution de l'oxygène dissous après l'injection de CO<sub>2</sub> (les zones en jaune correspondent aux périodes avec lumière)

Après l'injection de CO<sub>2</sub> (**Figure 78**), la tendance de l'oxygène dissous a été très différente et peut être décrite ainsi :

- De J0 à J0.5 : après la vidange, l'oxygène dissous a chuté jusqu'à 2 mg.L<sup>-1</sup> et a de nouveau été en hausse jusqu'à l'arrêt de la période lumineuse.
- De J0.5 à J1 : l'oxygène dissous a atteint un palier de 8 mg.L<sup>-1</sup>.
- De J1 à J1.5 : l'oxygène dissous a commencé à augmenter à partir de J1.25, car les microalgues ont été actives avec la photosynthèse, et l'oxydation bactérienne a ralenti comme une grande partie du substrat a été dégradée.
- De J1.5 à J2 : un palier a été atteint à 10 mg.L<sup>-1</sup>. Pendant la période obscure, il n'y a pas eu de photosynthèse et les bactéries n'ont plus utilisé d'oxygène car toute la matière organique a été oxydée.

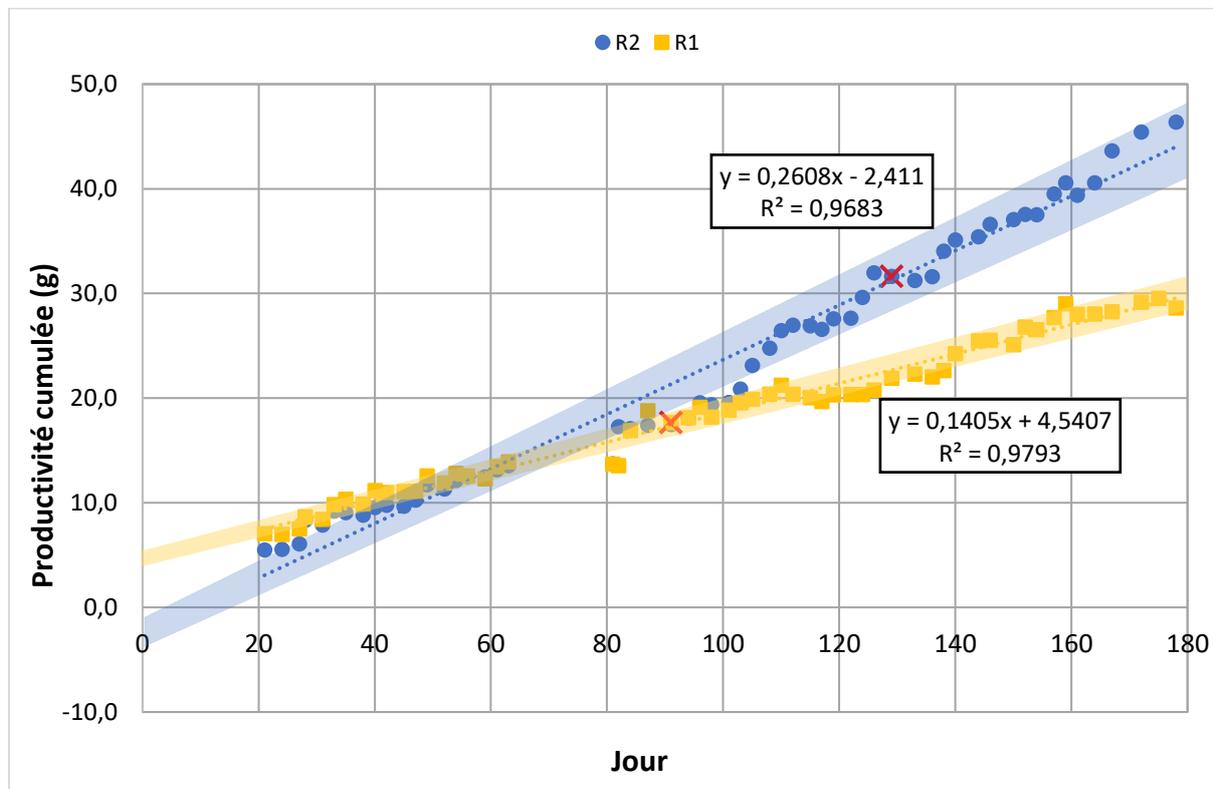
Le transfert gaz-liquide est aussi entré en compte dans l'oxygénation du photobioréacteur, même si le phénomène a été moins important que dans le chenal à haut rendement algal (voir II.2.3.2. Détermination expérimentale du  $k_{LaO_2}$ ).

### III.2.3. Productivité de la biomasse

Afin d'évaluer l'impact de la régulation de pH via l'ajout de CO<sub>2</sub>, la production de biomasse a été évaluée via un bilan massique dans chaque photobioréacteur, pendant les six mois (voir II.2.1.2. Productivité et productivité cumulée). La **Figure 79** présente la productivité cumulée de biomasse dans les deux réacteurs. Le démarrage de l'injection de CO<sub>2</sub> est indiqué par une croix rouge à J+89 pour R1 et J+129 pour R2. Ainsi, R1 a été 90 jours sous CO<sub>2</sub> et R2 a été 50 jours sous CO<sub>2</sub>. Les limites inférieure et supérieure (seuil de confiance à 95%) sont signalées par les zones colorées sur la **Figure 79** et résumées dans le **Tableau 38**.

### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>

Dans un premier temps, les comportements des cultures sont commentés en effectuant une régression linéaire sur l'ensemble du temps d'exploitation (**Tableau 38**). Dans un second temps, les comportements relatifs à R1 et R2 avant/après CO<sub>2</sub> sont analysés séparément en effectuant les régressions linéaires sur les périodes spécifiques avant et après la mise en place du CO<sub>2</sub> (**Tableau 38**).



**Figure 79.** Évolution de la productivité cumulée de biomasse dans les photobioréacteurs R1 et R2 (la période vide correspond à la fermeture des locaux). Les croix rouges indiquent le démarrage de l'injection de CO<sub>2</sub>.

Équation	R1	R2
<b>Droite de tendance</b>	$y = 0.141x + 4.541$	$y = 0.261x - 2.411$
<b>Limite inférieure</b>	$y = 0.135x + 3.936$	$y = 0.248x - 3.805$
<b>Limite supérieure</b>	$y = 0.146x + 5.145$	$y = 0.274x - 1.017$

**Tableau 38.** Régression linéaire avec intervalle de confiance à 95% pour les photobioréacteurs R1 et R2

Ainsi, après tracé des droites de tendance, la productivité (pente) s'est élevée à 141 mg.j<sup>-1</sup> pour R1 et 261 mg.j<sup>-1</sup> pour R2 sur la totalité de l'exploitation. Les intervalles de confiance ont confirmé que les pentes sont significativement différentes et que les données ne se recoupent pas. La culture R2 a atteint une productivité globale de biomasse plus élevée que R1 : la pente de R2 a été 85% plus élevée que la pente de R1. De manière globale, sans considérer l'impact du CO<sub>2</sub>, les deux cultures présentent donc des productivités différentes, peut-être en raison de la double enveloppe présente sur un des deux réacteurs qui entraîne un accès à la lumière différencié ou une augmentation de la température au sein du réacteur (voir discussion ci-après).

Sur la base du fait que la culture de microalgues est limitée par le carbone minéral, des études se sont concentrées sur l'apport en carbone minéral dissous via injection de CO<sub>2</sub> dans la culture. Concernant les effets sur la productivité de biomasse, il a été conclu que le dioxyde de carbone favorisait la productivité du consortium cultivé en eaux usées (Mehrabadi et al., 2017; Sutherland et al., 2015b; Uggetti et al., 2018). Dans notre cas, afin d'évaluer l'impact d'ajout de CO<sub>2</sub> sur la productivité, les pentes de productivité des deux réacteurs ont été évaluées sur les périodes avec ou sans injection (**Tableau 39**). Dans R1 (simple enveloppe), l'ajout de dioxyde de carbone n'a pas semblé avoir d'influence sur la productivité de biomasse : en effet, les intervalles de confiance des droites avant/après CO<sub>2</sub> se recoupent, confirmant l'absence d'impact significatif. En revanche dans R2 (avec double-enveloppe), un effet significatif sur la productivité a été observé avant et après l'ajout de CO<sub>2</sub> : les régressions linéaires avant et après la mise en place du CO<sub>2</sub> ont donné des intervalles de confiance qui ne se recoupent pas. Ainsi, les conclusions sur l'impact du CO<sub>2</sub> ont divergé entre les deux photobioréacteurs séquentiels étudiés : il y a semblé avoir un impact significatif dans R2 et un impact non significatif dans R1. Il faut tout de même rappeler que R1 a été 90 jours sous CO<sub>2</sub> et R2 a été 50 jours sous CO<sub>2</sub>, ce qui peut avoir impacté la significativité de ces données.

Droite de tendance	Avant CO <sub>2</sub>	Après CO <sub>2</sub>
<b>R1</b>	$y_{\text{inf}} = 0.118x + 3.498$ $y = 0.139x + 4.647$ $y_{\text{sup}} = 0.16x + 5.795$	$y_{\text{inf}} = 0.131x + 2.022$ $y = 0.145x + 3.893$ $y_{\text{sup}} = 0.159x + 5.764$
<b>R2</b>	$y_{\text{inf}} = 0.206x - 1.378$ $y = 0.223x - 0.017$ $y_{\text{sup}} = 0.239x + 1.343$	$y_{\text{inf}} = 0.306x - 25.84$ $y = 0.363x - 17.072$ $y_{\text{sup}} = 0.419x - 8.304$

**Tableau 39.** Régression linéaire pour R1 et R2 avant et après injection de CO<sub>2</sub>

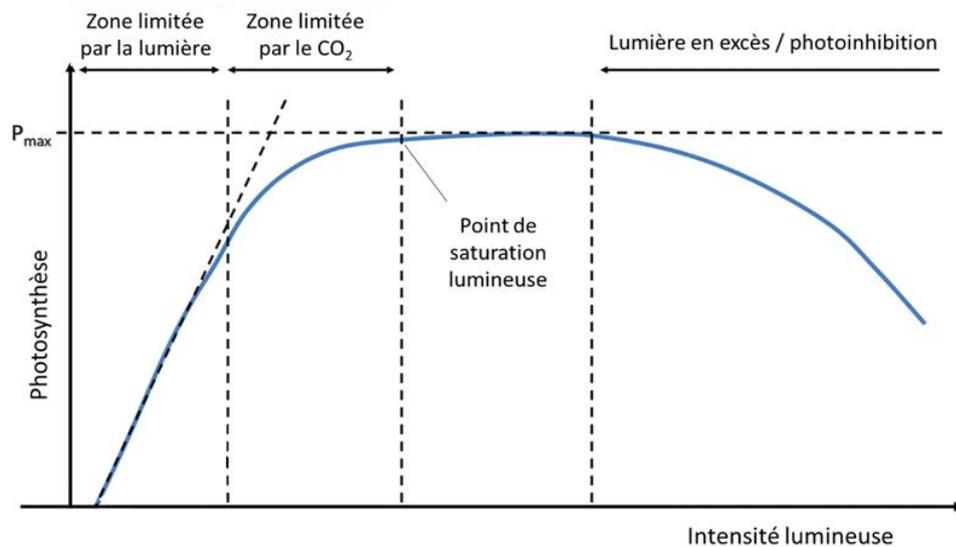
Pour cette partie de l'étude, la démarche initiale consistait à avoir un photobioréacteur témoin sans CO<sub>2</sub> (R2) et un photobioréacteur où du CO<sub>2</sub> était ajouté (R1) pour comparer les résultats et statuer sur une éventuelle influence. Toutefois, le suivi hebdomadaire de la production de biomasse suggérait que le comportement de R2 changeait à partir de J+100, sans même avoir ajouté du CO<sub>2</sub>. Ainsi, le parti pris a été d'injecter du dioxyde de carbone dans R2 car, l'expérience indiquait que le protocole n'était pas répétable. L'évaluation de l'impact du CO<sub>2</sub> s'est donc faite en comparant les données avant/après ajout du CO<sub>2</sub> sur les deux réacteurs. En effet, les deux photobioréacteurs ne sont alors pas comparables entre eux et doivent être traités comme deux systèmes distincts, même s'ils ont fonctionné avec des conditions opératoires supposément identiques.

Il a été difficile de statuer sur le caractère limitant ou non du carbone minéral et une combinaison ou non avec un second facteur. La divergence dans le comportement des cultures peut s'expliquer par différentes hypothèses :

- Le carbone minéral n'a pas été le seul facteur limitant à la croissance du consortium. Dans R1, la productivité inchangée après l'addition de CO<sub>2</sub> a suggéré que le carbone minéral n'a pas été un nutriment limitant et qu'un autre facteur a été limitant. Dans R2,

l'impact significatif a semblé indiquer que le carbone minéral a été un facteur limitant pour le développement des microalgues et bactéries.

- La double enveloppe de R2 a pu avoir un impact sur un paramètre environnemental et améliorer la productivité de biomasse. Le premier facteur supposé a été la température, si la double enveloppe a eu un effet isolant thermiquement. Pour vérifier cette hypothèse, les températures moyennes dans les deux cultures ont été vérifiées. Le mois de mars a été sélectionné comme référence car, cela a été la période avec le moins de dysfonctionnements et donc, le plus de données de température. Sur la première semaine de mars, la température moyenne dans R1 a été  $23.7 \pm 1.4^\circ\text{C}$  et dans R2 a été  $23.7 \pm 1.2^\circ\text{C}$ . La température mensuelle s'est élevée à  $23.8 \pm 1.2^\circ\text{C}$  dans R1 et  $23.1 \pm 2.9^\circ\text{C}$  dans R2. Globalement, les températures moyennes dans les photobioréacteurs ont été identiques. La température comme facteur explicatif a ainsi pu être écartée.
- L'accès à la lumière a pu être modifié par la double enveloppe de R2. En effet, les propriétés optiques (réfraction, absorption, réflexion) des parois sont des facteurs importants dans la conception des photobioréacteurs (Johnson et al., 2018; Laifa et al., 2021).



**Figure 80.** Cinétique de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse (adapté de Benedetti et al., 2018)

Ainsi, dans R1, il est possible que le système ait été dans la « zone limitée par la lumière » ou en « photoinhibition » (**Figure 80**). Les microalgues ont été limitées par la lumière, et la cinétique de la photosynthèse a stagné. Ou alors, les microalgues ont été saturées, et la cinétique de photosynthèse a atteint le plateau  $P_{max}$ . Une intensité lumineuse élevée dégrade les protéines actrices de la photosynthèse, et ralentit la cinétique photosynthétique. L'inhibition à cause de la lumière peut impacter la productivité des cellules qui sont endommagées et ont besoin de temps pour se rétablir (Béchet et al., 2013). Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence constatée d'effet du CO<sub>2</sub> sur la productivité de biomasse. Dans l'autre cas, R2 se serait trouvé dans la « zone limitée par le CO<sub>2</sub> » en raison de la double enveloppe. Quand le CO<sub>2</sub> a été injecté, le consortium microalgues-bactéries en a bénéficié car, il était limité par la lumière et le

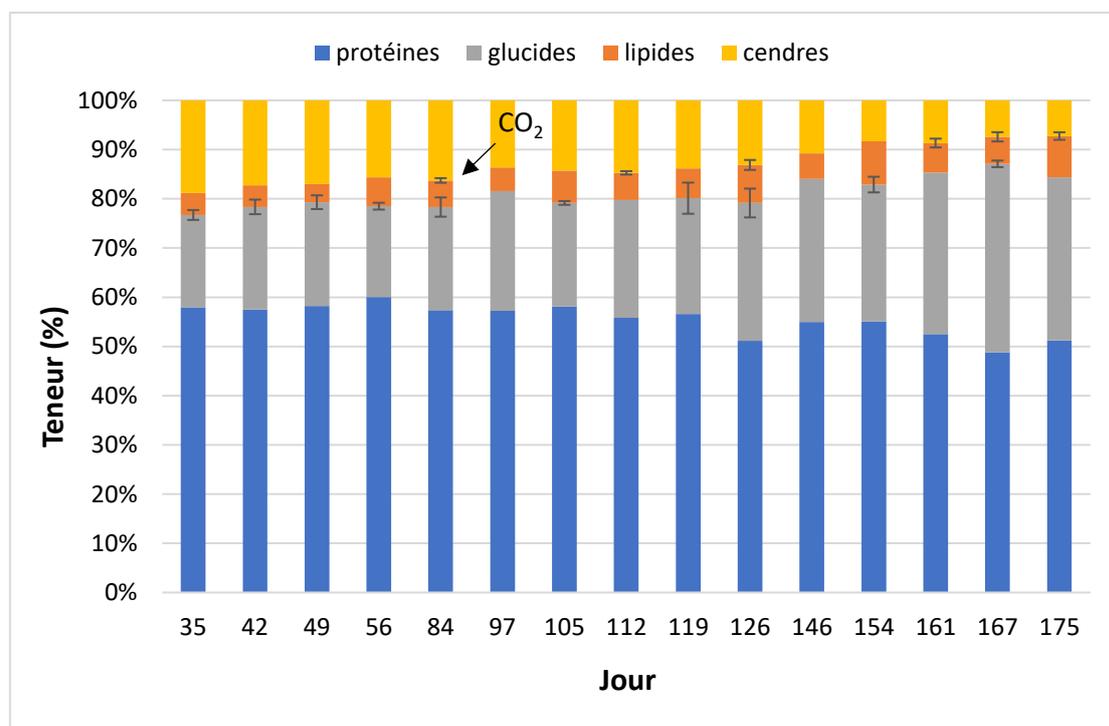
carbone minéral. Cependant, il n'a pas été possible de confirmer cette hypothèse, en l'absence de système de mesure de l'intensité lumineuse à l'intérieur des réacteurs.

- En raison des différences entre les deux réacteurs (double enveloppe) et d'un potentiel impact lors de l'inoculation de la biomasse, il est aussi possible que les consortia de microorganismes étaient différents entre les deux systèmes : les populations n'auraient alors pas la même productivité intrinsèque et la même sensibilité à l'injection du CO<sub>2</sub>. Cette hypothèse a été confortée par des différences visuelles constatées lors de l'exploitation (couleur de la suspension, différences de décantabilité).

### III.2.4. Composition de la biomasse

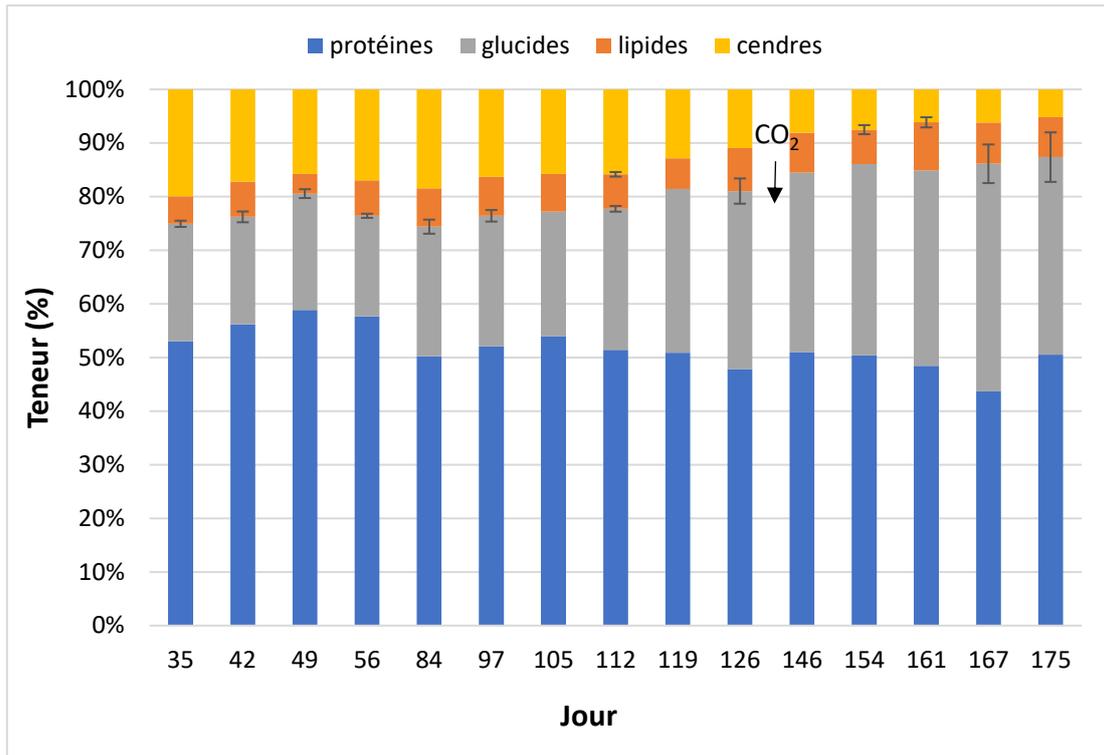
L'impact de l'ajout de CO<sub>2</sub> sur la composition biochimique a été évalué par des analyses régulières des teneurs en lipides, protéines, glucides et cendres selon les protocoles décrits dans la section III.1. (Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse).

La biomasse a commencé à être prélevée à partir de J35 quand la concentration de la culture a atteint 1g.L<sup>-1</sup>. 16 échantillons de biomasse ont été prélevés dans chaque photobioréacteur. Les pourcentages de chaque composé ont été regroupés pour obtenir la composition globale de chaque biomasse sur le long terme (**Figure 81** et **Figure 82**). Les analyses n'ont pas été systématiquement réalisées en triplicat, car les quantités de biomasse ont été insuffisantes dans certains cas. L'azote de Kjeldahl a été mesuré une fois par échantillon, car la méthode s'est révélée répétable sur les échantillons commerciaux de Chlorelle et de Spiruline avec des écarts-types relatifs inférieurs à 5%. L'analyse des glucides a été faite en triplicat sur une majorité d'échantillons. Enfin, les lipides ont été quantifiés en triplicat sur quelques échantillons. Les écarts-types existants ont été mis en évidence.



**Figure 81.** Composition de la biomasse dans le photobioréacteur R1

### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>



**Figure 82.** Composition de la biomasse dans le photobioréacteur R2

Dans R1, la teneur en protéines a varié entre 39 et 52.5%, celle en glucides entre 16.2 et 32.6%, celle en lipides entre 3.1 et 8.8% et celle en cendres entre 6 et 16.5% (**Figure 81**). Dans le photobioréacteur R2, la teneur en protéines a varié entre 35.9 et 51.5%, celle en glucides entre 16.7 et 34.9%, celle en lipides entre 3.2 et 9.7% et celle en cendres entre 4.3 et 16.5% (**Figure 82**). Globalement, les biomasses ont été similaires avec une part élevée en protéines suivie des taux moins importants en glucides et en lipides. Dans la littérature, les compositions rapportées sont variables, car elles dépendent des microorganismes présents, des paramètres en place lors de l'étude et des méthodes d'analyse.

Les quantités moyennes en protéines, en lipides et en glucides avant et après l'injection du dioxyde de carbone ont été calculées (**Tableau 40**). Dans la colonne « Variation (%) », le taux avant l'ajout de CO<sub>2</sub> a été pris comme référence (soit 100%) pour illustrer la baisse ou la hausse d'un composant.

	Protéines (mg.g <sup>-1</sup> MES)			Glucides (mg.g <sup>-1</sup> MES)			Lipides (mg.g <sup>-1</sup> MES)		
	Sans CO <sub>2</sub>	Avec CO <sub>2</sub>	Variation (%)	Sans CO <sub>2</sub>	Avec CO <sub>2</sub>	Variation (%)	Sans CO <sub>2</sub>	Avec CO <sub>2</sub>	Variation (%)
<b>R1</b>	50.2 ± 2.2	45.3 ± 4.5	-9.8	17.2 ± 1.1	20.2 ± 1.3	+16.8	4.1 ± 0.9	4.8 ± 1.5	+17.1
<b>R2</b>	41.8 ± 2.7	41.2 ± 3.1	-1.4	20.8 ± 3.3	30.7 ± 2.8	+47.6	5.4 ± 0.4	6.5 ± 0.8	+20.4

**Tableau 40.** Composition moyenne de la biomasse avant-après injection de CO<sub>2</sub> dans R1 et R2

Dans la Partie I, l'état de l'art a conclu que l'ajout de CO<sub>2</sub> améliorerait la productivité de la biomasse et s'accompagnait ou non d'un changement de composition. Dans cette étude, des

tendances similaires ont été observées avec une augmentation des lipides et des glucides et une réduction/stagnation des protéines suite à l'ajout du CO<sub>2</sub>. La hausse marquée des lipides et des glucides s'explique simplement car, le carbone est leur principal composant. D'un autre côté, les teneurs en protéines relativement inchangées avant et après l'injection en dioxyde de carbone se justifient par leur structure également fortement dépendante de l'azote (Amorim et al., 2021). Ainsi, un apport en carbone inorganique a plus d'effet sur des molécules carbonées comme les lipides ou les glucides que sur les protéines. Les métabolismes des protéines, des glucides et des lipides dans les microalgues ne sont pas encore entièrement compris et requièrent plus d'investigations.

Les variations de la composition ont été plus importantes dans R2 que dans R1. Ces données apparaissent confirmées les conclusions de la partie précédente avec une influence notable du CO<sub>2</sub> dans le photobioréacteur R2 comparé à R1. Pour rappel, R1 a une simple enveloppe et R2 une double enveloppe. Dans la culture R2, l'influence du dioxyde de carbone a été plus visible (+47% de glucides) (**Tableau 40**). Il a été supposé que le carbone minéral a été un nutriment limitant pour le consortium. Dans la section précédente, cette idée a été confortée par la hausse de la productivité du consortium avant-après ajout de CO<sub>2</sub> (**Tableau 39**). Combinée à l'amélioration de la productivité, la synthèse des lipides et plus spécifiquement celle des glucides semblent avoir été favorisées. La « favorisation » des glucides s'explique car, ce sont les principaux produits du mécanisme photosynthétique (de Carvalho Silvello et al., 2022). Ainsi, si plus de carbone inorganique a été fourni, plus de glucides ont pu être synthétisés lors de la photosynthèse.

#### III.2.5. Conclusions

Dans cette partie, l'impact de l'ajout de CO<sub>2</sub> sur la culture d'un consortium microalgues/bactérie a été étudié au sein de deux photobioréacteurs séquentiels.

Les deux systèmes ont abouti à des performances épuratoires de la DCO très satisfaisantes. Les concentrations et les rendements épuratoires ont respecté les normes imposées (**Tableau 4**). Les abattements ont été du même ordre de grandeur : l'un comme l'autre, les deux photobioréacteurs ont été aussi efficaces pour éliminer la Demande Chimique en Oxygène. Par ailleurs, le dioxyde de carbone n'a pas semblé avoir d'impact sur l'épuration de la DCO. Le traitement de l'azote a surtout été lié à la nitrification bactérienne, supportée par l'oxygène fourni par la photosynthèse. Une dénitrification a également eu lieu, lors des périodes nocturnes suivant le démarrage du cycle d'alimentation en affluent. L'ajout du CO<sub>2</sub> n'a pas eu un impact significatif sur ces mécanismes.

Les variations du pH et de l'oxygène dissous au cours des cycles ont été impactées par l'injection de CO<sub>2</sub>. En effet, le pH a été régulé autour de 7.5 et a varié avec moins d'amplitude. Les variations de l'oxygène dissous sont également moindres après l'ajout de CO<sub>2</sub>, avec notamment des diminutions quasiment absentes durant les périodes obscures. On peut donc supposer un accroissement de la population de microalgues et/ou une diminution de la proportion de bactéries dans le système.

### III.2. Photobioréacteurs séquentiels avec injection de CO<sub>2</sub>

Malgré des conditions opératoires similaires, la productivité des deux réacteurs était différente, même avant l'injection du CO<sub>2</sub>. Pour des raisons matérielles, l'un des deux était muni d'une double-enveloppe qui a pu modifier l'accès à la lumière des microalgues. Pour l'un des deux, il est apparu que le CO<sub>2</sub> semblait le facteur limitant devant la lumière, pas sur l'autre. Ainsi, l'ajout de CO<sub>2</sub> n'a pas eu le même impact en termes de productivité et de composition de la biomasse. Globalement, celle-ci est apparue plus riche en glucides et dans une moindre mesure en lipides, à la suite de l'ajout de CO<sub>2</sub>.

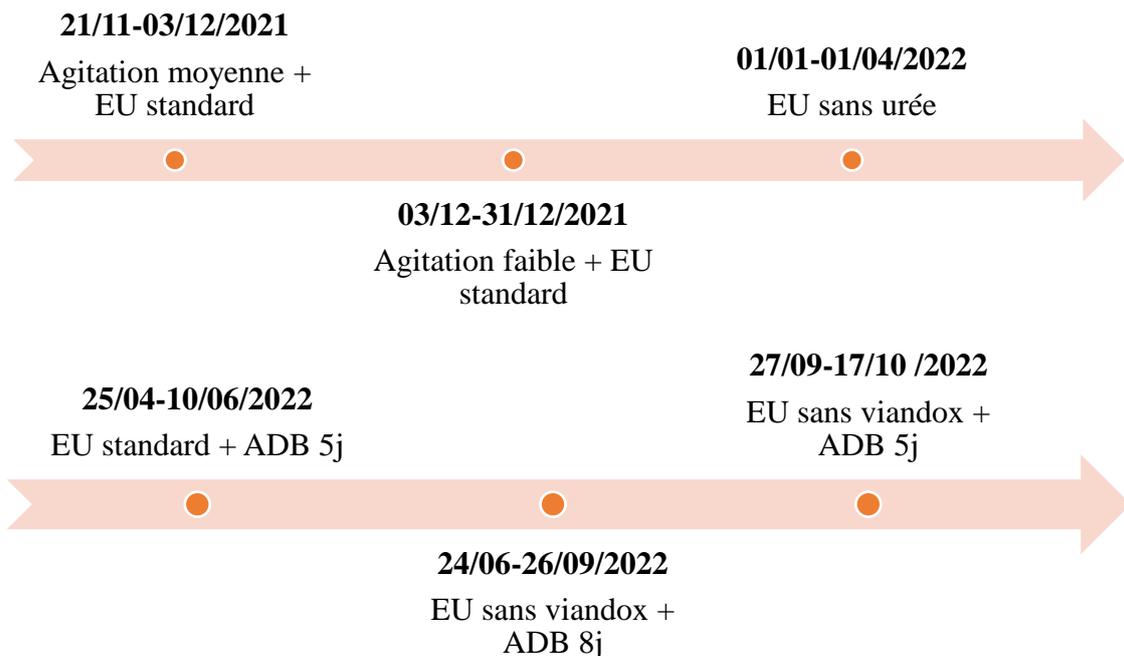
Si le fonctionnement en mode séquentiel peut présenter un intérêt en termes de traitement des eaux usées, celui-ci demeure contraignant et pose la question d'une application à échelle industrielle. Pour la suite de cette thèse, les expérimentations ont été réalisées au sein d'un chenal à haut rendement algal (CHRA), qui constitue le système le plus courant pour la culture de microalgues/bactéries en traitement des eaux usées.

### III.3. Chenal à haut rendement algal (CHRA)

À la suite des essais réalisés en photobioréacteurs séquentiels, il a été décidé d'étudier le système en mode continu. Ainsi, un chenal à haut rendement algal (CHRA) à l'échelle pilote a été exploité dans différentes conditions. L'ensemble des modalités testées est récapitulé dans la **Figure 83** et détaillé dans le **Tableau 20** (voir II.1.4.3. Modalités). Chaque condition opératoire avec son objectif vis-à-vis du système sont explicités. Les résultats sont discutés selon :

- les performances de traitement des eaux usées ;
- la productivité de la biomasse et sa composition biochimique (protéines, glucides, lipides) ;
- la dynamique du consortium microalgues-bactéries par la mesure d'oxygène dissous et du pH.

En complément, un modèle simplifié a été conceptualisé pour dériver les paramètres caractérisant l'activité microbienne (photosynthèse, respiration endogène, oxydation bactérienne) via l'analyse des données d'oxygène dissous (respirométrie *in-situ*). Pour conclure, l'influence potentielle des paramètres est exposée.



**Figure 83.** Chronologie des modalités testées dans le CHRA (ADB = âge de boues)

Tout d'abord, les conditions opératoires avec un ADB variable et une concentration en biomasse fixée à  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  ont été présentées (21/11/2021-01/04/2022). Pour minimiser la dépense énergétique générée par la roue à aubes, deux vitesses de rotation ont été étudiées. Puis, pour répliquer la variabilité des eaux usées réelles, la recette des eaux usées synthétiques a été modifiée en retirant l'urée de la composition, et le CHRA a été alimenté avec ces EU.

Par la suite, une pompe d'extraction de la biomasse a été installée le 20 avril 2022 pour contrôler l'ADB (égal au TSH), ce qui a rendu variable la concentration en biomasse. L'extrait de viande

(Viandox) et une partie de la peptone ont été enlevés des eaux usées synthétiques pour varier la charge en matière organique.

En fonction de la configuration du CHRA au regard de la gestion de l'ADB, la présentation de ces études est séparée dans les deux sous-parties suivantes :

- la première partie avec l'ADB variable et la concentration en biomasse fixée à  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$
- la seconde partie avec l'ADB égal au TSH et la concentration en biomasse qui varie

### III.3.1. Fonctionnement à concentration en biomasse fixe

#### III.3.1.1. Influence de la vitesse d'agitation

L'agitation d'un CHRA est un paramètre fondamental pour promouvoir des conditions favorables au consortium microbien : minimisation des phénomènes de sédimentation, des zones mortes, accès récurrent des cellules algales à la lumière, etc. Plusieurs études ont investigué ces aspects, notamment à travers des simulations numériques mais, en revanche, assez peu d'un point de vue expérimental (Bernard et al., 2021; Hadiyanto et al., 2013; Prussi et al., 2014). Cependant, une diminution de la vitesse de rotation de la roue à aube permet de significativement minimiser la dépense énergétique du chenal liée au mélange de la culture. Ainsi, deux vitesses de mélange ont été testées au cours de cette étude. Conformément à une précédente étude menée sur le même pilote expérimental (Pham et al., 2018), deux tensions sur le moteur connecté à la roue à aubes ont été fixées : 3.5V pour  $0.2 \pm 0.0 \text{ A}$  et 7V pour  $0.3 \pm 0.1 \text{ A}$ . En moyenne, les vitesses de rotation de la roue correspondantes ont été :  $5.6 \pm 0.4 \text{ tr.min}^{-1}$  et  $11.6 \pm 0.9 \text{ tr.min}^{-1}$ . Ces vitesses sont respectivement nommées : « Vitesse basse » et « Vitesse haute ». La consommation électrique du moteur relative à chaque vitesse d'agitation a été calculée (**Tableau 41**) :

$$\begin{aligned} \text{Consommation (kWh)} &= \text{Puissance (W)} * \text{Temps (h)} \\ &= \text{Tension (V)} * \text{Intensité (A)} * \text{Temps (h)} * 0.001 \end{aligned}$$

#### Équation 40

Vitesse	Rotation (tr.min <sup>-1</sup> )	Tension (V)	Intensité (A)	Puissance (W)	Volume d'eau traitée (m <sup>3</sup> )	Consommation énergétique annuelle (kWh.m <sup>-3</sup> d'eau traitée)
Vitesse basse	$5.6 \pm 0.4$	3.5	$0.2 \pm 0.0$	0.7	5.84	1.04
Vitesse haute	$11.6 \pm 0.9$	7	$0.3 \pm 0.1$	2.1	5.84	3.15

**Tableau 41.** Caractéristiques électriques pour deux vitesses d'agitation

La dépense énergétique a été multipliée par 3 entre vitesse basse et vitesse haute. Cependant, il convient de considérer la petite échelle du pilote expérimental utilisé et le fait que la taille de la roue à aubes utilisée est relativement surdimensionnée : ce ratio ne peut pas être transposé à un chenal taille réelle dans une STEU. Ce coefficient donne tout de même une tendance si le CHRA est amené à être dimensionné à taille industrielle. Outre le coût énergétique, la vitesse de mélange impacte les floccs de microalgues-bactéries avec les contraintes de cisaillement, et le

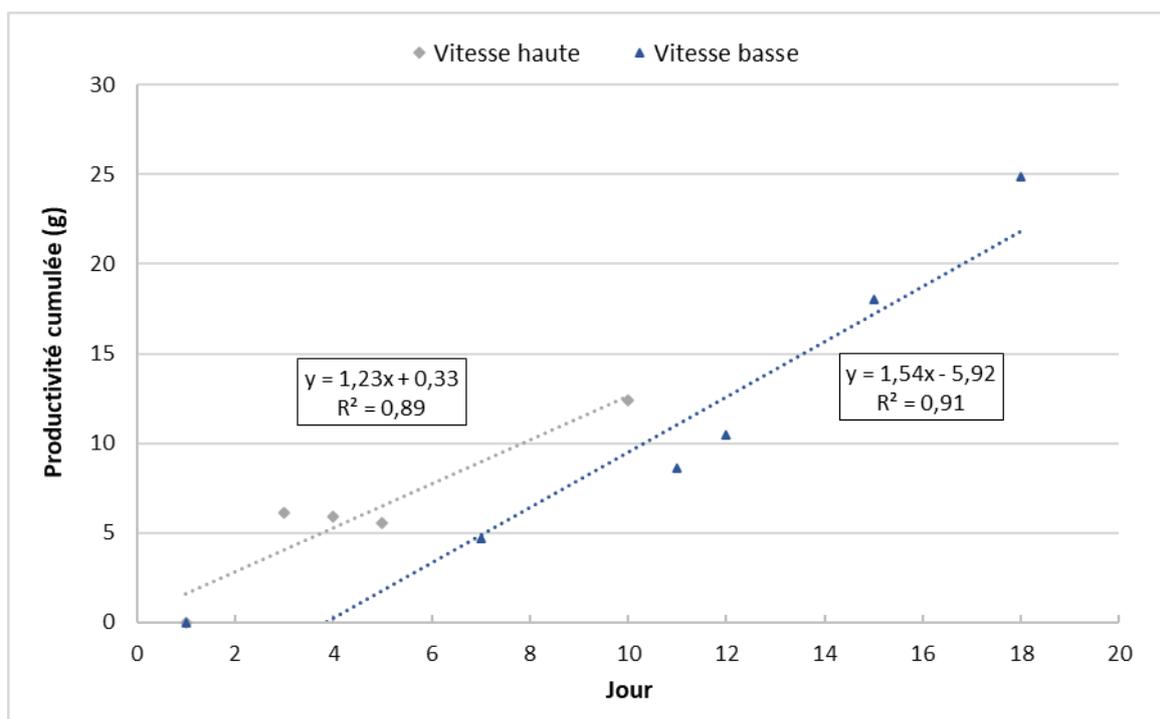
transfert gaz-liquide. (Pham et al., 2018) ont conclu, sur des considérations hydrodynamiques uniquement, que la vitesse de mélange optimale dans le pilote expérimental est de  $11.6 \text{ tr.min}^{-1}$ . Aussi, le coefficient de transfert gaz-liquide  $K_{La,O_2}$  a une corrélation positive avec la vitesse de rotation de la roue. Une vitesse de mélange plus élevée permet un meilleur mélange et maximise les phénomènes de transfert (dégazage, absorption) (Pham et al., 2018). Toutefois, la vitesse haute peut aussi causer des contraintes de cisaillement excessives qui endommagent les microorganismes (Sutherland et al., 2015b).

Par ailleurs, en parallèle d'une optimisation énergétique du système, une hypothèse a été considérée : la réduction de l'apport d'oxygène par transfert « mécanique » via la roue à aubes pourrait favoriser la respiration photosynthétique pour oxygéner le milieu. Pour l'étude de cette modalité, deux questions sont donc posées :

- Peut-on réduire la dépense énergétique en baissant la vitesse de rotation de la roue à aubes et en conservant de bonnes performances de traitement ?
- Dans quelle mesure la roue à aubes contribue à l'oxygénation du milieu par rapport à l'apport lié à la photosynthèse ?

#### III.3.1.1.1. Productivité et composition de la biomasse

Les modes de calcul de la productivité et de la productivité cumulée ont été décrites dans la section II.2.1.2. Productivité et productivité cumulée. Les modalités « Vitesse haute » et « Vitesse basse » ont été étudiées dans la configuration où la biomasse a été extraite manuellement pour maintenir une concentration dans la culture à  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ . Les régressions linéaires incluant les intervalles de confiances à 95% sur la productivité cumulée (ordonnée) en fonction des jours (abscisse) (**Figure 84**) pendant les deux modalités sont récapitulées dans le **Tableau 42**.



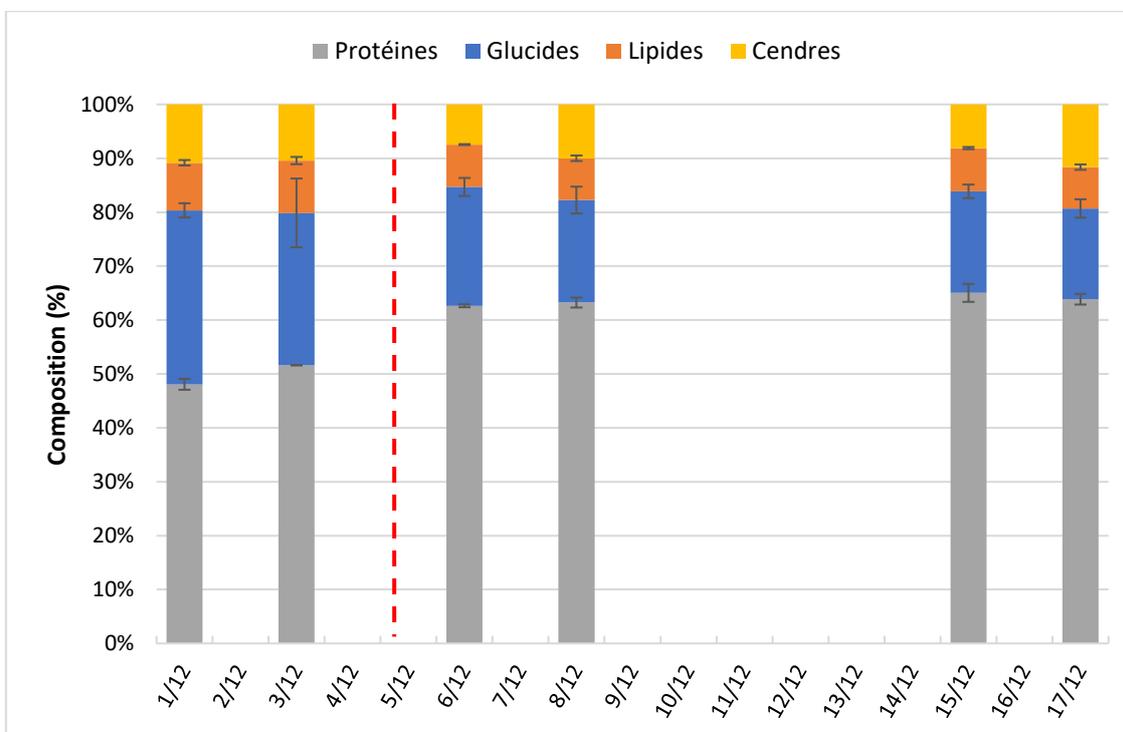
**Figure 84.** Evolution de la productivité cumulée à « Vitesse haute » et « Vitesse basse »

Modalité (n=nombre de données)	Équation (x=jours ; y=productivité cumulée en g)
Vitesse haute (n=5)	$y_{inf} = 0.51x + 34.4$ $y = (1.24 \pm 0.23)x + (38.41 \pm 1.26)$ $y_{sup} = 1.96x + 42.4$
Vitesse basse (n=8)	$y_{inf} = 1.02x - 11.9$ $y = (1.55 \pm 0.21)x - (5.89 \pm 2.33)$ $y_{sup} = 2.08x + 0.1$

**Tableau 42.** Productivité cumulée à vitesse haute et vitesse basse

La productivité cumulée de la biomasse paraît légèrement supérieure à vitesse basse ( $1.55 \text{ g}\cdot\text{j}^{-1}$ ), mais la différence n'est pas significative au regard des intervalles de confiance calculés, ainsi que du faible nombre de points expérimentaux. Ainsi, la fourniture accrue d'oxygène par voie mécanique à vitesse haute où les conditions de mélange plus douces à vitesse basse ne paraissent pas avoir influencé la croissance des bactéries ou aux microalgues, car la productivité cumulée globale n'a pas varié de manière significative.

La **Figure 85** retrace l'évolution de la composition biochimique globale de la biomasse (répartition en pourcentage entre protéines, glucides, lipides et cendres) à vitesse haute (avant trait rouge) et à vitesse basse (après trait rouge). Chaque analyse a été réalisée en triplicat sauf pour les cendres, d'où l'absence de barre d'erreur. Pendant la modalité « Vitesse haute », seulement deux échantillons ont pu être prélevés, car il n'y avait pas assez de biomasse dans le chenal.



**Figure 85.** Évolution de la composition globale de la biomasse à vitesse haute (avant trait) et vitesse basse (après trait)

## Partie III : Résultats et discussion

Globalement, à vitesse haute comme à vitesse basse, on observe une composition de la biomasse similaire en ordre de grandeur avec une grande part de protéines suivie par les glucides et les lipides. Cette composition est comparable à l'échantillon commercial de *Chlorella* utilisé précédemment pour valider les méthodes analytiques (voir III.1. . Adaptation de méthodes simplifiées pour caractériser la composition de la biomasse, **Tableau 34**).

Du point de vue de chaque composant (**Figure 85**), il a été observé que :

- La biomasse produite à vitesse basse (après le trait rouge) a affiché une part plus importante de protéines : 57.2%-59.3% contre 39.1%-40.9%. Les résultats ont été fiables avec des écarts-types inférieurs à 2%. Cela peut être le signe d'une plus grande assimilation de l'azote par le consortium microalgues-bactéries : cette hypothèse semble confirmée par une moindre teneur en nitrates  $\text{NO}_3\text{-N}$  mesurés en sortie pour la modalité « Vitesse basse »
- La proportion de lipides n'a pas varié avec la vitesse d'agitation, et s'est maintenue autour de 7%
- La part de glucides a baissé à vitesse basse, ce qui est cohérent avec l'augmentation des protéines. Les écarts-types ont été raisonnables pour toutes les mesures, sauf pour l'échantillon du 03/12/2021 en raison d'une erreur de manipulation.

### III.3.1.1.2. Traitement des eaux usées

Comme pour les photobioréacteurs séquentiels, le traitement des eaux usées a été évalué par mesure des paramètres classiques de pollution (la DCO, les formes de l'azote (NTK, ions  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) et les ions orthophosphates  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Les eaux usées synthétiques ont été préparées avec la recette standard (**Tableau 21**).

#### Matière organique (DCO)

Concernant la matière organique, le procédé a traité efficacement la DCO avec des rendements épuratoires à hauteur de  $84.6 \pm 2.8\%$  à vitesse haute, et  $88.5 \pm 2.2\%$  à vitesse basse. Les abattements de la DCO sont donc similaires avec des écarts-types faibles pour les deux vitesses d'agitation. Les concentrations en sortie ( $53.8 \pm 9.8 \text{ mg.L}^{-1}$  à vitesse haute et  $40.8 \pm 8.0 \text{ mg.L}^{-1}$  à vitesse faible) et les abattements sont compatibles avec la réglementation de  $125 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$  en sortie avec une réduction de 75% ("Arrêté du 21 juillet 2015," 2015). La vitesse d'agitation n'apparaît donc pas avoir d'impact sur l'élimination de la DCO, qui a néanmoins été traitée de manière satisfaisante.

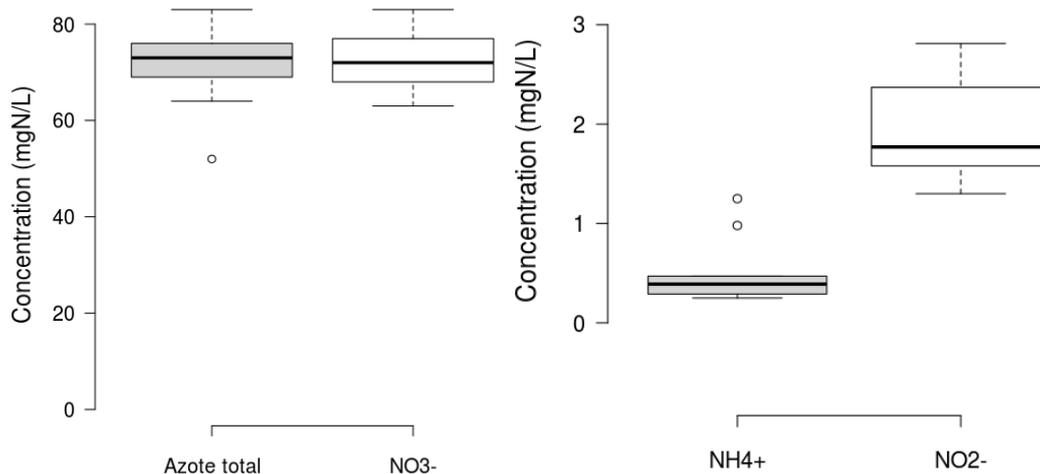
#### Phosphore

En revanche, à vitesse haute, les orthophosphates n'ont pas été éliminés de manière satisfaisantes, l'abattement est non-significatif avec un écart-type important. À vitesse basse, le traitement s'est amélioré avec  $35.4 \pm 14.5\%$  du phosphore éliminé. L'hypothèse d'une précipitation accrue sous forme de sels à vitesse basse a été écartée, car le pH n'a pas été beaucoup plus élevé à vitesse basse qu'à vitesse haute (voir Suivi du pH p.167). Toutefois, comme la productivité de biomasse a été plus élevée (+39.8%) à vitesse basse, on peut supposer que plus de phosphore a été assimilé par les microorganismes, ce qui a abouti à un meilleur abattement final.

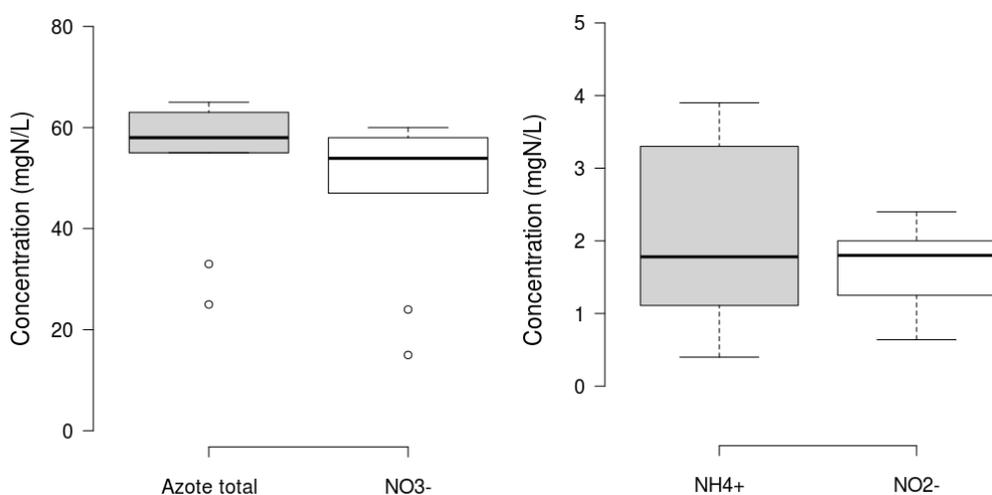
Ainsi, une vitesse d'agitation plus faible semble avoir permis une meilleure productivité, et une plus grande assimilation des composés phosphorés par le consortium microalgues-bactéries.

Azote

La **Figure 86** et la **Figure 87** illustrent la concentration en  $\text{mgN.L}^{-1}$  des espèces azotées en sortie du chenal à vitesse haute et vitesse basse, sachant qu'en entrée, les eaux usées synthétiques ont apporté  $80 \text{ mgN.L}^{-1}$ , sous formes d'azote organique et ammoniacal.



**Figure 86.** Concentrations des espèces azotées en sortie à vitesse haute (n=10)



**Figure 87.** Concentrations des espèces azotées en sortie à vitesse basse (n=9)

En sortie, la forme majoritaire de l'azote est constituée des nitrates pour les deux vitesses de rotation : 100% à vitesse haute et 88.7% à vitesse basse. Il n'y a pas d'accumulation de nitrites. La nitrification apparaît donc comme le principal mécanisme de conversion de l'azote au sein du chenal dans ces conditions. On peut aussi observer que l'abattement de l'azote total est plus important à vitesse basse (34% contre 11%) : ainsi, les concentrations de nitrates de sortie atteignent respectivement en moyenne  $47.2 \pm 16.3 \text{ mgN.L}^{-1}$  à vitesse basse contre  $72.5 \pm 6.5 \text{ mgN.L}^{-1}$  à vitesse haute.

Trois phénomènes peuvent expliquer l'augmentation de l'abattement de l'azote global :

## Partie III : Résultats et discussion

- La dénitrification : cette transformation des nitrates en diazote gazeux nécessite des conditions anoxiques dans le milieu. Même si la concentration en O<sub>2</sub> dissous a diminué suite à la diminution de la vitesse d'agitation, elle n'est pas nulle. Ce phénomène apparaît donc comme limité, sauf dans l'hypothèse d'une hétérogénéité de concentration dans le chenal où à l'échelle des floes ;
- La volatilisation de l'azote ammoniacal avant la nitrification : le pKa du couple NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> étant à 9.25, un pH basique serait nécessaire pour un dégagement d'azote sous forme d'ammoniac. Or, le pH était toujours proche de la neutralité donc ce phénomène est négligeable.
- L'assimilation par la biomasse : dans le paragraphe précédent, il a été observé que la production de biomasse était légèrement plus élevée à vitesse basse. La teneur en protéines a également été plus importante, et leur principal composant est l'azote. Cette plus grande assimilation apparaîtrait donc comme un des facteurs expliquant la hausse de l'abattement. Cette conclusion est à nuancer du fait du faible écart statistique entre les deux productivités (**Tableau 42**).

### III.3.1.1.3. Activité biologique du consortium microalgues-bactéries

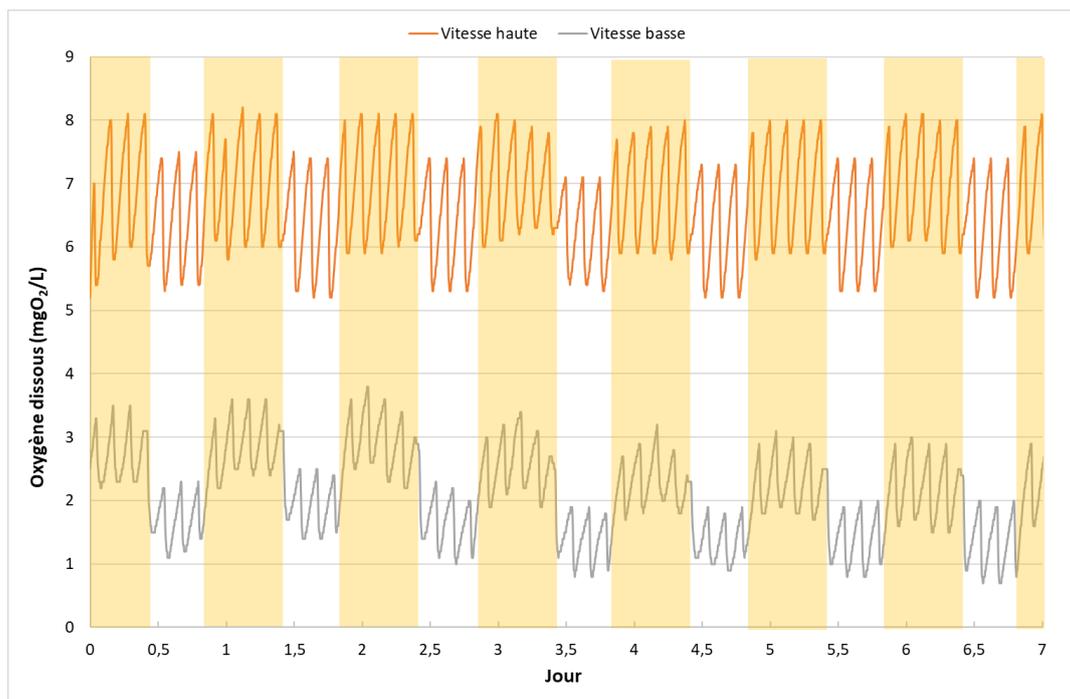
Le pH et l'oxygène dissous constituent de bons indicateurs de l'état du consortium microalgues-bactéries. Ces mesures réalisées en continu dans le chenal sont ici décrites et interprétées.

#### Suivi de l'oxygène dissous

La **Figure 88** présente l'évolution de l'oxygène dissous à vitesse haute et vitesse basse sur une semaine représentative du fonctionnement. Les phases de jour et de nuit sont mises en évidence.

Quelle que soit la modalité, on retrouve les tendances suivantes :

- Augmentation de la concentration en O<sub>2</sub> dissous le jour suite à la photosynthèse ;
- Cycles d'augmentation/diminution toutes les 3h suite aux injections d'eau usée synthétique.



**Figure 88.** Évolution de l'oxygène dissous dans le CHRA à vitesse haute et vitesse basse

A vitesse haute, les valeurs importantes d'oxygène dissous, même au milieu de la nuit ( $>5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ont confirmé qu'une grande partie de l'apport se fait par transfert gaz-liquide et non par la photosynthèse des microalgues. Pour réduire la dépense en énergie, la vitesse de rotation de la roue à aubes a donc été abaissée. Comme attendu, les valeurs d'oxygène ont diminué. En effet, l'oxygène dissous moyen a été de  $6.7 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$  à vitesse haute, et de  $2.1 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$  à vitesse basse. Ainsi, la vitesse d'agitation joue un rôle essentiel dans l'oxygénation du chenal en parallèle des microalgues.

L'effet de la photosynthèse est néanmoins bien mis en évidence : les valeurs d'oxygène dissous ont été plus élevées pendant la phase de jour que pendant la phase de nuit. À vitesse basse, elles ont oscillé entre 1 et  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  la nuit et entre 1.5 et  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  le jour. À vitesse haute, les données ont oscillé entre 5.3 et  $7.5 \text{ mg.L}^{-1}$  la nuit et 6 et  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  le jour.

Toutes les 3h, chaque baisse d'oxygène indique une alimentation en eaux usées synthétiques programmée à cet intervalle. À chaque nouvel apport de substrat, les phénomènes d'oxydation bactérienne (dégradation de la matière organique nitrification) entraînent une chute de l'oxygène dissous. Sur une journée, les pentes moyennes de décroissance de l'oxygène dissous après alimentation en eaux usées synthétiques ont été calculées :  $-89.6 \pm 12.4 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  à vitesse haute et  $-59.4 \pm 6.2 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  à vitesse basse. Cela laisse supposer une activité bactérienne plus intense dans les conditions de vitesse haute d'agitation. Cependant, il est difficile de discriminer à cette échelle les différents phénomènes en interaction (transfert gaz-liquide, oxydation bactérienne, photosynthèse). La modélisation des phénomènes en jeu peut permettre d'aboutir à une meilleure compréhension.

Modélisation du système à partir des données d'oxygène dissous

Pour aller plus loin dans l'interprétation des données d'oxygène dissous, l'activité biologique des populations de microorganismes peut être décomposée selon le modèle simplifié présenté dans la section « Matériel et méthodes » (II.2.3.1. Modélisation). Les termes du modèle à caler sont :

- $\mu_{B,max}X$  : activité (croissance) de la flore bactérienne ( $mg.L^{-1}.h^{-1}$ )
- $OPR_{max}$  : production maximale d'oxygène par la photosynthèse ( $mg O_2.L^{-1}.h^{-1}$ )
- $OUR_{endo}$  : consommation d'oxygène liée à la respiration endogène de la biomasse ( $mg O_2.L^{-1}.h^{-1}$ )

Pour les deux modalités, le calage a été réalisé sur des périodes de 4 et 5 jours où les données mesurées sont stables. À vitesse haute, le coefficient de transfert  $K_{LaO_2}$  mesuré est égal à  $27,4 j^{-1}$ . À vitesse basse,  $K_{LaO_2}$  est égal à  $12,2 j^{-1}$ . Les conditions initiales ont été récapitulées dans le **Tableau 43**.

Paramètre	Notation et unité	Valeurs
Concentration initiale en substrat dans le chenal	S (mgDCO/L)	5
Concentration en substrat dans l'affluent	So (mgDCO/L)	380
Concentration initiale en azote total dans le chenal	Nt (mgN/L)	27.5
Concentration en azote total dans l'affluent	Nto (mgN/L)	60

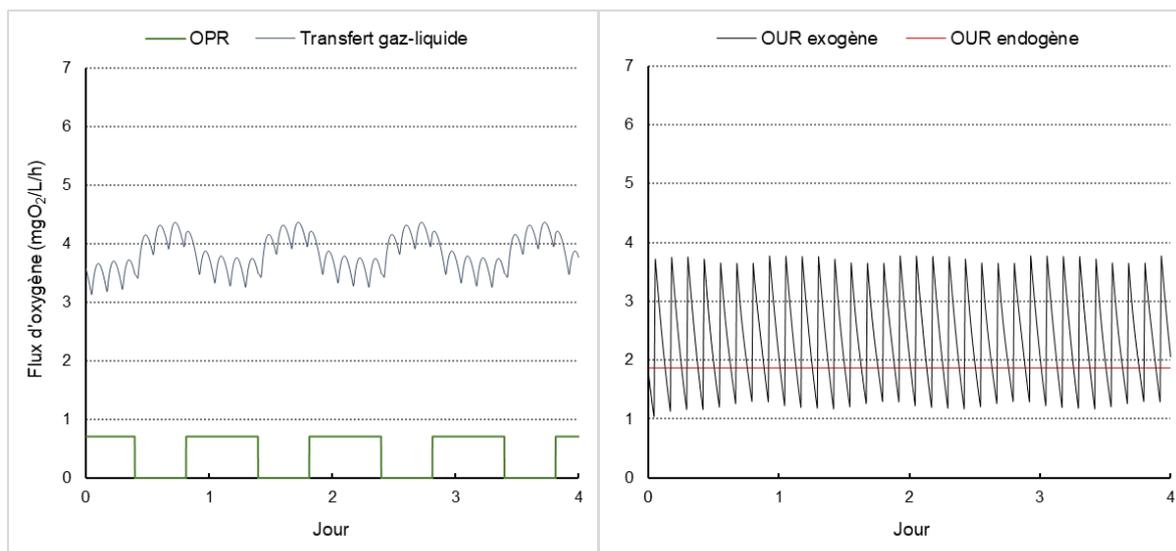
**Tableau 43.** Récapitulatif des paramètres du modèle pour chaque modalité

Les valeurs moyennes des paramètres calés sont répertoriées dans le **Tableau 44**.

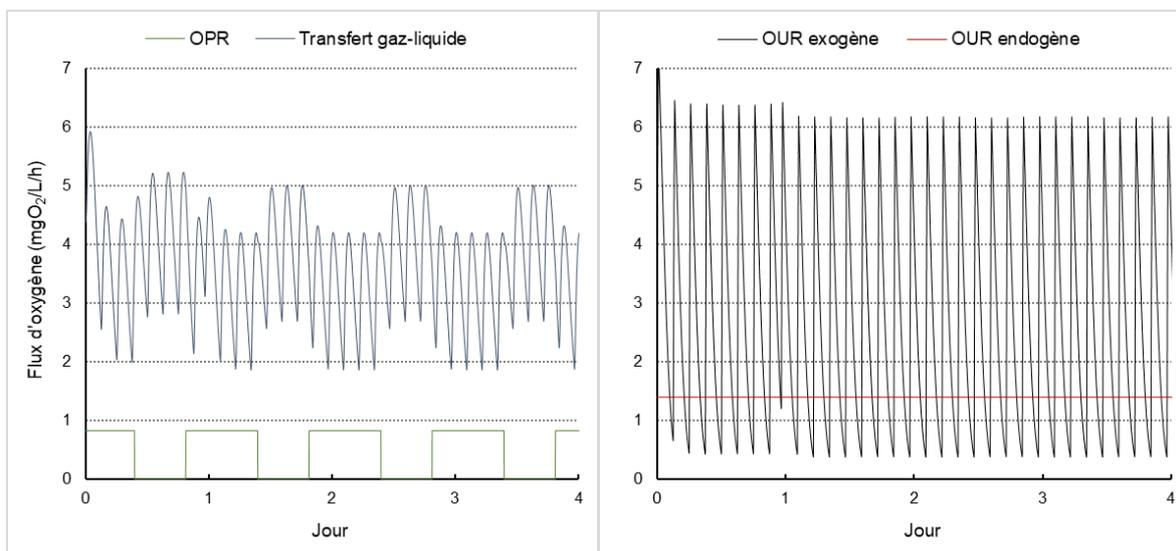
	$\mu_{B,max}X$ ( $mg.L^{-1}.h^{-1}$ )	$OPR_{max}$ ( $mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$ )	$OUR_{endo}$ ( $mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$ )
<b>Vitesse haute</b>	11.50±0.03	0.83±0.00	1.40±0.00
<b>Vitesse basse</b>	6.44±0.00	0.72±0.00	1.93±0.00

**Tableau 44.** Calage des paramètres à « Vitesse haute » et « Vitesse basse »

Les **Figure 89** et **Figure 90** décrivent à partir de ces paramètres calés l'évolution des différents termes contribuant à la dynamique de l'oxygène dissous (OUR exogène et endogène, OPR et le transfert gaz-liquide) pendant les modalités « Vitesse basse » et « Vitesse haute ». Les termes de production/transfert et de consommation d'oxygène ont été séparés en deux graphiques pour plus de clarté.



**Figure 89.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) à « Vitesse basse »



**Figure 90.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) à « Vitesse haute »

Les courbes fournies grâce au modèle permettent d'identifier séparément les phénomènes d'apport, de transfert et de consommation d'oxygène dans le CHRA. Le transfert gaz-liquide d'oxygène lié à l'agitation a été plus prononcé à vitesse haute qu'à vitesse basse. À vitesse basse, il a varié entre 3.2 et 4.5 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et à vitesse haute, il a varié entre 5.5 et 12 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Il a d'ailleurs été le mécanisme prédominant d'apport en oxygène, à vitesse haute comme à vitesse basse. Le modèle permet à cet égard de bien représenter l'effet du changement de la vitesse de rotation de la roue à aubes.

Concernant les processus biologiques, la fourniture d'oxygène par photosynthèse est relativement faible au regard du transfert gaz-liquide avec des valeurs durant le jour de 0.6 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à vitesse basse et 0.83 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à vitesse haute. Le modèle a bien capturé (comme attendu) la dynamique jour-nuit des microalgues avec une production d'oxygène la journée et

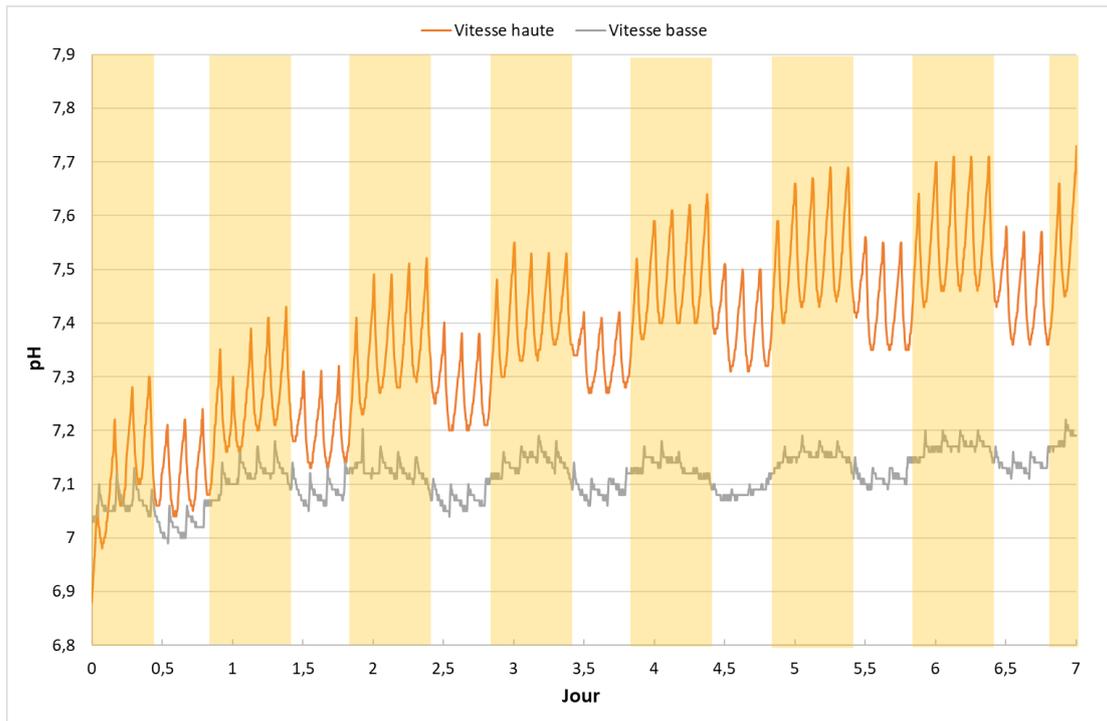
des valeurs nulles la nuit. De plus, le transfert gaz-liquide d'oxygène a été moins important la journée car, du fait de l'oxygène libéré par les microalgues, la concentration en O<sub>2</sub> dissous remonte la journée, se rapprochant de la valeur à saturation, ce qui décroît l'apport horaire en O<sub>2</sub> lié à ce transfert.

L'oxydation de la MO par les populations hétérotrophes ainsi que la nitrification constituent les mécanismes les plus importants avec des variations entre 1 et 3.5 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à vitesse basse et 0.5 et 7.1 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à vitesse haute. Suite à chaque injection, l'augmentation de l'OUR exogène liée à une augmentation de la concentration en substrat explique bien les cycles de diminution de l'O<sub>2</sub> dissous. La remontée correspond alors à la fin de l'oxydation. L'alimentation en eaux usées synthétiques correspond en effet à la chute de l'oxygène dissous pour l'OUR qui suit chaque injection.

Ainsi, le calage des paramètres est en accord (**Tableau 44**) avec l'interprétation visuelle des graphiques. À vitesse haute, la cinétique de croissance des bactéries a bien été supérieure à la cinétique à vitesse basse. Cela peut s'expliquer par l'apport en oxygène qui a été plus élevé à vitesse haute, favorisant l'activité bactérienne (moins de limitation par l'oxygène dissous). Les microalgues n'ont que peu été affectées par le changement de vitesse. En effet, l'OPR a été sensiblement plus faible à vitesse basse. L'OUR endogène qui englobe la mortalité des bactéries et des microalgues a été légèrement plus important à vitesse basse, indiquant une possible plus forte concentration en biomasse active, comme semblent l'attester les valeurs légèrement supérieures de productivité.

#### Suivi du pH

La **Figure 91** présente l'évolution du pH à vitesse haute et vitesse basse sur une semaine. Les phases de jour et de nuit sont mises en évidence. La dynamique jour-nuit a été mise en évidence avec un pH plus élevé la journée et moins élevé la nuit. Le pH augmente pendant le jour par effet de la photosynthèse. La nuit, le pH diminue suite à l'oxydation bactérienne : libération de CO<sub>2</sub> et consommation d'alcalinité (nitrification).



**Figure 91.** Evolution du pH dans le CHRA à vitesse haute et vitesse basse

Globalement, le pH a été plus élevé à vitesse haute qu'à vitesse basse. La vitesse d'agitation a donc impacté le pH. À vitesse haute, le paramètre a mis plus de temps à se stabiliser, et a varié entre 7 et 7.7. À vitesse basse, le pH a varié entre 7 et 7.2. L'amplitude des valeurs a été réduite à vitesse basse. À vitesse élevée, le transfert d'oxygène mais aussi de dioxyde de carbone est plus important. Ainsi, à vitesse haute, plus de  $\text{CO}_2$  produit par les bactéries a été dégazé vers l'atmosphère. C'est pour cette raison que les valeurs de pH ont été plus élevées à vitesse haute, et fluctuent de manière plus importante.

#### III.3.1.1.4. Conclusions

Les conclusions suivantes permettent de formuler des éléments de réponses aux deux questions scientifiques formulées en début de section :

1. Une grande partie de l' $\text{O}_2$  a été fournie mécaniquement via le mélange et non par la respiration photosynthétique des microalgues. En effet, les courbes issues du modèle ont montré que le transfert gaz-liquide a été le phénomène principal régissant l'apport en l'oxygène du CHRA à l'échelle pilote. Dans ces conditions d'agitation et d'alimentation en substrat, parmi les processus biologiques à l'œuvre, l'oxydation bactérienne a été le plus important suivi par l'activité photosynthétique des microalgues : les conditions paraissent donc plus favorables à la croissance des bactéries. La réduction de la vitesse d'agitation a permis de limiter ce phénomène sans pour autant inverser cette tendance.
2. Une vitesse d'agitation modérée n'a pas impacté significativement la productivité des microalgues et des bactéries, et a permis une légère amélioration de l'assimilation des nutriments (N,P) des eaux usées par le consortium ;

3. Une vitesse d'agitation modérée a permis des économies d'énergie tout en maintenant des performances épuratoires satisfaisantes.

#### III.3.1.2. Changement de la charge en azote des eaux usées synthétiques

De précédentes études ont montré que limiter l'apport d'un nutriment est une technique très répandue pour modifier la composition biochimique de cultures pures de microalgues. Par exemple, limiter l'apport en azote permet de favoriser l'accumulation des lipides (Wang et al., 2013). Comme il est principalement utilisé pour synthétiser les protéines, une carence en azote ralentit en effet le développement des cellules, réduit la teneur en protéines et augmente donc la proportion de glucides et/ou de lipides (Whitton et al., 2016). De plus, les lipides sont les molécules d'intérêt pour le biodiesel, qui est produit par transestérification. Toutefois, les données concernant l'occurrence de ce phénomène au sein des consortiums microalgues-bactéries manquent.

L'urée est abondante dans les effluents domestiques (environ 80% de la charge en azote), et il s'agit d'une source d'azote intéressante pour les microalgues. Elle est toutefois toxique à haute concentration. Ainsi, son apport doit être contrôlé : en excès, elle peut inhiber la croissance, et en quantités insuffisantes, la croissance peut être ralentie en raison d'une limitation par l'azote (Converti et al., 2006). En utilisant de l'urée (1.1 ; 1.7 ; 2.2 ; 2.8 mM) comme source d'azote, la croissance de *S. platensis* a été limitée par l'azote ( $N_o < 1.7 \text{ mM} = 23.8 \text{ mgN.L}^{-1}$ ) et inhibée par excès d'azote ( $N_o > 1.7 \text{ mM}$ ) (Converti et al., 2006)».

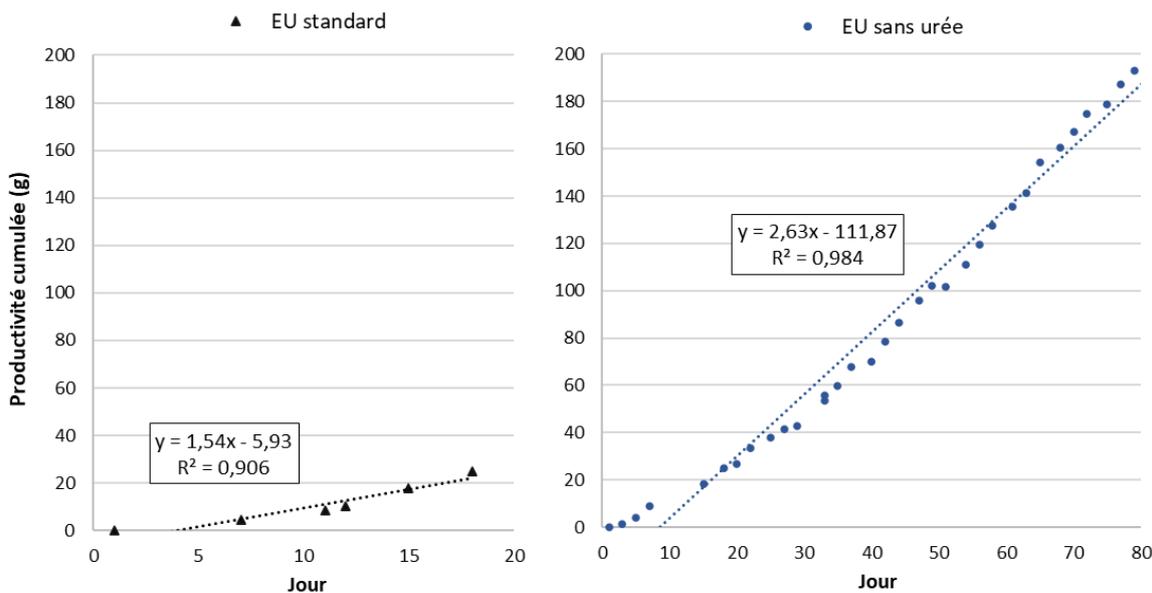
Ainsi, afin d'évaluer ces phénomènes, pour moduler l'apport en azote, l'urée a été retirée de la composition de l'eau synthétique. La composition détaillée de l'eau usée se trouve dans la section II.1.4.3.2. Composition des eaux usées entrantes. Les données de référence ont été reprises de la modalité « Vitesse basse » étudiée dans la partie précédente, où la composition des eaux usées synthétiques a été standard. La vitesse de rotation de la roue à aubes a été fixée à  $5.6 \text{ tr.min}^{-1}$  (vitesse basse définie précédemment). Les deux modalités ont été nommées respectivement : « EU standard » et « EU sans urée ».

Dans cette étude, les problématiques posées ont été les suivantes :

- Quel est l'impact de la diminution de l'apport nutritif en azote des EU entrantes sur les performances du CHRA ?
- Quelle est l'influence des nutriments sur la croissance et la composition biochimique de la biomasse ? La diminution de la charge en azote peut-elle induire une augmentation de la teneur en lipides ?

##### III.3.1.2.1. Productivité et composition de la biomasse

Pour les modalités « EU standard » et « EU sans urée », la biomasse a été extraite manuellement pour garder une concentration de  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  dans la culture, ce qui a donné un ADB variable. Dans le **Tableau 45**, les régressions linéaires incluant les intervalles de confiance à 95% sur la productivité cumulée (ordonnée) en fonction des jours (abscisse) pour les différentes entrées ont été résumées. La **Figure 92** présente l'évolution de la productivité cumulée quand le CHRA a été alimenté avec EU standard et des EU sans urée.



**Figure 92.** Évolution de la productivité cumulée pour l’EU standard (gauche) et sans urée (droite)

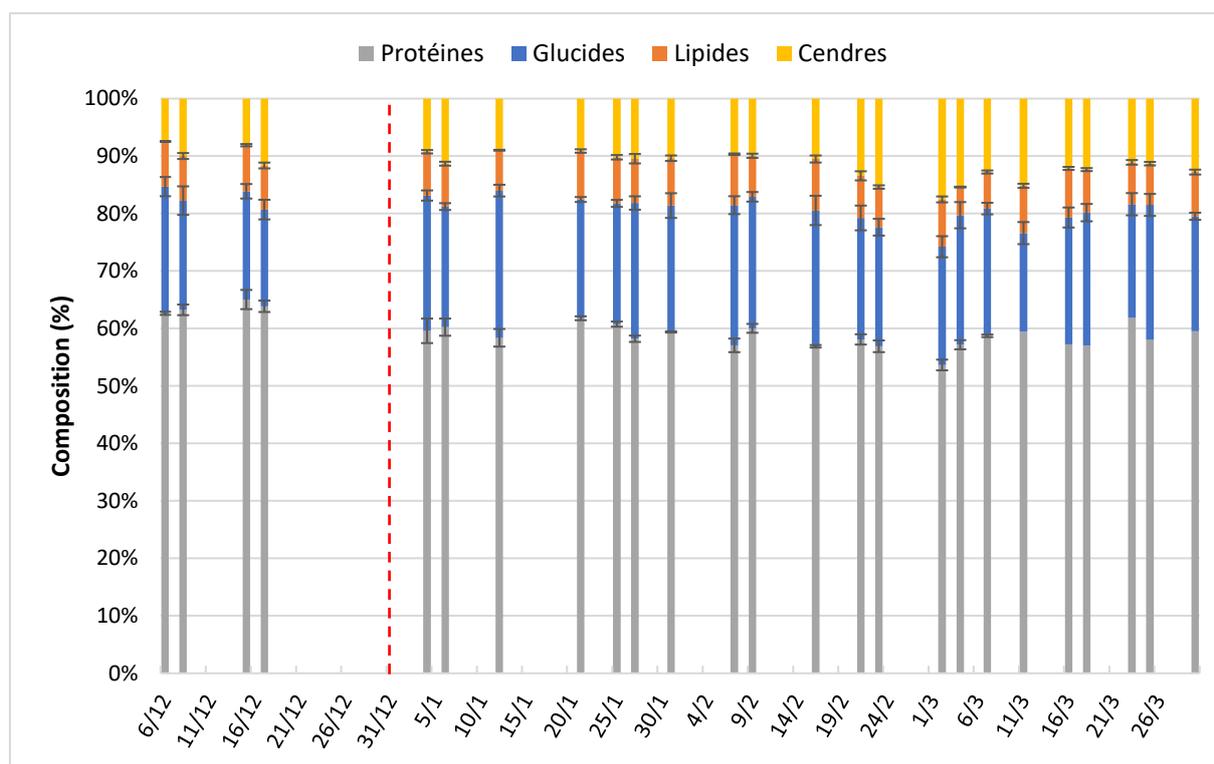
Modalité (n=nombre de données)	Équation (x=jours ; y= productivité cumulée en g)
EU standard (n=7)	$y_{inf} = 1.02x - 11.9$ $y = (1.55 \pm 0.21)x - (5.89 \pm 2.33)$ $y_{sup} = 2.08x + 0.1$
EU sans urée (n=36)	$y_{inf} = 2.51x - 28.6$ $y = (2.63 \pm 0.06)x - (22.6 \pm 2.97)$ $y_{sup} = 2.74x - 16.6$

**Tableau 45.** Productivité avec l’EU standard et l’EU sans urée

La littérature rapporte que la croissance de la biomasse peut être ralentie par manque d’urée ou bien inhibée par un excès (Converti et al., 2006). Le phénomène est dépendant des espèces en jeu et du système expérimental. Ici, en enlevant l’urée, les EU synthétiques semblent avoir un effet moins inhibiteur pour le consortium, favorisant ainsi la croissance des microalgues et des bactéries. En effet, la productivité a augmenté de 69.7% entre l’entrée standard et l’entrée sans urée. Cependant, la durée moindre de l’expérience avec la composition standard amène à prendre cette conclusion avec précaution, même si les intervalles de confiance inférieur et supérieur ne se recoupent pas pour les deux modalités.

La **Figure 93** présente l’évolution de la composition biochimique globale de la biomasse (protéines, glucides, lipides et cendres) en % avec l’entrée standard et l’entrée sans urée. A partir du 16 mars, les analyses de NTK pour les protéines ont été réalisées une fois par échantillon, d’où l’absence de barres d’erreur. La biomasse produite dans le CHRA a de nouveau été caractérisée par une grande teneur en protéines suivie par les glucides et lipides pour les deux types d’eaux usées synthétiques.

Selon la bibliographie, la composition biochimique de la biomasse est dépendante de la charge en azote fournie, car l'azote est l'élément principal de la synthèse des protéines. Si l'azote devient limitant, l'assimilation du carbone par les microalgues durant la photosynthèse continue, résultant en une accumulation accrue de glucides ou de lipides. De cette façon, un apport réduit en azote a augmenté la teneur en glucides et en lipides de *Chlorelle* et *Scenedesmus* (Beuckels et al., 2015). Dans une autre étude, une carence en azote a diminué la proportion de protéines, a favorisé l'accumulation des glucides mais, a peu impacté les lipides (Niccolai et al., 2019). La réponse des microalgues face à la charge en azote est propre à chaque souche. L'effet sur un consortium microalgues-bactéries est plus complexe, car plusieurs types de microorganismes sont impliqués.



**Figure 93.** Evolution de la composition globale de la biomasse avec l'entrée standard (avant trait rouge) et sans urée (après trait rouge)

	EU standard	EU sans urée
<b>Protéines (%)</b>	57.8±1.3	53.0±3.2
<b>Glucides (%)</b>	16.4±1.9	19.9±2.1
<b>Lipides (%)</b>	7.1±0.1	6.9±0.9
<b>Cendres (%)</b>	8.5±1.8	10.7±2.1
<b>Inconnu (%)</b>	9.2	9.5

**Tableau 46.** Composition biochimique moyenne sur l'ensemble des modalités « EU standard » et « EU sans urée »

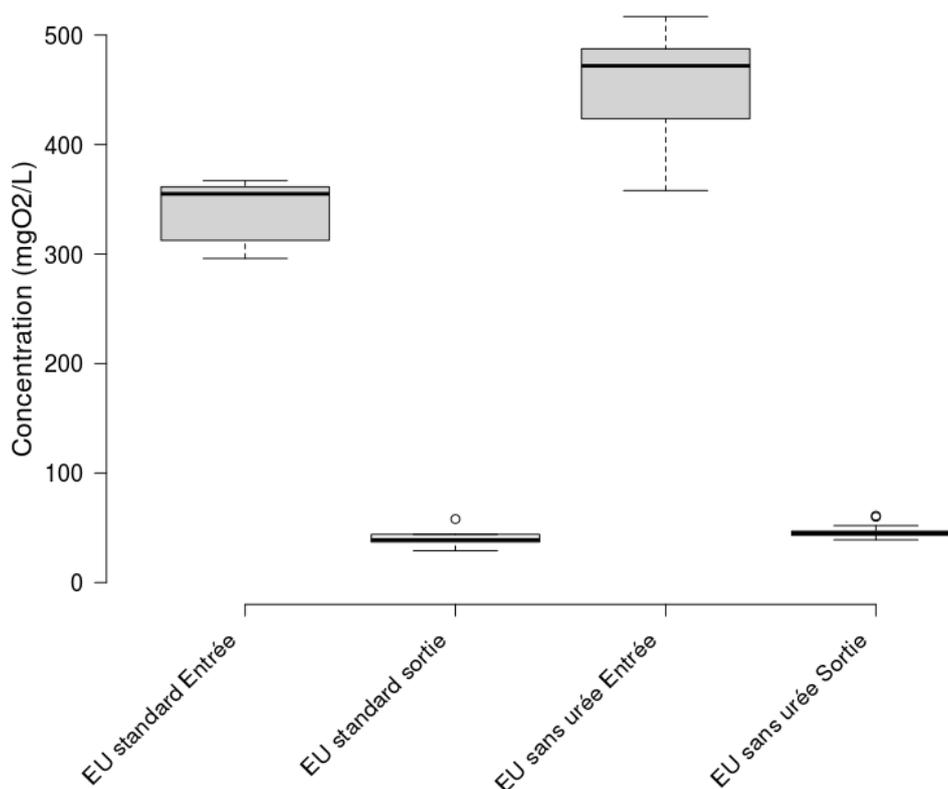
Le **Tableau 46** récapitule la composition biochimique moyenne de la biomasse quand le CHRA a été alimenté avec des EU standard et des EU sans urée. Avec les EU sans urée, la teneur en

protéines a baissé. Ceci est cohérent, car l'azote qui est le premier constituant des protéines a été fourni en moindres quantités. D'autre part, le contenu en glucides a légèrement augmenté avec les EU sans urée passant de  $16.4 \pm 1.9\%$  à  $19.9 \pm 2.1\%$ , ce qui est en accord avec la littérature qui a rapporté une chute de la teneur en protéines accompagnée d'une hausse des glucides et/ou des lipides. Toutefois, les mesures de lipides effectuées ne mettent pas en évidence de variation entre les deux modalités. La suraccumulation des lipides recensée avec une carence en azote chez des microalgues (Wang et al., 2013) n'a pas eu lieu pour le consortium microalgues-bactéries étudié ici.

#### III.3.1.2.2. Traitement des eaux usées

##### Matière organique (DCO)

La **Figure 94** présente les concentration moyennes de la DCO en sortie de chenal avec des eaux usées synthétiques standard et les eaux usées sans urée. Il est à noter que la concentration en DCO entrante a légèrement varié pendant la modalité « EU sans urée » : en effet, l'extrait de viande (Viandox) issu du commerce présente une composition variable en fonction des lots.

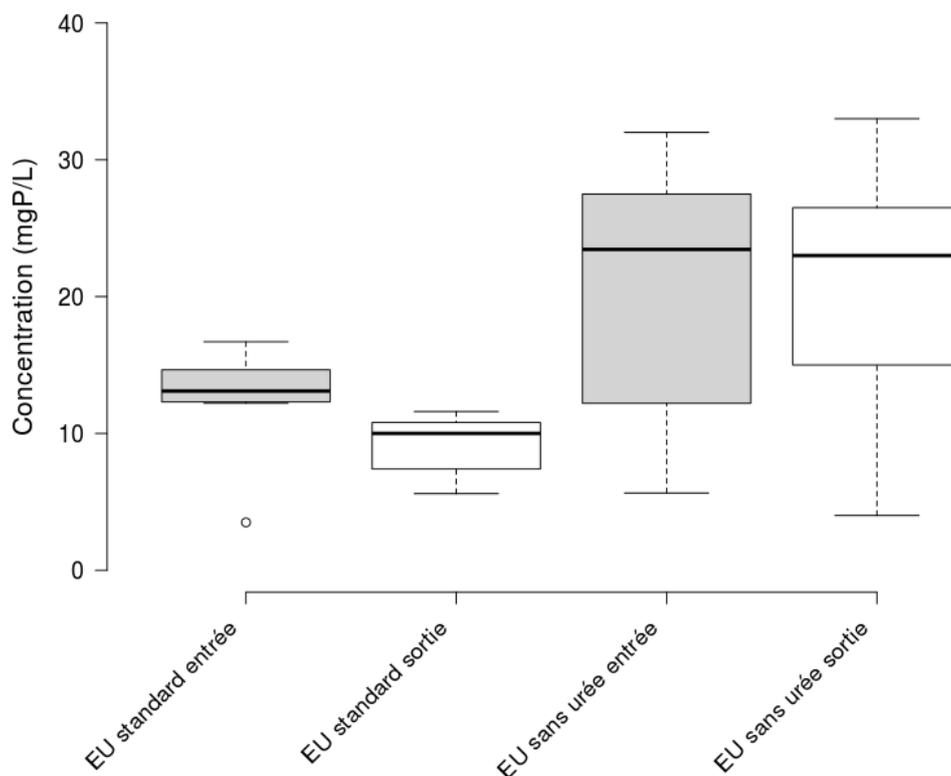


**Figure 94.** Concentration de la DCO en sortie avec l'EU standard et sans urée (n=9 pour EU standard entrée et sortie ; n=8 et n=35 pour EU sans urée entrée et sortie)

L'abattement moyen de la DCO avec les EU standard s'est élevé à  $88.3 \pm 2.3\%$ , et avec les EU sans urée à  $89.9 \pm 1.1\%$ . Ainsi, quelle que soit la composition de l'entrée, le système a permis de traiter la DCO sous le seuil de  $50 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  dans l'effluent sortant. Le CHRA a donc respecté le seuil de  $125 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  en sortie avec un abattement minimum de 75% de la DCO ("Arrêté du 21 juillet 2015," 2015). L'efficacité de la dégradation du substrat organique par le consortium n'a pas été affectée par la présence ou l'absence d'urée, car l'oxydation de la MO par les

bactéries hétérotrophes a été indépendante de la quantité d'azote apporté : il n'y a pas eu de limitation de la croissance des bactéries hétérotrophes par l'azote dans ces conditions.

## Phosphore



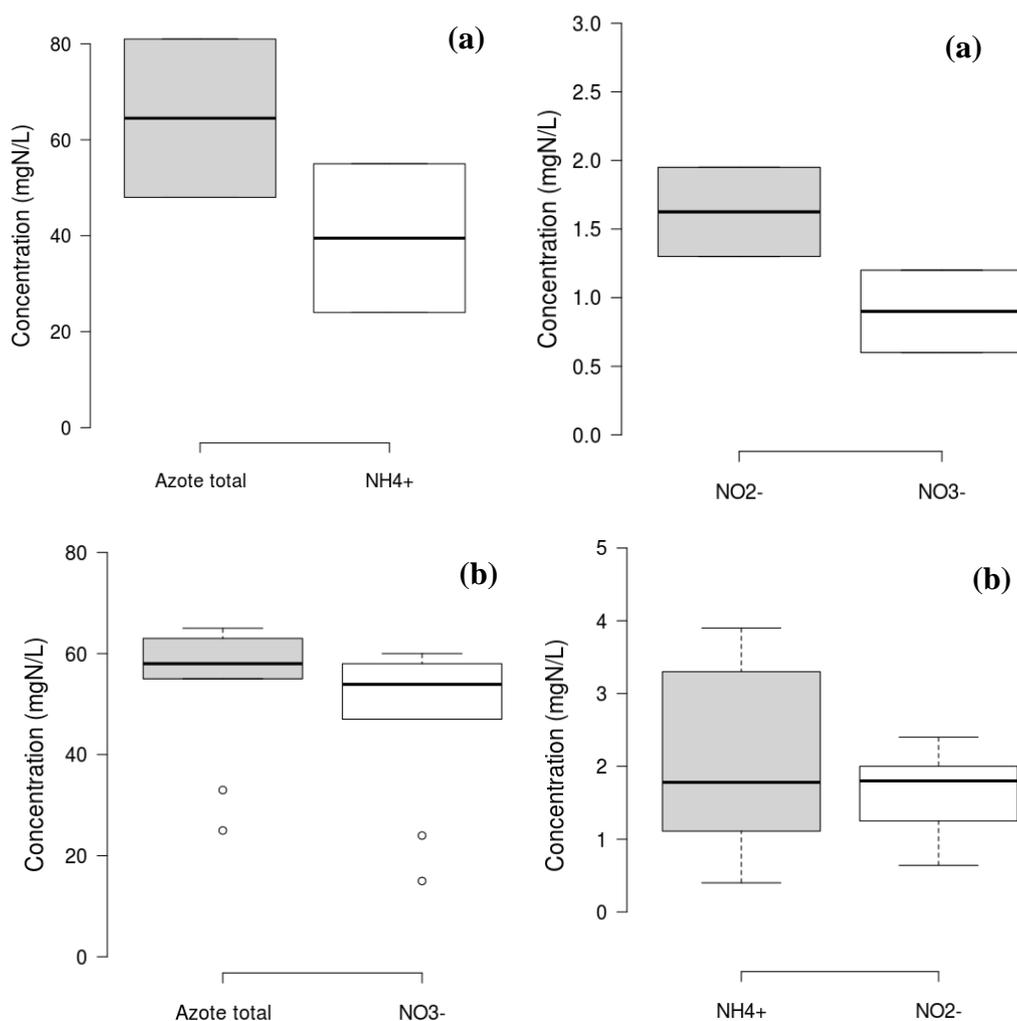
**Figure 95.** Concentration des orthophosphates en sortie de chenal avec l'EU standard et sans urée

Dans les cas des ions  $\text{PO}_4^{3-}$  (**Figure 95**), l'abattement moyen a atteint  $36.7 \pm 14.5\%$  avec les EU standard, et  $-4.3 \pm 2.1\%$  avec les EU sans urée. Suite à l'enlèvement de l'urée de la composition de l'eau d'entrée, l'abattement en orthophosphates a été plus faible et très variable comme en témoigne la dispersion importante des données sur la **Figure 95**. Cette observation est étonnante dans la mesure où la productivité de la biomasse ayant augmenté, on aurait pu s'attendre à une amélioration de l'assimilation. Ce phénomène peut dès-lors être compris grâce au rapport des nutriments azote-phosphore (N/P) apporté par les eaux usées. Dans les cultures de microalgues, le rapport azote-phosphore a été désigné comme un élément clé par plusieurs études (Z. Arbib et al., 2013; Beuckels et al., 2015; Wágner et al., 2021), qui influence l'espèce dominante du consortium, la cinétique de croissance, la composition biochimique des microorganismes et les performances épuratoires. Ainsi, (Wágner et al., 2021) ont observé que « l'abattement des phosphates chutait de manière significative de 95% à 40%, quand le rapport N/P diminuait ». De la même manière, (Beuckels et al., 2015) a conclu que l'élimination du phosphore des eaux usées était influencée par la concentration en azote. Précédemment cité dans le **Tableau 21**, le rapport N/P s'est élevé à 6.9 avec l'entrée standard et, la valeur est descendue à 2.2 avec l'entrée sans urée. On peut supposer qu'avec un rapport N/P de 2.2 (EU sans urée), pas suffisamment d'azote été fourni aux microalgues pour assimiler le phosphore, d'où l'accumulation des orthophosphates dans le milieu et l'effluent affichant en moyenne  $21.1 \text{ mgP.L}^{-1}$ . En dehors de

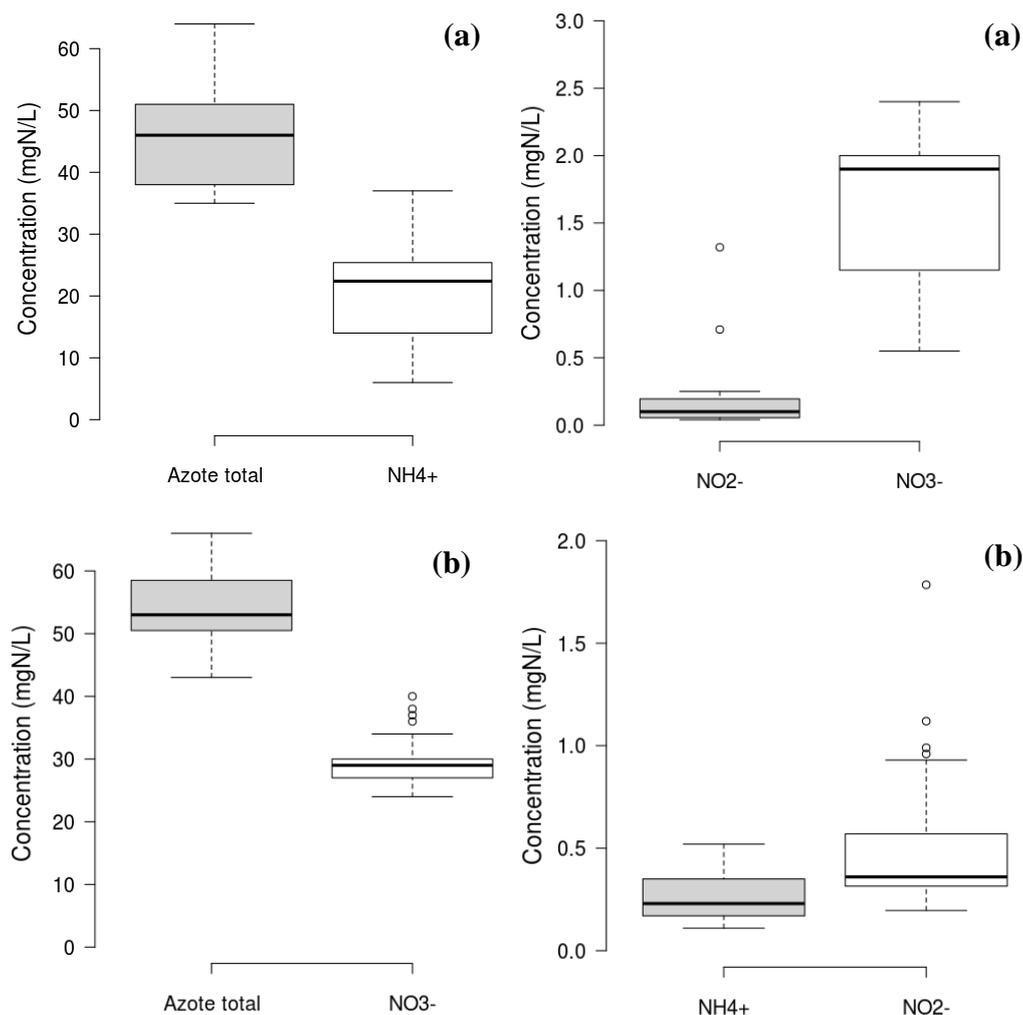
l'assimilation, les conditions nécessaires à la précipitation des phosphates dans une bonne gamme de pH n'ont pas été réunies (pH pas suffisamment élevé). Au final, dans ces conditions, le CHRA ne permet pas d'atteindre le niveau de rejet réglementaire vis-à-vis du phosphore imposé par la réglementation en zone sensible ("Arrêté du 21 juillet 2015," 2015).

Azote

Les graphiques (**Figure 96** et **Figure 97**) illustrent les concentrations des composés azotés en entrée (a) et en sortie (b) du système avec les EU standard et sans urée.



**Figure 96.** Concentration moyenne des espèces azotées en entrée (a) et sortie (b) de chenal avec l'EU standard



**Figure 97.** Concentration moyenne des espèces azotées en entrée (a) et en sortie (b) de chenal avec l'EU sans urée

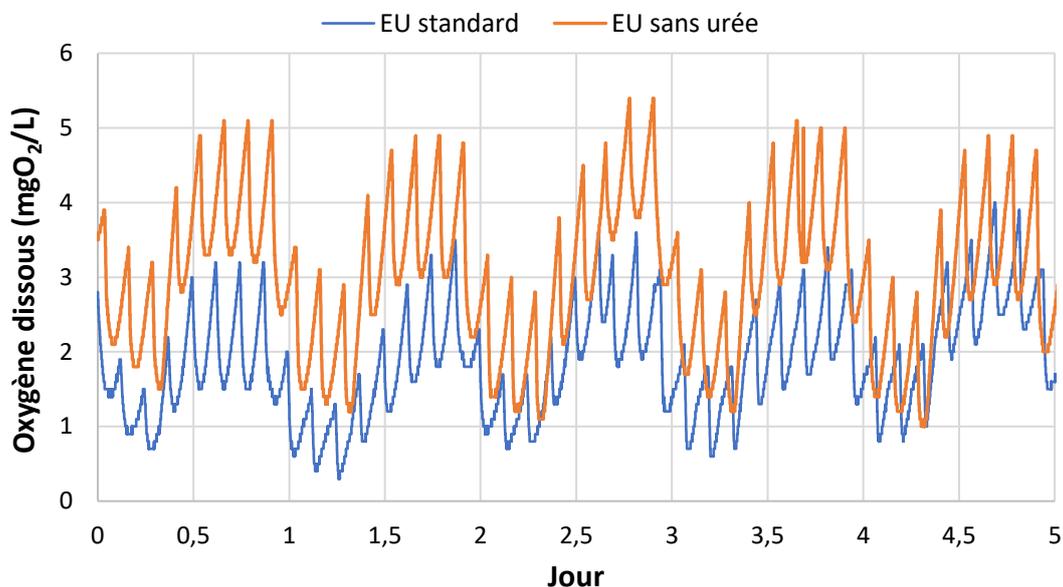
Comme attendu, la concentration en azote global d'entrée a bien diminué lorsque l'urée a été retirée des EU synthétiques. De manière analogue aux observations de la partie précédente « Influence de la vitesse », le mécanisme principal de conversion de l'azote au sein du CHRA a été la nitrification. En effet, les quantités importantes de nitrates  $\text{NO}_3\text{-N}$  mesurées en sortie pour les EU standard avec presque  $50 \text{ mgN.L}^{-1}$  (**Figure 96**) ou pour les EU sans urée avec environ  $30 \text{ mgN.L}^{-1}$  (**Figure 97**) sont indicatrices de l'activité des bactéries nitrifiantes. De plus, les concentrations infimes d'ions  $\text{NH}_4^+$  en aval ont confirmé que l'ammonium a bien été converti dans le processus de nitrification en  $\text{NO}_2^-$ , puis  $\text{NO}_3^-$ . Avec ou sans la quantité d'azote apportée par l'urée, les bactéries nitrifiantes n'ont pas semblé négativement impactées, car la nitrification est restée la voie majeure de transformation de l'azote. Le rendement sur l'azote global n'a pas évolué de manière significative entre les deux modalités : l'assimilation par les microalgues ou les bactéries n'a donc pas été influencée.

#### III.3.1.2.3. Activité biologique du consortium microalgues-bactéries

La mesure en continu de la dynamique de l'oxygène dissous et du pH a permis d'évaluer la dynamique du consortium microalgues-bactéries lorsque la composition des EU synthétiques en entrée a été modifiée.

Suivi de l'oxygène dissous

La **Figure 98** montre l'évolution de l'oxygène dissous au sein du CHRA quand il a été alimenté avec des EU standard et des EU sans urée sur une période de 5 jours. L'alternance jour-nuit a toujours été observable avec des valeurs plus élevées la journée, car les microalgues ont libéré de l'oxygène par photosynthèse.



**Figure 98.** Evolution de l'oxygène dissous dans le CHRA avec l'EU standard et sans urée

Globalement, les valeurs d'oxygène dissous avec les EU standard sont plus faibles (entre 0.3 et 4  $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) qu'avec les EU sans urée (entre 1 et 5.4  $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pour valider ces observations, une journée avec des données stables a été sélectionnée pour déterminer les pentes de remontée de l' $\text{O}_2$  ( $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) après injection d'eaux usées (8 fois par jour) standard et sans urée (**Tableau 47**).

	<b>EU standard</b>	<b>EU sans urée</b>
	<b>Pente (<math>\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Pente (<math>\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>)</b>
<b>Jour</b>	16.1±2.2	25.0±5.5
<b>Nuit</b>	11.0±0.6	15.5±3.8

**Tableau 47.** Pente moyenne de remontée de l'oxygène après alimentation

Les pentes moyennes ont confirmé que les données d'oxygène dissous ont été plus importantes le jour que la nuit, quelles que soient les eaux usées injectées. Par ailleurs, les remontées de l'oxygène ont été plus fortes avec les EU sans urée qu'avec les EU standard : 25.0±5.5 contre 16.1±2.2  $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Cette tendance peut s'expliquer de la manière suivante : moins d'azote réduit ayant été fourni avec les EU sans urée, la nitrification s'est atténuée, moins d'oxygène a été consommé par les bactéries nitrifiantes : les fluctuations de l'oxygène ont été plus marquées et impactées par la photosynthèse ainsi que le transfert d'oxygène. L'oxydation par les bactéries hétérotrophes et la photosynthèse ont été prédominantes dans les mécanismes liés à l'oxygène, et elles ont été moins contrebalancées par la nitrification.

Modélisation du système à partir des données d'oxygène dissous

La modélisation a rendu possible la discrimination des activités biologiques des microorganismes : photosynthèse des microalgues, oxydation bactérienne et respiration endogène. Pour les deux modalités, le coefficient de transfert  $K_{LaO_2}$  a été égal à  $12.2 \text{ j}^{-1}$ . Les conditions initiales et aux limites du modèle sont listées dans le **Tableau 48**.

Paramètre	Notation et unité	Valeurs pour la modalité « EU standard »	Valeurs pour la modalité « EU sans urée »
Concentration initiale en substrat dans le chenal	S (mgDCO/L)	5	5
Concentration en substrat dans l'affluent	So (mgDCO/L)	380	450
Concentration initiale en azote total dans le chenal	Nt (mgN/L)	27.5	27.5
Concentration en azote total dans l'affluent	Nto (mgN/L)	60	45

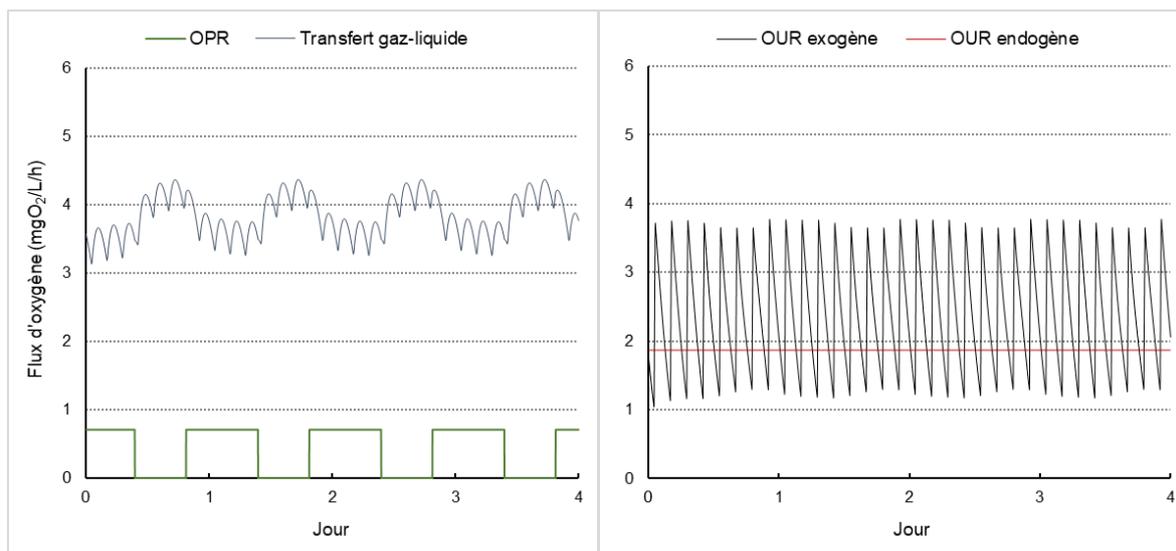
**Tableau 48.** Récapitulatif des paramètres du modèle pour chaque modalité

Les valeurs de  $\mu_{B,max}X$ ,  $OUR_{endo}$  et  $OPR_{max}$  obtenues avec le calage sont répertoriées dans le **Tableau 49**.

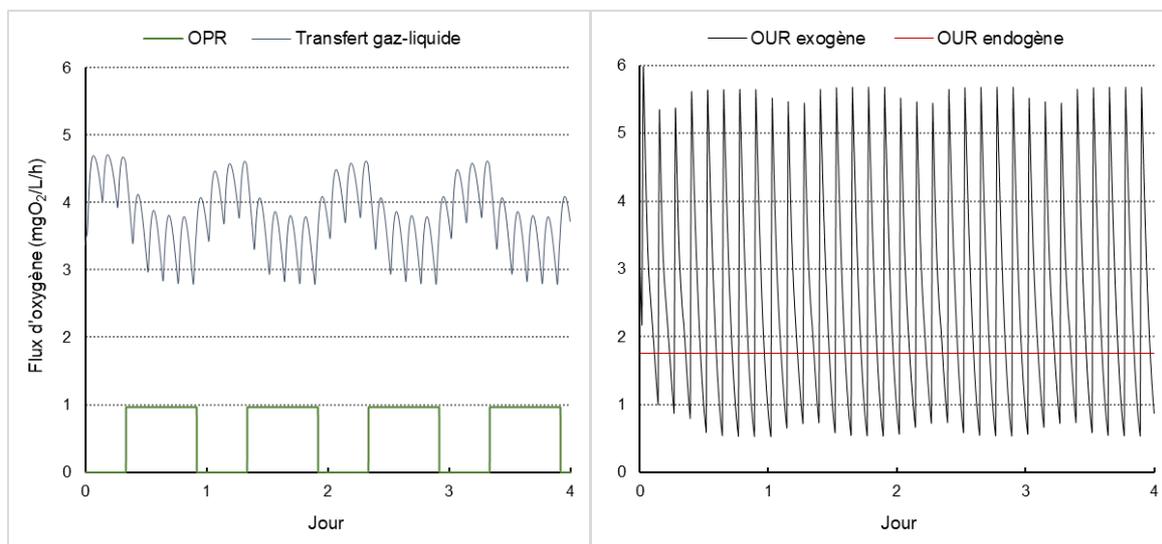
	$\mu_{B,max}X$ ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	$OPR_{max}$ ( $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	$OUR_{endo}$ ( $\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
<b>EU standard</b>	6.44±0.00	0.72±0.00	1.93±0.00
<b>EU sans urée</b>	10.80±0.05	1.02±0.00	1.79±0.00

**Tableau 49.** Calage des paramètres pour les modalités « EU standard » et « EU sans urée »

Les **Figure 99** et **Figure 100** décrivent l'évolution des termes du modèle  $OUR$ ,  $OPR$  et le transfert gaz-liquide pendant les modalités « EU standard » et « EU sans urée ».



**Figure 99.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant la modalité « EU standard »



**Figure 100.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant la modalité « EU sans urée »

Le transfert gaz-liquide demeure le mécanisme principal d'apport en oxygène dans le chenal, pour les deux modalités. Il a varié avec un peu plus d'ampleur avec les EU sans urée (2.8 et 4.8 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) qu'avec les EU standard (3.5 et 4.5 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) mais reste du même ordre de grandeur. Cela indique une certaine robustesse du calage du modèle : rien n'a changé niveau hydrodynamique dans le chenal (la vitesse est la même), et le transfert gaz-liquide a été du même ordre de grandeur (**Figure 99** et **Figure 100**).

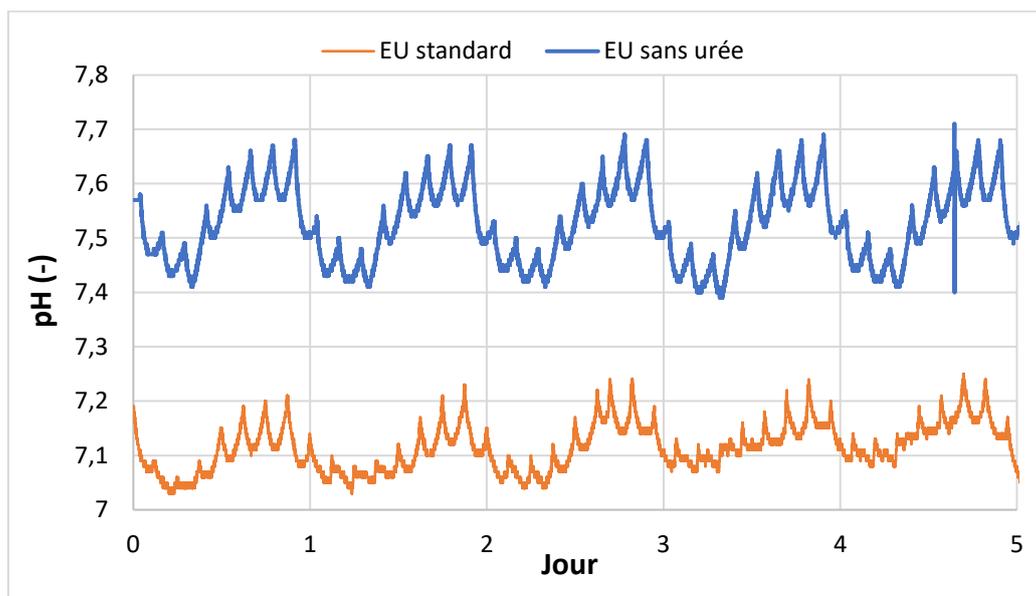
Avec les EU sans urée, l'OUR exogène bactérien (hétérotrophe et autotrophe) présente des valeurs maximales bien supérieures au cas des EU standard. Cela peut cependant être dû à la DCO supérieure des EU sans urée (**Tableau 48**).

Avec les EU standard comme sans urée, la photosynthèse des microalgues a été un mécanisme mineur dans les variations de l'oxygène dissous, ne permettant pas de supporter l'activité bactérienne. Ainsi, l'OPR a varié entre 0 et 0.6 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> avec l'EU standard, et entre 0 et 1.1 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour l'EU sans urée.

Ainsi, les observations réalisées avec les données de productivité cumulée de la biomasse sont appuyées par le jeu de paramètres calé avec le modèle (**Tableau 49**). En effet, le terme de croissance des bactéries  $\mu_{B,max}X$  a été multiplié par 1.7 quand l'urée a été retirée des eaux usées synthétiques : la population des bactéries (sans doute hétérotrophes) est donc devenue prédominante. Les conditions ont également été plus favorables dans les EU sans urée pour les microalgues. Ainsi, le terme OPR<sub>max</sub> a augmenté de 42% comparé aux EU standard. (**Figure 100**). Enfin, le terme de mortalité OUR<sub>endo</sub> a été constant malgré le changement de composition d'EU.

#### Suivi du pH

La **Figure 101** illustre les variations du pH quand le CHRA a été alimenté avec des EU standard et des EU sans urée pendant 5 jours.



**Figure 101.** Évolution du pH dans le CHRA avec l'EU standard et l'EU sans urée

La composition de l'eau usée a impacté le pH global au sein du chenal. Une activité moindre des nitrifiantes avec une alimentation sans urée doit en effet se traduire par une acidification moindre du milieu. Cela est confirmé par les données présentées sur la **Figure 101**. Le pH a bien été plus élevé avec l'EU sans urée qu'avec l'EU standard. En effet, il a varié entre 7.4 et 7.68 avec les EU sans urée, et entre 7.03 et 7.24 avec les EU standard. Aussi, la dynamique entre le jour et la nuit a été plus marquée avec les EU sans urée : l'écart entre jour et nuit a été de 0.2 en moyenne contre 0.1 pour les EU standard. Comme la nitrification a moins influencé les variations de pH, en abaissant le pH la journée, la dynamique jour-nuit a été plus marquée. La photosynthèse et l'oxydation des hétérotrophes ont été les mécanismes prédominants dans le CHRA. Comme pour le paramètre d'oxygène dissous, les pentes de remontée du pH après

injection d'eaux usées (8 fois par jour) standard et sans urée ont été calculées pour appuyer les raisonnements (**Tableau 50**).

	<b>EU standard</b>	<b>EU sans urée</b>
	<b>Pente (unité de pH/h)</b>	<b>Pente (unité de pH/h)</b>
<b>Jour</b>	1.7±0.4	1.5±0.1
<b>Nuit</b>	1.4±0.3	0.8±0.1

**Tableau 50.** Pente moyenne de remontée du pH après alimentation

Les pentes de remontée du pH ont confirmé l'alternance jour-nuit due à l'activité photosynthétique des microalgues avec des coefficients plus faibles la nuit que le jour. Comme la photosynthèse s'est arrêtée pendant la période obscure et n'a plus abaissé le pH, il a fluctué avec moins d'amplitude, ce qui est visible avec les pentes plus faibles la nuit 0.8±0.1 unité de pH.h<sup>-1</sup> et 1.4±0.3 unité de pH.h<sup>-1</sup>. Ensuite, l'écart a été plus prononcé entre le jour et la nuit pour les EU sans urée que pour les EU standard.

#### III.3.1.2.4. Conclusions

Les conclusions suivantes permettent de formuler des éléments de réponses aux questions scientifiques formulées en début de section :

1. La baisse de la charge d'azote en entrée a entraîné un accroissement de la production de biomasse. Le contenu en protéines de la biomasse a diminué alors que celui en glucides a augmenté avec une charge en azote plus faible. La part en lipides n'a pas varié. Ainsi, la biomasse produite n'est intrinsèquement pas plus attractive pour la production de biodiesel, mais la stabilité de la teneur en lipides accompagnée d'une meilleure productivité signifie potentiellement plus de biocarburant produit.
2. La charge en azote de l'effluent à traiter a affecté les performances épuratoires du consortium microalgues-bactéries. Les processus biologiques d'oxydation du substrat organique et de nitrification par les bactéries sont restés tout aussi efficaces. Toutefois, l'azote semble avoir été limitant vis-à-vis de l'élimination du phosphore, qui n'a été éliminé que faiblement et de manière très variable lorsque l'urée a été écartée de la composition. L'apport d'un nutriment devenu limitant ou non a donc une influence sur les mécanismes d'élimination des autres nutriments. Le rapport N/P de l'entrée apparaît comme un élément clé dans les performances de traitement du chenal vis-à-vis de l'abattement du phosphore.
3. La réduction de la charge en azote des EU a en particulier favorisé les microorganismes hétérotrophes du consortium avec une oxydation accrue de la matière organique, et dans une seconde mesure, les microalgues. L'analyse des flux d'oxygène grâce au calage du modèle simplifié ainsi que les données de pH confirment ces tendances.

### III.3.2. ADB fixe et concentration en biomasse variable

Le Temps de Séjour Solide (en anglais *Solids Retention Time*, SRT) ou âge des boues (ADB) correspond au temps de séjour moyen d'une biomasse dans un système. C'est un paramètre opérationnel relativement simple à calibrer qui influence les populations de microorganismes présentes (Buitrón and Coronado-Apodaca, 2022), et peut permettre la sélection d'espèces à croissance plus ou moins rapide. Il a également été rapporté qu'un ADB et une cinétique de croissance plus longues amélioreraient la décantation des floccs de microalgues et bactéries comparé à un ADB plus court (Valigore et al., 2012).

Dans la partie précédente, les résultats d'exploitation présentés correspondent à un système pilote où la concentration en biomasse était maintenue constante dans le système. Pour cette raison et avec la configuration de la sortie de la biomasse du chenal, l'âge de boues était dans ces conditions très élevé et présentait une grande variabilité. De plus, les résultats en question montrent globalement une activité de la biomasse algale plutôt faible (notamment au niveau de l'analyse des flux d'oxygène), malgré des performances épuratoires satisfaisantes.

Ainsi, pour cette nouvelle partie de l'étude, l'ADB a été fixé en changeant la configuration de la sortie de la liqueur du chenal (par pompage au lieu d'un écoulement gravitaire). L'ADB devient alors égal au Temps de Séjour Hydraulique (TSH) : le débit d'extraction des boues est égal au débit de sortie des eaux traitées.

Dans un premier temps, deux valeurs d'ADB/TSH de 5 et 8 jours ont été testées. Dans un second temps, pour répliquer la variabilité des eaux usées réelles (comme la section III.3.1.2. Changement de la charge en azote des eaux usées synthétiques) et aussi diminuer la turbidité/couleur, une nouvelle composition des eaux usées a été appliquée en changeant la charge en MO dans l'effluent d'entrée : l'extrait de viande (Viandox) et la moitié de la peptone ont été enlevés. Cela a permis de simuler le placement d'un CHRA en aval d'une première étape de traitement de la charge organique (par exemple boues activées à forte charge, UASB...). De plus, il s'avère que l'extrait de viande présent dans les modalités précédentes a apporté une coloration foncée au milieu de culture, ce qui a pu impacter la pénétration de la lumière au sein du chenal. Ainsi, l'activité algale devrait être favorisée dans ces nouvelles conditions.

En résumé, les modalités ont été nommées : « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ». La modalité « EU sans viandox et moitié de peptone » a été raccourcie en « EU sans viandox ». Les trois cas de figure ont uniquement été comparés entre eux, car pour rappel, la configuration du chenal était différente pour les modalités précédentes avec une extraction manuelle de la biomasse et un écoulement gravitaire des eaux traitées dans le décanteur.

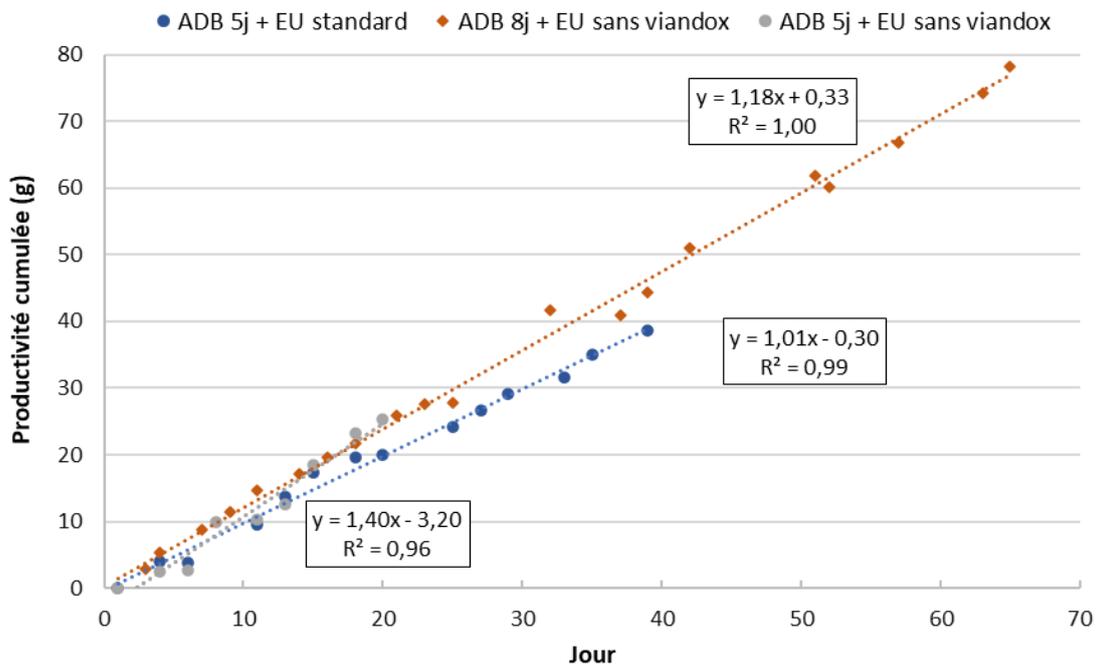
L'objectif de l'étude de ces nouvelles modalités a été de répondre aux problématiques :

- Quelle est l'influence de l'ADB sur le CHRA en termes de performances épuratoires et sur la biomasse en termes de productivité ?

- Quel est l'impact de l'apport en MO des EU sur le CHRA pour traiter les eaux usées et sur le consortium en termes de productivité et de composition biochimique ?
- Est-ce que la couleur du milieu a un effet sur le consortium microalgues-bactéries ?

III.3.2.1. Productivité de la biomasse

Dans cette étude, une pompe a été installée pour extraire la biomasse et maîtriser l'ADB (qui est ainsi égal au TSH). Le calcul de productivité cumulée a donc été effectué différemment pour tenir compte de cette modalité (II.2.1.2. Productivité et productivité cumulée). La productivité cumulée de la biomasse a été tracée en fonction du temps pour les différents âges des boues testés (**Figure 102**).



**Figure 102.** Évolution de la productivité cumulée de la biomasse pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox »

Les 15 premiers jours, la productivité a chuté, car la biomasse a commencé à être extraite à intervalles réguliers par la pompe pour atteindre un ADB de 5 j. Le consortium microalgues-bactéries a mis deux semaines, soit 3 fois l'ADB, pour compenser la perte de biomasse avec la croissance. Par la suite, une période de trois fois l'ADB a été prise en compte pour que le système soit considéré stable et que les mesures de MES reprennent. En complément, les régressions linéaires avec les intervalles de confiance à 95% sur la productivité cumulée (ordonnée) en fonction des jours (abscisse) pour les trois modalités sont listées dans le **Tableau 51**.

Modalité n=nombre de données	Équation (x=jours ; y=productivité cumulée en g)
ADB 5j + EU standard (n=14)	$y_{inf} = 0.94x - 10.86$ $y = (1.01 \pm 0.03)x - (9.41 \pm 0.67)$ $y_{sup} = 1.07x + 7.96$
ADB 8j + EU sans viandox (n=21)	$y_{inf} = 1.14x - 0.89$ $y = (1.18 \pm 0.02)x + (0.33 \pm 0.58)$ $y_{sup} = 1.21x + 1.54$
ADB 5j + EU sans viandox (n=9)	$y_{inf} = 1.15x - 6.21$ $y = (1.4 \pm 0.1)x - (3.2 \pm 1.27)$ $y_{sup} = 1.64x - 0.19$

**Tableau 51.** Productivité cumulée pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox »

Pour plus de clarté, les comparaisons ont été respectivement établies entre :

- « ADB 5j + EU standard » et « ADB 5j + EU sans viandox » pour comprendre l'effet de la charge en MO et la coloration due à l'extrait de viande avec un ADB identique
- « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox » pour déterminer l'impact de l'ADB

Pour un ADB de 5 j associé à des EU standard ou sans viandox, la productivité cumulée a augmenté de 36.8% lorsque l'extrait de viande a été retiré des EU synthétiques (**Tableau 51**). De plus, les intervalles de confiance à 95% ne se recoupent pas. Par conséquent, l'absence de viandox et de peptone a eu un effet bénéfique visible via l'augmentation de la productivité, en dépit d'une baisse de 66% de la DCO entrante. Pour expliquer l'amélioration de la productivité, deux hypothèses sont envisageables :

- Les concentrations initiales de viandox et de peptone ont pu exercer un effet inhibiteur, peut-être par la présence de certains composés dans l'extrait de viande ;
- L'accès à la lumière constitue un paramètre fondamental dans le fonctionnement du CHRA. Le viandox a apporté une couleur brunâtre, qui a fait obstacle à la diffusion de la lumière. Les microalgues ont capté moins de lumière pendant la photosynthèse, ce qui a ralenti leur cinétique de croissance. Quand l'extrait de viande a été enlevé, les eaux synthétiques ont été clarifiées : les cellules algales ont alors bénéficié d'un meilleur accès à la lumière, résultant en une hausse de la productivité. L'influence de la couleur de la culture sur des microalgues a été documenté avec du digestat brun foncé : la couleur de ce dernier a été établie comme un paramètre critique qui limite la transmittance de la lumière (Al-Mallahi and Ishii, 2022). Par exemple, (Marcilhac et al., 2014) a cultivé un consortium de microalgues et de bactéries dans un digestat dilué à des densités optiques de (0.22, 0.36, 0.89 et 1.36) tout en conservant la même charge nutritive. Aux densités les plus élevées, le flux photosynthétique mesuré à 4.8 cm était nul. Enfin, les meilleures productivités ont été atteintes aux densités optiques les plus faibles.

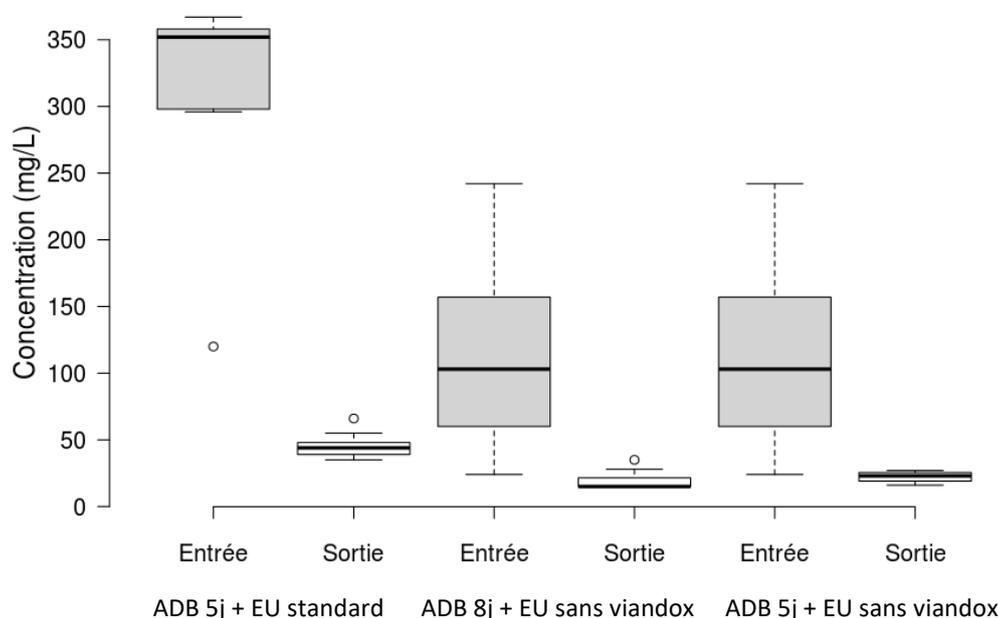
En comparant les données des deux ADB, la productivité a été similaire avec des intervalles de confiance qui se sont recoupés. Quel que soit l'ADB, les MES ont été du même ordre de grandeur dans le chenal. L'absence d'influence peut être attribuée à la brièveté de la dernière modalité avec un ADB de 5 j (n=9) comparé à un ADB de 8 j (n=21). Très peu d'études renseignent sur l'influence de l'ADB sur la productivité des microalgues et des bactéries. L'hypothèse que des espèces à croissance rapide seraient sélectionnées n'a pas été vérifiée, peut être parce que les ADB appliqués n'étaient pas assez différents.

La composition en termes de protéines, lipides, glucides et cendres ne peut pas être présentée. En effet, seuls quatre échantillons ont été analysés pour la modalité « ADB 5j + EU standard », les autres échantillons n'ayant pas pu être testés : suite à un problème lors de la lyophilisation, ils ont moisie pendant le stockage. Par exemple, une mesure des protéines d'un échantillon dégradé du 07/04/2023 a donné 29.8% comparée à une mesure d'un échantillon sain du 04/04/2023 qui a donné 56.3%. Si l'on s'appuie sur la bibliographie, (Buitrón and Coronado-Apodaca, 2022) n'ont rapporté aucune différence significative dans la composition de la biomasse (microalgues-bactéries) produite à différents ADB avec en moyenne  $49.0 \pm 6.0\%$  de protéines,  $6.7 \pm 0.6\%$  de lipides,  $9.5 \pm 1.6\%$  de glucides et  $34.5 \pm 2.7\%$  de cendres.

#### III.3.2.2. Traitement des eaux usées

##### III.3.2.2.1. Matière organique (DCO)

Cette partie aborde séparément l'influence de l'âge des boues et de la charge entrante en MO sur l'efficacité du traitement des eaux usées. La **Figure 103** présente les concentrations en DCO) pour un ADB de 5 et 8j, et ce pour les EU standard et sans viandox.



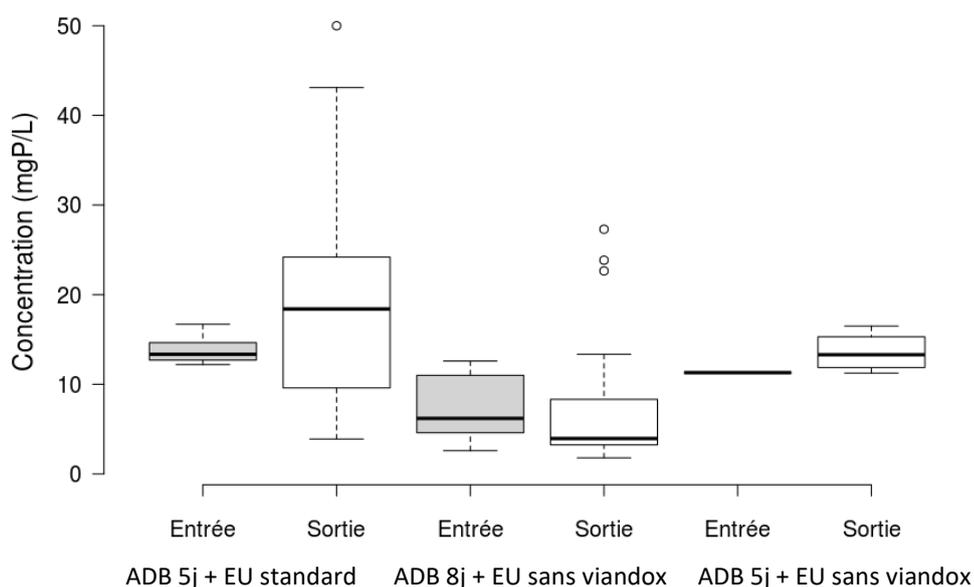
**Figure 103.** Concentration de la DCO en entrée et sortie de chenal pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox »

En comparant un ADB de 5j et de 8j (EU sans viandox), le traitement de la DCO a été similaire avec des abattements respectifs de  $79.3 \pm 4.3\%$  (ADB 5j) et  $82.4 \pm 5.3\%$  (ADB 8j). La dégradation de la MO n'a donc pas varié avec l'âge des boues. Pareillement, (Buitrón and Coronado-

Apodaca, 2022) ont déduit que le changement d'ADB n'a pas eu de conséquence sur la réduction de la DCO. Le même constat a été établi dans un photobioréacteur microalgal-bactérien à membrane où le traitement de la DCO a été constant quel que soit l'ADB (Zhang et al., 2021).

Ensuite, entre « ADB 5j + EU standard » et « ADB 5j + EU sans viandox », l'élimination de la MO a été satisfaisante dans les deux cas avec des abattements respectifs de  $86.0 \pm 2.4\%$  et de  $79.3 \pm 4.3\%$ . L'abattement a été légèrement supérieur pour l'EU standard, principalement car l'effluent était plus concentré au départ. Dans les trois configurations, l'effluent rejeté a respecté le seuil imposé de  $125 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  et la réduction minimum de la DCO de 75% (« Arrêté du 21 juillet 2015,» 2015).

### III.3.2.2.2. Phosphore



**Figure 104.** Concentration des orthophosphates en entrée et sortie pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox »

Le second nutriment d'intérêt a été le phosphore apporté par le réactif  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dans les eaux usées synthétiques. Comme observé précédemment avec un ADB variable et des EU sans urée, les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  n'ont pas été éliminés significativement par le consortium microalgues-bactéries (**Figure 104**), et ce pour les trois modalités testées ici. En effet, au regard des incertitudes de mesures et d'une certaine variabilité en entrée, il n'est pas possible de considérer un abattement du phosphore.

Pour rappel, le meilleur abattement s'est élevé à  $36.7 \pm 14.5\%$  avec les EU standard et un ADB variable avec un écart-type important (voir paragraphe III.3.1.1.2. Traitement des eaux usées), et n'a plus été atteint par la suite. Enfin, les concentrations mesurées en sortie n'ont pas été inférieures au palier de  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  indiqué par (« Arrêté du 21 juillet 2015,» 2015).

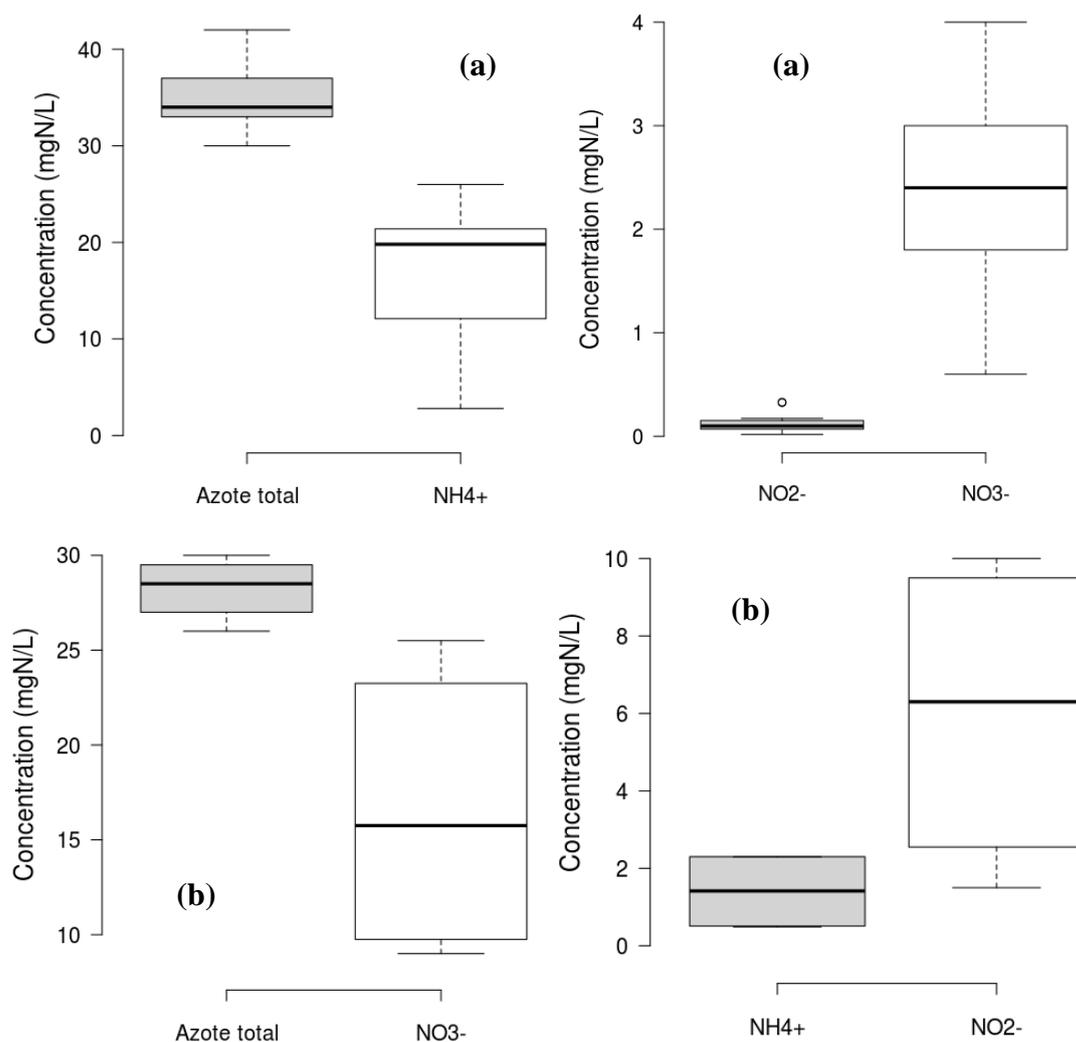
Le traitement peu satisfaisant et fluctuant du phosphore a aussi été observé lors d'études précédentes menées sur le même CHRA pilote (Pham, 2018) traitant des eaux usées réelles (ayant subi une décantation primaire) ou mélangées avec des centrats de digestion anaérobie

des boues, ainsi qu'en variant le TSH (4j et 8j) (Pham, 2018) : le phosphore total (PT) mesuré en sortie a été égal voire plus élevé que le PT mesuré en entrée, ce qui implique aucune élimination du phosphore par le système. Les abattements moyens enregistrés ont été au maximum de  $13.9 \pm 13.6\%$ .

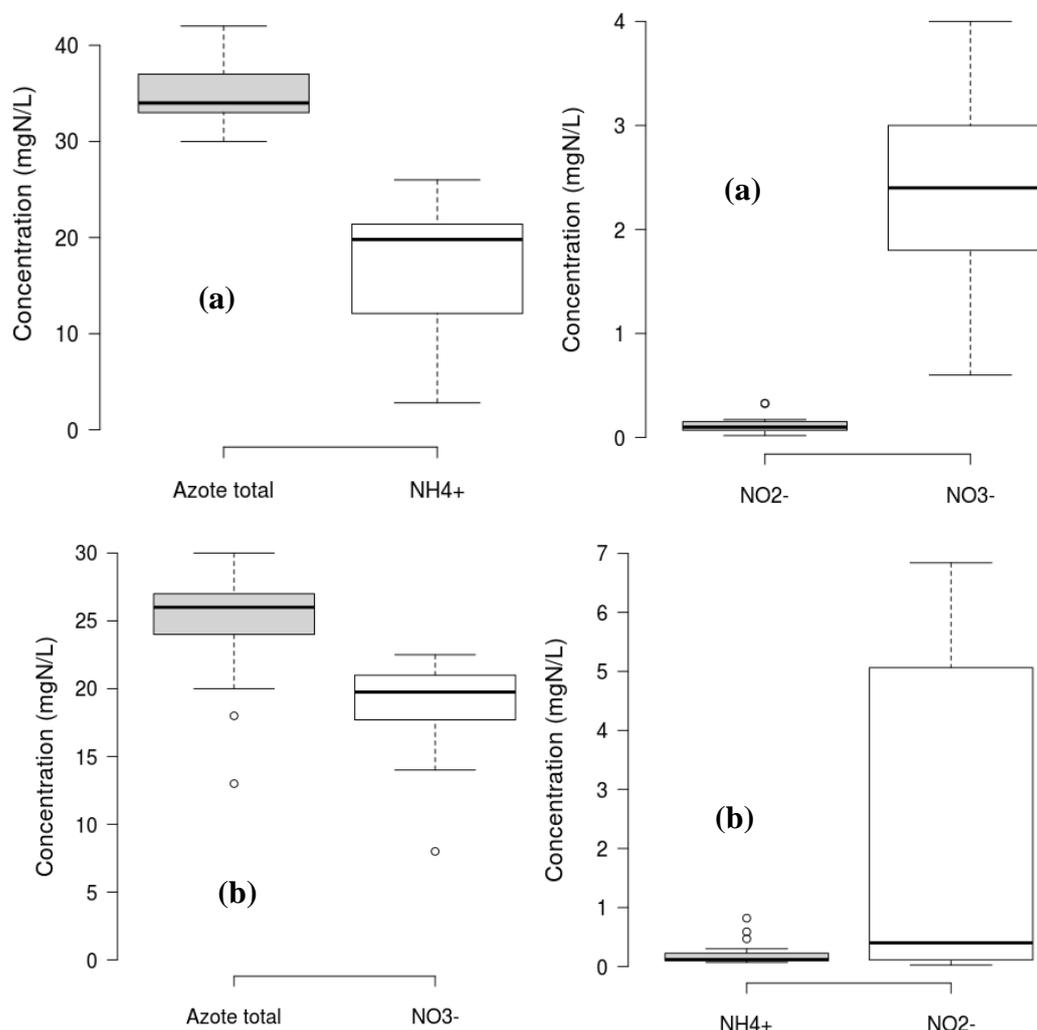
Dans les EU, un déséquilibre nutritionnel peut expliquer l'absence de traitement du phosphore. En effet, les concentrations des nutriments doivent correspondre aux besoins des bactéries et des microalgues pour permettre un traitement biologique (assimilation par la biomasse). Le rapport  $DBO_5:N:P$  (mg.L<sup>-1</sup>) requis au traitement biologique par les bactéries est de 100:5:1 (Metcalf and Eddy, 1991). Les EU standard ont un rapport DCO:N:P de 27:6.9:1 et les EU sans viandox ont un rapport DCO:N:P de 18:4.8:1. Si les EU ont créé une carence nutritionnelle pour les microorganismes, la hausse de l'ADB n'a eu aucune influence sur l'assimilation du phosphore.

### III.3.2.2.3. Azote

Le dernier nutriment d'intérêt a été l'azote sous différentes formes. Pour les trois modalités, la concentration moyenne (mgN.L<sup>-1</sup>) des espèces azotées en entrée et en sortie sont présentées dans les **Figure 105**, **Figure 106** et **Figure 107** qui suivent.



**Figure 105.** Concentration des espèces azotées en entrée (a) et sortie (b) pour « ADB 5j + EU sans viandox »



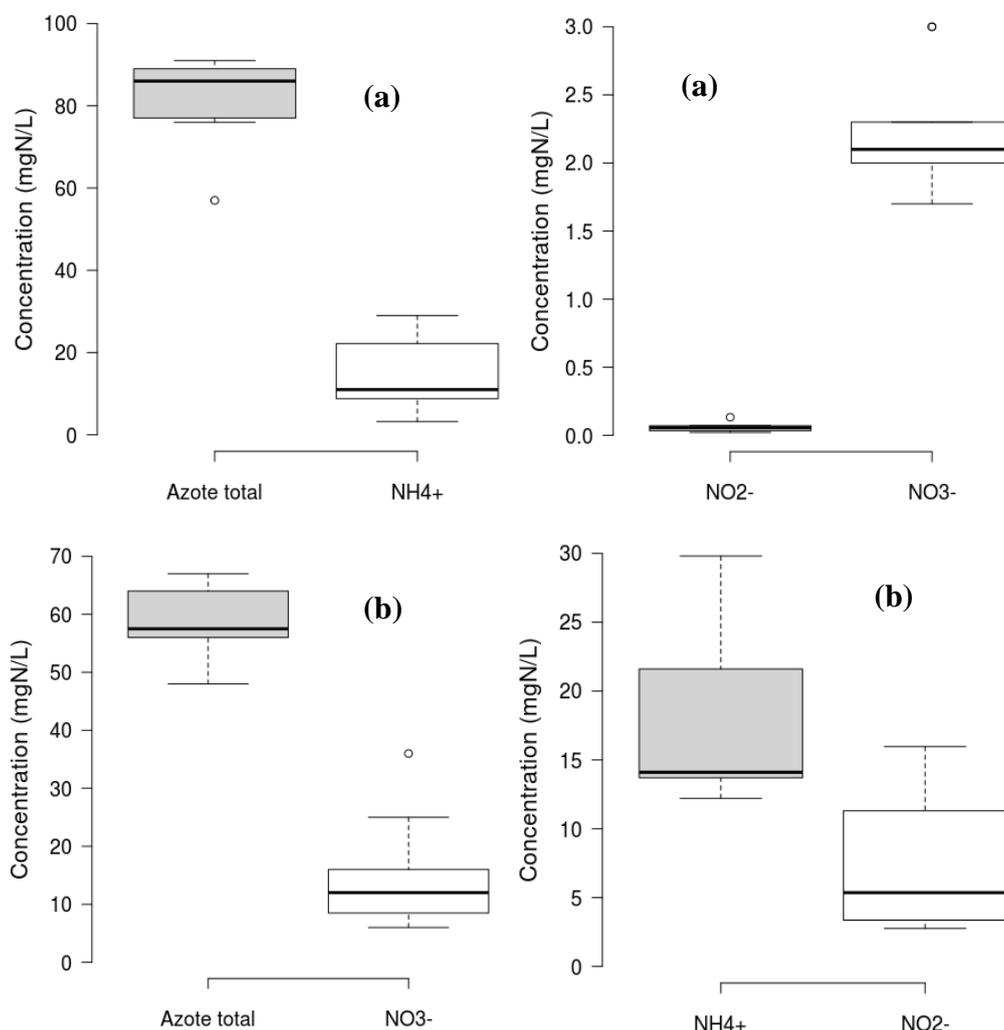
**Figure 106.** Concentration des espèces azotées en entrée (a) et sortie (b) pour « ADB 8j + EU sans viandox »

Pour 5 jours (**Figure 105**) ou 8 jours (**Figure 106**) d'ADB et une alimentation avec des EU sans viandox, les nitrates ont été majoritaires en sortie du procédé : la nitrification par les bactéries autotrophes a donc été le processus dominant de conversion de l'azote. En effet, l'intégralité de l'ammonium a été nitrifié en nitrates à la sortie avec des réductions de  $91.6 \pm 6.2\%$  (ADB 5j) et  $98.8 \pm 1.1\%$  (ADB 8j). Pareillement, l'incrémentement de l'ADB de 6 j à 12 j a amélioré le traitement de l'ammonium de  $89.1 \pm 6.6\%$  à  $98.2 \pm 2.0\%$  par le consortium microalgues-bactéries dans un CHRA (Buitrón and Coronado-Apodaca, 2022).

Il faut noter qu'avec les EU sans viandox, l'oxygène dissous a été élevé (de 5.8 à 8.6  $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ) (**Figure 108**). Il y a eu peu, voire aucune condition d'anoxie pour permettre une élimination de l'azote par dénitrification. L'abattement de l'azote total a été assez faible car, il n'y a pas eu de dénitrification et peu d'assimilation par la biomasse.

Dans notre étude, l'ADB a légèrement avantage les bactéries nitrifiantes. 5 jours ont suffi aux populations nitrifiantes pour qu'elles se renouvellent sans être lessivées, et qu'elles

maintiennent leur activité biologique. D'autre part, les écarts-types affichés avec un ADB plus court (**Figure 105**) ont été plus importants qu'à un ADB de 8 j (**Figure 106**). Ceci peut suggérer qu'un ADB plus long a permis des performances d'épuration plus stables.



**Figure 107.** Concentration des espèces azotées en entrée (a) et en sortie (b) pour « ADB 5j + EU standard »

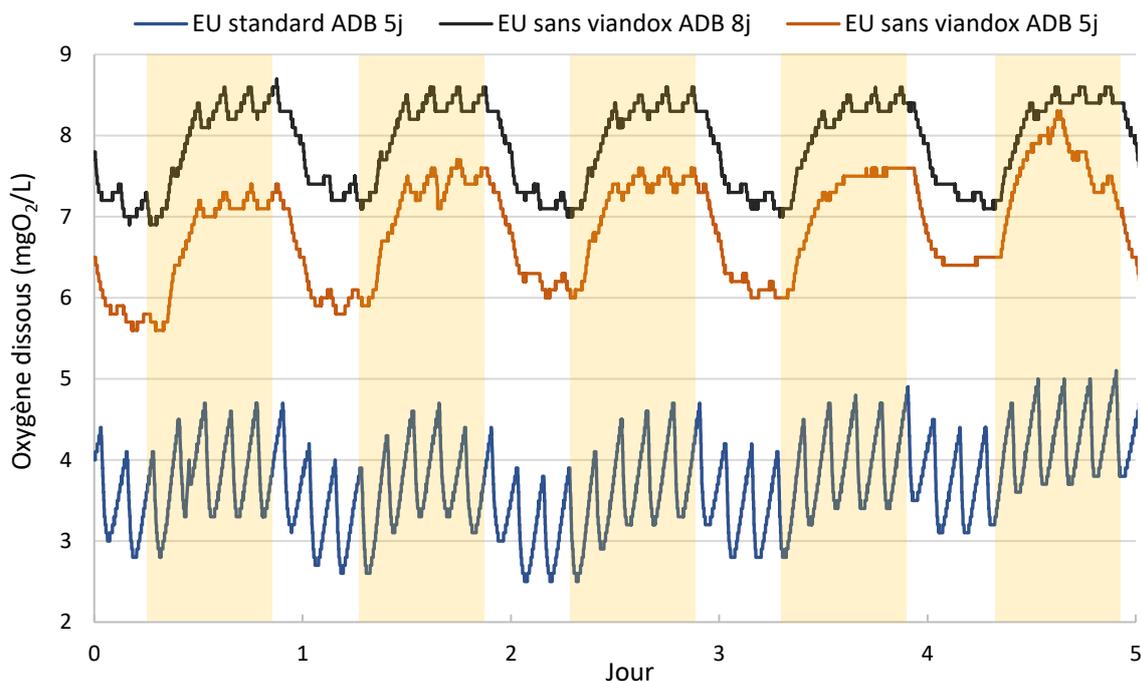
Concernant l'impact de la charge organique entre les modalités « ADB 5j + EU standard » (**Figure 107**) et « ADB 5j + EU sans viandox » (**Figure 105**), les mécanismes de transformation de l'azote ont été différents. Pour les EU sans viandox (**Figure 105**), il n'y avait plus d'ammonium mais beaucoup de nitrates en sortie, indicateurs d'une importante nitrification. Avec les EU standard (**Figure 107**), la tendance a changé : la concentration d'ions  $\text{NH}_4^+$  a été aussi élevée qu'en entrée, et la concentration en nitrates est restée importante. Dans les conditions « EU standard + ADB 5 j », la nitrification a donc été instable, avec une accumulation de nitrites non négligeable. Il est probable que, dans ces conditions, la combinaison d'une charge en matière organique et en azote plus importantes aient défavorisé la croissance des bactéries nitrifiantes. Dans le même CHRA pilote, ce phénomène a déjà été observé par (Pham, 2018) en augmentant la concentration en azote qui est passée pour l'azote de Kjeldahl de  $34.8 \pm 16.1$  à  $123.5 \pm 33.8$  mgN.L<sup>-1</sup> pour un TSH de 4 j : la concentration en  $\text{NH}_4^+$

en sortie était nulle à « Charge nutritive basse », et la concentration en ammonium a été aussi élevée en entrée qu'en sortie à « Charge nutritive haute ».

### III.3.2.3. Activité biologique du consortium microalgues-bactéries

#### III.3.2.3.1. Suivi de l'oxygène dissous

La **Figure 108** montre les variations de l'oxygène dissous pour les modalités « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ». Entre les EU standard et les EU sans viandox, l'impact des mécanismes bactériens dans le consortium microalgues-bactéries a été mis en évidence grâce au suivi de l'oxygène dissous dans le CHRA.



**Figure 108.** Evolution de l'oxygène dissous dans le CHRA pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox »

On observe que la dynamique jour-nuit a été plus marquée avec les EU sans viandox, car l'activité photosynthétique des algues paraît dès lors plus importante par rapport aux mécanismes bactériens. Ainsi, l'oxygène libéré par les microalgues s'est accumulé dans le milieu, donnant lieu à des valeurs globales d'oxygène plus importantes pour les modalités « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».

Aussi, pour le même ADB de 5j, les fluctuations de l'oxygène dissous après chaque injection d'eaux usées ont été plus marquées avec les EU standard que les EU sans viandox. Comme la charge organique entrante a été réduite (sans viandox), les processus d'oxydation bactérienne ont été moins importants, et les valeurs globales d'oxygène ont augmenté, moins d'oxygène étant consommé par les bactéries hétérotrophes ou autotrophes. Si l'on compare l'injection des EU standard et des EU sans viandox, les alimentations des EU standard (courbe bleue) sont plus marquées car plus d'oxygène a été consommé pour oxyder la charge en MO plus importante dans ce cas-là. De manière globale, la concentration en  $O_2$  a été plus élevée avec les EU sans viandox allant de 5.8 et 8.6  $mgO_2.L^{-1}$  contre 2.6 et 4.8  $mgO_2.L^{-1}$  pour les EU standard.

### III.3. Chenal à haut rendement algal (CHRA)

Si l'on compare les deux ADB, la concentration en oxygène dissous a été plus importante à ADB=TSH=8j avec une différence de 1 à 1.3 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> relevée entre les deux modalités. Le débit d'alimentation a été de 9.2 L.j<sup>-1</sup> contre 16 L.j<sup>-1</sup> pour ADB=TSH=5j. Pour un âge des boues égal à 8j, une charge moins importante en MO et azote a donc été apportée à la culture, les processus d'oxydation ont été ralentis et l'oxygène dissous s'est accumulé dans le CHRA. Ainsi, un ADB plus long a favorisé l'oxygénation du milieu.

#### III.3.2.3.2. Modélisation du système à partir des données d'oxygène dissous

Comme pour les modalités précédentes, la modélisation a été un outil supplémentaire pour déterminer les flux d'oxygène et les phénomènes biologiques liés. Le coefficient de transfert gaz-liquide K<sub>LaO2</sub> a de nouveau été défini à 12.2 j<sup>-1</sup>. Dans le **Tableau 52**, les données implémentées dans le modèle ont été résumées. Le débit d'alimentation a été 9.2 L.j<sup>-1</sup> pour ADB=8j et 16 L.j<sup>-1</sup> pour ADB=5j.

Paramètre	Notation et unité	EU standard + ADB 5j	EU sans viandox + ADB 5j	EU sans viandox + ADB 8j
Concentration en substrat initiale dans le chenal	S (mgDCO/L)	5	5	5
Concentration en substrat dans l'affluent	So (mgDCO/L)	320	110	110
Concentration initiale en azote total dans le chenal	Nt (mgN/L)	27.5	27.5	27.5
Concentration en azote total dans l'affluent	Nto (mgN/L)	85	35	35

**Tableau 52.** Récapitulatif des paramètres du modèle pour chaque modalité

Après le calage du modèle sur nos données expérimentales, les paramètres obtenus sont récapitulés dans le **Tableau 53** ci-dessous.

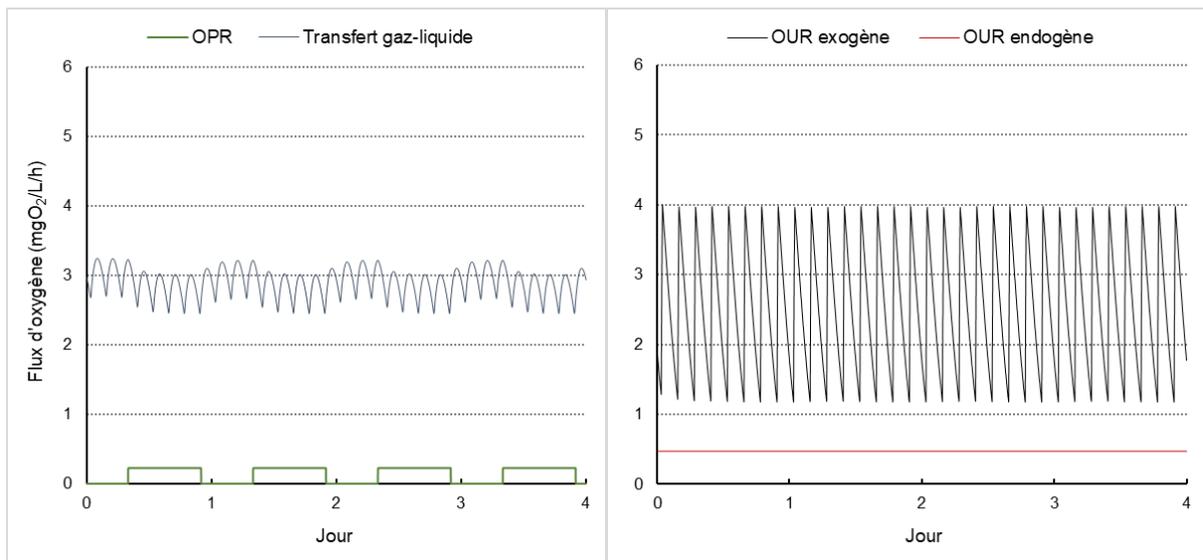
	$\mu_{B,max}X$ (mg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	OPR <sub>max</sub> (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	OUR <sub>endo</sub> (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>EU standard + ADB 5j</b>	6.74±0.03	0.22±0.00	0.47±0.00
<b>EU sans viandox + ADB 5j</b>	3.61±0.06	0.76±0.00	1.56±0.00
<b>EU sans viandox + ADB 8j</b>	2.43±0.01	0.64±0.00	0.76±0.00

**Tableau 53.** Calage des paramètres pour les modalités « EU standard + ADB 5j », « EU sans viandox + ADB 5j » et « EU sans viandox + ADB 8j »

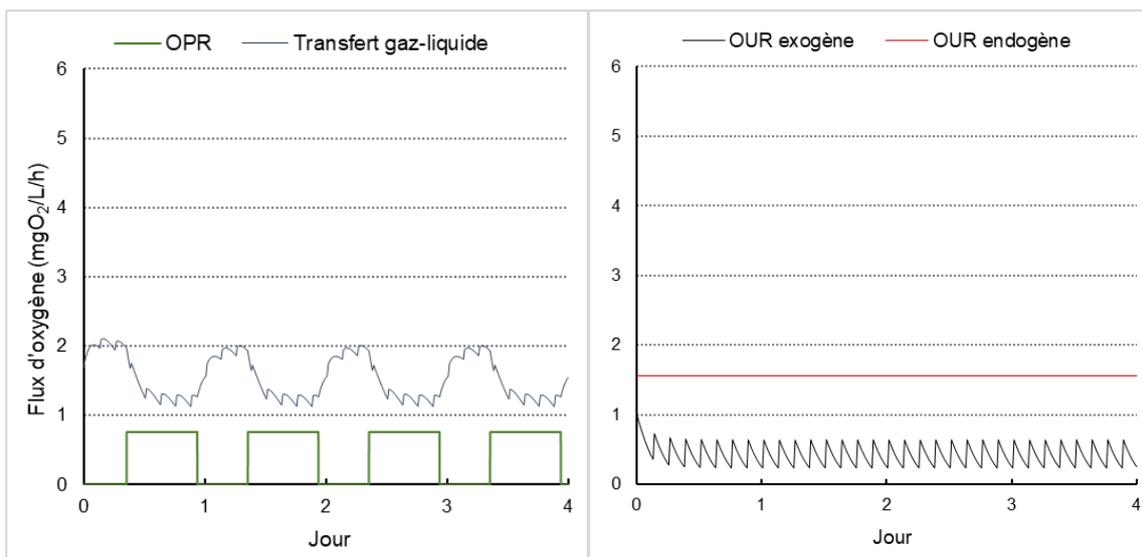
D'après le jeu de paramètres obtenus, les remarques suivantes peuvent être formulées :

- Comme attendu, l'activité bactérienne  $\mu_{B,max}X$  a été réduite suite à la diminution de la charge polluante, et également suite à l'augmentation de l'âge de boues. La valeur de  $\mu_{B,max}X$  a été 1.9 fois plus importante dans les EU standard. En effet, moins de substrat organique a été fourni par les EU sans viandox, la cinétique des hétérotrophes a donc été ralentie (probablement en raison de la diminution de la concentration en biomasse bactérienne).
- Le terme  $OPR_{max}$  des EU sans viandox a été multiplié par 3.4 comparé aux EU standard. L'hypothèse selon laquelle la couleur du viandox a inhibé l'activité photosynthétique est ainsi confortée par les valeurs d' $OPR_{max}$  en lien avec les données expérimentales de production de biomasse (**Tableau 51**).
- En passant l'âge des boues de 5 à 8j, les mécanismes bactériens et l'activité photosynthétique ont diminué, car le TSH a été plus long, donc moins de nutriments ont été fournis au CHRA, impliquant une biomasse active moins importante dans le système, ce qui est confirmé par la chute de la respiration endogène  $OUR_{endo}$ .

Les **Figure 109**, **Figure 110** et **Figure 111** illustrent l'évolution de l'OPR et le transfert gaz-liquide (gauche) et l'OUR exogène et endogène (droite) pour les trois modalités.



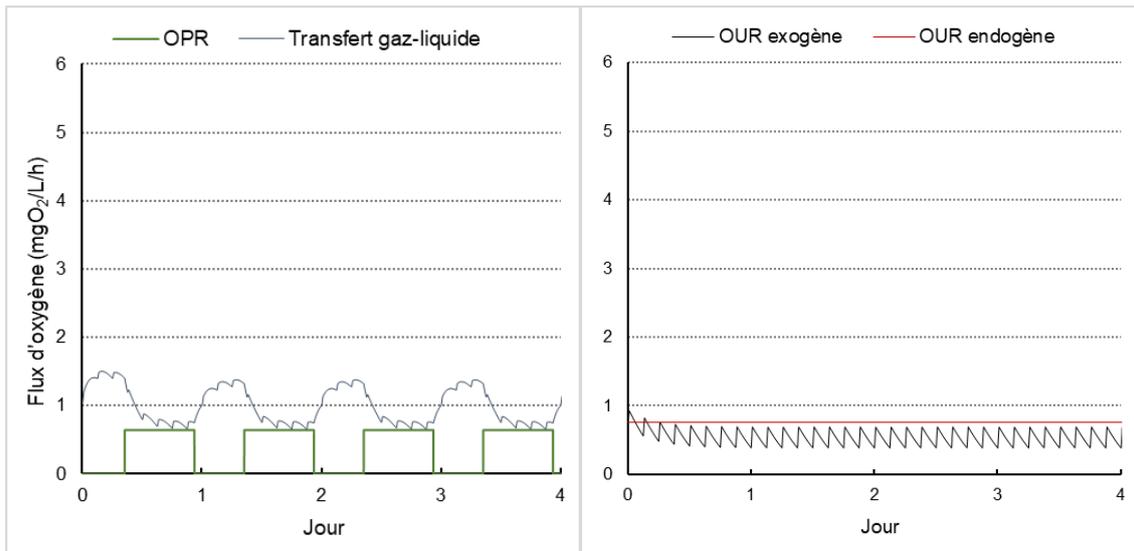
**Figure 109.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pour « EU standard + ADB 5j »



**Figure 110.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant « EU sans viandox + ADB 5j »

En comparant les EU standard (**Figure 109**) et les EU sans viandox (**Figure 110**), on constate que :

- L'OPR a mis en évidence les périodes jour-nuit. Par ailleurs, l'activité des microalgues a été plus importante dans les EU sans viandox avec un terme OPR de  $0.75 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  contre  $0.22 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour les EU standard. Les microalgues ont été favorisées car les EU sans viandox ont fourni moins de MO à oxyder aux bactéries. De plus, sans la coloration brune apportée par l'extrait de viande, les cellules algales ont bénéficié d'un accès optimal à la lumière, et la photosynthèse a été plus performante dans les eaux usées clarifiées.
- L'oxydation par les bactéries hétérotrophes a varié avec une plus grande amplitude dans les EU standard ( $1.2$  et  $4 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) que les EU sans viandox ( $0.25$  et  $0.62 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), car il y a eu plus de matière organique à oxyder dans le premier cas.
- Quand la culture a été alimentée avec les EU sans viandox, le transfert gaz-liquide a été prédominant par rapport à l'OPR. De plus, la tendance du transfert a différé. Le transfert a été faible en journée et très élevé la nuit (**Figure 110**). Avec les eaux usées standard, le transfert a été plutôt stable (entre  $2.5$  et  $3.2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) (**Figure 109**). En l'occurrence, avec une charge organique réduite, plus d'oxygène  $O_2$  s'est accumulé dans le système pendant la journée, car les microalgues ont produit de l'oxygène par photosynthèse et les bactéries ont eu une activité ralentie par manque de substrat organique comparé à des EU standard. Le terme global de transfert  $k_{La,O_2}(O_{2,sat} - O_2)$  a donc diminué. Pendant la nuit, le milieu de culture a été moins concentré en oxygène dissous, car l'activité photosynthétique s'est arrêtée mais l'oxydation bactérienne a continué. Le terme global de transfert  $k_{La,O_2}(O_{2,sat} - O_2)$  a donc augmenté. Ces variations plus marquées du transfert gaz-liquide sont dues à la concentration en  $O_2$  du CHRA qui se rapproche de la concentration à saturation  $O_{2,sat}$ . En effet, les EU sans viandox ont ralenti les processus bactériens qui consommaient de l'oxygène. L'oxygène s'est accumulé et a donné des valeurs globales beaucoup élevées que les EU standard.



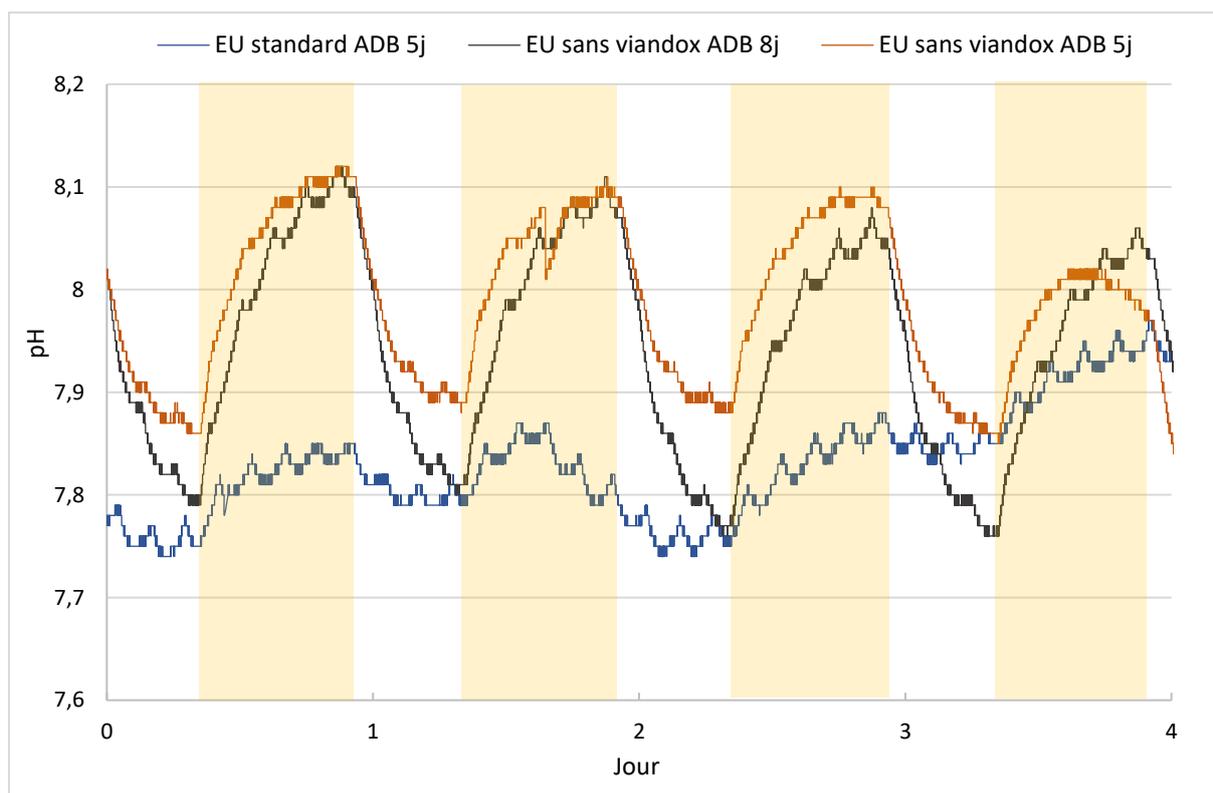
**Figure 111.** Évolution des termes OPR et transfert gaz-liquide (gauche) et OUR exogène et endogène (droite) pendant la modalité « EU sans viandox + ADB 8j »

Pour comprendre l'influence de l'âge des boues sur la dynamique de chaque microorganisme, les courbes du modèle (**Figure 110** et **Figure 111**) ont été comparées :

- Avec un ADB de 5 jours, la photosynthèse des microalgues a été plus importante atteignant  $0.76 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  contre  $0.64 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  à un ADB de 8 j (**Tableau 53**). Cette observation est en partie confortée par la productivité (**Tableau 51**). Bien que les productivités aux deux ADB ne soient pas significativement différentes (les intervalles de confiance se recoupent), la productivité moyenne est plus élevée à un ADB de 5 j. On peut donc supposer que la densité en microalgues était plus grande à un ADB de 5 j qu'à un ADB de 8 j, d'où l'activité photosynthétique accrue.
- Lorsque l'ADB a été fixé à 5 j, la consommation d'oxygène par les populations hétérotrophes et nitrifiantes (OUR exogène) a varié avec plus d'amplitude ( $0.24$  à  $0.62 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), car le débit d'alimentation a été plus important avec un TSH de cinq jours.
- Si l'activité des microalgues et des populations bactériennes a été plus forte (ADB 5 j) en raison d'une concentration en biomasse plus élevée, l'OUR endogène doit être plus élevé. Ce qui est le cas avec une valeur presque deux fois supérieure :  $1.56 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  contre  $0.76 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .
- Le transfert gaz-liquide d'oxygène a été plus important ( $1.1$  à  $2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) à 5 j d'ADB (**Figure 110**) comparé à 8 j ( $0.66$  à  $1.36 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), car les mécanismes biologiques impliquant l'oxygène ont été intensifiés et plus d'oxygène a été transféré de l'atmosphère vers le chenal.

### III.3.2.3.3. Suivi du pH

La **Figure 112** présente les variations du pH au sein du chenal pour les modalités « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox ».



**Figure 112.** Evolution du pH dans le CHRA pour « ADB 5j + EU standard », « ADB 5j + EU sans viandox » et « ADB 8j + EU sans viandox »

La réduction de la charge en MO et en azote implique une réduction de l'activité bactérienne, comme montré ci-dessus par l'interprétation des mesures d' $O_2$  dissous. Ainsi, l'acidification du milieu liée aux mécanismes d'oxydation (nitrification en particulier) se trouve atténuée. Dans le même temps, l'activité algale a bénéficié de l'absence du viandox avec un meilleur accès à la lumière et l'augmentation diurne du pH liée à la photosynthèse est moins compensée par l'activité bactérienne. Ainsi, les tendances du pH ont été très différentes selon une alimentation avec des EU standard ou des EU sans viandox et peptone.

Sur une journée, le pH a varié de 7,74 à 7,84 pour les EU standard et de 7,86 à 8,12 pour les EU sans viandox. Sans viandox (courbe noire et marron), il y a eu moins d'azote à nitrifier, le pH est donc un peu plus élevé. Lorsque la lumière a été éteinte à J0.91, le pH a chuté de 8,11 à 7,89 (EU sans viandox) et de 7,85 à 7,79 (EU standard). De plus, les fluctuations de pH causées par les injections d'eaux usées synthétiques ont été moins marquées.

Concernant l'impact de l'ADB, les variations de pH ont été similaires aux deux âges des boues testés avec les EU sans viandox. Avec un ADB plus long, le pH est descendu la nuit (J1.3) à 7,8 (ADB 8j) contre 7,9 (ADB 5j).

#### III.3.2.4. Conclusions

Cette partie de l'étude consistait à étudier l'influence d'un changement de composition des eaux usées (réduction de la DCO, de l'azote et de la couleur) pour deux âges de boues (= temps de séjour hydraulique) de 5 et 8 jours respectivement. Les observations et interprétations des données obtenues permettent de formuler les éléments de réponse suivants :

La couleur apportée par l'eau usée à traiter exerce un impact non négligeable sur le consortium : ainsi, la suppression de l'extrait de viande de la composition de l'effluent synthétique a permis d'augmenter la productivité et l'activité des microalgues.

1. Les processus d'oxydation ont été dépendants de la charge organique supplémentée au consortium microalgues-bactéries. La diminution des charges organique et en azote a comme attendu eu un effet principalement sur l'activité bactérienne : cela a pu être mis en évidence grâce aux données d'oxygène dissous interprétées grâce au modèle simplifié (respirométrie in-situ) et de pH.
2. Si l'on compare les deux ADB avec des EU sans viandox, un ADB de 5 j a été suffisant aux bactéries nitrifiantes du consortium pour oxyder plus de 90% de l'ammonium en nitrates. L'augmentation de l'ADB a stabilisé les performances de nitrification avec des écarts-types réduits pour l'abattement global de l'ammonium. Pour les EU sans viandox, la nitrification a été le mécanisme dominant de conversion de l'azote, car l'oxygène dissous élevé a éliminé la possibilité d'une dénitrification sous forme de  $N_2$  et l'assimilation par la biomasse a été minoritaire. La charge en MO (entre EU standard et EU sans viandox) des eaux usées influence les voies de conversion de l'azote dans le consortium.
3. La hausse de l'ADB de 5 à 8 jours n'a pas influencé la productivité de la biomasse, ni l'oxydation du substrat organique par les bactéries hétérotrophes.
4. Le phosphore n'a pas été éliminé par le CHRA, que ce soit par voie physicochimique avec précipitation des phosphates sous forme de sels ou par voie biologique avec une assimilation par le consortium microalgues-bactéries. Un TSH et un ADB plus longs sont peut-être nécessaires pour une réduction acceptable du phosphore dans l'effluent de sortie. Toutefois, ceci impliquerait un plus grand volume et une plus grande surface à occuper pour le chenal.
5. L'analyse de l'activité du consortium démontre une plus grande activité de la biomasse algale pour les EU sans Viandox : la photosynthèse devient alors beaucoup plus importante pour supporter l'activité bactérienne que dans les modalités précédentes.

La modélisation est un outil de suivi prometteur pour le CHRA, car il fournit des informations complémentaires aux analyses classiques sur le consortium microalgues-bactéries. L'interprétation des données de productivité démontrait que la production de biomasse était similaire pour les 2 ADB (à noter un potentiel manque de données pour conforter cette conclusion). Grâce au calage du modèle sur les données expérimentales, il apparaît que les termes  $\mu_{BX}$  et  $OPR_{max}$  sont supérieurs à un ADB de 5 j comparé à 8 j (même s'il n'est pas possible de distinguer le taux de croissance de la concentration). La modélisation de l'oxygène dissous permet d'appuyer ou de nuancer certaines conclusions relatives à la productivité ou au traitement des eaux usées. Ainsi, l'influence de la couleur du viandox a été mis en avant par un  $OPR$  plus élevé dans les EU sans viandox. L'effet de charge organique sur les populations hétérotrophes et nitrifiantes a été illustré dans les EU standard par un terme  $\mu_{BX}$  qui a presque doublé et qui témoigne d'une activité bactérienne plus importante. Ce modèle distingue, de manière simple avec des données expérimentales facilement accessibles, un ensemble d'interactions biologiques et physiques dans le système telles que la respiration exogène, la photosynthèse, la respiration endogène et le transfert gaz-liquide d'oxygène.

### III.4. ACV

L'ensemble des résultats précédents démontrent une certaine capacité du chenal à haut rendement algal pour le traitement des effluents, sans apport d'énergie mécanique pour l'aération autre que celle nécessaire au mélange avec la roue à aube. La facilité d'exploitation est également un avantage potentiel de ce type de filière. La question de la récupération de la biomasse traitée et de sa préparation en vue d'une valorisation éventuelle (par exemple sous forme de biocarburant) nécessite toujours d'être investiguée.

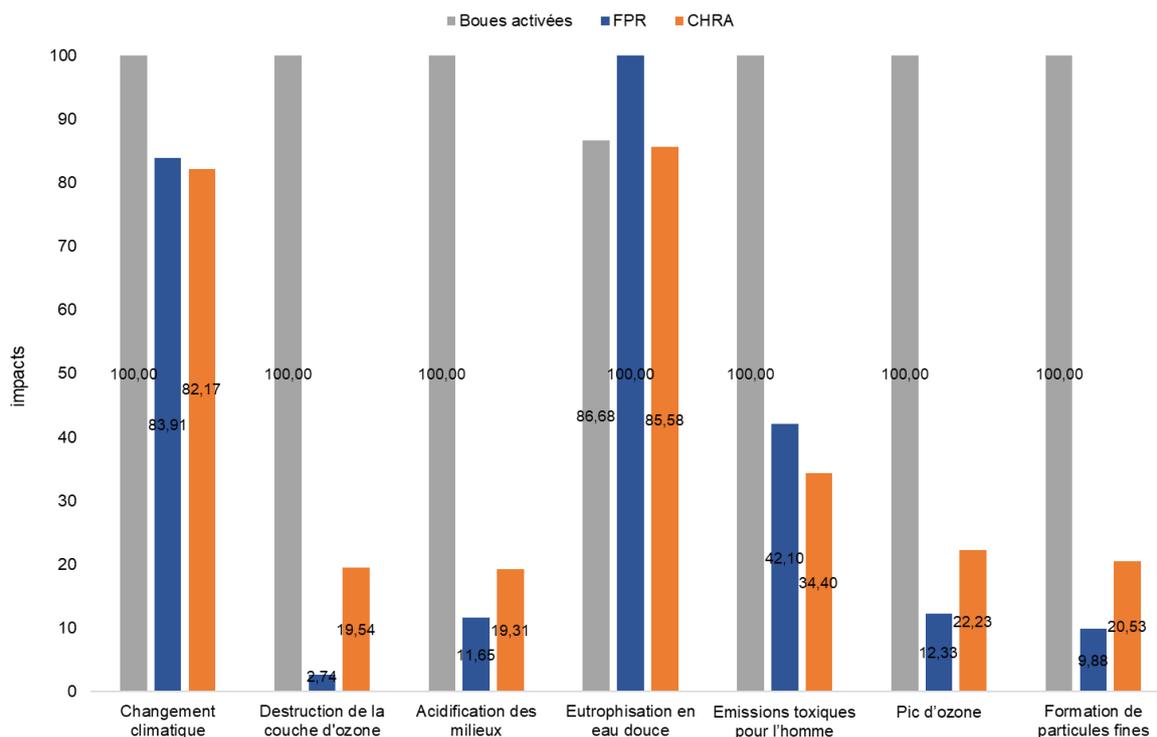
Afin d'extrapoler l'application d'un chenal à taille réelle et évaluer de manière objective la pertinence environnementale de ce procédé, une Analyse du Cycle de Vie simplifiée est ici proposée.

Pour rappel, trois stations de traitement des eaux usées d'une capacité de 1500 EH ont été comparées : les boues activées (BA), le filtre planté de roseaux (FPR) et le chenal à haut rendement algal (CHRA). La méthodologie a été expliquée dans II.3. Analyse du Cycle de Vie (ACV). Cette section a pour objectif d'exploiter et d'interpréter les impacts environnements issus du logiciel ACV4E. Les valeurs brutes ont été récupérées d'ACV4E et mises en forme avec un tableur Excel. Le détail des impacts environnementaux peut être trouvé en Annexe A.

#### III.4.1. Comparaison entre BA, FPR et CHRA

Cette section permet de mieux appréhender l'impact individuel de chaque filière et son ampleur, mais également de comprendre la signification des impacts. Les impacts ont des unités et des ordres de grandeur différents, ce qui rend difficile la présentation des résultats. Pour comparer les filières entre elles et présenter les données dans un seul graphique, les unités des impacts (**Tableau 30**) ont été normalisées selon la valeur maximale dans chaque catégorie d'impact. Ici, les impacts englobent sans distinction l'exploitation, les rejets et émissions, la fin de vie des boues et les pathogènes. Ils sont présentés pour chaque scénario (BA, FPR et CHRA) dans les **Figure 113** et **Figure 114**. Les indicateurs d'impact ont été séparés en deux graphiques pour plus de clarté. L'infrastructure des installations n'a pas été considérée dans cette étude.

L'interprétation de certains indicateurs d'impact est beaucoup moins intuitive, car ce sont des impacts indirects liés à la production, au transport ou à la consommation électrique (impacts liés aux activités d'arrière-plan de la STEP) (Catel et al., 2018).



**Figure 113.** Impacts environnementaux des trois filières de traitement (1)

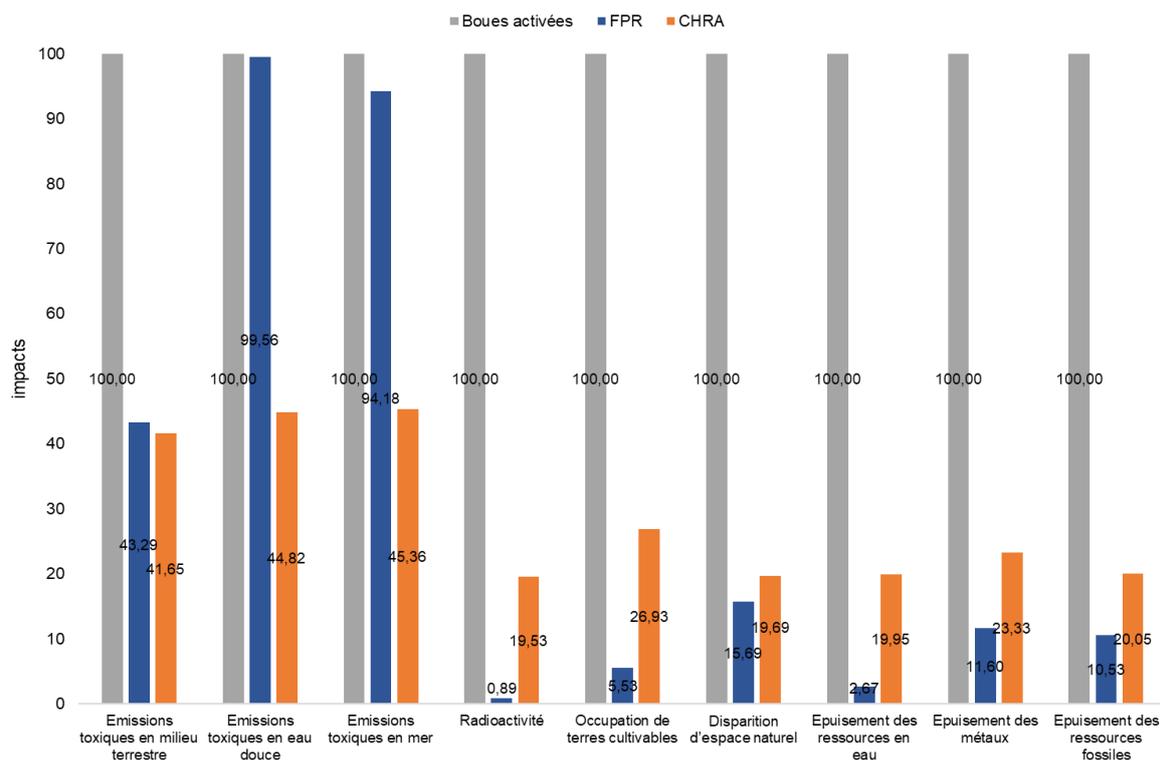
Globalement, la filière BA apparaît la plus impactante pour sept indicateurs d'impacts sauf l'eutrophisation en mer (**Figure 113**). Le FPR est dominant pour l'eutrophisation en eau douce et en mer. Le procédé qui occupe la seconde place en termes d'impact (le FPR ou le CHRA) dépend des facteurs : le chenal est le second plus impactant pour la destruction de la couche d'ozone, l'acidification des milieux, le pic d'ozone et la formation de particules fines, tandis que le FPR prend la seconde place pour le changement climatique et les émissions toxiques pour l'homme. À présent, nous allons décrire brièvement chaque indicateur et tenter d'expliquer pourquoi une filière a plus d'impact qu'une autre.

- Le facteur **changement climatique** est rapporté au kg CO<sub>2</sub> eq et englobe les gaz à effet de serre comme le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), la vapeur d'eau (H<sub>2</sub>O), le méthane (CH<sub>4</sub>) et le protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O). En traitement des eaux usées, les gaz à effet de serre peuvent être émis par oxydation de la MO par les hétérotrophes (CO<sub>2</sub>), lors de la décomposition de la biomasse/boue (CH<sub>4</sub>) ou par les processus de dénitrification hétérotrophe et les processus de nitrification autotrophe (N<sub>2</sub>O) (Bollon et al., 2013). Il y a aussi le CO<sub>2</sub> fossile produit lors des différents procédés impliqués dans le cycle de vie des stations d'épuration. La BA a un impact supérieur car, c'est une installation plus complexe avec des besoins énergétiques plus importants pour le fonctionnement et la maintenance. Le FPR et le CHRA ont des impacts plus faibles, ce qui est cohérent avec la relative simplicité des installations.
- La **destruction de la couche d'ozone**, exprimée en quantités de CFC-11 (fréon 11), fait référence à la contribution d'un composé à la destruction de la couche d'ozone causée en grande partie par les transports avec combustion de diesel (Risch and Boutin, 2011). Dans notre scénario, les trajets entre la station d'épuration et les champs pour épandre

les boues y contribuent ainsi que l'entretien ponctuel des abords du site (désherbage mécanique, faucardage des roseaux). La filière BA présente de nouveau un impact dominant suivi par le CHRA et le FPR. Les trajets aller-retour pour l'entretien régulier sont 2.5 fois plus nombreux pour le procédé à BA.

- Les composés qui contribuent à l'**acidification des milieux** sont les  $SO_x$  et les  $NO_x$ . Le dioxyde de soufre se transforme en  $H_2SO_4$  au contact de l'humidité (ou les  $NO_x$  en  $HNO_3$ ), ce qui résulte en des pluies acides. Ces gaz proviennent principalement de la combustion de matières fossiles, de la décomposition de la matière organique. Ainsi, la station par BA est respectivement 6.5 fois plus impactante que le CHRA et 8.7 fois que le FPR. De plus, l'opérateur d'une station à BA effectue 2.5 fois plus de trajets que pour les deux autres filières extensives, ce qui résulte en plus d'émissions de  $SO_x$  et  $NO_x$ .
- Concernant l'**eutrophisation en eau douce** (kg P eq), le constat est plus nuancé car, cet indicateur est directement lié aux performances de traitement du phosphore. Comme les systèmes atteignent des abattements équivalents pour une même charge polluante en entrée, les impacts sont du même ordre de grandeur. En effet, les flux en sortie contiennent les mêmes quantités de composés phosphorés apportées au cours d'eau douce. Pour le FPR qui est le plus impactant des trois filières, les phosphates non précipités contribuent au score élevé en eutrophisation en eau douce (Risch and Boutin, 2011). Dans le bilan matière, trois-quarts du phosphore total se retrouve dans l'effluent de sortie contre 59% pour la BA et 64.4% pour le CHRA. C'est pour cela que la BA et le CHRA ont des scores plus modérés.
- Pour les **émissions toxiques pour l'homme**, la substance de référence est le 1,4-DCB (1,4-Dichlorobenzène). Ces indicateurs mesurent les risques d'une substance pour la santé humaine. Pour la santé humaine, la station à BA représente un impact 2.5 fois plus important que le FPR et 3.7 fois plus important que le CHRA.
- Le kg de COVNM de la catégorie **pic d'ozone** correspond aux composés organiques volatils non méthaniques (aussi appelés précurseurs d'ozone) qui sont principalement issus de la combustion. Comme les boues ne sont pas incinérées, les émissions dues au transport et à d'autres opérations intervenant dans le cycle génèrent la majorité des impacts. Comme les BA nécessitent une plus grande dépense énergétique et plus de transport, l'impact est plus élevé que pour le FPR et le CHRA.
- La formation de **particules fines** est donnée en kg PM10, dont le diamètre est inférieur à 10  $\mu m$ . Elles peuvent déclencher des troubles respiratoires et cardiovasculaires chez l'Homme. Le FPR et le CHRA génèrent des impacts 11.3 fois et 5.6 fois moins importants que la filière par BA. Cette différence peut se justifier par la fréquence réduite des déplacements de l'opérateur pour le FPR et CHRA comparé à la station à BA.

Pour les neuf indices d'impact suivants, la filière boues activées est à nouveau la plus impactante suivie par le CHRA et le FPR (**Figure 114**).



**Figure 114.** Impacts environnementaux des trois filières de traitement (2)

- Comme pour les émissions toxiques pour l'homme, les **émissions toxiques en milieu terrestre, en eau douce et en mer** ont pour substance de référence le 1,4-DCB (1,4-Dichlorobenzène). Les impacts du FRP et du CHRA sont semblables pour les émissions toxiques en milieu terrestre et 2.5 fois inférieurs au procédé BA. Enfin, les BA et le FPR ont des impacts quasi-identiques pour les émissions en eau douce et en mer tandis que le CHRA est 2.3 fois moins impactant.
- Si l'on s'intéresse à la **radioactivité**, les boues activées ont un impact 5.5 fois plus élevé plus que le CHRA. La catégorie « Radioactivité » est liée à consommation électrique des stations. L'électricité française est principalement d'origine nucléaire (75%) et émet de la radioactivité. L'impact dominant des BA s'explique par la consommation électrique plus importante de ce genre de système. Dans une station de type « Boues activées » en France, l'aération du bassin biologique représente 35 à 50% de la dépense en énergie, suivi par l'agitation de 8 à 20% (Stricker et al., 2017). Il faut tout de même noter que le procédé à boues activées est le moins énergivore des systèmes de traitement intensif avec  $3.2 \text{ kWh.kg}^{-1}$  de  $\text{DBO}_5$  éliminé (Stricker et al., 2017). L'impact plus modéré du CHRA est causé par la consommation électrique de la roue à aubes, moins énergivore que la technologie d'aération des bassins à BA. Le FPR a un impact presque nul, car le système ne consomme quasiment pas d'électricité (notamment dans le cas d'une alimentation gravitaire en effluents). Pour le CHRA et le FPR, les points de dépense d'énergie se situent au niveau du dégrillage et du pompages (le fonctionnement des appareils électroniques est négligé).
- L'**occupation des terres cultivables** est comptabilisée en  $\text{m}^2$  par année. Cette catégorie indique « l'emprise de toutes les activités induites durant le cycle de vie du système sur des terres agricoles (Notice et aide du logiciel ACV4E, 2018) ». Le scénario avec les BA

est à nouveau le plus impactant suivi par le CHRA et le FPR. Au quotidien, les boues activées génèrent de plus grandes quantités de boues que le FPR ou CHRA, ce qui suppose un épandage plus fréquent sur l'année ou sur de plus grandes surfaces. Ainsi, « l'occupation des surfaces agricoles » par l'épandage des boues a plus d'incidence pour cette filière. Le raisonnement est similaire avec le CHRA qui produit plus de boues que le FPR.

- La **disparition d'espace naturel** calculée en m<sup>2</sup> désigne la « transformation d'une surface dédiée à un type d'utilisation en une surface dédiée à un autre type d'utilisation (ex : site industriel) (*Notice et aide du logiciel ACV4E*, 2018) ». La filière BA est la plus impactante des trois stations étudiées. Le FPR et le CHRA génèrent des impacts équivalents respectivement de 15.7 et 19.7. Cet impact est dû à la fréquence du transport par camion (« Transport, lorry 3.5-7.5t » dans Ecoinvent) entre la station d'épuration et le lieu d'épandage (distance de 20 km) (Risch and Boutin, 2011). Le transport est plus important dans le cas de la STEP BA du fait de plus grandes quantités produites.
- L'**épuisement des ressources en eau** est donné en m<sup>3</sup>. Le scénario BA obtient l'impact le plus élevé suivi par le canal et le filtre planté de roseaux. C'est un impact indirect lié au transport, à l'énergie nécessaire...
- L'**épuisement des ressources fossiles**, calculé en kg pétrole, représente l'épuisement des énergies ou combustibles fossile comme le pétrole, le charbon, le gaz naturel (*Notice et aide du logiciel ACV4E*, 2018). Dans nos scénarios, la combustion de carburant pour le transport ou l'entretien des abords des installations (faucardage, désherbage, tonte) peuvent représenter les principales contributions à cet indicateur. La filière BA obtient l'impact le plus important en raison des nombreux déplacements nécessaires au bon fonctionnement de la STEP. Le CHRA et le FPR sont des procédés plus rustiques moins demandeurs de main d'œuvre sur place, d'où les impacts nettement réduits dans cette catégorie. On peut également attribuer cet impact à la consommation d'énergie électrique, dont une partie reste produite à l'aide de combustibles fossiles malgré la part prédominante du nucléaire dans le mix énergétique français.

Dans la quasi-totalité des catégories, la station à BA exerce un impact environnemental majeur comparé aux autres solutions de traitement. Lors d'une étude similaire sur des unités de traitement pour des communautés rurales (Garfí et al., 2017), l'impact du traitement conventionnel avec les boues activées a été 2 à 5 fois plus élevé que celui généré par les systèmes extensifs (FPR et CHRA), selon la catégorie d'impact. Cette ACV préalable aboutit aux mêmes conclusions avec une filière BA bien plus impactante que les filières alternatives. Toutefois, il faut rappeler que l'infrastructure et la construction n'ont pas été incluses dans les scénarios. Sachant que l'emprise foncière des filières CHRA et FPR est beaucoup plus importante, cela nuancerait probablement ces conclusions. Aussi, le FPR nécessite l'import de granulats pour les couches filtrantes, dont l'impact en termes d'extraction et de transport ne sont sans doute pas négligeables. Concernant la construction du CHRA, cela dépendrait très fortement des matériaux de construction employés (béton, géomembranes...).

### III.4.2. Exploitation, Rejets et émissions, Fin de vie des boues et Pathogènes

Dans cette section, on s'intéresse à chaque filière séparément. Les flux qui contribuent aux indices d'impact (Changement climatique, Eutrophisation en eau douce, Radioactivité...) sont répartis sous quatre volets : **Exploitation, Rejets et émissions, Fin de vie des boues et Pathogènes**. L'objectif est de déterminer dans quelle mesure ces étapes sont responsables de l'impact environnemental d'une filière donnée et les améliorations possibles à envisager.

Pour rappel, l'ACV prend en compte la totalité des flux directs et indirects impliqués dans le cycle de vie de la station d'épuration. Dans le rapport sur l'ACV de la filière Boues activées (Boutin et al., 2010), l'inventaire de toutes les étapes dénombre :

- **Exploitation** : Entretien ponctuel (tonte de l'herbe, faucardage des roseaux, débroussaillage, transport, fin de vie des roseaux), Curage de l'installation, Consommation électrique des équipements (pompes, aération...), Transport de l'opérateur de la station
- **Rejets et émissions** à l'eau et à l'air par le traitement des eaux usées et le conditionnement des boues
- **Fin de vie des boues** : Transport et épandage
- Les **Pathogènes** dépendent des activités (domestiques et/ou industrielles), du nombre d'équivalent habitants et du type de traitement mis en œuvre. En épuration des eaux usées, ils se concentrent dans les boues par décantation ou par adsorption sur les MES.

Il est à noter que l'**infrastructure**, non considérée ici, génère une partie significative des impacts pour : Pic d'ozone, Formation de particules fines, Emissions toxiques en eau douce, Disparition d'espace naturel, Epuisement des ressources en eau, Epuisement des métaux, Epuisement des ressources fossiles.

L'ensemble des impacts environnementaux avec les catégories Exploitation, Rejets et émissions, Fin de vie des boues et Pathogènes sont listés ci-dessous dans les **Tableau 54**, **Tableau 55** et **Tableau 56**.

	<b>Exploitation</b>	<b>Rejets et émissions</b>	<b>Fin de vie des boues</b>	<b>Pathogènes</b>
<b>Changement climatique</b>	15.9%	<b>79.1%</b>	5.0%	0%
<b>Destruction de la couche d'ozone</b>	<b>96.9%</b>	0%	3.1%	0%
<b>Acidification des milieux</b>	<b>66.9%</b>	0%	33.1%	0%
<b>Eutrophisation en eau douce</b>	0.4%	<b>88.6%</b>	11.0%	0%
<b>Eutrophisation en mer</b>	0.2%	49.7%	<b>50.1%</b>	0%
<b>Emissions toxiques pour l'homme</b>	5.7%	16.4%	0.4%	<b>77.5%</b>
<b>Pic d'ozone</b>	<b>80.8%</b>	0%	19.2%	0%
<b>Formation de particules fines</b>	<b>79.2%</b>	0%	20.8%	0%

<b>Emissions toxiques en milieu terrestre</b>	24.0%	<b>64.3%</b>	11.7%	0%
<b>Emissions toxiques en eau douce</b>	<b>68.7%</b>	29.2%	2.1%	0%
<b>Emissions toxiques en mer</b>	<b>67.2%</b>	30.2%	2.6%	0%
<b>Radioactivité</b>	<b>99.8%</b>	0%	0.2%	0%
<b>Occupation de terres cultivables</b>	<b>95.7%</b>	0%	4.3%	0%
<b>Disparition d'espace naturel</b>	<b>76.5%</b>	0%	23.5%	0%
<b>Epuisement des ressources en eau</b>	<b>97.7%</b>	0%	2.3%	0%
<b>Epuisement des métaux</b>	<b>89.7%</b>	0%	10.3%	0%
<b>Epuisement des ressources fossiles</b>	<b>85.3%</b>	0%	14.7%	0%

**Tableau 54.** Impacts environnementaux de la filière BA

- De manière globale, l'exploitation de la STEP est responsable d'une majeure partie des impacts environnementaux, soit 12 sur 17 facteurs d'impact. Cette étape comprend la forte consommation énergétique pour aérer en permanence les bassins à boues activées et apporter mécaniquement l'oxygène nécessaire. Pour diminuer l'impact du fonctionnement de la station, la réduction de la dépense énergétique est à envisager. D'une part, l'optimisation de l'aération via des algorithmes plus poussés de régulation ainsi que l'optimisation du transfert lui-même (nouveaux types de surpresseurs et diffuseurs, optimisation hydrodynamique...) paraît indispensable. D'autre part, la récupération d'énergie sur la filière de traitement, par exemple via la valorisation des boues d'épuration par méthanisation, permettrait de couvrir une partie des besoins en énergie. Cependant, la pertinence de l'installation de méthaniseurs peut être questionnée vu la faible capacité de la station modélisée ici. Les scénarios de fin de vie des boues sont peut-être à diversifier. Les déplacements fréquents de l'opérateur pour la maintenance expliquent également l'impact premier de l'exploitation.
- Les rejets et émissions génèrent la majorité des impacts pour le changement climatique, l'eutrophisation en eau douce et les émissions toxiques en milieu terrestre. Étant donné qu'il n'y a pas de déphosphatation plus poussée avant rejet dans le milieu pour la station modélisée ici, les rejets et émissions participent en grande partie au facteur d'eutrophisation et à la formation de composés potentiellement toxiques en milieu terrestre.
- La fin de vie des boues et les rejets/émissions participent de manière équivalente à l'eutrophisation en mer. Il y a un possible lessivage de certains composés des boues après épandage, qui apportent une charge nutritive trop élevée au milieu marin et favorisent une eutrophisation. Ensuite, l'épandage ou le stockage des boues génèrent des composés gazeux qui peuvent participer aux pluies acides.

	Exploitation	Rejets et émissions	Fin de vie des boues	Pathogènes
Changement climatique	1.2%	<b>97.5%</b>	1.3%	0%
Destruction de la couche d'ozone	<b>73.1%</b>	0%	26.9%	0%
Acidification des milieux	31.9%	0%	<b>68.1%</b>	0%
Eutrophisation en eau douce	0%	<b>97.8%</b>	2.1%	0%
Eutrophisation en mer	0%	<b>96.9%</b>	3.1%	0%
Emissions toxiques pour l'homme	0.7%	30.5%	0.2%	<b>68.6%</b>
Pic d'ozone	<b>62.6%</b>	0%	37.4%	0%
Formation de particules fines	49.4%	0%	<b>50.6%</b>	0%
Emissions toxiques en milieu terrestre	6.2%	<b>87.6%</b>	6.1%	0%
Emissions toxiques en eau douce	5.5%	<b>94.0%</b>	0.5%	0%
Emissions toxiques en mer	5.5%	<b>93.9%</b>	0.6%	0%
Radioactivité	<b>95.2%</b>	0%	4.8%	0%
Occupation de terres cultivables	81.1%	0%	18.9%	0%
Disparition d'espace naturel	<b>64.1%</b>	0%	35.9%	0%
Epuisement des ressources en eau	<b>79.7%</b>	0%	20.3%	0%
Epuisement des métaux	<b>78.7%</b>	0%	21.3%	0%
Epuisement des ressources fossiles	<b>66.5%</b>	0%	33.5%	0%

Tableau 55. Impacts environnementaux de la filière FPR

Le FPR, étant un système extensif, amène une réflexion différente sur la place des étapes dans son cycle de vie.

- L'exploitation est dominante dans huit catégories d'impacts environnementaux, ce qui est inférieur à ce qu'on a observé pour les BA. Comme il n'y a presque pas de demande en énergie pour ce type de système et que le transport de l'opérateur a diminué comparativement aux BA, la contribution en ordre de grandeur est aussi réduite.
- Les rejets et émissions participent à la quasi-totalité des six facteurs de changement climatique, eutrophisation et émissions toxiques. Ceci est cohérent, car la phase d'exploitation est moins impactante : le FPR est un système relativement « autonome » qui demande peu de main d'œuvre ou d'intervention. Il n'y a pas d'équipement électrique qui fonctionne en permanence. L'étape « Rejets et émissions » dans le cycle de vie de ce procédé occupe donc une plus grande place pour plusieurs indices.
- La fin de vie des boues est le principal contributeur pour deux facteurs d'impact : l'acidification des milieux et l'émission de particules fines. L'explication est similaire

aux BA avec des émissions causées lors du transport, du stockage et de l'épandage des boues aux champs agricoles.

	Exploitation	Rejets et émissions	Fin de vie des boues	Pathogènes
Changement climatique	4.1%	<b>95.7%</b>	0.2%	0%
Destruction de la couche d'ozone	<b>99.7%</b>	0%	0.3%	0%
Acidification des milieux	<b>92.6%</b>	0%	7.4%	0%
Eutrophisation en eau douce	0.1%	<b>99.6%</b>	0.4%	0%
Eutrophisation en mer	0%	<b>99.4%</b>	0.6%	0%
Emissions toxiques pour l'homme	4.5%	40%	0.1%	55.5%
Pic d'ozone	<b>96.6%</b>	0.1%	3.4%	0%
Formation de particules fines	<b>95.5%</b>	0%	4.5%	0%
Emissions toxiques en milieu terrestre	13.6%	<b>86.2%</b>	0.3%	0%
Emissions toxiques en eau douce	33.0%	<b>66.8%</b>	0.2%	0%
Emissions toxiques en mer	31.8%	<b>67.9%</b>	0.2%	0%
Radioactivité	<b>100%</b>	0%	0%	0%
Occupation de terres cultivables	<b>95.3%</b>	0%	4.7%	0%
Disparition d'espace naturel	<b>98.0%</b>	0%	2.0%	0%
Épuisement des ressources en eau	<b>99.5%</b>	0%	0.5%	0%
Épuisement des métaux	<b>97.3%</b>	0%	2.7%	0%
Épuisement des ressources fossiles	<b>98.5%</b>	0%	1.5%	0%

**Tableau 56.** Impacts environnementaux de la filière CHRA

- Concernant le chenal, on attribue au fonctionnement plus de 90% des impacts dans dix indicateurs : la destruction de la couche d'ozone, l'acidification des milieux, le pic d'ozone, la formation de particules fines, la radioactivité, l'occupation de terres cultivables, la disparition d'espace naturel, l'épuisement des métaux, des ressources en eau et des ressources fossiles. Par ailleurs, la part de l'exploitation est plus importante que dans le cas du FPR. Bien que le CHRA soit une filière dite extensive comme le FPR, il requiert une consommation électrique plus élevée pour le mélange continu des eaux usées par la roue à aubes.
- Les rejets de la station sont majoritaires pour 6 facteurs d'impacts environnementaux suivi les pathogènes dans les émissions toxiques pour l'homme. Les facteurs sont identiques aux facteurs d'impact du FPR.

- Dans ce scénario, la fin de vie des boues a un impact très mineur pour chaque indicateur comparé aux deux autres filières, car la production de biomasse est relativement moins importante.

### III.4.3. Conclusions

L'ACV aide à identifier les contributeurs majeurs aux divers impacts environnementaux dans chaque système. Elle permet aussi de comparer différents scénarios de traitement des eaux usées entre eux. Il est possible de détailler individuellement chaque technologie et comprendre dans quelle mesure une étape du cycle de vie intervient dans une catégorie d'impact. Les indices « *midpoint* » fournissent un compte-rendu exhaustif des acteurs de chaque facteur d'impact (étapes du cycle de vie, réactifs, process...). Sur les trois systèmes étudiés, le FPR et le CHRA obtiennent les impacts les plus faibles. La filière BA a obtenu un score environnemental moins bon, notamment en raison d'une consommation en électricité accrue pour l'aération des bassins et le besoin plus fréquent d'intervention sur site par un opérateur.

En perspective, il serait bien évidemment intéressant d'inclure l'impact de l'infrastructure pour une ACV plus complète et réaliste des trois procédés. Un inventaire de l'infrastructure pour le chenal est donc à réaliser. Celui-ci devra prendre en compte le type de matériaux de construction employés qui sont variés pour ce type de réacteur. Pour étendre l'approche, une ACV des chaînes de production de biocarburant à partir de la biomasse produite par le CHRA est à envisager.

## Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, le traitement des eaux usées a été envisagé sous l'aspect de la durabilité, d'une meilleure gestion de la ressource en eau et de la récupération des ressources des effluents. Les procédés utilisant un consortium microalgues/bactéries s'inscrivent dans cette optique avec une dépense énergétique modérée, une facilité de mise en œuvre, un caractère autonome avec un besoin réduit en main d'œuvre sur place ainsi que l'assimilation des nutriments au sein de la biomasse cultivée. Par ailleurs, leur relative autonomie en fait des systèmes particulièrement adaptés à des territoires isolés ou ruraux. Il s'agit d'une réponse potentielle plus adaptée à certains scénarios d'épuration, à défaut des unités de traitement conventionnelles comme les bassins à boues activées.

Ainsi, deux systèmes de traitement ont été évalués : le photobioréacteur séquentiel (PBR) et le chenal à haut rendement algal (CHRA). Dans les cultures pures de microalgues, les deux procédés sont souvent comparés du fait de leurs configurations distinctes et les variétés de performances. Le photobioréacteur est un système compact à géométries très diverses (tubulaires, plat...) qui repose sur un éclairage artificiel. Le chenal constitue une infrastructure rustique que l'on retrouve en extérieur avec une grande emprise foncière. Ces technologies ont été transposées au traitement des eaux usées pour allier épuration et production de biomasse valorisable.

D'après nos expérimentations, les deux pilotes se sont distingués par leurs performances de traitement et la production de biomasse. Le PBR a abouti à des performances épuratoires de la DCO très satisfaisantes. Les concentrations et les rendements épuratoires ont respecté les normes imposées. Le CO<sub>2</sub> n'a pas semblé impacter l'épuration de la DCO. L'azote a surtout été traité par la nitrification bactérienne, et une dénitrification a aussi eu lieu en absence de lumière suivant le démarrage du cycle d'alimentation en affluent. L'ajout du CO<sub>2</sub> n'a pas eu un impact significatif sur ces mécanismes. Toutefois, la dynamique du pH et de l'oxygène dissous au cours des cycles a été influencée par l'injection de CO<sub>2</sub>. En effet, le pH a été régulé autour de 7.5 et a varié avec moins d'amplitude. Les variations de l'oxygène ont aussi été modérées par l'ajout de CO<sub>2</sub>. Si le mode séquentiel est intéressant en traitement des eaux usées, il pose une contrainte et soulève la question d'une application à échelle industrielle. Pour la suite de cette thèse, les expériences ont été faites dans un CHRA, qui constitue le système le plus courant pour la culture de microalgues/bactéries en traitement des eaux usées.

Durant la phase d'expérimentation avec le CHRA, différentes modalités opératoires ont été examinées sur le pilote : la vitesse d'agitation, la variabilité des eaux usées réelles en changeant la charge en matière organique ou en azote en entrée, et l'âge de boues de la culture. Chaque condition opératoire testée a mis en avant des abattements épuratoires satisfaisants pour la matière organique et les composés azotés. Toutefois, l'élimination du phosphore reste à ce jour un verrou dans l'épuration par le chenal. Pour diminuer la consommation énergétique, la vitesse d'agitation a été réduite et a eu un impact peu significatif sur la productivité et la composition de la biomasse. Mais la réduction importante du transfert gaz-liquide associée a modifié la dynamique du consortium à travers l'augmentation de l'activité photosynthétique. L'apport nutritionnel des eaux usées synthétiques a influencé la production de biomasse par le

consortium et les performances épuratoires. Ensuite, la couleur des EU génère un impact sur le consortium : le retrait de l'extrait de viande de l'effluent synthétique a permis d'augmenter la productivité et l'activité des microalgues.

La détermination de la composition biochimique de la biomasse produite est une information d'intérêt pour le choix de la conversion en biocarburant. Globalement, la composition biochimique du consortium a été relativement stable, quel que soit le paramètre opératoire étudié. D'une part, la stabilité de la composition face à des EU variables ou un changement de facteur opératoire peut constituer un atout dans l'optique d'une valorisation énergétique (régulation du procédé, fiabilité). D'autre part, la valorisation de la biomasse reste à investiguer car le contenu lipidique et glucidique actuel demeure sans doute trop faible pour produire un biocarburant en grandes quantités.

Le suivi de la dynamique entre les microalgues et les bactéries a été réalisé par une acquisition en continu de données d'oxygène dissous et la simulation grâce à un modèle simplifié de ces mesures expérimentales. Ce protocole a rendu possible la discrimination des populations de microorganismes et les mécanismes biologiques associés : la photosynthèse, l'oxydation bactérienne hétérotrophe et la nitrification, la respiration endogène. Le transfert gaz-liquide majoritairement généré par l'agitation via la roue à aubes a été également pris en compte. La modélisation des données d'oxygène pourrait s'avérer à terme un outil de suivi complémentaire et indispensable de la santé du consortium au sein du chenal, et se distingue, de la mesure classique des MES et des MVS qui est somme toute quantitative, par la finesse et l'exhaustivité dans l'interprétation de données relativement brutes. Au sein du chenal, ces résultats mettent en exergue le rôle prépondérant du transfert gaz-liquide (agitation liée à la roue à aubes) dans le bilan en oxygène. L'activité photosynthétique a pu être augmentée en faisant varier notamment la couleur et la charge polluante de l'eau usée à traiter.

L'étude des différentes configurations et conditions opératoires durant cette thèse démontre que l'équilibre entre les communautés de microorganismes constitue l'élément clé permettant de comprendre les mécanismes et d'optimiser cette filière que l'on pourrait qualifier, par analogie avec le procédé à boues activées, de « procédé à biomasse photoactivée ».

Pour élargir la réflexion, une approche transversale a été adoptée avec une analyse du cycle de vie (ACV). Il s'agit d'une démarche d'éco-conception qui considère l'impact environnemental d'un objet ou d'un système depuis le berceau jusqu'à la tombe. Dans notre cas, l'objectif a été d'évaluer le chenal en tant que filière de traitement des eaux usées face à un procédé conventionnel intensif et un système extensif, dit basé sur la nature. L'infrastructure n'a pas été incluse dans notre approche. A la fin de l'ACV, il a été conclu que le CHRA et le filtre planté de roseaux étaient bien moins impactants d'un point de vue environnemental que la filière boues activées.

En perspective, on peut envisager de dimensionner un CHRA à plus grande échelle et de l'installer en extérieur ou sous serre en milieu rural avec une alimentation en continu d'eaux usées réelles. Ainsi, une meilleure compréhension de l'influence des facteurs environnementaux, saisonniers et opérationnels sur le consortium microalgues-bactéries et sur le système à grande échelle pourrait être acquise.



## Annexes

## Annexe A :ACV

## A.1 Bilan matière du CHRA

	ENTREE		SORTIE			TOTAL	
	Substances Eau Usée (g/(EH*j))		Emissions air	Rejets eau	Boues		
<b>N-Azote</b>	7.5	N-NH4		2.5	0.0	N-NH4	
	2.5	N-org		2.8	11.1	N-org	
	0	N-NO2		2.1	0.0	N-NO2	
	0	N-NO3		58.3	0.0	N-NO3	
		N-NH3	0			N-NH3	
		N-NO	0			N-NO	
		N-N <sub>2</sub> O	0.6			N-N <sub>2</sub> O	
		N-N <sub>2</sub>	22.6			N-N <sub>2</sub>	
	<b>10</b>	<b>N Tot. Entrée</b>	<b>23.2</b>	<b>65.7</b>	<b>11.1</b>	<b>100.0</b>	<b>N Tot, Sortie</b>
<b>P-Phosp.</b>	0.4	P-org		3.2	14.9	P-org	
	1.6	P-PO4		61.4		P-PO4	
	0	P-P2O5			20.5	P-P2O5	
	<b>2</b>	<b>P Tot. Entrée</b>		<b>64.6</b>	<b>35.4</b>	<b>100.0</b>	<b>P Tot, Sortie</b>
<b>C-Carbone</b>		C-CO2	67.3			C-CO2	
		C-CH4	0.4			C-CH4	
	45	C-inerte		11.5	20.8	C-org	
	0	C-DBO5		0	0	C-inerte	
	<b>45</b>	<b>C Tot. Entrée</b>	<b>67.7</b>	<b>11.5</b>	<b>20.8</b>	<b>100.0</b>	<b>C Tot, Sortie</b>
<b>ETM</b>	3.60 <sup>E-05</sup>	Cd	0	15.0	85.0	Cd	
	7.20 <sup>E-05</sup>	Hg	50	15.0	42.5	Hg	
	1.85 <sup>E-03</sup>	Ni	0	85.2	15.0	Ni	
	1.17 <sup>E-03</sup>	Pb	0	15.0	85.0	Pb	
	1.19 <sup>E-04</sup>	Co	0	85.0	15.0	Co	
	4.68 <sup>E-04</sup>	As	0	85.0	15.0	As	
	8.82 <sup>E-04</sup>	Mo	0	50.0	50.0	Mo	
	2.47 <sup>E-02</sup>	Zn	0	15.0	85.2	Zn	
	1.02 <sup>E-02</sup>	Ba	0	50.0	50.0	Ba	
	9.72 <sup>E-03</sup>	Cu	0	15.0	85.0	Cu	
	1.96 <sup>E-03</sup>	Cr	0	15.0	85.1	Cr	
	3.24 <sup>E-04</sup>	V	0	84.9	15.0	V	
<b>CTO</b>	1.80 <sup>E-04</sup>	Dichlorométhane	87.8	12.0	0.0	Dichlorométhane	
	5.40 <sup>E-06</sup>	Simazine		100.0	0.0	Simazine	
	3.96 <sup>E-05</sup>	2.4-dichlorophénol	0	48.0	52.0	2.4-dichlorophénol	

## A.2 Données brutes des impacts environnementaux des 3 filières

Boues activées									
	Unité	Total	Exploitation	Impact (%)	Rejets et émissions	Fin de vie des boues	Pathogènes	Impacts (%)	Total (%)
Changement climatique	kg CO2 eq	1,85E-01	2,94E-02	15,9	1,46E-01	79,1	9,28E-03	5,0	100,0
Destruction de la couche d'ozone	kg CFC-11 eq	2,21E-08	2,14E-08	96,9	0,00E+00	0,0	6,77E-10	3,1	100,0
Acidification des milieux	kg SO2 eq	1,82E-04	1,22E-04	66,9	0,00E+00	0,0	6,01E-05	33,1	100,0
Eutrophisation en eau douce	kg P eq	1,35E-03	5,57E-06	0,4	1,19E-03	88,6	1,48E-04	11,0	100,0
Eutrophisation en mer	kg N eq	2,43E-03	4,45E-06	0,2	1,21E-03	49,7	1,21E-03	50,1	100,0
Emissions toxiques pour l'homme	kg 1,4-DB eq	2,25E-01	1,29E-02	5,7	3,69E-02	16,4	9,66E-04	0,4	100,0
Pic d'ozone	kg NMVOC	9,46E-05	7,64E-05	80,8	1,82E-08	0,0	1,82E-05	19,2	100,0
Formation de particules fines	kg PM10 eq	6,07E-05	4,81E-05	79,2	0,00E+00	0,0	1,26E-05	20,8	100,0
Emissions toxiques en milieu terrestre	kg 1,4-DB eq	8,63E-06	2,07E-06	24,0	5,56E-06	64,3	1,01E-06	11,7	100,0
Emissions toxiques en eau douce	kg 1,4-DB eq	1,40E-03	9,99E-04	68,7	4,06E-04	29,2	2,98E-05	2,1	100,0
Emissions toxiques en mer	kg 1,4-DB eq	1,29E-03	8,66E-04	67,2	3,89E-04	30,2	3,31E-05	2,6	100,0
Radioactivité	kg U235 eq	1,86E-01	1,86E-01	99,8	0,00E+00	0,0	3,33E-04	0,2	100,0
Occupation de terres cultivables	m2a	1,34E-03	1,28E-03	95,7	0,00E+00	0,0	5,83E-05	4,3	100,0
Occupation d'espace urbain	m2a	3,62E-04	2,38E-04	65,7	0,00E+00	0,0	1,24E-04	34,3	100,0
Disparition d'espace naturel	m2	5,78E-06	4,42E-06	76,5	0,00E+00	0,0	1,36E-06	23,5	100,0
Epuisement des ressources en eau	m3	5,49E-04	5,37E-04	97,7	0,00E+00	0,0	1,24E-05	2,3	100,0
Epuisement des métaux	kg Fe eq	2,58E-03	2,32E-03	89,7	0,00E+00	0,0	2,66E-04	10,3	100,0
Epuisement des ressources fossiles	kg oil eq	9,29E-03	7,92E-03	85,3	0,00E+00	0,0	1,37E-03	14,7	100,0

FPR									
	Unité	Total	Exploitation	Impact (%)	Rejets et émissions	Fin de vie des boues	Pathogènes	Impacts (%)	Total (%)
Changement climatique	kg CO2 eq	1,55E-01	1,88E-03	1,2	1,51E-01	97,5	2,09E-03	1,3	100,0
Destruction de la couche d'ozone	kg CFC-11 eq	5,66E-10	4,13E-10	73,1	0,00E+00	0,0	1,52E-10	26,9	100,0
Acidification des milieux	kg SO2 eq	1,99E-05	6,34E-06	31,9	0,00E+00	0,0	1,35E-05	68,1	100,0
Eutrophisation en eau douce	kg P eq	1,55E-03	3,40E-07	0,0	1,52E-03	97,8	3,32E-05	2,1	100,0
Eutrophisation en mer	kg N eq	8,70E-03	2,88E-07	0,0	8,43E-03	96,9	2,73E-04	3,1	100,0
Emissions toxiques pour l'homme	kg 1,4-DB eq	9,29E-02	6,88E-04	0,7	2,83E-02	30,5	2,17E-04	0,2	100,0
Pic d'ozone	kg NMVOC	1,09E-05	6,88E-06	62,6	0,00E+00	0,0	4,09E-06	37,4	100,0
Formation de particules fines	kg PM10 eq	5,62E-06	2,78E-06	49,4	0,00E+00	0,0	2,84E-06	50,6	100,0
Emissions toxiques en milieu terrestre	kg 1,4-DB eq	3,70E-06	2,30E-07	6,2	3,25E-06	87,6	2,27E-07	6,1	100,0
Emissions toxiques en eau douce	kg 1,4-DB eq	1,39E-03	7,61E-05	5,5	1,30E-03	94,0	6,70E-06	0,5	100,0
Emissions toxiques en mer	kg 1,4-DB eq	1,21E-03	6,67E-05	5,5	1,13E-03	93,9	7,44E-06	0,6	100,0
Radioactivité	kg U235 eq	1,55E-03	1,47E-03	95,2	0,00E+00	0,0	7,50E-05	4,8	100,0
Occupation de terres cultivables	m2a	6,96E-05	4,53E-05	61,1	0,00E+00	0,0	1,31E-05	18,9	100,0
Occupation d'espace urbain	m2a	7,33E-05	4,53E-05	61,9	0,00E+00	0,0	2,80E-05	38,1	100,0
Disparition d'espace naturel	m2	8,50E-07	5,45E-07	64,1	0,00E+00	0,0	3,05E-07	35,9	100,0
Epuisement des ressources en eau	m3	1,38E-05	1,10E-05	79,7	0,00E+00	0,0	2,79E-06	20,3	100,0
Epuisement des métaux	kg Fe eq	2,81E-04	2,21E-04	78,7	0,00E+00	0,0	5,99E-05	21,3	100,0
Epuisement des ressources fossiles	kg oil eq	9,17E-04	6,10E-04	66,5	0,00E+00	0,0	3,08E-04	33,5	100,0

CHRA									
	Unité	Total	Exploitation	Impact (%)	Rejets et émissions	Fin de vie des boues	Pathogènes	Impacts (%)	Total (%)
Changement climatique	kg CO2 eq	1,51E-01	6,17E-03	4,1	1,44E-01	95,7	2,64E-04	0,2	100,0
Destruction de la couche d'ozone	kg CFC-11 eq	4,05E-09	4,04E-09	99,7	0,00E+00	0,0	1,04E-11	0,3	100,0
Acidification des milieux	kg SO2 eq	2,75E-05	2,55E-05	92,6	0,00E+00	0,0	2,03E-06	7,4	100,0
Eutrophisation en eau douce	kg P eq	1,31E-03	1,20E-06	0,1	1,31E-03	99,6	4,69E-06	0,4	100,0
Eutrophisation en mer	kg N eq	6,72E-03	9,68E-07	0,0	6,68E-03	99,4	3,85E-05	0,6	100,0
Emissions toxiques pour l'homme	kg 1,4-DB eq	6,28E-02	2,81E-03	4,5	2,51E-02	40,0	3,20E-05	0,1	100,0
Pic d'ozone	kg NMVOC	2,07E-05	2,00E-05	96,6	1,82E-08	0,1	6,96E-07	3,4	100,0
Formation de particules fines	kg PM10 eq	1,07E-05	1,03E-05	95,5	0,00E+00	0,0	4,78E-07	4,5	100,0
Emissions toxiques en milieu terrestre	kg 1,4-DB eq	3,56E-06	4,83E-07	13,6	3,07E-06	86,8	9,66E-09	0,3	100,0
Emissions toxiques en eau douce	kg 1,4-DB eq	6,13E-04	2,02E-04	33,0	4,09E-04	66,8	1,43E-06	0,2	100,0
Emissions toxiques en mer	kg 1,4-DB eq	5,72E-04	1,82E-04	31,8	3,89E-04	67,9	7,33E-06	0,2	100,0
Radioactivité	kg U235 eq	3,41E-02	3,40E-02	100,0	0,00E+00	0,0	7,36E-06	0,0	100,0
Occupation de terres cultivables	m2a	3,38E-04	3,22E-04	95,3	0,00E+00	0,0	1,58E-05	4,7	100,0
Occupation d'espace urbain	m2a	7,21E-05	6,91E-05	95,9	0,00E+00	0,0	2,97E-06	4,1	100,0
Disparition d'espace naturel	m2	1,07E-06	1,05E-06	98,0	0,00E+00	0,0	2,11E-08	2,0	100,0
Epuisement des ressources en eau	m3	1,02E-04	1,02E-04	99,5	0,00E+00	0,0	4,80E-07	0,5	100,0
Epuisement des métaux	kg Fe eq	5,59E-04	5,44E-04	97,3	0,00E+00	0,0	1,51E-05	2,7	100,0
Epuisement des ressources fossiles	kg oil eq	1,75E-03	1,72E-03	98,5	0,00E+00	0,0	2,64E-05	1,5	100,0

### A.3 Histogrammes des impacts environnementaux relatifs à chaque filière

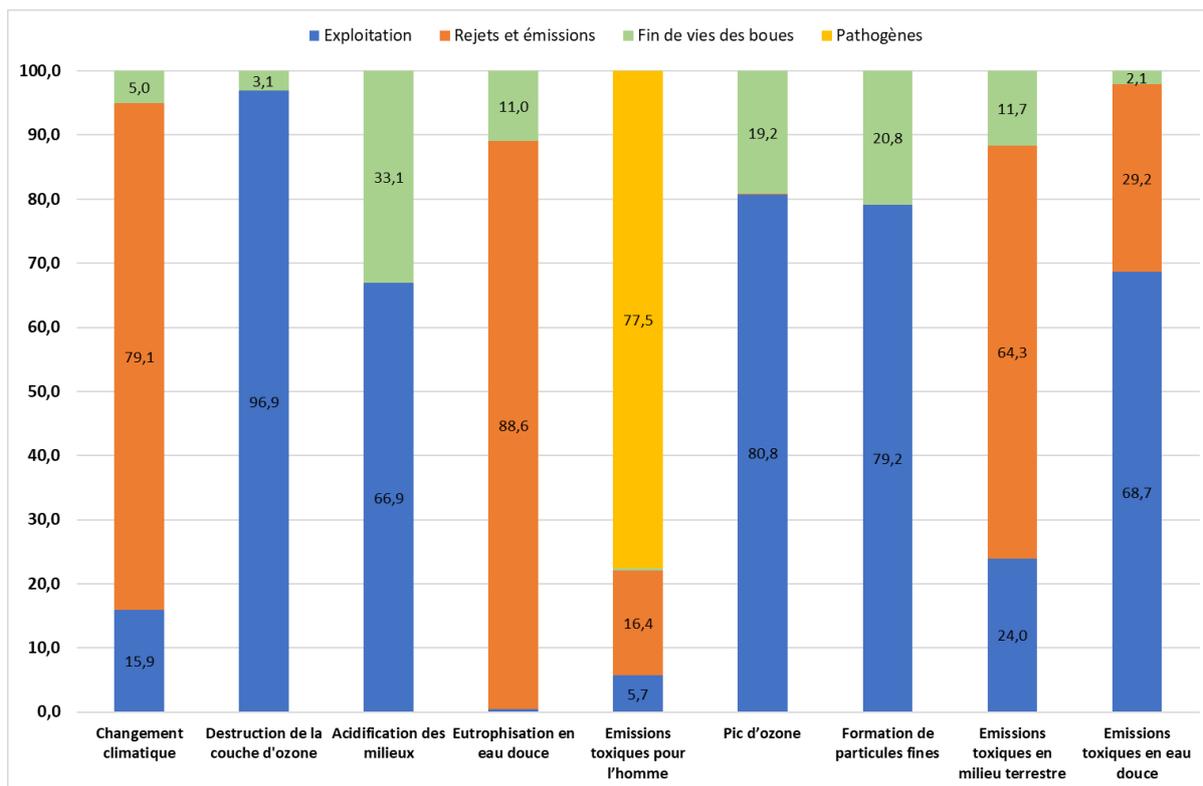


Figure 115. Impacts environnementaux de la filière par boues activées (1)

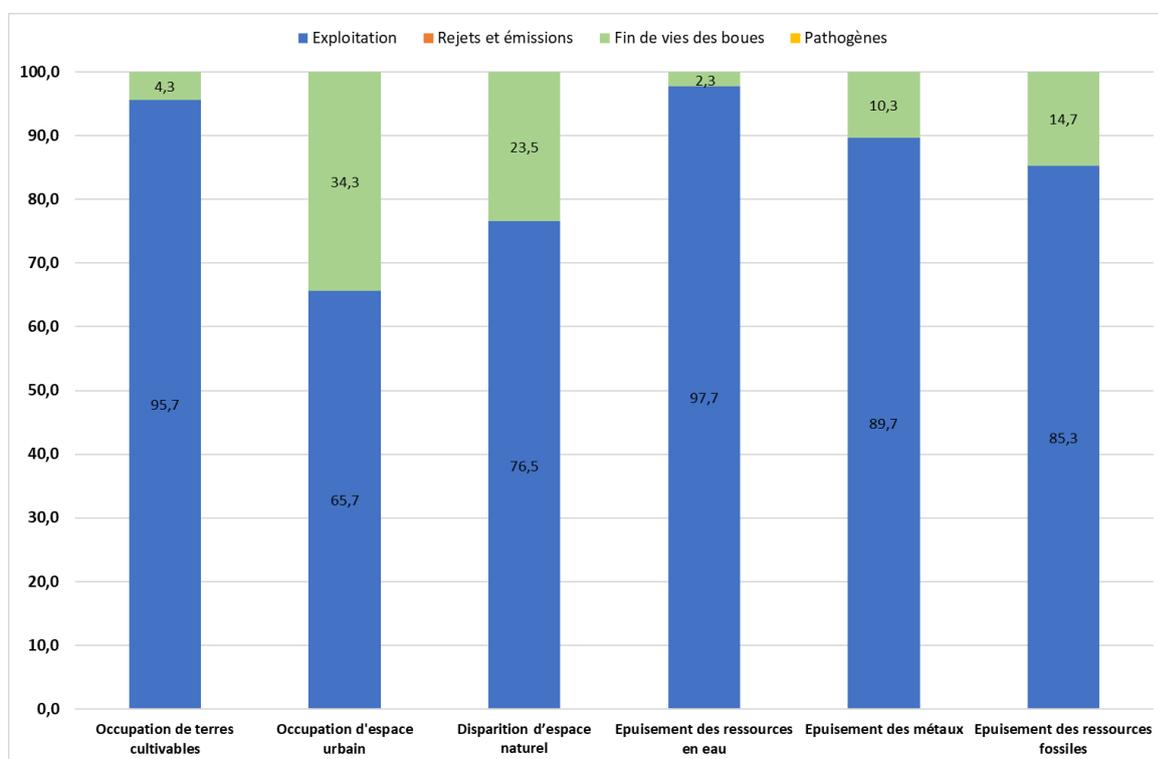


Figure 116. Impacts environnementaux de la filière par boues activées (2)

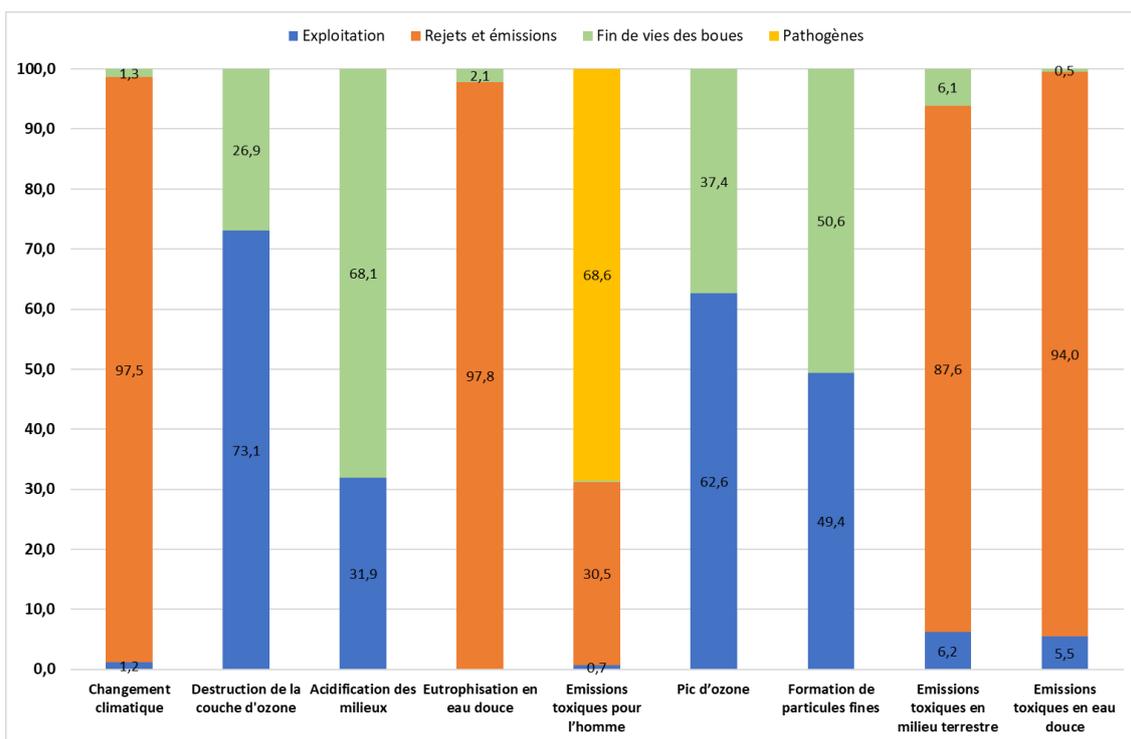


Figure 117. Impacts environnementaux de la filière par filtre planté de roseaux (1)

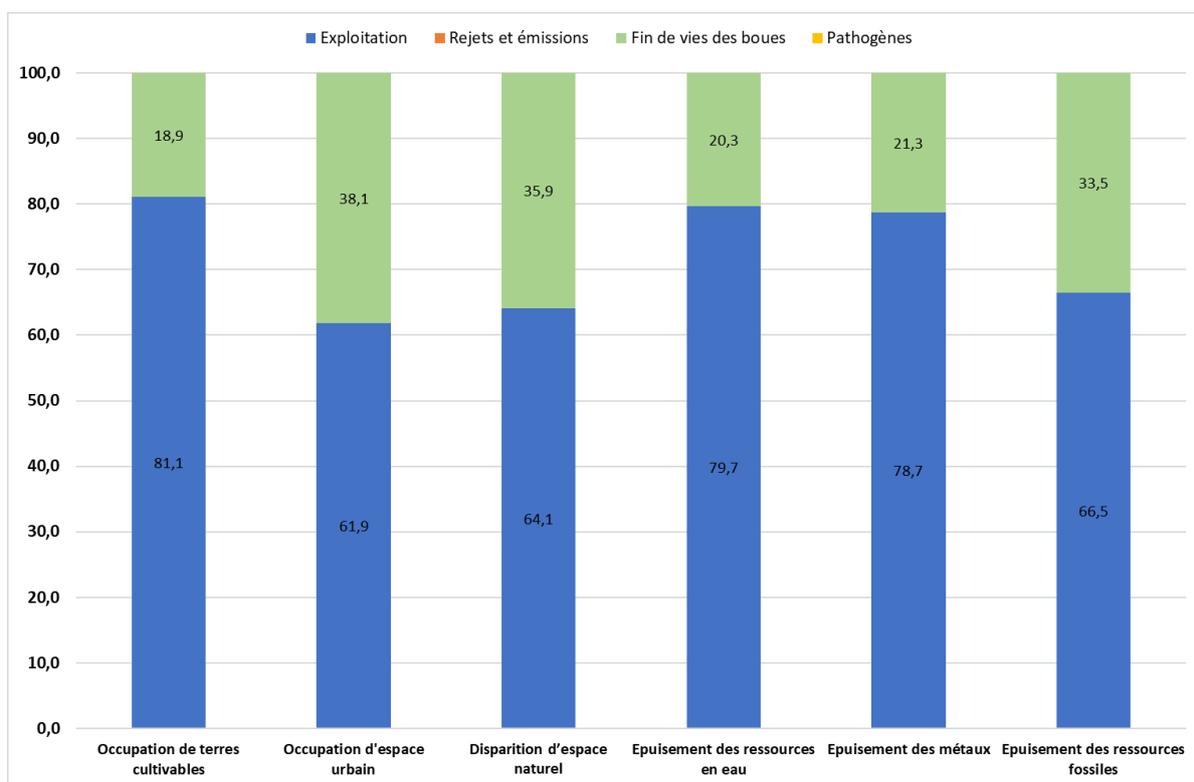


Figure 118. Impacts environnementaux de la filière par filtre planté de roseaux (2)

## Annexe A

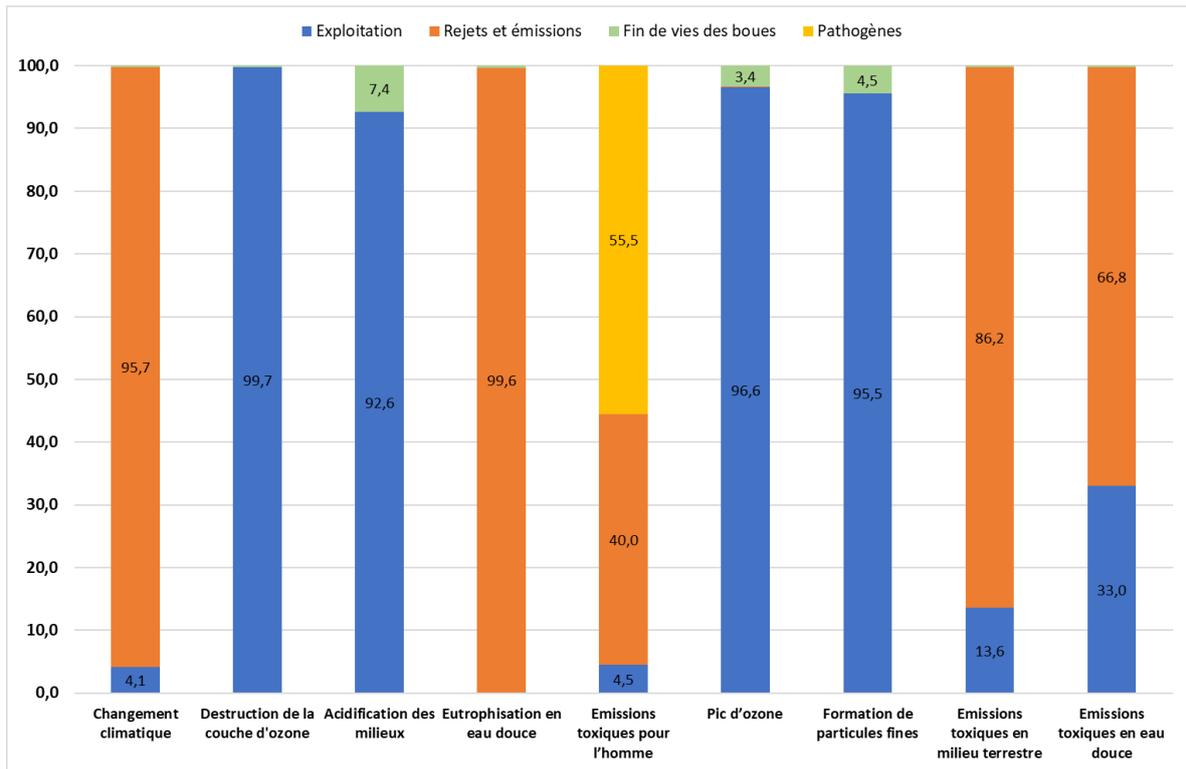


Figure 119. Impacts environnementaux de la filière par CHRA (1)

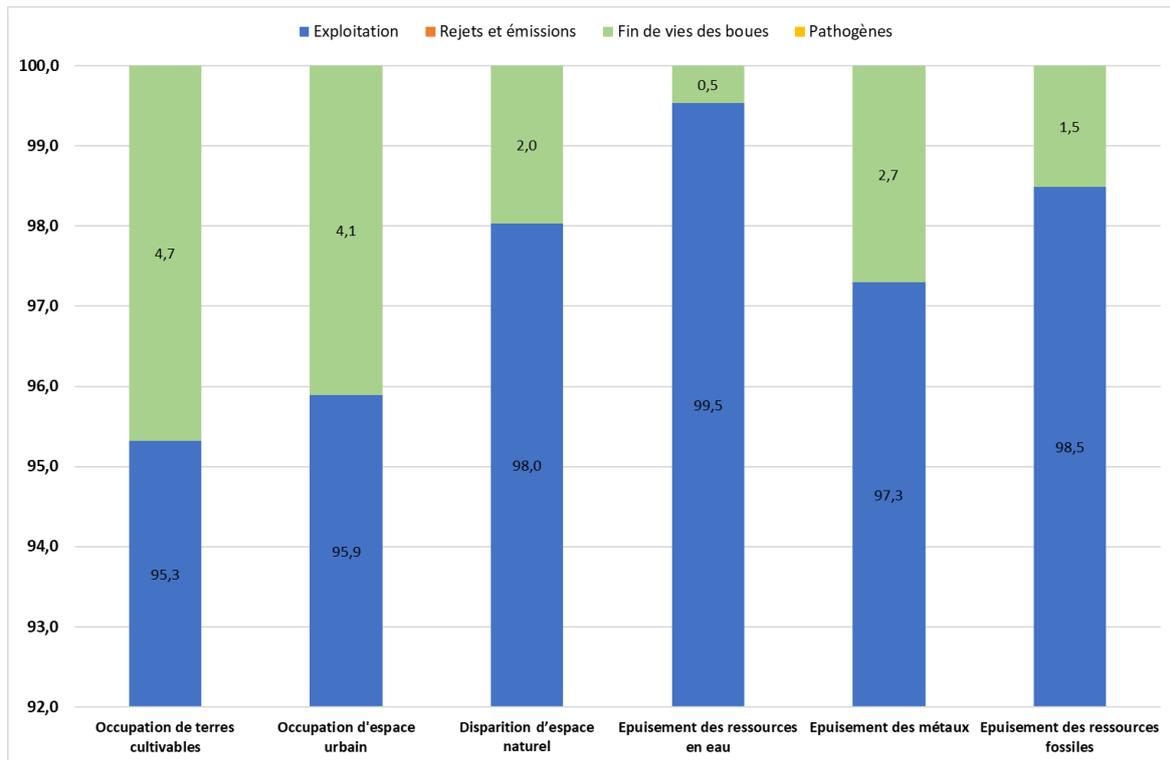


Figure 120. Impacts environnementaux de la filière par CHRA (2)



## Références

- 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. *Environ. Technol.* 34, 1807–1836. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.831487>
- Abiusi, F., E, T., A, P., Rh, W., M, J., 2022. Acid Tolerant and Acidophilic Microalgae: An Underexplored World of Biotechnological Opportunities. *Front. Microbiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.820907>
- Adamczyk, M., Lasek, J., Skawińska, A., 2016. CO<sub>2</sub> Biofixation and Growth Kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 179, 1248–1261. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2062-3>
- ADEME, 2021. La méthanisation en 10 questions.
- Afnor NF EN 872 [WWW Document], 2005. . Afnor Ed. URL <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-872/qualite-de-leau-dosage-des-matieres-en-suspension-methode-par-filtration-su/fa135090/710> (accessed 10.4.22).
- Ahmad, T., Boyd, C.E., 1988. Design and performance of paddle wheel aerators. *Aquac. Eng.* 7, 39–62. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(88\)90037-4](https://doi.org/10.1016/0144-8609(88)90037-4)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. The Shape and Structure of Proteins. *Mol. Biol. Cell* 4th Ed.
- Alepu, O.E., 2016. Effect of Hydraulic Retention Time on Anaerobic Digestion of Xiao Jiahe Municipal Sludge 6, 5.
- Al-Mallahi, J., Ishii, K., 2022. Attempts to alleviate inhibitory factors of anaerobic digestate for enhanced microalgae cultivation and nutrients removal: A review. *J. Environ. Manage.* 304, 114266. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114266>
- Alonzo, F., Mayzaud, P., 1999. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Mar. Chem.* 67, 289–301. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00075-4)
- Amorim, M.L., Soares, J., Coimbra, J.S. dos R., Leite, M. de O., Albino, L.F.T., Martins, M.A., 2021. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61, 1976–2002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>
- Anderson, R., 2004. *Algal Culturing Techniques* - 1st Edition. Academic Press.
- Anschau, A., Caruso, C.S., Kuhn, R.C., Franco, T.T., Anschau, A., Caruso, C.S., Kuhn, R.C., Franco, T.T., 2017. VALIDATION OF THE SULFO-PHOSPHO-VANILLIN (SPV) METHOD FOR THE DETERMINATION OF LIPID CONTENT IN OLEAGINOUS MICROORGANISMS. *Braz. J. Chem. Eng.* 34, 19–27. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20140222>
- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2002. Determination of Reducing Sugars with 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal. Biochem.* 305, 287–289. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5644>
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., Granström, K., 2019. A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. *Processes* 7, 504. <https://doi.org/10.3390/pr7080504>
- Arashiro, L.T., Montero, N., Ferrer, I., Ación, F.G., Gómez, C., Garfí, M., 2018. Life cycle assessment of high rate algal ponds for wastewater treatment and resource recovery. *Sci. Total Environ.* 622–623, 1118–1130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.051>
- Arbib, Zouhayr, Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., Perales, J.A., 2013. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate

- algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecol. Eng.* 52, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., Perales, J.A., 2013. Photobiotreatment: Influence of Nitrogen and Phosphorus Ratio in Wastewater on Growth Kinetics of *Scenedesmus Obliquus*. *Int. J. Phytoremediation* 15, 774–788. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.735291>
- Arcila, J.S., Buitrón, G., 2017. Influence of solar irradiance levels on the formation of microalgae-bacteria aggregates for municipal wastewater treatment. *Algal Res.* 27, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.011>
- Argun, H., Kargi, F., 2011. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *Int. J. Hydrog. Energy*, Hysydays 36, 7443–7459. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>
- Arrêté du 21 juillet 2015 [WWW Document], 2015. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGIARTI000031088746/2016-01-01/> (accessed 2.23.23).
- Astals, S., Musenze, R.S., Bai, X., Tannock, S., Tait, S., Pratt, S., Jensen, P.D., 2015. Anaerobic co-digestion of pig manure and algae: Impact of intracellular algal products recovery on co-digestion performance. *Bioresour. Technol.* 181, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.039>
- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokhman, I., Zamir, A., 2002. Salt Induction of Fatty Acid Elongase and Membrane Lipid Modifications in the Extreme Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 129, 1320–1329.
- Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M.M., Shiraiwa, Y., 2012. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Innovative Researches on Algal Biomass 109, 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059>
- Baer, S., Heining, M., Schwerna, P., Buchholz, R., Hübner, H., 2016. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. *Algal Res.* 14, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.011>
- Bagchi, S.K., Rao, P.S., Mallick, N., 2015. Development of an oven drying protocol to improve biodiesel production for an indigenous chlorophycean microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 180, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.092>
- Baidya, A., Akter, T., Islam, Md.R., Shah, A.K.M.A., Hossain, Md.A., Salam, M.A., Paul, S.I., 2021. Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll,  $\beta$ -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. *Heliyon* 7, e08525. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08525>
- Bailey, L.S., Prajapati, D.V., Basso, K.B., 2022. Optimization of the Sulfo-Phospho-Vanillin Assay for Total Lipid Normalization in Untargeted Quantitative Lipidomic LC–MS/MS Applications. *Anal. Chem.* 94, 17810–17818. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03488>
- Balasubramanian, R.K., Yen Doan, T.T., Obbard, J.P., 2013. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chem. Eng. J.* 215–216, 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.063>
- Barbarino, E., Lourenço, S.O., 2005. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *J. Appl. Phycol.* 17, 447–460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>

- Béchet, Q., Shilton, A., Guieysse, B., 2013. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnol. Adv.* 31, 1648–1663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Béji, O., Adouani, N., Poncin, S., Li, H.-Z., 2022. Growth of Microalgae-Bacteria Flocs for Nutrient Recycling from Digestate and Liquid Slurry and Methane Production by Anaerobic Digestion. *Appl. Sci.* 12, 7634. <https://doi.org/10.3390/app12157634>
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., Dall'Osto, L., 2018. Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microb. Cell Factories* 17, 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>
- Benemann, J., 2013. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. *Energies* 6, 5869–5886. <https://doi.org/10.3390/en6115869>
- Beneroso, D., Bermúdez, J.M., Arenillas, A., Menéndez, J.A., 2013. Microwave pyrolysis of microalgae for high syngas production. *Bioresour. Technol.* 144, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.102>
- Bernard, O., Lu, L.-D., Salomon, J., 2021. Mixing strategies combined with shape design to enhance productivity of a raceway pond. *IFAC-Pap., 16th IFAC Symposium on Advanced Control of Chemical Processes ADCHEM 2021* 54, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2021.08.255>
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., Magnani, M., 2011. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *J. Microbiol. Methods* 87, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.018>
- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bilans matière des stations d'épuration modélisées pour ACV4E : hypothèses et calculs, 2018.
- Biller, P., Ross, A.B., 2014. Pyrolysis GC–MS as a novel analysis technique to determine the biochemical composition of microalgae. *Algal Res.* 6, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.009>
- Bitog, J.P., Lee, I.-B., Lee, C.-G., Kim, K.-S., Hwang, H.-S., Hong, S.-W., Seo, I.-H., Kwon, K.-S., Mostafa, E., 2011. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Comput. Electron. Agric.* 76, 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.01.015>
- Bleakley, S., Hayes, M., 2017. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 6, 33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/y59-099>
- Bollon, J., Filali, A., Fayolle, Y., Gillot, S., 2013. Emissions de N<sub>2</sub>O dans les procédés de traitement des ERUs. *Convention Onema-Irstea*.
- Bouterfas, R., Belkoura, M., Dauta, A., 2006. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica* 25, 647–656. <https://doi.org/10.23818/limn.25.43>
- Boutin, C., Gillot, S., Heduit, A., Risch, E., Roux, P., 2010. Modèle ACV – Filière de traitement des eaux usées par Boues Activées (BA) Rapports d'ACV et données d'inventaire.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

- 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, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.1009>
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour. Technol.* 124, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>
- Buchanan, N., 2014. Comparing the performance of a High Rate Algal Pond with a Waste Stabilisation Pond in rural South Australia. Flinders University.
- Buchanan, N., Young, P., Cromar, N.J., Fallowfield, H.J., 2018. Comparison of the treatment performance of a high rate algal pond and a facultative waste stabilisation pond operating in rural South Australia. *Water Sci. Technol.* 78, 3–11. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.201>
- Buhr, H.O., Miller, S.B., 1983. A dynamic model of the high-rate algal-bacterial wastewater treatment pond. *Water Res.* 17, 29–37. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90283-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90283-X)
- Buitrón, G., Coronado-Apodaca, K.G., 2022. Influence of the solids retention time on the formation of the microalgal-bacterial aggregates produced with municipal wastewater. *J. Water Process Eng.* 46, 102617. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102617>
- Bunce, J.T., Ndam, E., Ofiteru, I.D., Moore, A., Graham, D.W., 2018. A Review of Phosphorus Removal Technologies and Their Applicability to Small-Scale Domestic Wastewater Treatment Systems. *Front. Environ. Sci.* 6.
- Buswell, A., Neave, S., 1930. Laboratory studies of sludge digestion (No. 30), Illinois State Water Survey.
- Byreddy, A., Gupta, A., Barrow, C., Puri, M., 2016. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *J. Microbiol. Methods* 125. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.002>
- Cadoret, J.-P., Bernard, O., 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis.
- Caia, M., Bernard, O., Béchet, Q., 2018. Optimizing CO<sub>2</sub> transfer in algal open ponds. *Algal Res.* 35, 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.009>
- Canler, J.-P., 2017. Mécanismes d'élimination de l'azote et du phosphore par la boue activée.
- Canler, J.-P., Perret, J.-M., 2007. Les clari-floculateurs plus particulièrement utilisés en traitement tertiaire. Ministère de l'Écologie, de l'Aménagement et du Développement durables.
- Carmo da Silva, J., Lombardi, A.T., 2020. Chlorophylls in Microalgae: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis, in: *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer International Publishing.
- Casagli, F., Rossi, S., Steyer, J.P., Bernard, O., Ficara, E., 2021a. Balancing Microalgae and Nitrifiers for Wastewater Treatment: Can Inorganic Carbon Limitation Cause an Environmental Threat? *Environ. Sci. Technol.* 55, 3940–3955. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05264>
- Casagli, F., Zuccaro, G., Bernard, O., Steyer, J.-P., Ficara, E., 2021b. ALBA: A comprehensive growth model to optimize algae-bacteria wastewater treatment in raceway ponds. *Water Res.* 190, 116734. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116734>
- Catel, L., Couliou, E., Ceccaldi, M., 2018. Correction TD – ACV de systèmes d'assainissement.
- Catel, L., Risch, E., Roux, P., 2016. Analyse, limites et perspectives de la prise en compte des micropolluants dans l'ACV du traitement des eaux usées.
- Chabrol, E., Charonnat, R., 1937. Une nouvelle réaction pour l'études des lipides : l'oléidémie 1713–1714.

- Chader, S., Touzi, A., 2001. Biomasse Algale : Source Energétique et Alimentaire. *Rev Energ Ren Prod. Valoris.* – Biomasse 47–50.
- Chen, C., Ma, X., Liu, K., 2011. Thermogravimetric analysis of microalgae combustion under different oxygen supply concentrations. *Appl. Energy* 88, 3189–3196. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.003>
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>
- Chen, P.H., 1987. Factors influencing methane fermentation of micro-algae. Univ. of California, Berkeley, CA.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Methods* 77, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>
- Chen, Z., Wang, L., Qiu, S., Ge, S., 2018. Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. *BioMed Res. Int.* 2018, e1503126. <https://doi.org/10.1155/2018/1503126>
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., VanderGheynst, J.S., 2011. Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. *Lipids* 46, 95–103. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3494-0>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- Choubert, J.M., 2002. Analyse et optimisation du traitement de l'azote par boues activées à basse température.
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29, 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Collet, P., Lardon, L., Hélias, A., Bricout, S., Lombaert-Valot, I., Perrier, B., Lépine, O., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2014. Biodiesel from microalgae – Life cycle assessment and recommendations for potential improvements. *Renew. Energy* 71, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.06.009>
- Coltelli, P., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Gualtieri, P., 2013. Automatic and real time recognition of microalgae by means of pigment signature and shape. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 1397–1410. <https://doi.org/10.1039/C3EM00160A>
- Comeau, Y., Hall, K.J., Hancock, R.E.W., Oldham, W.K., 1986. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* 20, 1511–1521. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(86\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90115-6)
- Compton, S.J., Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151, 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., 2006. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis* 9.
- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Callis, P.R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J. Microbiol. Methods* 6, 333–345. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90019-4)
- Cooper, M.S., Hardin, W.R., Petersen, T.W., Cattolico, R.A., 2010. Visualizing “green oil” in live algal cells. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.004>
- Costa, J.A.V., Santana, F.B., Andrade, M. da R., Lima, M.B., Franck, D.T., 2008. Microalga biomass and biomethane production in the south of Brazil. *J. Biotechnol.*,

- Biotechnology for the Sustainability of Human Society 136, S430.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.996>
- Craggs, R., Park, J., Heubeck, S., Sutherland, D., 2014. High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. *N. Z. J. Bot.* 52, 60–73. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.861855>
- Craggs, Rupert, Park, J., Heubeck, S., Sutherland, D., 2014. High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. *N. Z. J. Bot.* 52, 60–73. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.861855>
- Craggs, R., Sutherland, D., Campbell, H., 2012. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *J. Appl. Phycol.* 24, 329–337. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9810-8>
- Craggs, R.J., Heubeck, S., Lundquist, T.J., Benemann, J.R., 2011. Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Sci. Technol.* 63, 660–665. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.100>
- Danic, F., Lepochat, S., Lévêque, B., Moniot, L., Neveux, G., 2014. Comment utiliser les flux, indicateurs et méthodes ACV existants pour traiter l'impact sur la biodiversité.
- Danielewicz, M.A., Anderson, L.A., Franz, A.K., 2011. Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 52, 2101–2108. <https://doi.org/10.1194/jlr.D018408>
- Darvehei, P., Bahri, P.A., Moheimani, N.R., 2018. Model development for the growth of microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 97, 233–258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>
- Davidcarmack, 2013. Ethanol fermentation-1.
- Day, J.G., Gong, Y., Hu, Q., 2017. Microzooplanktonic grazers – A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Res.* 27, 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.024>
- de Baar, H.J.W., 1994. von Liebig's law of the minimum and plankton ecology (1899–1991). *Prog. Oceanogr.* 33, 347–386. [https://doi.org/10.1016/0079-6611\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0079-6611(94)90022-1)
- de Carvalho Silvello, M.A., Severo Gonçalves, I., Patrícia Held Azambuja, S., Silva Costa, S., Garcia Pereira Silva, P., Oliveira Santos, L., Goldbeck, R., 2022. Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. *Bioresour. Technol.* 344, 126304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126304>
- De Schampelaire, L., Verstraete, W., 2009. Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 296–304. <https://doi.org/10.1002/bit.22257>
- Dean Pakulski, J., Benner, R., 1992. An improved method for the hydrolysis and MBTH analysis of dissolved and particulate carbohydrates in seawater. *Mar. Chem.* 40, 143–160. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(92\)90020-B](https://doi.org/10.1016/0304-4203(92)90020-B)
- Decostere, B., Janssens, N., Alvarado, A., Maere, T., Goethals, P., Van Hulle, S.W.H., Nopens, I., 2013. A combined respirometer–titrimeter for the determination of microalgae kinetics: Experimental data collection and modelling. *Chem. Eng. J.* 222, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.01.103>
- Dégliise, X., 1982. Les conversions thermochimiques du bois. *Rev. For. Fr.* 249. <https://doi.org/10.4267/2042/21577>
- Degrémont, 2004a. Mémento technique de l'eau - Tomes 1 et 2. Degrémont.
- Degrémont, 2004b. Mémento technique de l'eau - Tomes 1 et 2, 10th ed. Degrémont.
- Dejoye, C., 2013. Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant. Avignon.

- Delavaud, A., Milleret, E., Wroza, S., Soubelet, H., Deligny, A., Silvain, J.-F., 2021. Indicateurs et outils de mesure Évaluer l'impact des activités humaines sur la biodiversité ?, Exxpertise et synthèse. Fondation pour la recherche sur la biodiversité.
- Delucca, R., McCracken, M.D., 1977. Observations on interactions between naturally-collected bacteria and several species of algae. *Hydrobiologia* 55, 71–75. <https://doi.org/10.1007/BF00034807>
- Demirbaş, A., 2006. Oily Products from Mosses and Algae via Pyrolysis. *Energy Sources Part Recovery Util. Environ. Eff.* 28, 933–940. <https://doi.org/10.1080/009083190910389>
- Demirbas, A., Demirbas, M., 2010. *Algae Energy - Algae as a New Source of Biodiesel, Green Energy and Technology*. Springer-Verlag London.
- Deniel, M., 2016. Etude de la production de bio-huile par liquéfaction hydrothermale de résidus agroalimentaires et de leurs molécules modèles. Ecole des Mines d'Albi-Carmaux.
- Departe, A., Ollivier, T., 2011. Etude prospective sur la seconde generation de biocarburants : une analyse de leur efficacite economique et environnementale 1, 169–175.
- Deronzier, G., Choubert, J.-M., 2004. Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées : comparaisons techniques et économiques des voies de traitement biologique et physico-chimique (No. 24), FNDAE. CEMAGREF.
- Deronzier, G., Schétrite, S., Racault, Y., Canler, J.-P., Liénard, A., Héduit, A., Duchène, P., 2001. Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités.
- Deshmukh, S., Kumar, R., Bala, K., 2019. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Process. Technol.* 191, 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013>
- Diaz-MacAduo, D., Mata, M.T., Riquelme, C., 2022. Influence of Irradiance and Wavelength on the Antioxidant Activity and Carotenoids Accumulation in *Muriellopsis* sp. Isolated from the Antofagasta Coastal Desert. *Molecules* 27, 2412. <https://doi.org/10.3390/molecules27082412>
- Donot, F., Cazals, G., Gunata, Z., Egron, D., Malinge, J., Strub, C., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., 2013. Analysis of neutral lipids from microalgae by HPLC-ELSD and APCI-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 942–943, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.1016>
- Drevon, B., Schmit, J., 1964. La réaction sulfo-phospho-vanillique dans l'étude des lipides sériques. Applications en biochimies clinique et pharmacologique, Société de pharmacie de Lyon. Séance du 17 avril 1964. 173–178.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, Fred., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Durot, M.-A., Molle, P., 2015. Amélioration du rejet des lagunes d'épuration. ONEMA.
- El Hamouri, B., Rami, A., Vasel, J.-L., 2003. The reasons behind the performance superiority of a high rate algal pond over three facultative ponds in series. *Water Sci. Technol.* 48, 269–276. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0130>
- Eloka-Eboka, A.C., Inambao, F.L., 2017. Effects of CO 2 sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. *Appl. Energy* 195, 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.03.071>
- Elsay, D., Jameson, D., Raleigh, B., Cooney, M.J., 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Methods* 68, 639–642. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.008>
- Eme, C., Boutin, C., 2015. Composition des eaux usées domestiques par source d'émission à l'échelle de l'habitation.

- Esakkimuthu, S., Krishnamurthy, V., Govindarajan, R., Swaminathan, K., 2016. Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass Bioenergy* 88, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.019>
- European Commission, Directorate-General for Environment, Berland, J., Cooper, P., Faby, J., 2003. Extensive wastewater treatment processes adapted to small and medium sized communities (500 to 5,000 population equivalents): implementation of Council Directive 91/271 of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment. Publications Office.
- Fallahi, A., Rezvani, F., Asgharnejad, H., Khorshidi Nazloo, E., Hajinajaf, N., Higgins, B., 2021. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere* 272, 129878. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129878>
- Fallowfield, H. j., Garrett, M. k., 1985. The treatment of wastes by algal culture. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 187S-205S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb04900.x>
- Farinacci, J., Laurent, J., 2023. Critical assessment of the sulfo-phospho-vanillin method to quantify lipids in freeze-dried microalgae. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-023-02930-3>
- Fasaiei, F., Bitter, J.H., Slegers, P.M., van Boxtel, A.J.B., 2018. Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Res.* 31, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>
- Fields, F.J., Hernandez, R.E., Weilbacher, E., Garcia-Vargas, E., Huynh, J., Thurmond, M., Lund, R., Burkart, M.D., Mayfield, S.P., 2021. Annual productivity and lipid composition of native microalgae (Chlorophyta) at a pilot production facility in Southern California. *Algal Res.* 56, 102307. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102307>
- Fleurence, J., 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00015-1)
- Flores-Salgado, G., Thalasso, F., Buitrón, G., Vital-Jácome, M., Quijano, G., 2021. Kinetic characterization of microalgal-bacterial systems: Contributions of microalgae and heterotrophic bacteria to the oxygen balance in wastewater treatment. *Biochem. Eng. J.* 165, 107819. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107819>
- Fokaides, P.A., Christoforou, E., 2016. Life cycle sustainability assessment of biofuels, in: *Handbook of Biofuels Production*. pp. 41–60.
- François-Lopez, E., 2016. Production de biohydrogène par fermentation obscure : potentiel de différentes biomasses et variabilité microbienne. Strasbourg.
- Friedlingstein, P., Jones, M.W., O’Sullivan, M., Andrew, R.M., Bakker, D.C.E., Hauck, J., Le Quéré, C., Peters, G.P., Peters, W., Pongratz, J., Sitch, S., Canadell, J.G., Ciais, P., Jackson, R.B., Alin, S.R., Anthoni, P., Bates, N.R., Becker, M., Bellouin, N., Bopp, L., Chau, T.T.T., Chevallier, F., Chini, L.P., Cronin, M., Currie, K.I., Decharme, B., Djeutchouang, L., Dou, X., Evans, W., Feely, R.A., Feng, L., Gasser, T., Gilfillan, D., Gkritzalis, T., Grassi, G., Gregor, L., Gruber, N., Gürses, Ö., Harris, I., Houghton, R.A., Hurtt, G.C., Iida, Y., Ilyina, T., Luijkx, I.T., Jain, A.K., Jones, S.D., Kato, E., Kennedy, D., Klein Goldewijk, K., Knauer, J., Korsbakken, J.I., Körtzinger, A., Landschützer, P., Lauvset, S.K., Lefèvre, N., Lienert, S., Liu, J., Marland, G., McGuire, P.C., Melton, J.R., Munro, D.R., Nabel, J.E.M.S., Nakaoka, S.-I., Niwa, Y., Ono, T., Pierrot, D., Poulter, B., Rehder, G., Resplandy, L., Robertson, E., Rödenbeck, C., Rosan, T.M., Schwinger, J., Schwingshackl, C., Séférian, R., Sutton, A.J., Sweeney, C., Tanhua, T., Tans, P.P., Tian, H., Tilbrook, B., Tubiello, F., van der Werf, G., Vuichard, N., Wada, C., Wanninkhof, R., Watson, A., Willis, D., Wiltshire, A.J., Yuan, W., Yue, C., Yue,

- X., Zaehle, S., Zeng, J., 2021. Global Carbon Budget 2021. *Earth Syst. Sci. Data Discuss.* 1–191. <https://doi.org/10.5194/essd-2021-386>
- Frings, C.S., Dunn, R.T., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Pathol.* 53, 89–91. <https://doi.org/10.1093/ajcp/53.1.89>
- Fuentes, J., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M., Vílchez, C., 2016. Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. *Mar. Drugs* 14, 100. <https://doi.org/10.3390/md14050100>
- Gammanpila, A.M., Rupasinghe, C.P., Subasinghe, S., 2015. LIGHT INTENSITY AND PHOTO PERIOD EFFECT ON GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS AND NANNOCHLOROPSIS SP FOR BIODIESEL PRODUCTION 5.
- Gao, F., Yang, H.-L., Li, C., Peng, Y.-Y., Lu, M.-M., Jin, W.-H., Bao, J.-J., Guo, Y.-M., 2019. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour. Technol.* 282, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.011>
- Gao, S., Edmundson, S., Huesemann, M., 2022. Oxygen stress mitigation for microalgal biomass productivity improvement in outdoor raceway ponds. *Algal Res.* 68, 102901. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102901>
- Gao, Y., Tahmasebi, A., Dou, J., Yu, J., 2016. Combustion characteristics and air pollutant formation during oxy-fuel co-combustion of microalgae and lignite. *Bioresour. Technol.* 207, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.031>
- García, M., Soto, F., González, J.M., Bécares, E., 2008. A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems. *Ecol. Eng.* 32, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.012>
- Garfí, M., Flores, L., Ferrer, I., 2017. Life Cycle Assessment of wastewater treatment systems for small communities: Activated sludge, constructed wetlands and high rate algal ponds. *J. Clean. Prod.* 161, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.116>
- Gaudot, C., Vedeau, F., Bardon, E., 2019. Diversification de la ressource protéique en alimentation humaine et animale - Etat des lieux et perspectives (No. 18079). Conseil général de l'alimentation de l'agriculture et des espaces ruraux.
- Ghnimi, T., Hassini, L., Bagane, M., 2019. Convective and infrared drying assisted by capillary drainage of spirulina: a real possibility to reduce the energy consumption. *Heat Mass Transf.* 55, 867–876. <https://doi.org/10.1007/s00231-018-2472-6>
- Giordano, M., Ratti, S., Domenighini, A., Vogt, F., 2009. Spectroscopic classification of 14 different microalga species: first steps towards spectroscopic measurement of phytoplankton biodiversity. *Plant Ecol. Divers.* 2, 155–164. <https://doi.org/10.1080/17550870903353088>
- Giraldo-Zuluaga, J.-H., Diez, G., Gomez, A., Martinez, T., Vasquez, M.P., Bonilla, J.F.V., Salazar, A., 2018. Automatic Identification of *Scenedesmus* Polymorphic Microalgae from Microscopic Images. *Pattern Anal. Appl.* 21, 601–612. <https://doi.org/10.1007/s10044-017-0662-3>
- Golla, G., Hocquet, C., 2011. État des lieux de la conformité des stations de traitement des eaux usées. eaufrance.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic Digestion of Algae. *Appl. Microbiol.* 5, 47–55. <https://doi.org/10.1128/am.5.1.47-55.1957>
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24, 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>

- Gong, X., Zhang, B., Zhang, Y., Huang, Y., Xu, M., 2014. Investigation on Pyrolysis of Low Lipid Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*. *Energy Fuels* 28, 95–103. <https://doi.org/10.1021/ef401500z>
- González López, C.V., García, M. del C.C., Fernández, F.G.A., Bustos, C.S., Chisti, Y., Sevilla, J.M.F., 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 7587–7591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.20104.077>
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., 2012. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenergy* 40, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.008>
- Gorain, P.C., Bagchi, S.K., Mallick, N., 2013. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environ. Technol.* 34, 1887–1894. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.812668>
- Goswami, G., Makut, B.B., Das, D., 2019. Sustainable production of bio-crude oil via hydrothermal liquefaction of symbiotically grown biomass of microalgae-bacteria coupled with effective wastewater treatment. *Sci. Rep.* 9, 15016. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51315-5>
- Gouveia, L., Batista, A.P., Sousa, I., Raymundo, A., Bandarra, N.M., 2008. Microalgae in Novel Food Products, in: *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, New York.
- Gouvernement du Canada, S.C., 2021. 4.5.2 Visualiser la boîte à moustaches [WWW Document]. URL <https://www150.statcan.gc.ca/n1/edu/power-pouvoir/ch12/5214889-fra.htm> (accessed 3.20.23).
- Goyal, H.B., Seal, D., Saxena, R.C., 2008. Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 12, 504–517. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.07.014>
- Grobbelaar, J., 2004. Algal Nutrition, in: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley-Blackwell.
- Gruchlik, Y., Linge, K., Joll, C., 2018. Removal of organic micropollutants in waste stabilisation ponds: A review. *J. Environ. Manage.* 206, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.1020>
- Guiry, M., 2012. How many species of algae are there ? *J. Phycol.* 48, 1057–1063.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2023. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., 1999. Activated sludge model No. 3 11.
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., Bux, F., 2014. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel* 128, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.059>
- Gutierrez, J., Kwan, T.A., Zimmerman, J.B., Peccia, J., 2016. Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Res.* 19, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.016>
- Hadiyanto, H., Elmore, S., Van Gerven, T., Stankiewicz, A., 2013. Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design. *Chem. Eng. J.* 217, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.015>
- Hafiane, F., Rami, A., Bouchaib, E.H., 2003. Mechanisms of nitrogen and phosphorus removal in a high rate algal pond. *Rev. Sci. Eau* 16, 157–172.
- Hamouda, R.A.E., Abou-El-Souod, G.W., 2018. Influence of Various Concentrations of Phosphorus on the Antibacterial, Antioxidant and Bioactive Components of Green Microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Int. J. Pharmacol.* 14, 99–107. <https://doi.org/10.3923/ijp.2018.99.107>

- Han, Y., Hoekman, S.K., Cui, Z., Jena, U., Das, P., 2019. Hydrothermal liquefaction of marine microalgae biomass using co-solvents. *Algal Res.* 38, 101421. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101421>
- Hancock, L., Goff, L., Lane, C., 2010. Red Algae Lose Key Mitochondrial Genes in Response to Becoming Parasitic. *Genome Biol. Evol.* 2, 897–910. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq075>
- Haris, N., Manan, H., Jusoh, M., Khatoon, H., Katayama, T., Kasan, N.A., 2022. Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species. *Aquac. Rep.* 22, 100925. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100925>
- Hecky, R.E., Campbell, P., Hendzel, L.L., 1993. The stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in particulate matter of lakes and oceans. *Limnol. Oceanogr.* 38, 709–724. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.4.0709>
- Henderson, R., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2008. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid–liquid separation of algae. *Water Res.* 42, 1827–1845. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.039>
- Henze, M., Grady, C.P.L., Gujer, W., Marais, G.V.R., Matsuo, T., 1987. A general model for single-sludge wastewater treatment systems. *Water Res.* 21, 505–515. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90058-3)
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C., 1999. Activated sludge model No.2D, ASM2D 18.
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M.C., 2013. Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 598–603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.029>
- Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S.B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., Orta Ledesma, M.T., 2019. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>
- Heubeck, S., Craggs, R.J., Shilton, A., 2007. Influence of CO<sub>2</sub> scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. *Water Sci. Technol.* 55, 193–200. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.358>
- Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S., Ogushi, Y., 1997. CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy, International Symposium on CO<sub>2</sub> Fixation and Efficient Utilization of Energy* 22, 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0360-5442\(96\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0360-5442(96)00123-5)
- Ho, L.T., Van Echelpoel, W., Goethals, P., 2017. Design of waste stabilization pond systems : a review. *WATER Res.* 123, 236–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.071>
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.-S., 2013. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>
- Ho, S.-H., Nakanishi, A., Ye, X., Chang, J.-S., Hara, K., Hasunuma, T., Kondo, A., 2014. Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnol. Biofuels* 7, 97. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-97>
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., Rastall, R.A., 2012. In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydr. Polym.* 87, 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.085>

- Hossain, Md.N.B., Basu, J.K., Mamun, M., 2015. The Production of Ethanol from Micro-Algae Spirulina. *Procedia Eng.* 105, 733–738. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.064>
- Hosseinzand, H., Sokhansanj, S., Lim, C.J., 2018. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Dry. Technol.* 36, 1049–1060. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1369986>
- Hreiz, R., Sialve, B., Morchain, J., Escudié, R., Steyer, J.-P., Guiraud, P., 2014. Experimental and numerical investigation of hydrodynamics in raceway reactors used for algaculture. *Chem. Eng. J.* 250, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.027>
- Hu, H., Wu, D.-D., Yu, L., Hu, Y., Meng, F.-L., Wei, D., 2023. Pollutants removal, microbial community shift and oleic acid production in symbiotic microalgae–bacteria system. *Bioresour. Technol.* 370, 128535. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128535>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008a. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008b. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Hu, Z., Ma, X., Li, L., Wu, J., 2014. The catalytic pyrolysis of microalgae to produce syngas. *Energy Convers. Manag.* 85, 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.096>
- Huang, Y., Zhang, D., Xue, S., Wang, M., Cong, W., 2016. The Potential of Microalgae Lipids for Edible Oil Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180, 438–451. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2108-6>
- Hughes, A.R., Sulesky, A., Andersson, B., Peers, G., 2018. Sulfate amendment improves the growth and bioremediation capacity of a cyanobacteria cultured on municipal wastewater centrate. *Algal Res.* 32, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.004>
- Huijbregts, M.A.J., Steinmann, Z.J.N., Elshout, P.M.F., Stam, G., Verones, F., Vieira, M., Zijp, M., Hollander, A., van Zelm, R., 2017. ReCiPe2016: a harmonised life cycle impact assessment method at midpoint and endpoint level. *Int. J. Life Cycle Assess.* 22, 138–147. <https://doi.org/10.1007/s11367-016-1246-y>
- Iacopozzi, I., Innocenti, V., Marsili-Libelli, S., Giusti, E., 2007. A modified Activated Sludge Model No. 3 (ASM3) with two-step nitrification–denitrification. *Environ. Model. Softw.* 22, 847–861. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2006.05.009>
- Inglesby, A.E., Fisher, A.C., 2012. Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy Environ. Sci.* 5, 7996–8006. <https://doi.org/10.1039/C2EE21659K>
- Inouye, L.S., Lotufo, G.R., 2006. Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods. *Talanta* 70, 584–587. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.01.024>
- ISO 5663:1984, 1984. Water quality — Determination of Kjeldahl nitrogen — Method after mineralization with selenium.
- ISO 14040:2006 [WWW Document], 2006. . ISO. URL <https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/03/74/37456.html> (accessed 3.16.22).
- ISO 14044:2006 [WWW Document], 2006. . ISO. URL <https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/03/84/38498.html> (accessed 3.16.22).
- Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Queiroz, M.I., 2018. *Microalgal Biotechnology*. IntechOpen.

- Jendoubi, N., 2011. Mécanismes de transfert des inorganiques dans les procédés de pyrolyse rapide de la biomasse : Impacts de la variabilité des ressources lignocellulosiques sur la qualité des bio-huiles. Paul Cézanne - Aix-Marseille III.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* 102, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Johnson, K.R., Ellis, G., Toothill, C., 1977. The sulfophosphovanillin reaction for serum lipids: a reappraisal. *Clin. Chem.* 23, 1669–1678. <https://doi.org/10.1093/clinchem/23.9.1669>
- 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, 811–827. <https://doi.org/10.1002/btpr.2628>
- Jørgensen, S.E., 1976. A eutrophication model for a lake. *Ecol. Model.* 2, 147–165. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(76\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0304-3800(76)90030-2)
- Jurtshuk, P., 1996. Bacterial Metabolism, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Kamperidou, V., Terzopoulou, P., 2021. Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Waste Materials. *Sustainability* 13, 12810. <https://doi.org/10.3390/su132212810>
- Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T.T.V., Croft, M.T., Sherwood, E., Sasso, S., Hodson, S.J., Warren, M.J., Smith, A.G., 2012. Mutualistic interactions between vitamin B12 - dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ. Microbiol.* 14, 1466–1476. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02733.x>
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A., Pruvost, J., 2019. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Res.* 39, 101432. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432>
- Kim, B.-H., Choi, J.-E., Cho, K., Kang, Z., Ramanan, R., Moon, D.-G., Kim, H.-S., 2018. Influence of Water Depth on Microalgal Production, Biomass Harvest, and Energy Consumption in High Rate Algal Pond Using Municipal Wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01014>
- Kim, G.M., Kim, Y.-K., 2022. Drying Techniques of Microalgal Biomass: A Review. *Appl. Chem. Eng.* 33, 145–150. <https://doi.org/10.14478/ACE.2022.1007>
- Kim, J.K., Nhat, L., Chun, Y.N., Kim, S.W., 2008. Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 499–504. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0142-0>
- Kim, K., Hur, J., Kim, S., Jung, J.-Y., Han, H.-S., 2019. Biological wastewater treatment: Comparison of heterotrophs (BFT) with autotrophs (ABFT) in aquaculture systems. *Bioresour. Technol.* 296, 122293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122293>
- Kim, M.-J., Jeong, S.-Y., Lee, S.-J., 2008. Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Appl. Phycol.* 20, 1069–1078. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9312-x>
- Kim, M.-S., Baek, J.-S., Yun, Y.-S., Jun Sim, S., Park, S., Kim, S.-C., 2006. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 812–816. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.06.009>
- Kim, S., Chojnacka, K., 2015. *Marine Algae Extracts : Processes, Products, and Applications*. Wiley VCH.
- Kim, T.-H., Lee, Y., Han, S.-H., Hwang, S.-J., 2013. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 130, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.134>

- Kloosterman, K., 2011. Food and fuel from greenhouse gas? [WWW Document]. ISRAEL21c. URL <https://www.israel21c.org/food-and-fuel-from-greenhouse-gas/> (accessed 11.2.22).
- Knight, J.A., Anderson, S., Rawle, J.M., 1972. Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. *Clin. Chem.* 18, 199–202. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.3.199>
- Kong, L., Feng, Y., Sun, J., Rong, K., Zhou, J., Zheng, R., Ni, S., Liu, S., 2022. Cross-feeding among microalgae facilitates nitrogen recovery at low C/N. *Environ. Res.* 211, 113052. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113052>
- Kumar, K., Mishra, S.K., Shrivastav, A., Park, M.S., Yang, J.-W., 2015. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 51, 875–885. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.033>
- Lage, S., Gentili, F.G., 2023. Chemical composition and species identification of microalgal biomass grown at pilot-scale with municipal wastewater and CO<sub>2</sub> from flue gases. *Chemosphere* 313, 137344. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137344>
- Laifa, R., Morchain, J., Barna, L., Guiraud, P., 2021. A numerical framework to predict the performances of a tubular photobioreactor from operating and sunlight conditions. *Algal Res.* 60, 102550. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102550>
- Lakaniemi, A.-M., Hulatt, C.J., Thomas, D.N., Tuovinen, O.H., Puhakka, J.A., 2011. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnol. Biofuels* 4, 34. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-34>
- Lampert, W., Sommer, U., 2007. *Limnology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I., 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol.* 11, 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124>
- Laroche, C., 2022. Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications. *Mar. Drugs* 20, 336. <https://doi.org/10.3390/md20050336>
- Latrille, É., Trably, É., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2017. 11. Biomasse : production de biohydrogène, in: Jeandel, C., Mosseri, R. (Eds.), *L'énergie à Découvert, À Découvert*. CNRS Éditions, Paris, p. 154.
- Laurens, L.M.L., Dempster, T.A., Jones, H.D.T., Wolfrum, E.J., Van Wycken, S., McAllister, J.S.P., Rencenberger, M., Parchert, K.J., Gloe, L.M., 2012a. Algal Biomass Constituent Analysis: Method Uncertainties and Investigation of the Underlying Measuring Chemistries. *Anal. Chem.* 84, 1879–1887. <https://doi.org/10.1021/ac202668c>
- Laurens, L.M.L., Dempster, T.A., Jones, H.D.T., Wolfrum, E.J., Van Wycken, S., McAllister, J.S.P., Rencenberger, M., Parchert, K.J., Gloe, L.M., 2012b. Algal Biomass Constituent Analysis: Method Uncertainties and Investigation of the Underlying Measuring Chemistries. *Anal. Chem.* 84, 1879–1887. <https://doi.org/10.1021/ac202668c>
- Laurent, J., 2020. *Génie des procédés appliqué au traitement des eaux*.
- Laurent, J., Casellas, M., Carrère, H., Dagot, C., 2011. Effects of thermal hydrolysis on activated sludge solubilization, surface properties and heavy metals biosorption. *Chem. Eng. J.* 166, 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.11.054>
- Laurent, J., Casellas, M., Pons, M.-N., Dagot, C., 2010. Cadmium biosorption by ozonized activated sludge: The role of bacterial flocs surface properties and mixed liquor composition. *J. Hazard. Mater.* 183, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.019>

- Laurent, J., Pierra, M., Casellas, M., Dagot, C., 2009. Fate of cadmium in activated sludge after changing its physico-chemical properties by thermal treatment. *Chemosphere* 77, 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.024>
- Lee, E., Heng, R.-L., Pilon, L., 2013. Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 114, 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2012.08.012>
- Lennert, B., 2005. Triglyceride.
- Leong, W.-H., Lim, J.-W., Lam, M.-K., Uemura, Y., Ho, C.-D., Ho, Y.-C., 2018. Co-cultivation of activated sludge and microalgae for the simultaneous enhancements of nitrogen-rich wastewater bioremediation and lipid production. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 87, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.03.038>
- Les procédés d'épuration des petites collectivités du bassin Rhin-Meuse - Élément de comparaison techniques et économiques, 2007. . AERM.
- Lewis, W.K., Whitman, W.G., 1924. Principles of Gas Absorption. *Ind. Eng. Chem.* 16, 1215–1220. <https://doi.org/10.1021/ie50180a002>
- Li, P., Luo, Y., Yuan, X., 2022. Life cycle and techno-economic assessment of source-separated wastewater-integrated microalgae biofuel production plant: A nutrient organization approach. *Bioresour. Technol.* 344, 126230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126230>
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., Cong, W., 2013. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *J. Appl. Phycol.* 25, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9865-6>
- Liu, L., Hong, Y., Ye, X., Wei, L., Liao, J., Huang, X., Liu, C., 2018. Biodiesel production from microbial granules in sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 249, 908–915. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.105>
- Ljubic, A., Safafar, H., Jacobsen, C., 2019. Recovery of microalgal biomass and metabolites from homogenized, swirl flash-dried microalgae. *J. Appl. Phycol.* 31, 2355–2363. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-1733-1>
- Local Government Association of South Australia, 2020. High Rate Algal Pond (HRAP) Design Guideline - an element in CWMS Wastewater Treatment Trains.
- Logiciel ACV4E - Structure [WWW Document], 2016. . ACV4E. URL <https://acv4e.inrae.fr/fr/logiciel-acv4e/structure/> (accessed 4.23.23).
- Loosdrecht, M.C.M. van, Nielsen, P.H., Lopez-Vazquez, C.M., Brdjanovic, D. (Eds.), 2016. Experimental methods in wastewater treatment. IWA Publishing, London.
- López Muñoz, I., Bernard, O., 2021. Modeling the Influence of Temperature, Light Intensity and Oxygen Concentration on Microalgal Growth Rate. *Processes* 9, 496. <https://doi.org/10.3390/pr9030496>
- López, R., Fernández, C., Gómez, X., Martínez, O., Sánchez, M.E., 2013. Thermogravimetric analysis of lignocellulosic and microalgae biomasses and their blends during combustion. *J. Therm. Anal. Calorim.* 114, 295–305. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2843-z>
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, L.O. da S., Marquez, U.M.L., 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.* 50, 233–241. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2002.00278.x>
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Marquez, U.M.L., Aidar, E., 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Eur. J. Phycol.* 39, 17–32. <https://doi.org/10.1080/0967026032000157156>

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lü, F., Ji, J., Shao, L., He, P., 2013. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnol. Biofuels* 6, 92. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-92>
- Lucchetti, A., 2014. Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris.
- Lutzu, G., 2011. Analysis of the growth of microalgae in batch and semi-batch photobioreactors. Université de Cagliari.
- Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., Chen, H.-L., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresour. Technol.* 101, 6797–6804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.120>
- Ma, K., 2013. Schéma d'un chloroplaste.
- MacDougall, K.M., McNichol, J., McGinn, P.J., O'Leary, S.J.B., Melanson, J.E., 2011. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 2609–2616. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5376-6>
- Machado, A.P., Urbano, L., Brito, A.G., Janknecht, P., Salas, J.J., Nogueira, R., 2007. Life cycle assessment of wastewater treatment options for small and decentralized communities. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 56, 15–22. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.497>
- Maggi, R., Delmon, B., 1994. Comparison between 'slow' and 'flash' pyrolysis oils from biomass. *Fuel* 73, 671–677. [https://doi.org/10.1016/0016-2361\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0016-2361(94)90007-8)
- Mainardis, M., Buttazzoni, M., Cottes, M., Moretti, A., Goi, D., 2021. Respirometry tests in wastewater treatment: Why and how? A critical review. *Sci. Total Environ.* 793, 148607. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148607>
- Malcata, F.X., Pinto, I., Guedes, A.C., 2018. Marine Macro- and Microalgae: An Overview. CRC Press.
- Marcel, C., Pastor, F., 2012. L'assainissement des eaux usées en agglomération parisienne : principes et procédés. SIAAP.
- Marcilhac, C., Sialve, B., Pourcher, A.-M., Ziebal, C., Bernet, N., Béline, F., 2014. Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water Res.* 64, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.012>
- Mariotti, F., Tomé, D.D., Mirand, P.P., 2008. Converting Nitrogen into Protein – Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 177–184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2013. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel In press*. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.013>
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- 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>
- MARZANO, C.-M.A.D.S., LEGROS, A., NAVEAU, H.P., NYNS, E.-J., 1982. Biomethanation of the Marine Algae *Tetraselmis*. *Int. J. Sol. Energy* 1, 263–272. <https://doi.org/10.1080/01425918208909891>

- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M., 2013. Photosynthesis in Microalgae, in: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. John Wiley & Sons, p. 1119.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, Nidia.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matsumoto, M., Yokouchi, H., Suzuki, N., Ohata, H., Matsunaga, T., 2003. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105–108, 247–254. <https://doi.org/10.1385/abab:105:1-3:247>
- Mattern, R., 2009. Amylosestruktur.
- Mayers, J.J., Vaiciulyte, S., Malmhäll-Bah, E., Alcaide-Sancho, J., Ewald, S., Godhe, A., Ekendahl, S., Albers, E., 2018. Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivities under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Res.* 31, 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.034>
- McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (part 3): gasification technologies. *Bioresour. Technol., Reviews Issue* 83, 55–63. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00120-1)
- McMahon, A., Lu, H., Butovich, I.A., 2013. The Spectrophotometric Sulfo-Phospho-Vanillin Assessment of Total Lipids in Human Meibomian Gland Secretions. *Lipids* 48, 513–525. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3755-9>
- Mehrabadi, A., Farid, M.M., Craggs, R., 2017. Effect of CO<sub>2</sub> addition on biomass energy yield in wastewater treatment high rate algal mesocosms. *Algal Res.* 22, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.010>
- Meless Teshome, T., 2020a. Computational fluid dynamics application to optimize and evaluate the performance of high rate algal pond system. Strasbourg.
- Meless Teshome, T., 2020b. Computational Fluid Dynamics Application to Optimize and Evaluate the Performance of High Rate Algal Pond System. Université de Strasbourg.
- Mendoza, J.L., Granados, M.R., de Godos, I., Acién, F.G., Molina, E., Banks, C., Heaven, S., 2013. Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. *Biomass Bioenergy* 54, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.017>
- Menegazzo, M.L., Fonseca, G.G., 2019. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 107, 87–107. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.064>
- Menia, S., Nouicer, I., Bakouri, Y., M'raoui, A., Tebibel, H., Khellaf, A., 2019. Production d'hydrogène par procédés biologiques. *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. D'IFP Energ. Nouv.* 74, 34. <https://doi.org/10.2516/ogst/2018099>
- Metcalf, Eddy, 1991. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*. McGraw-Hill.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.* 17, 477–489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Mfoumou, C.M., 2012. Piégeage du dioxyde de carbone sur solides à base de zéolithe faujasite X: adsorption seul, en mélange binaire et/ou en présence d'eau; étude en thermodesorption. Poitiers.
- Milledge, J.J., Heaven, S., 2013. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 165–178. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9301-z>
- Minhas, A.K., Hodgson, P., Barrow, C.J., Adholeya, A., 2016. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>

- Ministère de la transition écologique, 2020. Panorama 2020 des biocarburants incorporés en France.
- Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires, 2022. Biocarburants [WWW Document]. URL <https://www.ecologie.gouv.fr/biocarburants> (accessed 12.9.22).
- Ministère de la transition énergétique, 2022. La méthanisation en questions.
- Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S., Yang, J.-W., 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour. Technol.* 155, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Mohamadzadeh Shirazi, H., Karimi-Sabet, J., Ghotbi, C., 2017. Biodiesel production from *Spirulina* microalgae feedstock using direct transesterification near supercritical methanol condition. *Bioresour. Technol.* 239, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.073>
- Mohammadi, M., Mowla, D., Esmailzadeh, F., Ghasemi, Y., 2018. Cultivation of microalgae in a power plant wastewater for sulfate removal and biomass production: A batch study. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 2812–2820. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.037>
- Mojiri, A., Ozaki, N., Kazeroon, R.A., Rezaia, S., Baharlooeian, M., Vakili, M., Farraji, H., Ohashi, A., Kindaichi, T., Zhou, J.L., 2022. Contaminant Removal from Wastewater by Microalgal Photobioreactors and Modeling by Artificial Neural Network. *Water* 14, 4046. <https://doi.org/10.3390/w14244046>
- Monod, J., 1949. THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annu Rev Microbiol* 371–394.
- Monsigny, M., Petit, C., Roche, A.-C., 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* 175, 525–530. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90578-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90578-7)
- Moodley, P., 2021. Sustainable biofuels: opportunities and challenges, in: *Sustainable Biofuels : Opportunities and Challenges*. pp. 1–20.
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.* 40, 2799–2815. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Muralikrishna, I.V., Manickam, V., 2017. Chapter Five - Life Cycle Assessment, in: *Muralikrishna, I.V., Manickam, V. (Eds.), Environmental Management*. Butterworth-Heinemann, pp. 57–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811989-1.00005-1>
- Musgrove, E., 2017. Investigating the performance of paddlewheels used in microalgae raceways for the production of biomass. University of Southampton.
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.20107.030>
- Nakamura, D., 2006. Journally Speaking: the Mass Appeal of Biomass. *Oil Gas J.* 104, 15–16.
- Nalley, J.O., O'Donnell, D.R., Litchman, E., 2018. Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria. *Algal Res.* 35, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.018>
- Narendra, M.V., Shakti, M., Amitesh, S., Bhartendu, N.M., 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 1402–1411. <https://doi.org/10.5897/AJBx09.071>
- National Center for Biotechnology Information, 2005. Diagram of cell types.
- National Research Council (US) Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowances, 1989. *Recommended Dietary Allowances: 10th Edition*, The

- National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. National Academies Press (US), Washington (DC).
- NEUROtiker, 2008. Structure of Pectin.
- NEUROtiker, 2007. Structure of sucrose (saccharose).
- Nguyen, T.D.P., Le, T.V.A., Show, P.L., Nguyen, T.T., Tran, M.H., Tran, T.N.T., Lee, S.Y., 2019. Bioflocculation formation of microalgae-bacteria in enhancing microalgae harvesting and nutrient removal from wastewater effluent. *Bioresour. Technol.* 272, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.146>
- Niccolai, A., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R., 2019. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Res.* 42, 101617. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>
- Nikolaou, A., Booth, P., Gordon, F., Yang, J., Matar, O., Chachuat, B., 2016. Multi-Physics Modeling of Light-Limited Microalgae Growth in Raceway Ponds. *IFAC-Pap., Foundations of Systems Biology in Engineering - FOSBE 2016* 49, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.147>
- Notice et aide du logiciel ACV4E, 2018.
- Nzayisenga, J.C., Farge, X., Groll, S.L., Sellstedt, A., 2020. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnol. Biofuels* 13, 4. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1646-x>
- Observatoire national des services publics d'eau et d'assainissement, 2009. Les procédés de traitement des eaux usées.
- OECD, 2001. Test No. 303: Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment -- A: Activated Sludge Units; B: Biofilms, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264070424-en>
- O'Flaherty, E., Gray, N.F., 2013. A comparative analysis of the characteristics of a range of real and synthetic wastewaters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 8813–8830. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1863-y>
- Olguín, E.J., 2012. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>
- Olsson, J., Toth, G.B., Albers, E., 2020. Biochemical composition of red, green and brown seaweeds on the Swedish west coast. *J. Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02145-w>
- OpenStax, 2016. Phospholipid Structure.
- Ortiz, A., Díez-Montero, R., García, J., Khalil, N., Uggetti, E., 2022. Advanced biokinetic and hydrodynamic modelling to support and optimize the design of full-scale high rate algal ponds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 20, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.034>
- Oswald, W.J., Golueke, C.G., 1960. Biological Transformation of Solar Energy, in: Umbreit, W.W. (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 223–262. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70127-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70127-8)
- Palmer, J.S., Lawton, L.A., Kindt, R., Edwards, C., 2021. Rapid analytical methods for the microalgal and cyanobacterial biorefinery: Application on strains of industrial importance. *MicrobiologyOpen* 10, e1156. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1156>
- Pambrun, V., 2005. Analyse et modélisation de la nitrification partielle et de la précipitation concomitante du phosphore dans un réacteur à alimentation séquentielle (thesis). <http://www.theses.fr>. Toulouse, INSA.
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., Mishra, S., 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae

- Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.* 156, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Pandey, R., Premalatha, M., 2017. Design and analysis of flow velocity distribution inside a raceway pond using computational fluid dynamics. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40, 439–450. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1712-8>
- Pantami, H.A., Ahamad Bustamam, M.S., Lee, S.Y., Ismail, I.S., Mohd Faudzi, S.M., Nakakuni, M., Shaari, K., 2020. Comprehensive GCMS and LC-MS/MS Metabolite Profiling of *Chlorella vulgaris*. *Mar. Drugs* 18, 367. <https://doi.org/10.3390/md18070367>
- Pappalardo, C., 2018. SABANA Project: Innovative Biofertilizers and Biopesticides from Microalgae. *BE Sustain.* URL <https://www.besustainablemagazine.com/cms2/sabana-project-launched/> (accessed 12.19.22).
- Park, J., Jeong, H.J., Yoon, E.Y., Moon, S.J., Park, J., Jeong, H.J., Yoon, E.Y., Moon, S.J., 2016. Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *ALGAE* 31, 391–401. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.12.7>
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., 2011. Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Sci. Technol.* 63, 2403–2410. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.200>
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., 2010. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Sci. Technol.* 61, 633–639. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.951>
- Park, J.-I., Lee, J., Sim, S.J., Lee, J.-H., 2009. Production of hydrogen from marine macro-algae biomass using anaerobic sewage sludge microflora. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 307. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0241-y>
- Pasciucco, F., Pecorini, I., Iannelli, R., 2023. A comparative LCA of three WWTPs in a tourist area: Effects of seasonal loading rate variations. *Sci. Total Environ.* 863, 160841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160841>
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I., 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.114>
- Patel, A., Antonopoulou, I., Enman, J., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L., 2019. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: an overview of the current state of the art. *BMC Chem. Eng.* 1, 13. <https://doi.org/10.1186/s42480-019-0013-9>
- Pavard, M., 2019.
- Pedersen, O., Colmer, T.D., Sand-Jensen, K., 2013. Underwater Photosynthesis of Submerged Plants – Recent Advances and Methods. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00140>
- Peyraud, J.-L., Cellier, P., Donnars, C., Rechauchère, O., Aarts, F., Béline, F., Bockstaller, C.C., Bourblanc, M., Delaby, L., Dourmad, J.-Y., Dupraz, P., Durand, P., Faverdin, P., Fiorelli, J.-L., Gaigné, C., Kuikman, P., Langlais, A., Le Goffe, P., Lescoat, P., Morvan, T., Nicourt, C., Parnaudeau, V., Rochette, P., Vertès, F., Veysset, P., 2012. Les flux d’azote liés aux élevages : réduire les pertes, rétablir les équilibres. *Synthèse (Other)*. Inra - DEPE. <https://doi.org/10.15454/y0av-b820>
- Pham, L.A., 2018. Consortium algues-bactéries des lagunes à haut rendement algal : évaluation des performances, devenir des nutriments des eaux usées et conception à base de modèles expérimentaux et numériques (thesis). <http://www.theses.fr>. Strasbourg.
- Pham, L.A., Laurent, J., Bois, P., Teshome, T.M., Wanko, A., 2021. Operating a semi-continuous raceway pond allows to link pH and oxygen dynamics to the interaction

- between microalgae and bacteria. *DESALINATION WATER Treat.* 211, 105–116. <https://doi.org/10.5004/dwt.2021.26506>
- Pham, L.A., Laurent, J., Bois, P., Wanko, A., 2019. Finding optimal algal/bacterial inoculation ratio to improve algal biomass growth with wastewater as nutrient source. *Water SA* 45. <https://doi.org/10.17159/wsa/2019.v45.i4.7543>
- Pham, L.A., Laurent, J., Bois, P., Wanko, A., 2018. Impacts of operational conditions on oxygen transfer rate, mixing characteristics and residence time distribution in a pilot scale high rate algal pond. *Water Sci. Technol.* 78, 1782–1791. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.461>
- Picot, B., Bahlaoui, A., Moersidik, S., Baleux, B., Bontoux, J., 1992. Comparison of the Purifying Efficiency of High Rate Algal Pond with Stabilization Pond. *Water Sci. Technol.* 25, 197–206. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0351>
- Pinger, C., Copeman, L., Stowell, M., Cormack, B., Fugate, C., Rogers, M., 2022. Rapid measurement of total lipids in zooplankton using the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Anal. Methods* 14, 2665–2672. <https://doi.org/10.1039/D2AY00665K>
- Pipes, W.O., 1962. pH Variation and BOD Removal in Stabilization Ponds. *J. Water Pollut. Control Fed.* 34, 1140–1150.
- Plouviez, M., Guieysse, B., 2020. Nitrous oxide emissions during microalgae-based wastewater treatment: current state of the art and implication for greenhouse gases budgeting. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 82, 1025–1030. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.304>
- Posadas, E., Morales, M. del M., Gomez, C., Acién, F.G., Muñoz, R., 2015. Influence of pH and CO<sub>2</sub> source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chem. Eng. J.* 265, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.059>
- Posten, C., Walter, C. (Eds.), 2013. *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110225020>
- Pradel, M., Aissani, L., Villot, J., Baudez, J.-C., Laforest, V., 2016. From waste to added value product: towards a paradigm shift in life cycle assessment applied to wastewater sludge – a review. *J. Clean. Prod.* 131, 60–75. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.076>
- Prussi, M., Buffi, M., Casini, D., Chiaramonti, D., Martelli, F., Carnevale, M., Tredici, M.R., Rodolfi, L., 2014. Experimental and numerical investigations of mixing in raceway ponds for algae cultivation. *Biomass Bioenergy* 67, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.024>
- Punal, 2000. INFLUENCE OF C:N RATIO ON THE START-UP OF UPFLOW ANAEROBIC FILTER REACTORS.
- Rafiqul, I.M., Hassan, A., Sulebele, G., Orosco, C.A., Roustaian, P., Jalal, K.C.A., 2003. Salt Stress Culture of Blue-green Algae *Spirulina fusiformis*. *Pak. J. Biol. Sci.* 6, 648–650. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.648.650>
- Ram, M., Mondal, M.K., 2022. Chapter 13 - Biomass gasification: a step toward cleaner fuel and chemicals, in: Gurunathan, B., Sahadevan, R., Zakaria, Z.A. (Eds.), *Biofuels and Bioenergy*. Elsevier, pp. 253–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85269-2.00008-3>
- Ramírez-Romero, A., Martin, M., Boyer, A., Bolzoni, R., Matricon, L., Sassi, J.-F., Steyer, J.-P., Delrue, F., 2023. Microalgae adaptation as a strategy to recycle the aqueous phase from hydrothermal liquefaction. *Bioresour. Technol.* 371, 128631. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128631>
- Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau 2017: Les eaux usées: une ressource inexploitée - UNESCO Bibliothèque Numérique [WWW

- Document], n.d. URL <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247551> (accessed 4.21.20).
- Rayen, F., Behnam, T., Dominique, P., 2019. Optimization of a raceway pond system for wastewater treatment: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 422–435. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1571007>
- Redfield, A.C., Ketchum, B.H., Richards, F.A., 1963. The influence of organisms on the composition of sea-water. *Sea Ideas Obs. Prog. Study Seas.*
- Reichert, P., 1994. AQUASIM – A TOOL FOR SIMULATION AND DATA ANALYSIS OF AQUATIC SYSTEMS. *Water Sci. Technol.* 30, 21–30. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0025>
- Reichert, P., Borchardt, D., Henze, M., Rauch, W., Shanahan, P., Somlyódy, L., Vanrolleghem, P., 2001. River Water Quality Model no. 1 (RWQM1): II. Biochemical process equations. *Water Sci. Technol.* 43, 11–30. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0241>
- Richard, R., 2011. Transestérification éthanolique d’huile végétale dans des microréacteurs : transposition du batch au continu. INP, Toulouse.
- Richfield, D., 2007. Chlorophyll a.
- Richmond, A., Hu, Q., 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology.* John Wiley & Sons.
- Risch, E., Boutin, C., 2011. ACV comparative inter-filières de traitement des eaux usées Filtres plantés de roseaux à flux verticaux vs boues activées.
- Risch, E., Boutin, C., 2010. Modèle ACV – Filière de traitement des eaux usées par filtres plantés de roseaux à flux verticaux (FPRv) Rapports d’ACV et données d’inventaire.
- Risch, E., Roux, P., Boutin, C., Héduit, A., 2012. L’analyse de cycles de vie (ACV) des systèmes d’assainissement : un outil complémentaire d’aide à la décision. *Sci. Eaux Territ.* Numéro 9, 82. <https://doi.org/10.3917/set.009.0082>
- Rittmann, B., McCarty, P., 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications.* McGraw-Hill.
- Rodas-Zuluaga, L.I., Castañeda-Hernández, L., Castillo-Vacas, E.I., Gradiz-Menjivar, A., López-Pacheco, I.Y., Castillo-Zacarías, C., Bouilly, L., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R., 2021. Bio-capture and influence of CO<sub>2</sub> on the growth rate and biomass composition of the microalgae *Botryococcus braunii* and *Scenedesmus* sp. *J. CO<sub>2</sub> Util.* 43, 101371. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101371>
- Rodjaroen, S., Juntawong, N., Mahakhant, A., Miyamoto, K., 2007. High Biomass Production and Starch Accumulation in Native Green Algal Strains and Cyanobacterial Strains of Thailand. *Agric. Nat. Resour.* 41, 570–575.
- Rossi, S., Bellucci, M., Marazzi, F., Mezzanotte, V., Ficara, E., 2018. Activity assessment of microalgal-bacterial consortia based on respirometric tests. *Water Sci. Technol.* 78, 207–215. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.078>
- Rossi, S., Casagli, F., Mantovani, M., Mezzanotte, V., Ficara, E., 2020a. Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater. *Bioresour. Technol.* 305, 122995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122995>
- Rossi, S., Sforza, E., Pastore, M., Bellucci, M., Casagli, F., Marazzi, F., Ficara, E., 2020b. Photo-respirometry to shed light on microalgae-bacteria consortia—a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19, 43–72. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09524-2>
- Rui, X., Pay, E., Tianrong, G., Fang, Y., Wudi, Z., 2009. The Potential of Blue-Green Algae for Producing Methane in Biogas Fermentation, in: Goswami, D.Y., Zhao, Y. (Eds.), *Proceedings of ISES World Congress 2007 (Vol. I – Vol. V).* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2426–2429. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75997-3\\_491](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75997-3_491)
- Ryan, C., 2009. *Cultivating Clean Energy : The Promise of Algae Biofuels.*

- Ryckebosch, E., Muylaert, K., Eeckhout, M., Ruysen, T., Foubert, I., 2011. Influence of Drying and Storage on Lipid and Carotenoid Stability of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11063–11069. <https://doi.org/10.1021/jf2025456>
- Safi, C., Frances, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.-Y., 2015. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Res.* 8, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002>
- Samson, R., LeDuyt, A., 1986. Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1014–1023. <https://doi.org/10.1002/bit.260280712>
- Sánchez Hernández, E.P., Travieso Córdoba, L., 1993. Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. *Resour. Conserv. Recycl.* 9, 127–132. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(93\)90037-G](https://doi.org/10.1016/0921-3449(93)90037-G)
- Sánchez-Zurano, A., Gómez-Serrano, C., Acién-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2020. A novel photo-respirometry method to characterize consortia in microalgae-related wastewater treatment processes. *Algal Res.* 47, 101858. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101858>
- Sancho, I., Lopez-Palau, S., Arespachaga, N., Cortina, J.L., 2019. New concepts on carbon redirection in wastewater treatment plants: A review. *Sci. Total Environ.* 647, 1373–1384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.070>
- Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* 6, 899. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Sarpal, A.S., Teixeira, C.M.L.L., Silva, P.R.M., Lima, G.M., Silva, S.R., Monteiro, T.V., Cunha, V.S., Daroda, R.J., 2015. Determination of lipid content of oleaginous microalgal biomass by NMR spectroscopic and GC-MS techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 3799–3816. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8613-6>
- Savitsky, A., 2019. Unicellular algae.
- Sawant, S.S., Gosavi, S.N., Khadamkar, H.P., Mathpati, C.S., Pandit, R., Lali, A.M., 2019. Energy efficient design of high depth raceway pond using computational fluid dynamics. *Renew. Energy* 133, 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.1016>
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Res.* 1, 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Schmid, B., Navalho, S., Schulze, P.S.C., Van De Walle, S., Van Royen, G., Schüler, L.M., Maia, I.B., Bastos, C.R.V., Baune, M.-C., Januschewski, E., Coelho, A., Pereira, H., Varela, J., Navalho, J., Cavaco Rodrigues, A.M., 2022. Drying Microalgae Using an Industrial Solar Dryer: A Biomass Quality Assessment. *Foods* 11, 1873. <https://doi.org/10.3390/foods11131873>
- Schwerna, P., Hübner, H., Buchholz, R., 2017. Quantification of oxygen production and respiration rates in mixotrophic cultivation of microalgae in nonstirred photobioreactors. *Eng. Life Sci.* 17, 140–144. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600004>
- Sharma, K.K., Schuhmann, H., Schenk, P.M., 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* 5, 1532–1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Shaul, O., 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* 307–321. <https://doi.org/10.1023/A:1016091118585>
- Shebanova, A., Ismagulova, T., Solovchenko, A., Baulina, O., Lobakova, E., Ivanova, A., Moiseenko, A., Shaitan, K., Polshakov, V., Nedbal, L., Gorelova, O., 2017. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission

- electron microscopy. *Protoplasma* 254, 1323–1340. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1024-5>
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; Close-Out Report (No. NREL/TP-580-24190, 15003040). <https://doi.org/10.2172/15003040>
- Shelef, G., Azov, Y., 1987. High-Rate Oxidation Ponds: The Israeli Experience. *Water Sci. Technol.* 19, 249–255. <https://doi.org/10.2166/wst.1987.0153>
- Shoener, B.D., 2019. Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: A critical review 20.
- Silva, N.C., Machado, M.V.C., Brandão, R.J., Duarte, C.R., Barrozo, M.A.S., 2019. Dehydration of microalgae *Spirulina platensis* in a rotary drum with inert bed. *Powder Technol.* 351, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.04.025>
- Silva, S.C., Ferreira, I.C.F.R., Dias, M.M., Barreiro, M.F., 2020. Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. *Molecules* 25, 3406. <https://doi.org/10.3390/molecules25153406>
- Singh, G., Patidar, S.K., 2018. Microalgae harvesting techniques: A review. *J. Environ. Manage.* 217, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Singh, N., Sarma, S., 2022. Chapter 21 - Biological routes of hydrogen production: a critical assessment, in: Sahay, S. (Ed.), *Handbook of Biofuels*. Academic Press, pp. 419–434. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822810-4.00021-X>
- Sivakaminathan, S., Wolf, J., Yarnold, J., Roles, J., Ross, I.L., Stephens, E., Henderson, G., Hankamer, B., 2020. Light guide systems enhance microalgae production efficiency in outdoor high rate ponds. *Algal Res.* 47, 101846. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101846>
- Sizer, F., Whitney, E., 2013. *Nutrition : Concepts & Controversies*. Heinle.
- Solimeno, A., García, J., 2019. Microalgae and bacteria dynamics in high rate algal ponds based on modelling results: Long-term application of BIO\_ALGAE model. *Sci. Total Environ.* 650, 1818–1831. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.345>
- Solimeno, A., Parker, L., Lundquist, T., García, J., 2017. Integral microalgae-bacteria model (BIO\_ALGAE): Application to wastewater high rate algal ponds. *Sci. Total Environ.* 601–602, 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.215>
- Sørensen, S.T., Campbell, M.L., Duke, E., Manley-Harris, M., 2018. A standard, analytical protocol for the quantitation of non-structural carbohydrates in seagrasses that permits inter-laboratory comparison. *Aquat. Bot.* 151, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.08.006>
- Spanjers, H., 2008. *Respirometry in Activated Sludge* 205.
- Sperling, M., 2007. *Waste stabilisation ponds, Biological wastewater treatment series*. IWA Publ, London.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., Prasertsan, P., Kato, Y., Asano, Y., 2018. Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: Nutrient starvations and cost-effective harvesting process. *Renew. Energy* 122, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.121>
- Steele, J.H., 1962. Environmental Control of Photosynthesis in the Sea. *Limnol. Oceanogr.* 7, 137–150. <https://doi.org/10.4319/lo.1962.7.2.0137>
- Stricker, A.E., Husson, A., Canler, J.-P., 2017. Consommation énergétique du traitement intensif des eaux usées en France : état des lieux et facteurs de variation. *Irstea*.

- Su, Y., 2021. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 762, 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2012. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresour. Technol.* 105, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.113>
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Res.* 45, 3351–3358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.046>
- Sun, C.-H., Fu, Q., Liao, Q., Xia, A., Huang, Y., Zhu, X., Reungsang, A., Chang, H.-X., 2019. Life-cycle assessment of biofuel production from microalgae via various bioenergy conversion systems. *Energy* 171, 1033–1045. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.01.074>
- Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J., 2015a. The effects of CO<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water Res.* 70, 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.1064>
- Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J., 2015b. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol., Advances in biofuels and chemicals from algae* 184, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.1074>
- Sutherland, D.L., Park, J., Ralph, P.J., Craggs, R., 2021. Ammonia, pH and dissolved inorganic carbon supply drive whole pond metabolism in full-scale wastewater high rate algal ponds. *Algal Res.* 58, 102405. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102405>
- Sutherland, D.L., Park, J., Ralph, P.J., Craggs, R.J., 2020. Improved microalgal productivity and nutrient removal through operating wastewater high rate algal ponds in series. *Algal Res.* 47, 101850. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101850>
- Sutherland, D.L., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J., 2014. Effects of two different nutrient loads on microalgal production, nutrient removal and photosynthetic efficiency in pilot-scale wastewater high rate algal ponds. *Water Res.* 66, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.010>
- Syndicat des énergies renouvelables, GRDF, GRTgaz, SPEGNN, Teréga, 2021. Panorama des gaz renouvelables en 2021.
- Tahmasebi, A., Kassim, M.A., Yu, J., Bhattacharya, S., 2013. Thermogravimetric study of the combustion of *Tetraselmis suecica* microalgae and its blend with a Victorian brown coal in O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmospheres. *Bioresour. Technol.* 150, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.113>
- Tan, F., Wang, Z., Zhouyang, S., Li, H., Xie, Y., Wang, Y., Zheng, Y., Li, Q., 2016. Nitrogen and phosphorus removal coupled with carbohydrate production by five microalgae cultures cultivated in biogas slurry. *Bioresour. Technol.* 221, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.030>
- Tang, C.-C., Zhang, X.-Y., Wang, R., Wang, T.-Y., He, Z.-W., Wang, X.C., 2021. Calcium ions-effect on performance, growth and extracellular nature of microalgal-bacterial symbiosis system treating wastewater. *Environ. Res.* 112228. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112228>
- Taylor, R.P., Jones, C.L.W., Laubscher, R.K., 2021. Empirical comparison of activated sludge and high rate algal ponding technologies used to recover water, nitrogen and carbon from brewery effluent. *J. Water Process Eng.* 40, 101840. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101840>

- Tchobanoglous, G., Schroeder, E.E., 1985. Water quality: Characteristics, modeling, modification.
- Tejido-Nuñez, Y., Aymerich, E., Sancho, L., Refardt, D., 2020. Co-cultivation of microalgae in aquaculture water: Interactions, growth and nutrient removal efficiency at laboratory- and pilot-scale. *Algal Res.* 49, 101940. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101940>
- Templeton, D.W., Quinn, M., Van Wycken, S., Hyman, D., Laurens, L.M.L., 2012. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *J. Chromatogr. A* 1270, 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.1034>
- Thangalazhy-Gopakumar, S., Adhikari, S., Chattanathan, S.A., Gupta, R.B., 2012. Catalytic pyrolysis of green algae for hydrocarbon production using H+ZSM-5 catalyst. *Bioresour. Technol.* 118, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.080>
- Thompson, G.A., 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1302, 17–45. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8)
- Tien Thanh, N., Mostapha, M., Lam, M.K., Ishak, S., Kanna Dasan, Y., Lim, J.W., Tan, I.S., Lau, S.Y., Chin, B.L.F., Hadibarata, T., 2022. Fundamental understanding of in-situ transesterification of microalgae biomass to biodiesel: A critical review. *Energy Convers. Manag.* 270, 116212. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116212>
- Toumi, A., Nejmeddine, A., El Hamouri, B., 2000. Heavy metal removal in waste stabilisation ponds and high rate ponds. *Water Sci. Technol.* 42, 17–21. <https://doi.org/10.2166/wst.2000599>
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S., Garg, M.O., 2015. Algae based biorefinery— How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>
- Turon, V., 2015. Coupling dark fermentation with microalgal heterotrophy: influence of fermentation metabolites mixtures, light, temperature and fermentation bacteria on microalgal growth. Université de Montpellier.
- Ueda, R., Hirayama, S., Sugata, K., Nakayama, H., 1996. Process for the production of ethanol from microalgae. US5578472A.
- Uggetti, E., Sialve, B., Hamelin, J., Bonnafous, A., Steyer, J.-P., 2018. CO<sub>2</sub> addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater. *J. CO<sub>2</sub> Util.* 28, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.1009>
- Ummalyma, S.B., Gnansounou, E., Sukumaran, R.K., Sindhu, R., Pandey, A., Sahoo, D., 2017. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. *Bioresour. Technol.*, Special Issue on International Conference on Current Trends in Biotechnology & post ICCB-2016 conference on Strategies for Environmental Protection and Management (ICSEPM-2016) 242, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.097>
- Unnithan, V.V., Unc, A., Smith, G.B., 2014. Mini-review: A priori considerations for bacteria–algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. *Algal Res.*, Progress and Perspectives on Microalgal Mass Culture 4, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.009>
- Vachon, A., Naturelle, G., Tondeux, P., Bourdon, F., 1992. La déphosphatation biologique des eaux usées. Illustration de l'expérience de Blois.
- Vadlamani, A., Viamajala, S., Pendyala, B., Varanasi, S., 2017. Cultivation of Microalgae at Extreme Alkaline pH Conditions: A Novel Approach for Biofuel Production. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 7284–7294. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01534>
- Valigore, J.M., Gostomski, P.A., Wareham, D.G., O'Sullivan, A.D., 2012. Effects of hydraulic and solids retention times on productivity and settleability of microbial (microalgal-

- bacterial) biomass grown on primary treated wastewater as a biofuel feedstock. *Water Res.* 46, 2957–2964. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.023>
- Van Den Hende, S., Beelen, V., Julien, L., Lefoulon, A., Vanhoucke, T., Coolsaet, C., Sonnenholzner, S., Vervaeren, H., Rousseau, D.P.L., 2016. Technical potential of microalgal bacterial floc raceway ponds treating food-industry effluents while producing microalgal bacterial biomass: An outdoor pilot-scale study. *Bioresour. Technol.* 218, 969–979. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.065>
- Van Wychen, S., Laurens, L.M.L., 2016. Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (No. NREL/TP-5100-60957, 1118073). <https://doi.org/10.2172/1118073>
- Van Wychen, S., Long, W., Black, S.K., Laurens, L.M.L., 2017. MBTH: A novel approach to rapid, spectrophotometric quantitation of total algal carbohydrates. *Anal. Biochem.* 518, 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.11.014>
- Varfolomeev, S.D., Wasserman, L.A., 2011. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Appl. Biochem. Microbiol.* 47, 789–807. <https://doi.org/10.1134/S0003683811090079>
- VerBerkmoes, N.C., Deneff, V.J., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2009. Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 196–205. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2080>
- Villagràcia, A.R.C., Mayol, A.P., Ubando, A.T., Biona, J.B.M.M., Arboleda, N.B., David, M.Y., Tumlos, R.B., Lee, H., Lin, O.H., Espiritu, R.A., Culaba, A.B., Kasai, H., 2016. Microwave drying characteristics of microalgae (*Chlorella vulgaris*) for biofuel production. *Clean Technol. Environ. Policy* 18, 2441–2451. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1169-0>
- Villay, A., 2013. Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale d'un exopolysaccharide produit par une microalgue rouge, *Rhodella violacea*: application à l'obtention d'actifs antiparasitaires. Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
- Voloshin, R., Rodionova, M., Zharmukhamedov, S., Veziroglu, T., Allakhverdiev, S., 2016. Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *Int. J. Hydrog. Energy* 41. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.084>
- Wágner, D.S., Cazzaniga, C., Steidl, M., Dechesne, A., Valverde-Pérez, B., Plósz, B.G., 2021. Optimal influent N-to-P ratio for stable microalgal cultivation in water treatment and nutrient recovery. *Chemosphere* 262, 127939. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127939>
- Wágner, D.S., Valverde-Pérez, B., Sæbø, M., Bregua de la Sotilla, M., Van Wagenen, J., Smets, B.F., Plósz, B.G., 2016. Towards a consensus-based biokinetic model for green microalgae - The ASM-A. *Water Res.* 103, 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.026>
- 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. *Bioresour. Technol.* 102, 2724–2730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.026>
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresour. Technol.* 129, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.062>
- Wang, Y., Tibbetts, S.M., McGinn, P.J., 2021. Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements. *Foods* 10, 3002. <https://doi.org/10.3390/foods10123002>
- Ward, A.J., Lewis, D.M., Green, F.B., 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Res.* 5, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>

- Wertz, J.-L., 2013. Bioraffineries de deuxième génération utilisant la voie biochimique.
- Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., Jefferson, B., 2016. Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Res.* 91, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.054>
- Winkler, M., 2015. Nutriments : proportions optimales pour le traitement des eaux.
- Wu, W., Lei, Y.-C., Chang, J.-S., 2019. Life cycle assessment of upgraded microalgae-to-biofuel chains. *Bioresour. Technol.* 288, 121492. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121492>
- Xia, L., Rong, J., Yang, H., He, Q., Zhang, D., Hu, C., 2014. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. *Bioresour. Technol.* 161, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.063>
- Yadala, S., Cremaschi, S., 2016. A Dynamic Optimization Model for Designing Open-Channel Raceway Ponds for Batch Production of Algal Biomass. *Processes* 4, 10. <https://doi.org/10.3390/pr4020010>
- Yamada, H., 2021. Amine-based capture of CO<sub>2</sub> for utilization and storage. *Polym. J.* 53, 93–102. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00400-y>
- Yamada, T., Sakaguchi, K., 1982. Comparative studies on *Chlorella* cell walls: Induction of protoplast formation. *Arch. Microbiol.* 132, 10–13. <https://doi.org/10.1007/BF00690809>
- Yan, Q., Zhao, M., Miao, H., Ruan, W., Song, R., 2010. Coupling of the hydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHA) production through anaerobic digestion from Taihu blue algae. *Bioresour. Technol.* 101, 4508–4512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.20101.073>
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X., 2010. Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. *Int. J. Hydrog. Energy, HE (Hydrogen Systems and Materials For Sustainability)* 35, 9618–9623. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.20107.017>
- Yemm, E.W., Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508–514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>
- Yen, H.-W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.010>
- Yikrazuul, 2009. Different illustrations of alpha-D-Glucopyranose: Tollens (1); Haworth (2); chair (3); absolut stereo (4).
- Young, P., Buchanan, N., Fallowfield, H.J., 2016. Inactivation of indicator organisms in wastewater treated by a high rate algal pond system. *J. Appl. Microbiol.* 121, 577–586. <https://doi.org/10.1111/jam.13180>
- Young, P., Taylor, M., Fallowfield, H.J., 2017. Mini-review: high rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 117. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2282-x>
- Yun, C.-J., Hwang, K.-O., Han, S.-S., Ri, H.-G., 2019. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass Bioenergy* 127, 105277. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105277>
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W., 2012. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Appl. Energy* 92, 733–738. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.017>
- Zambrano, J., Krustok, I., Nehrenheim, E., Carlsson, B., 2016. A simple model for algae-bacteria interaction in photo-bioreactors. *Algal Res.* 19, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.022>

- Zhang, M., Leung, K.-T., Lin, H., Liao, B., 2021. Effects of solids retention time on the biological performance of a novel microalgal-bacterial membrane photobioreactor for industrial wastewater treatment. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 105500. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105500>
- Zouhir, F., 2008. Modélisation d'une filière de traitement des eaux usées - Chenal Algal à haut Rendement (Thèse de doctorat). Liège, Université de Liège.



**Julie FARINACCI**

**Biomasse photoactivée  
pour le traitement des  
eaux résiduaires :  
influence des conditions  
opératoires sur le potentiel  
de récupération de  
ressources**



## Résumé

En épuration, dans les consortiums microalgues-bactéries, les algues convertissent par photosynthèse le  $\text{CO}_2$  et les nutriments en biomasse et en  $\text{O}_2$ . Les bactéries utilisent l' $\text{O}_2$  libéré pour dégrader les composés organiques et oxyder l'azote ammoniacal tout en produisant les nitrates et le  $\text{CO}_2$  pour les microalgues.

Dans le photobioréacteur séquentiel, l'ajout de  $\text{CO}_2$  n'a pas eu d'impact significatif sur les mécanismes d'épuration, mais la dynamique du pH et de l' $\text{O}_2$  dissous a été influencée. Dans le chenal à haut rendement algal, d'autres modalités (vitesse d'agitation, variabilité des eaux usées, âge de boues) ont été testées.

Le dynamique du consortium a été évaluée avec l' $\text{O}_2$  dissous et la simulation des données via un modèle simplifié. Les populations de microorganismes et les mécanismes biologiques associés ont été identifiés.

Enfin, une analyse du cycle de vie a été adoptée pour évaluer le chenal comme filière d'épuration.

**Mots clés : traitement des eaux usées, chenal à haut rendement algal, microalgues**

## Résumé en anglais

For wastewater treatment, in microalgae-bacteria consortia, algae convert  $\text{CO}_2$  and nutrients into biomass and  $\text{O}_2$  by photosynthesis. Bacteria use the released  $\text{O}_2$  to degrade organic compounds and oxidize ammoniacal nitrogen while producing nitrates and  $\text{CO}_2$  for microalgae.

In the sequential photobioreactor, the addition of  $\text{CO}_2$  did not have a significant impact on the treatment mechanisms, but the dynamics of pH and dissolved  $\text{O}_2$  were influenced. In high rate algal pond, other conditions (mixing speed, wastewater variability, sludge age) were tested.

The dynamics of the consortium were evaluated with dissolved O<sub>2</sub> and simulation data via a simplified model. The populations of microorganisms and the associated biological mechanisms have been identified.

Finally, a life cycle analysis was adopted to assess the channel as a wastewater treatment system.

**Keywords : wastewater treatment, high-rate algal pond, microalgae**