



HAL
open science

Couplage des cultures de microalgues avec la méthanisation : traitement et valorisation de la matière et de l'énergie dans le cadre de la bioraffinerie environnementale

Bruno Sialve

► **To cite this version:**

Bruno Sialve. Couplage des cultures de microalgues avec la méthanisation : traitement et valorisation de la matière et de l'énergie dans le cadre de la bioraffinerie environnementale. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 2013. Français. NNT : . tel-02810041

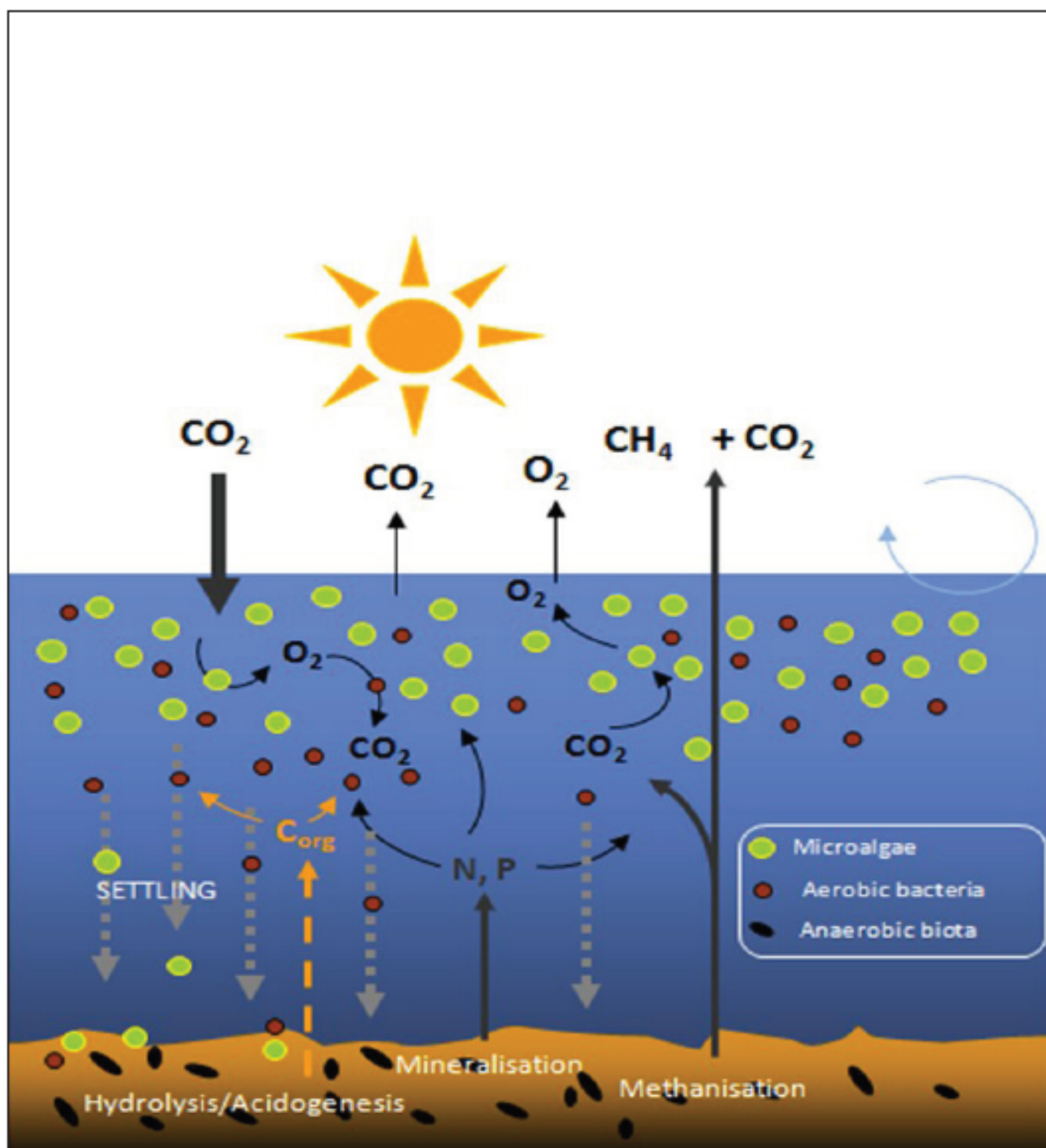
HAL Id: tel-02810041

<https://hal.inrae.fr/tel-02810041>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



COUPLAGE DES CULTURES DE MICROALGUES AVEC LA MÉTHANISATION

TRAITEMENT ET VALORISATION DE LA MATIÈRE ET DE L'ÉNERGIE DANS LE CADRE DE LA BIORAFFINERIE ENVIRONNEMENTALE

MICROALGAE CULTIVATION AND ANAEROBIC DIGESTION : ORGANIC MATTER AND ENERGY TREATMENT AND RECOVERY AS PART OF ENVIRONMENTAL BIOREFINERY

THESE

Couplage des cultures de microalgues avec la méthanisation : traitement et valorisation de la matière et de l'énergie dans le cadre de la bioraffinerie environnementale.

Présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Ecole doctorale

Ecole doctorale de Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement)

Par

Bruno Sialve

Le 15 Juillet 2013

devant la Commission d'examen

BERNARD Olivier	Directeur de Recherche	Examineur
BUFFIERE Pierre	Professeur	Directeur de Thèse
CADORET Jean-Paul	Directeur de Recherche	Rapporteur
COLONNA Paul	Directeur de Recherche	Examineur
GOURDON Rémy	Professeur	Examineur
STEYER Jean-Philippe	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse
VERSTRAETE Willy	Professeur	Rapporteur

Résumé

L'utilisation des microalgues dans les filières bioénergies est une thématique qui connaît un développement remarquable ces dernières années. Si dans une perspective d'exploitation de masse, elles permettent de répondre plus favorablement aux contraintes qui pèsent sur l'exploitation des biocarburants de première et de deuxième génération, elles se heurtent également à la question de la demande en éléments nutritifs mais aussi à un bilan énergétique défavorable. En conséquence, il apparaît difficile de répondre à une exigence de durabilité attendue pour ce nouveau gisement. Ce travail de thèse s'est intéressé à une solution permettant à la fois de recycler les éléments nutritifs présents dans la biomasse et de fournir de l'énergie au système de production voire de transformation : la digestion anaérobie. Les travaux se sont particulièrement focalisés sur l'intégration de la production de microalgues et de la méthanisation au travers de la conversion énergétique de cette biomasse et de la mobilisation des éléments nutritifs vers la culture à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote. Après avoir identifié les contraintes associées à la biodégradabilité anaérobie des microalgues et les stratégies d'optimisation, nous avons mis en évidence que le potentiel énergétique est contraint par la qualité propre des cellules et une capacité de résistance à la dégradation biologique. L'application de stratégies d'optimisation de cette étape de conversion via l'utilisation de prétraitement thermique a montré qu'il est possible d'augmenter les rendements de production d'énergie et d'éléments minéraux mobilisables vers la culture. L'utilisation d'un écosystème naturel microalgue-bactérie destiné à la production en milieu ouvert et qui utilise un digestat synthétique comme milieu de culture a révélé le rôle déterminant de la flore bactérienne associée en interaction avec les microalgues. Ces résultats ont été évalués dans un système de production à l'échelle pilote préindustrielle en conditions extérieures, conçu et opéré spécifiquement pour répondre à cette problématique. Les caractéristiques propres du bassin de culture déterminent le comportement hydrodynamique du milieu et le comportement physique et écologique de la population phytoplanctonique mobilisée. L'étude de la dynamique des communautés microbiennes, eucaryotes et procaryotes, confirme le potentiel de résilience et de production d'un écosystème complexe soumis aux contraintes de son environnement. Les résultats de ces travaux ouvrent des perspectives de gestion et d'optimisation des procédés intégrant l'algoculture et la méthanisation qui peuvent répondre plus largement à des problématiques environnementales et de production de molécules d'intérêt au-delà des filières énergétiques.

Mots clés : microalgues, digestion anaérobie, bioénergie, communautés microbiennes, recyclage d'éléments nutritifs.

Abstract

In recent years, there has been an explosion of interest in the use of microalgae as a source of bioenergy. Mass cultivation of microalgae for bioenergy production promises several advantages compared to first and second generation biofuels. However, similar difficulties in terms of nutrient requirements and an unfavourable energy balance are faced. As a consequence, achieving the sustainable levels of microalgal culture required to implement this strategy in the longer term appears problematic. The work presented in this thesis focuses on anaerobic digestion; a solution which allows both recycling of nutrients and supply of energy to the production and downstream processes. In particular, the studies presented here have been directed towards the integration of microalgal culture and methanisation, at both the laboratory and pilot scale. The guiding principle used is conversion of biomass and provision of nutrients to the culture. We first identified the constraints and potential strategies associated with the aerobic biodegradability of microalgae. Next, we demonstrated that the energetic potential of cells is limited by their quality as well as their level of resistance to biological degradation. We have shown that it is possible to optimise the conversion step, increasing energy yields and nutrient mineralisation via a strategy of thermal pretreatment. The use of a natural microalgae-bacteria ecosystem which uses a synthetic digestate as culture media, revealed a key role for bacterial flora interacting with microalgae. These results were further tested in a pilot-level production system specifically designed to address these questions. The evidence suggests that the characteristics of the culture pond determine both the hydrodynamic behaviour of the culture and the physical and ecological behaviour of the phytoplanktonic population. A study of the dynamics of the microbial, eukaryotic and prokaryotic communities suggests the presence of a resilient and complex ecosystem, which is influenced by variations in its environment. The results of this work provide opportunities for management and optimisation of processes integrating microalgae cultivation and methanisation beyond bioenergy production, for example liquid wastes treatment and production of high-value byproducts.

Keywords : microalgae, anaerobic digestion, bioenergy, microbial communities, nutrients recycling

Remerciements

Je remercie très chaleureusement Pierre Buffière et Jean-Philippe Steyer, mes directeurs et codirecteurs de thèse pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail et qui m'ont accompagné et soutenu dans cette démarche. Mes remerciements s'adressent également à Jean-Paul Cadoret et Willy Verstraete qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce document. Egalement, je remercie les autres membres du Jury, Paul Colonna, Olivier Bernard d'avoir accepté d'être membres du Jury et à Rémy Gourdon d'en avoir été le président. Merci à vous tous pour m'avoir fait l'immense honneur d'examiner ce travail.

Ce travail de thèse marque une étape majeure dans mon parcours professionnel et personnel. J'adresse ainsi toute ma gratitude à Olivier Bernard, Pierre Buffière et Jean-Philippe Steyer pour la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée, le soutien indéfectible dont ils ont fait preuve et tout ce qu'ils m'ont transmis et apporté sur le plan scientifique. Puisseons-nous poursuivre ce plaisir de faire de la « belle » science ensemble !

L'aventure du projet ANR Symbiose a été déterminante pour mener à bien ce travail, aussi je tiens à adresser mes remerciements à l'ensemble des « symbiontes » avec lesquels j'ai eu l'honneur et le plaisir de collaborer pendant ces trois années. A l'ensemble du personnel du LBE impliqué dans ce projet, Guillaume, Jérôme, Eric, Renaud, Laurent, Arnaud, Cristina, Nicolas ainsi que Nadine et Sylvie, un grand merci pour votre soutien, votre participation enthousiaste et vos précieux conseils. A mes collaborateurs de chez Naskeo Environnement, Romy-Alice, Bruno, Emilie, Romain pour ces années passées ensemble. A la joyeuse équipe du LPBA de l'Ifremer, Gael, Jean-Paul, Myriam et tous ceux que j'ai côtoyé avec plaisir. A cette sympathique équipe d'Ecosym, Eric, Christophe et Christophe (72 powa) pour nos fructueux et chaleureux échanges. Enfin, au personnel de l'équipe Projet Biocore, Olivier, Antoine et Jean-Luc pour toutes ces années d'échanges et de précieuses collaborations.

Egalement, je tiens à remercier chaleureusement Maia, Mathieu, Alexis, pour leurs encouragements et leurs conseils et le personnel du LBE dans son ensemble sans lequel ce travail n'aurait pu être accompli. A ma famille et mes amis qui de prêt ou de loin m'ont accompagné toutes ces années.

A mes parents, à mon frère,

A Lola Clemy Pia,

Liste des communications

- **Revues internationales à comité de lecture**

[1] Enrica Uggetti, [Bruno Sialve](#), Jean-Philippe Steyer

Growth performance of a freshwater algal ecosystem: effect of low temperature and carbon dioxide addition Soumis à [Journal of Applied Energy](#) (2013)

[2] Cristina González-Fernández, [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Jean Philippe Steyer

Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass.

[Bioresource Technology](#), Volume 129, pp 219-223, 2013

[3] Christophe Vasseur, Gaël Bougaran, Matthieu Garnier, Jérôme Hamelin, Christophe Leboulanger, Myriam Le Chevanton, Behzad Mostajir, [Bruno Sialve](#) Jean-Philippe Steyer, Eric Fouilland.

Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae–bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion.

[Bioresource Technology](#) , Volume 119, pp 79-87, 2012

[4] Cristina González-Fernández, [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Jean Philippe Steyer

Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass.

[Biomass and Bioenergy](#), Volume 40, pp 105-111, 2012

[5] Cristina Gonzalez-Fernandez, [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Jean-Philippe Steyer

Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production

[Bioresource Technology](#), Volume 110, pp 610-616, 2012

[6] Cristina González-Fernández, [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Jean Philippe Steyer

Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: Focus on cultivation and biofuel production

[Biofuels, Bioproducts & Biorefining](#), Volume 6, Issue 1 : 105-113, 2012

[7] Cristina González-Fernández, [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Jean Philippe Steyer.

Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production

[Biofuels, Bioproducts & Biorefining](#) Volume 6, Issue 2 : 205-218, 2012

[8] Monique Ras, Laurent Lardon, [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Jean-Philippe Steyer

Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*

[Bioresource Technology](#), Issue 102 : 200-206, 2011

[9] Laurent Lardon , Arnaud Hélias, [Bruno. Sialve](#), Jean-Philippe Steyer, Olivier. Bernard

Life-cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae

[Environmental Science and Technology](#), Volume 43, Issue 17: pp 6475–6481, 2009

[10] [Bruno Sialve](#), Nicolas Bernet, Olivier Bernard

Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable

Biotechnology Advances, Volume 27, Issue 4, pp 409-416, 2009

[11] Hélène Carrère, Bruno Sialve, Nicolas Bernet

Improving pig manure conversion into biogas by thermal and thermo-chemical pretreatments

Bioresource Technology, Volume 100, Issue 15, pp 3690-3694, 2009

[12] Olivier Bernard, Benoit Chachuat, Arnaud Helias, Bruno Le Dantec, Bruno Sialve, Jean-Philippe Steyer, Laurent Lardon, Pascal Neveu, S. Lambert, J. Gallop, M. Dixon, Paolo Ratini, A. Quintaba, S. Frattesi, J.M. Lema, E. Roca, Gonzalo Ruiz, Juan Rodriguez, A. Franco, Peter Vanrolleghem, U. Zaher, D.J.W. De Pauw, K. De Neve, K. Lievens, Denis Dochain, O. Schoefs, H. Fibrianto, Roberto Farina, Victor Alcaraz Gonzalez, V. Gonzalez Alvarez, Patrice Lemaire, J.A. Martinez, F. Esandi, Olivier Duclaudand Jean-François Lavigne

An integrated system to remote monitor and control anaerobic wastewater treatment plants through the internet

Water Science & Technology Volume 52, Issue 1-2: 457-464, 2005

[13] Patrick Dabert, Bruno Sialve, Jean-Philippe Delgenes, René Moletta, Jean-Jacques Godon.

Characterisation of the microbial 16S rDNA of an aerobic phosphorus removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration.

Applied Microbiology and Biotechnology, Issue 55:500-509, 2001

- **Communications orales dans des conférences internationales avec texte intégral**

[1] Gw  n  elle Jard, Claire Dumas, Jean-Philippe Delgenes, Hélène Marfaing, Bruno Sialve, Jean-Philippe Steyer, Hélène Carrere

Production of methane from seaweeds: *Palmaria palmata*

4th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation From 10 to 13 September 2012 - Porto (Portugal)

[2] Eric Fouilland, Christophe Vasseur, Christophe Leboulanger, Bruno Sialve, Bruno Marty, Cristina Gonzalez, Jean-Philippe Steyer

Biomass production from freshwaters and marine microalgae supplemented with anaerobic digestion products

Alg'n' Chem 2011 Algae, new resources for Industry 7 – 10 November 2011 – Montpellier – France

[3] Mathieu Lesteur, Bruno Sialve, Sébastien Preys, Latrille Eric, Sylvie Roussel, Jean Philippe Steyer

Near infrared spectroscopy : a tool for the monitoring process of anaerobic digestion of algae.

Alg'n' Chem 2011 Algae, new resources for Industry? 7 – 10 November 2011 – Montpellier – France

[4] Jean-Philippe Steyer, Nicolas Bernet, Frédéric Habouzit, Arnaud Hélias, Laurent Lardon, Eric Latrille, Eric Fouilland, Bruno Sialve, Olivier Bernard.

Recent advances in algal bioenergy production

12th World Congress on Anaerobic Digestion (*AD12*) October 31st to November 4th, 2010 – Guadalajara Mexique

[5] Isabelle Roux, Corinne Miquel, Bruno Sialve, Alain Mavon and Isabelle Lagarde.

Skin reservoir erythromycin expressed in microbiological units.

Perspectives in percutaneous penetration. 25-29 avril 2000

[6] Patrick Dabert, Bruno Sialve, Jean-Jacques Godon, Jean-Philippe Delgenes, and René Moletta.

Characterization of microbial population present in phosphorus removal processes.

The First Arab Environmental Biotechnology Conference/Exhibition Abu Dhabi - United Arab Emirates on March 5-8, 1999.

[7] Patrick Dabert, Bruno Sialve, Bénédicte Bernier, Jean-Jacques Godon, Jean-Philippe Delgenes, and René Moletta.

Microbial 16S rDNA diversity and dynamics in a phosphate removal ecosystem.

New Advances in Biological Nitrogen and Phosphorus Removal for Municipal or Industrial Wastewaters. Narbonne (11). Octobre 12-14 1998.

- **Communications par posters dans des conférences nationales et internationales**

[1] Cyril Marcilhac, Nicolas Bernet, Bruno Sialve, Anne Marie Pourcher, A Trémier, Fabrice Béline

Recycling of digestate from agricultural anaerobic digestion with microalgae-effect of color of the influent and Light

15th RAMIRAN Conference. Recycling of organic residues for agriculture: from waste management to ecosystem service, 3-5 Juin 2013, Versailles.

[2] Bruno Sialve, Nicolas Bernet, Olivier Bernard, Monique Ras, Laurent Lardon, et Jean-Philippe Steyer

Anaerobic digestion of photosynthetic biomasses towards sustainable production of bioenergy

Algal Biomass Summit – San Diego 2009

[3] Olivier Bernard, Antoine Sciandra, Bruno Sialve

Toward modelling of lipids photosynthesis in marine phytoplanktonic microalgae under nitrogen starvation

7th European Workshop "*Biotechnology of Microalgae*" 11-13 Juin, 2007, Nuthetal, Allemagne

[4] Bruno Sialve, Nicolas Bernet, Jean-Philippe Delgènes, Hélène Carrère

Impact of pig manure thermal pre-treatment on kinetics of batch anaerobic digestion under mesophilic condition.

11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion, 23-27 septembre 2007, Brisbane-Australie

[5] [Bruno Sialve](#), Jean-Jacques Godon, Jean-Philippe Delgenes et René Moletta.

Accumulation biologique du phosphate description moléculaire d'un écosystème modèle.

Congrès du bureau des ressources génétiques, Lille, Octobre 1997

[6] [Bruno Sialve](#), Patrick Dabert, Jean-Jacques Godon, Jean-Philippe Delgenes, Nicolas Bernet and René Moletta.

Microbial 16S rDNA diversity in a phosphate removal ecosystem.

Nineteenth Biennial Conference of the International Association on Water Quality

Juin 21-26 1998 Vancouver, Canada.

- **Communications orales sans comité de lecture**

[7] [Bruno Sialve](#)

Présentation du programme de recherche Symbiose et des résultats associés

Colloques ANR Programme Nationale de Recherche sur les Bioénergies/Bio Matière et énergie : 2009 à 2012

- **Conférences invitées lors d'évènements nationaux et internationaux**

[1] [Bruno Sialve](#), Olivier Bernard

3 years of active research on microalgal biofuel in Europe: achievements and hurdles.

2 Novembre 2009 Aquatic Biomass Workshop – Berlin

[2] [Bruno Sialve](#)

Production d'énergie et applications environnementales : Verrous scientifiques et technologiques, réalités industrielles : scale-up et production, complémentarités et interactions entre les filières

17 au 19 Novembre 2010 Colloque Adebitech "Algues : filières du futur" - Romainville

[3] [Bruno Sialve](#)

Méthanisation des microalgues

Novembre 2011 : Colloque Bioénergiesud - Nîmes

[4] [Bruno Sialve](#)

Projet Symbiose : couplage culture de microalgues et méthanisation

12 et 13 Janvier 2012 : Colloque ANR « Quelle recherche pour l'énergie du futur ? » - Lyon

[5] [Bruno Sialve](#)

8 et 9 Février 2012 : ATEE «Journées recherche et industrie sur la méthanisation et le biogaz

Méthanisation appliquée à la filière microalgues : perspectives

- **Brevets**

[6] [Bruno. Sialve](#), Jean-Philippe Steyer, Eric Latrille, Olivier Bernard, Jean-Paul Cadoret, Gael Bougaran, Raymond Kaas

Procédé de fixation de CO₂ et de traitement de déchets organiques par couplage d'un système de digestion anaérobie et d'un système de production de microorganismes phytoplanctoniques. brevet

n° 09 50334

[7] Bruno Sialve, Jean-Philippe Steyer, Eric Latrille, Nicolas Hourizadeh

Procédé de surveillance de culture de microorganismes photosynthétiques à l'aide d'un dispositif de capture d'images numériques (brevet en cours de dépôt).

Ayant choisi de focaliser le manuscrit sur le « Couplage des cultures de microalgues avec la méthanisation : traitement et valorisation de la matière et de l'énergie dans le cadre de la bioraffinerie environnementale. », la suite du document se réfère aux articles [3], [4], [5], [8], [9] et [10] publiés dans des revues internationales à comité de lecture.

Liste des abréviations

ACV : Analyse du Cycle de Vie

AGV (VFA): Acides gras volatils

CVA (OLR) : Charge volumique appliquée

DCO (COD) : Demande Chimique en Oxygène

TSH(HRT) : Temps de séjours hydraulique

MV (VM) : Matière volatile

MS : Matière sèche

MES : Matière en Suspension

TAGs: Tri Acyl Gkycérides

TSS : Temps de séjour des solides

Liste des figures

Figure I-1 : Intégration de la méthanisation dans le processus de production de microalgues.....	2
Figure II-1 : Schéma d'une cellule de microalgue	10
Figure II-2 : Exemples de structures pariétales remarquables pour – à gauche – la diatomée <i>Navicula yarrensii</i> (Bacillariophyceae) et, à droite, le coccolithophore <i>Coccolithus pelagicus</i> (Haptophyceae) (http://planktonnet.awi.de/).	11
Figure II-3 : Phases lumineuse et obscure de la réaction de photosynthèse (d'après Masojidek <i>et al.</i> ; 2007).....	12
Figure II-4 : Comparaison des spectres d'absorption de la chlorophylle et des pigments accessoires par rapport au spectre solaire (d'après Williams & Laurens, 2010).....	13
Figure II-5 : L'activité photosynthétique en soutien de la flore bactérienne hétérotrophe pour le traitement de la matière organique (d'après Oswald <i>et al.</i> , 1957, Munoz & Guiseppe, 2006).....	29
Figure II-6 : 4 principaux processus de valorisation énergétique des microalgues	32
Figure II-7 : Process chain overview.....	37
Figure II-8 : Cumulative Energy Demand and Energy production associated with the production of 1 MJ of biodiesel.....	42
Figure II-9 : Distribution of impacts relative to the combustion of 1 MJ of algal fuel in a diesel engine. For each impact, the 4 bars refer to respectively Normal-Dry, Normal-Wet, LowN-Dry and LowN-Wet. Impacts are normalized by the impact value of the production with the highest impact.....	44
Figure II-10 : Processus de méthanisation en 4 étapes	49
Figure II-11 : Facteurs majeurs et interactions qui influent sur la productivité (adapté et augmenté d'après Molina Grima, 2002).....	65
Figure II-12 : (A) Lac exploité pour la production de <i>Dunaliella salina</i> (B) Bassin de culture optimisé pour la production de Spiruline (C) Schéma d'un système ouvert de culture de type raceway	66
Figure II-13 : (A) Photobioréacteur tubulaire (B) Schéma de principe d'un photobioréacteur tubulaire immergé (Burlew, 1953).....	67
Figure III-1 : (A) Calibration curve and equation of optical density at 685 nm to cell density of <i>Chlorella vulgaris</i> . (B) Standardised settling curves of <i>Chlorella vulgaris</i> cells measured at initial absorbance values (Abst0 at 685 nm) of 0.620 (■) and 0.820 (△).....	82
Figure III-2 : Comparison of methane yields obtained with <i>Chlorella vulgaris</i> in this study (d) with literature data obtained from different particulate substrates: mixed cultures of <i>Chlorella</i> and <i>Scenedesmus</i> (Yen and Brune 2007; Golueke <i>et al.</i> , 1957; Chen 1987) and activated sludge (Converti <i>et al.</i> , 2009).....	87
Figure III-3 : (A) Degradation kinetics of <i>Chlorella vulgaris</i> : soluble COD (○) and Total COD (●) dynamics during successive batch inputs of 1, 2, 4 and 6 g COD. (B) Degradation kinetics of <i>Chlorella vulgaris</i> : VFA concentration (X) and methane flow rate (▲) dynamics during successive batch inputs of 1, 2, 4 and 6 g COD.	89
Figure III-4 : Time course of organic matter solubilisation in terms of (a) sol COD, (b) COD-VFA and (c) NH ₄ ⁺ concentration upon the two temperatures tested, namely 70 and 90°C represented by open and closed circles, respectively. Triangles refer to not-pretreated biomass (control). Discontinuous line in (a) refers to the hydrolysis rate of sol COD.	100
Figure III-5 : Sytox staining <i>Scenedesmus</i> ecosystem of not thermally pretreated biomass (A) and thermally treated at 90°C after (B) 30 min, (C) 60 min and (D) 180 min.	101

Figure III-6 : Evolution of methane production per gram of COD initial for raw microalgae (triangle) and pretreated microalgae at 70°C (open circles) and 90°C (closed circles).	102
Figure III-7 : Particle size distribution for different Es applied during ultrasound (A) and different temperatures applied during thermal pretreatment (B) of <i>Scenedesmus</i> biomass	108
Figure III-8 : Ammonium, phosphate and soluble chemical oxygen demand at different Es applied during ultrasound and different temperatures during thermal application.....	110
Figure III-9 : Comparison of COD solubilization obtained with activated sludge and <i>Scenedesmus</i> biomass under different ultrasound energy inputs. (Triangles and squares correspond to sonicated AS while rhombus shapes represent <i>Scenedesmus</i> biomass.)	110
Figure III-10 : Methane production per gram of initial COD for each sample (untreated and pretreated) and each pretreatment (A) ultrasound and (B) thermal application.....	112
Figure III-11 : COD solubilization and methane production for the different Es applied during ultrasound pretreatment.	114
Figure IV-1 : Relationship observed between Total Carbon content (mg C L^{-1}) and Optical Density measured at 680 nm (OD 680) during the experiment for the whole data set.	124
Figure IV-2 : Temporal variations of the Carbon content (mg CL^{-1}) during the 10 days experiment for: (A) Microalgae, (B) Bacteria and (C) Total C content. Minimal (min), maximal (max) and mean values measured under the 17 experimental conditions.....	132
Figure IV-3 : Neighbor-joining phylogenetic tree of 16S-rDNA sequences from bacterial communities during the first (day 2) and last period (day 10). Sequences of the last period are shown in bold. Bootstrap values are expressed as a percentage of 100 replicates.	134
Figure V-1 : Facteurs majeurs et interactions qui influent sur la productivité pour une géométrie et une implantation fixées (adapté et augmenté d'après Molina Grima, 2002).....	138
Figure V-2 : Plan et réalisation du bassin de culture.....	139
Figure V-3 : Vue de la roue à aube positionnée sur le bassin	140
Figure V-4 : Contacteur gaz/liquide employé pour assurer le transfert de CO_2	141
Figure V-5 : Architecture du réseau assurant l'acquisition, le suivi et le stockage des données capteurs.....	141
Figure V-6 : Points de mesure des vitesses d'écoulements, de A à P et pour les lignes 1 à 3.	142
Figure V-7 : Vitesse moyenne d'écoulement en fonction de la fréquence de rotation appliquée au moteur.....	143
Figure V-8 : Evolution des vitesses d'écoulement pour l'ensemble des points de mesures	143
Figure V-9 : Effet de l'hétérogénéité de l'écoulement sur la sédimentation des cellules pour la zone de H à L.....	144
Figure V-10 : Evolution des profils de vitesse pour une vitesse de 25 cm s^{-1} en fonction de la hauteur de mesure dans la colonne d'eau : (A) ligne 1, (B) ligne 2, (C) ligne 3.	145
Figure V-11 : Evolution de la diversité Eucaryotes et Procaryotes et de la concentration en matières en suspension (MES) au cours de la période expérimentale. Les flèches indiquent les jours de prélèvements destinés au pyroséquençage en plus du prélèvement initial à J0.....	148
Figure V-12 : Analyse en Composante Principale de la structure de la communauté procaryote (Les nombres près des points correspondent aux jours de culture ; les ellipses regroupent les différentes phases de culture)	150
Figure VI-1 : Production potentielle de méthane pour différents gisements de matière organique et pour (encadré grisé) l'ensemble des microalgues étudiées dans Sialve <i>et al.</i> (2009) et Gonzalez <i>et al.</i> (2012).	154

Liste des Tableaux

Tableau II-1 : Diversité des microalgues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce (d'après Richmond 2007, Jeffrey et al, 1997, Sharma 2011)	9
Tableau II-2 : Productivité comparée de quatre espèces de plantes supérieures et de deux espèces de microalgues eucaryote et procaryote mesurée en conditions extérieures de cultures et exprimée en tonne de matière sèche par hectare et par an (adapté d'après (Dismukes <i>et al.</i> , 2008)	15
Tableau II-3 : Composition élémentaire du phytoplancton.....	16
Tableau II-4 : Répartition du fractionnement biochimique d'une cellule de microalgue (Becker, 1994).	16
Tableau II-5 : Aperçu de la production mondiale de microalgues d'après Milledge <i>et al.</i> (2011) et Spoalare, (2006)	20
Tableau II-6 : Mode d'action des microalgues sur la charge polluante constitutionnelle d'un effluent (d'après Munoz et Guiyesse, 2006).....	23
Tableau II-7 : Comparaison de la composition élémentaire exprimée en mg/L, en macro et microéléments pour des digestat de fumier bovin, porcin, de volaille et de boues activées (D'après Wu & Pond, 1981).	25
Tableau II-8 : Effets potentiels des constituants caractéristiques d'une phase liquide de digestat (d'après une étude de la bibliographie)	27
Tableau II-9 : Performances épuratoires remarquables sur des effluents urbains, des composés organiques et des métaux pour des associations artificielles et naturelles microalgues et de bactéries (CI : concentration initiale ; RE : rendement épuratoire).....	30
Tableau II-10 : Biomass fractions.....	38
Tableau II-11 : Composition and culture parameters of <i>C. vulgaris</i>	39
Tableau II-12 : Most impacting flows generated by the production of 1 kg of biodiesel.....	41
Tableau II-13 : Specific methane yield of three types of organic compounds.....	54
Tableau II-14 : Gross composition of several microalgae species (Becker, 2004) and calculated (using Eq.(1)) theoretical methane potential and theoretical ammonia release during the anaerobic digestion of the total biomass.....	55
Tableau II-15 : Experiments with anaerobic digestion of microalgae species and algal sludge: substrate characteristics, methane yield and process conditions.	56
Tableau II-16 : Effect of low nitrogen growth conditions on the composition of three <i>Chlorella</i> species (adapted from Illman <i>et al.</i> , 2000) and estimation of the theoretical methane potential and theoretical ammonia release (in brackets: computed theoretical methane potential and ammonia release of the residual biomass after lipid extraction).	60
Tableau II-17 : Energetic content (KJ/g VS) of microalgae according to two scenarii based on data from Illman <i>et al.</i> , 2000.	61
Tableau II-18 : Comparaison des systèmes ouverts et fermés d'un point de vue biologique, opérationnel, et économique (adapté d'après Brennan & Owende, 2010 et Mata <i>et al.</i> ,2010).....	69
Tableau II-19 : Avantages et inconvénients des 5 technologies usuelles de récolte et de concentration pour les cultures de microalgues (d'après Milledge & Heaven, 2012).	70
Table III-1 : Operational parameters of the experimental set-up.....	83
Tableau III-2 : Chemical characteristics of digested <i>Chlorella vulgaris</i> : maximal values recorded under constant methane production yields.	86

Tableau III-3 : Initial set-up conditions during ultrasound pretreatment applied to <i>Scenedesmus</i> ecosystem.	106
Tableau III-4 : d50 for different energy levels supplied by ultrasound and different temperatures applied during thermal treatment	109
Tableau III-5 : Overview of different measured and calculated parameters obtained during anaerobic digestion of untreated and ultrasound- and thermally pretreated <i>Scenedesmus</i> biomass.	112
Tableau IV-1 : Experimental conditions for the 3 variables: Temperature (T), irradiance (I) and pH. Experimental results for concentrations of C content, total content C:N ratio, microalgal abundance and growth rates, index of microbial diversity, and carbon conversion efficiency (%) obtained for (i) microalgae, (ii) microalgae & bacteria on acetate and (iii) microalgae & bacteria on acetate & bacteria on exudates, obtained after the 10 day experiment in the 17 photobioreactors. n.d. no data (MA : microalgal; BA Bacterial)	130
Tableau IV-2 : Optimized T, I and pH conditions maximizing C content of each microbial compartment.....	131
Tableau IV-3 : Optimized T, I and pH conditions maximizing the C conversion efficiency for each microbial compartment.....	131
Tableau V-1 : Conditions de culture.....	147
Tableau V-2 : Décomposition de la culture en 4 phases opérationnelles	148
Tableau V-3 : Evolution du nombre d'espèces Eucaryotes et Procaryotes en fonction du temps.....	149
Tableau V-4 : Evolution de l'abondance des organismes Eucaryotes majoritaires (>10%) identifiés au cours de la période expérimentale (CP : consommateur primaire ; PP : producteur primaire)	150

Table des matières

I	Introduction générale	1
II	Introduction	8
II.1	Les microalgues : une biomasse diversifiée pour des applications multiples	8
II.1.1	Définition	8
II.1.2	Diversité et classification	8
II.1.3	Distribution et habitats : des océans aux milieux extrêmes	9
II.1.4	De l'organisation cellulaire au métabolisme	10
II.1.5	Composition et nutrition	16
II.1.6	Applications	20
II.2	Analyse du cycle de vie de production d'énergie à partir de microalgues	34
II.2.1	Avant-propos	34
II.2.2	Analyse du cycle de vie de la production de biodiesel à partir de microalgues	35
II.2.3	Introduction	35
II.2.4	Production system overview	36
II.2.5	Production chain Analysis	41
II.2.6	Discussion	45
II.3	Digestion anaérobie et microalgues	48
II.3.1	Avant propos	49
II.3.2	Digestion anaérobie appliquée aux microalgues	51
II.3.3	Introduction	51
II.3.4	Anaerobic digestion of microalgae	53
II.3.5	Inhibitions induced by microalgae as substrate	57
II.3.6	Anaerobic digestion enhancement	59
II.3.7	Biogas purification	62
II.3.8	Is it worth to recover lipids from an energetic point of view ?	63
II.3.9	Conclusion	64
II.4	Production de masse et récolte	65
II.4.1	Cultures en condition photoautotrophe : systèmes ouverts et fermés	65
II.4.2	Comparaison des systèmes de culture	68
II.4.3	Récolte	69
II.5	Conclusions	71

III Digestion anaérobie des microalgues.....	76
Avant propos.....	76
III.1 Digestion anaérobie d'une espèce modèle : <i>Chlorella vulgaris</i>	78
III.1.1 Introduction.....	78
III.1.2 Methods	80
III.1.3 Results and discussion.....	83
III.1.4 Conclusion	91
III.2 Stratégies d'optimisation de la biodégradabilité.....	92
III.2.1 Effet des traitements thermiques sur un écosystème phytoplanctonique d'eau douce 94	
III.2.2 Introduction.....	94
III.2.3 Materials and methods	96
III.2.4 Anaerobic digesters.....	96
III.2.5 Thermal pretreatment procedure.....	97
III.2.6 Analysis.....	97
III.2.7 Results and discussion.....	98
III.2.8 Conclusions.....	103
III.2.9 Comparaison des performances entre traitement thermique et ultrasonique sur la production de méthane.....	104
III.2.10 Introduction.....	104
III.2.11 Methods	105
III.2.12 Results and discussion.....	107
III.2.13 Conclusion	114
III.3 Discussion	115
IV Croissance sur digestat.....	119
IV.1 croissance d'un écosystème phytoplanctonique marin sur un digestat synthétique	120
IV.2 Introduction	120
IV.3 Methods.....	122
IV.3.1 The marine consortium selected and culture conditions prior to experiments	122
IV.3.2 Experimental design	122
IV.3.3 Chemical measurements	123
IV.4 Biological measurements	123
IV.4.1 Optical density.....	123
IV.4.2 Microalgae abundance and carbon content conversion.....	124
IV.4.3 Bacterial abundance and carbon content conversion.....	124

IV.4.4	Estimation of carbon conversion efficiency and growth rates.....	125
IV.4.5	Bacterial diversity	125
IV.4.6	Statistical test	126
IV.5	Results and discussion	126
IV.5.1	Dynamics of the microalgal C content.....	127
IV.5.2	Dynamics of the bacterial carbon and diversity using acetate	127
IV.5.3	Dynamics of the bacterial C content and diversity associated with microalgae.....	128
IV.6	Conclusions	135
V	Culture à échelle préindustrielle : de la compréhension vers l'optimisation	138
V.1	Conception et mise en œuvre du pilote	139
V.1.1	Système de culture	139
V.2	Etudes de l'hydrodynamique et de la diversité microbienne	142
V.2.1	Caractérisation de l'écoulement	142
V.2.2	Dynamique des communautés microbienne d'un écosystème phytoplanctonique d'eau douce	147
VI	Conclusions et perspectives.....	153

I Introduction

I Introduction générale

En 2011, les énergies fossiles représentaient près de 87% de la consommation énergétique mondiale. Essentiellement dévolu au secteur du transport, le pétrole assure la plus grande part de l'énergie primaire consommée (BP, 2012). L'exploitation massive des ressources fossiles et leur utilisation se heurte cependant à deux problématiques majeures : l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre et la perspective d'épuisement d'ici quelques décennies des ressources pétrolières facilement accessibles (Murray & King, 2012), ce qui motive l'exploitation des ressources non-conventionnelles.

L'utilisation de la biomasse à des fins énergétiques est considérée aujourd'hui comme une solution potentielle et complémentaire à l'exploitation des énergies fossiles. A cette fin, un objectif d'incorporation de 10 % d'énergie renouvelable dans le secteur des transports a été fixé par l'Europe pour 2020. Dans ce gisement, les biocarburants représentaient presque 7% de la ressource pour la France en 2010, importés (Hors Europe : Amérique du Sud et Asie) pour près de 50 % (ADEME, 2012).

Appelés également agrocarburants, les biocarburants sont capables de répondre aux besoins des principales voies de valorisation des ressources pétrolières, essentiellement la combustion pour le transport. Les filières bioéthanol et biodiesel s'adressent à la demande respective des motorisations essences et diesel. Ces carburants se déclinent en 3 catégories. Les biocarburants dits de 1^{ère} génération valorisent les structures de réserve des plantes - lipides et amidon - tandis que la seconde génération permet une valorisation de l'ensemble de la plante, c.a.d. la fraction ligno-cellulosique. Cette dernière filière permet d'étendre la ressource à un gisement de matière organique plus important et pas uniquement restreint aux cultures sucrières et oléagineuses. En dépit des attentes portées sur ces générations de biocarburant, l'intensification de leur production et de leur importation, dopée en Europe notamment par une politique incitative, a révélé un grand nombre d'effets délétères: changement d'affectation des surfaces destinées à la production alimentaire et spéculation financière sur ces ressources, déforestation massive,... Ces conséquences se sont traduites par un plafonnement du taux d'incorporation des biocarburants de 1^{ère} génération fixé par la commission européenne à 5% pour 2020 (ADEME, 2012).

Une 3^{ème} génération de biocarburant cherche à lever les problèmes posés par les générations précédentes. Dans cette perspective, la production d'hydrogène et de lipides, voire d'éthanol, mobilise d'autres ressources parmi lesquelles les microalgues se distinguent. Moins d'une dizaine d'années ont fallu pour positionner ces organismes dans l'horizon énergétique de cette dernière génération. Le potentiel du phytoplancton a pourtant été exploré dès les années 50 (Goeluke et Oswald, 1957) et a connu, à l'instar d'autres énergies renouvelables, un regain d'intérêt dans les années 70 (Benemann

et al., 1977) qui a perduré jusqu'au milieu des années 90 (Hu *et al.*, 2008). Au début du XXI^{ème} siècle, les bouleversements des cours du pétrole et de l'accès aux gisements ainsi que la prise de conscience de l'impact environnemental de l'usage de cette ressource ont concouru à l'intérêt récent que suscitent ces organismes (Chisti, 2007). En effet, à l'instar des plantes supérieures, les microalgues sont capables de produire des intermédiaires chimiques qui peuvent être convertis en énergie : lipides, amidon et hydrogène. Elles peuvent être valorisées par ailleurs dans des filières de transformation usuelles de la biomasse (gazéification, pyrolyse, méthanisation). Une productivité plus importante que la plupart des plantes supérieures et une culture pouvant s'affranchir des surfaces arables comptent parmi les avantages de ces microorganismes. En outre, elles peuvent utiliser une large gamme de ressources hydriques, eaux douces, saumâtres, marines et également des eaux usées (comme ressources nutritive et hydrique conjuguée). Enfin, l'utilisation de CO₂ d'origine industrielle en subvenant aux besoins en carbone permet d'atteindre les productivités plus élevées. Par comparaison avec les plantes oléagineuses, la productivité lipidique peut être 10 à 100 fois supérieure par unité de surface (Cadoret & Bernard, 2008; Chisti, 2007).

Cette productivité remarquable a un coût. La production de masse mobilise des quantités importantes d'éléments nutritifs et d'énergie qui mettent en péril la recherche de durabilité de cette filière (Lardon *et al.*, 2009) comme établie par Reijnders (2006). La production durable nécessite donc impérativement une optimisation de l'ensemble des étapes de la filière, de la culture à l'extraction (Benemann *et al.*, 2012).

Une solution énergétique complémentaire de la filière précitée réside dans la mobilisation de la digestion anaérobie. En effet, le potentiel énergétique du résidu de matière organique peut être converti en énergie (sous forme de méthane) et les éléments nutritifs minéralisés recyclés sous une forme assimilable, le digestat. Dans cette perspective se dessine alors un procédé dans lequel la digestion anaérobie intervient comme une brique technologique permettant de répondre aux contraintes nutritives et énergétique de cette production (Figure I-1).

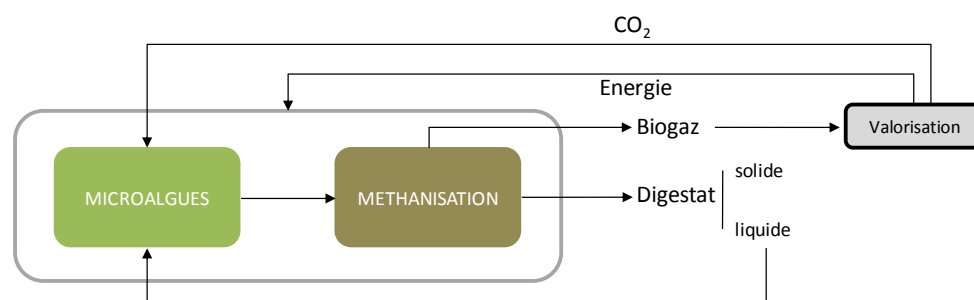


Figure I-1 : Intégration de la méthanisation dans le processus de production de microalgues

Dans cette configuration, il devient possible pour les microalgues de répondre de façon presque exhaustive aux conditions de durabilité auxquels les biocarburants devraient se soumettre, tels que proposés par Reijnders (2004) :

- Préservation des ressources hydriques, nutritives et organiques des sols,
- Limitation de l'impact des émissions de GES (N_2O , CH_4 , CO_2),
- Mobilisation des surfaces non cultivées (jachères par exemples)
- Recyclage des éléments nutritifs présents dans la biomasse résiduelle.

L'intégration de la production de microalgues et de la méthanisation dans un procédé unique suppose des interactions directes par échanges de flux de matières (biomasse de microalgues pour la digestion anaérobie et recyclage du digestat dans la culture) et indirectes via une valorisation du biogaz (production d'énergie pour subvenir aux besoins de la filière et de CO_2).

Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons en particulier aux interactions directes qui caractérisent ce couplage : la digestion anaérobie des microalgues et la croissance des microalgues sur digestat. Dans un premier temps, l'étude de la filière globale de production d'énergie à partir de microalgues fait l'objet d'une revue bibliographique présentée dans le **chapitre II**. Les propriétés de ces organismes sont présentées d'un point de vue fondamental et les applications sur les versants du traitement d'effluents et de la production d'énergie sont ensuite détaillées et confrontées à une analyse de cycle de vie. L'étude de la méthanisation des microalgues est l'objet du **chapitre III**. Dans cette partie, nous étudions également les solutions qui sont en mesure d'améliorer les performances de biodégradabilité de cette biomasse. Le digestat, co-produit de la digestion anaérobie utilisé comme ressource nutritive à destination des microalgues est abordé dans le **chapitre IV**. Enfin, la conception d'un dispositif pilote qui intègre la culture et la méthanisation est proposée dans le **chapitre V**.

Sur la base des résultats obtenus, la conception d'un dispositif expérimental à une échelle pilote pré-industrielle validant l'association de ces procédés constitue le dernier objectif de ce travail et le manuscrit se termine sur des perspectives et des pistes de recherche autour de questions de recherches clés sur la thématique de la bioraffinerie environnementale et de la conceptualisation de l'algo-écologie.

II Synthèse bibliographique

SOMMAIRE

II.1 Les microalgues : une biomasse diversifiée pour des applications multiples.....	8
II.1.1 Définition.....	8
II.1.2 Diversité et classification.....	8
II.1.3 Distribution et habitats : des océans aux milieux extrêmes	9
II.1.4 De l'organisation cellulaire au métabolisme.....	10
II.1.5 Composition et nutrition	16
II.1.6 Applications.....	20
II.2 Analyse du cycle de vie de production d'énergie à partir de microalgues.....	34
II.2.1 Avant-propos.....	34
II.2.2 Analyse du cycle de vie de la production de biodiesel à partir de microalgues.....	35
II.2.3 Introduction.....	35
II.2.4 Production system overview	36
II.2.5 Production chain Analysis.....	41
II.2.6 Discussion.....	45
II.3 Digestion anaérobie et microalgues	48
II.3.1 Avant propos	49
II.3.2 Digestion anaérobie appliquée aux microalgues	51
II.3.3 Introduction.....	51
II.3.4 Anaerobic digestion of microalgae.....	53
II.3.5 Inhibitions induced by microalgae as substrate.....	57
II.3.6 Anaerobic digestion enhancement	59
II.3.7 Biogas purification.....	62
II.3.8 Is it worth to recover lipids from an energetic point of view?.....	63
II.3.9 Conclusion	64
II.4 Production de masse et récolte	65
II.4.1.1 Cultures en condition photoautotrophe : systèmes ouverts et fermés.....	65
II.4.2 Comparaison des systèmes de culture.....	68
II.4.3 Récolte.....	69
II.5 Conclusions	71

II Introduction

II.1 Les microalgues : une biomasse diversifiée pour des applications multiples

II.1.1 Définition

Les algues désignent un ensemble d'organismes que l'on retrouve préférentiellement dans les milieux aquatiques, elles rassemblent à la fois les macroalgues benthiques (organismes fixés sur un support) ainsi que des organismes microscopiques pélagiques (organismes en eau libre, du fond à la surface) : les microalgues. Ces dernières, appelées également phytoplancton, sont définies comme étant des organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés. Sous cette désignation, elles constituent un sous-ordre des Eucaryotes et des Procaryotes. Dans ce dernier règne, les représentants des microalgues sont regroupés dans la sous-classe des Cyanobactéries. Les experts distinguent en général ces deux règnes et n'attribuent le terme microalgues qu'au règne des Eucaryotes, parmi lesquelles nous retrouvons les espèces étudiées dans notre travail.

Dans ces deux règnes, plusieurs types d'organisation cellulaire s'observent: unicellulaires, colonies et filaments. Si la plupart des cyanobactéries ne disposent pas d'organites assurant leur mobilité, on retrouvera chez les microalgues eucaryotes des individus dotés de flagelles en nombre variable (Richmond 2007).

II.1.2 Diversité et classification

Les microalgues constituent un groupe remarquablement hétérogène rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique (Andersen, 1992). Cette famille rassemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces selon les estimations parmi lesquelles 47 000 espèces sont décrites (Andersen *et al.*, 1997 ; Sharma *et al.*, 2011). La classification de cette diversité est complexe et la taxonomie est sujette à de fréquents bouleversements du fait notamment de l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire (Sharma & Rai, 2011). En dépit des considérations et polémiques entre morphotype et génotype, le Tableau II-1 présente les embranchements et classes de microalgues.

Le travail présenté se focalisera essentiellement sur les microalgues eucaryotes qui constituent les organismes étudiés dans nos travaux, certaines caractéristiques pouvant se retrouver, toutefois chez les Cyanobactéries.

Tableau II-1 : Diversité des microorganismes photosynthétiques (eucaryotes et procaryotes), marines et d'eau douce (d'après Sharma & Rai, 2011)

Règne	Embranchement /Classe
Procaryotes	Cyanophytes
	Prochlorophytes
Eucaryotes	Bacillariophytes
	Charophytes
	Chlorophytes
	Chrysophytes
	Cryptophytes
	Dinophytes
	Euglenophytes
	Glaucoophytes
	Haptophytes
	Phaeophytes
	Rhodophytes

II.1.3 Distribution et habitats : des océans aux milieux extrêmes

Les microalgues occupent la plupart des niches écologiques. Si elles sont surtout présentes dans les environnements aquatiques, elles ont su également coloniser les sols et une vaste gamme de supports comme les rochers, les arbres ou encore les édifices architecturaux (Macedo *et al.*, 2009). Preuve de leur diversité d'habitats, certaines microalgues se développent dans les eaux de fonte de la glace, de la neige et on les rencontrera également dans les déserts arides à semi-arides. L'atmosphère constitue un environnement dans lequel une diversité notable de microalgues eucaryotes et de cyanobactéries est également signalée (Sharma *et al.*, 2007). Enfin, cette capacité à coloniser l'ensemble de la biosphère est une propriété qui, comme pour les bactéries non photosynthétiques, leur permet de se développer dans les environnements extrêmes. C'est grâce à l'absence de structures complexes autre que la cellule, à un métabolisme orienté principalement vers la production d'énergie que les microalgues ont cette capacité à être notablement ubiquistes (Falkowski & Raven, 1997).

85 % des biotopes de la terre présentent des conditions de températures inférieures à 5°C (Margesin & Miteva, 2011). Ces milieux hébergent une diversité remarquable de microorganismes photosynthétiques psychrophiles. Parmi ceux-ci, nous citerons par exemple *Chlamydomonas nivalis*, responsable des colorations rouges sur les neiges qui présente en outre une résistance aux radiations UV du fait d'une accumulation d'Astaxanthine dans son cytoplasme. A l'inverse, dans des conditions thermophiles, la cyanobactérie *Synechococcus* est capable de croître dans les sources d'eau chaude (60-

80°C), par ailleurs alcalines. Dans des sources chaudes (38-57°C) et acides (pH 0,5-2,5), les microalgues rouges *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* et *Galdieria* sont les seules représentantes des Eucaryotes identifiées à ce jour capables de se développer. Parmi les espèces acidophiles, *Dunaliella acidophila* croît dans une gamme de pH de 0 à 3 (Assunção *et al.*, 2011). Dans cette vaste classe des Chlorophyceae, *Dunaliella salina*, exploitée massivement pour la production de β -carotène et de glycérol a la particularité de croître dans des conditions hypersalines proche de la saturation. *Coccomyxa actinabiotis* présente une radiotolérance remarquable lui conférant une capacité d'épuration des radionucléides supérieure aux procédés physico-chimique usuels (Rivasseau *et al.*, 2013).

A l'instar des bactéries et *archae*, l'adaptation à ces conditions environnementales particulières mobilise des propriétés métaboliques qui recèlent un intérêt pour des applications en biotechnologie (Otto Pulz & Gross, 2004), que nous abordons en détail dans la suite. A ce jour, les productions les plus importantes de microalgues concernent les espèces extremophiles, spiruline (alcaliphile) et *Dunaliella salina* (halophiles) (Day *et al.*, 2012).

II.1.4 De l'organisation cellulaire au métabolisme

Les microalgues eucaryotes et procaryotes ont en commun la photosynthèse oxygénique. Cette réaction assure la transformation du carbone inorganique en énergie chimique en captant l'énergie lumineuse. C'est dans le chloroplaste que se réalise cette conversion.

II.1.4.1 Ultrastructure

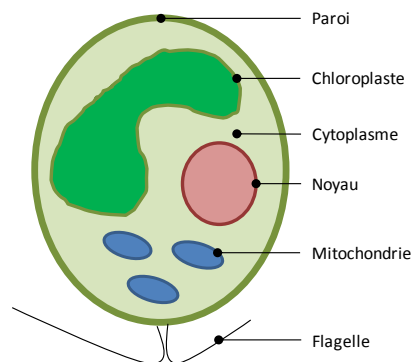


Figure II-1 : Schéma d'une cellule de microalgue

La cellule de microalgue eucaryote (Figure II-1) se compose d'un ensemble d'organites intracellulaires, sièges des réactions métaboliques qui s'opèrent dans le cytoplasme. La membrane plasmique sépare le cytoplasme du milieu extérieur et, en fonction des espèces, elle est recouverte d'une paroi de composition variable.

II.1.4.2 Paroi et propriétés

Une cellule de microalgues mesure de quelques microns à plusieurs centaines. Le cytoplasme est séparé du milieu extracellulaire par une membrane plasmique. Certaines espèces présentent des structures pariétales plus ou moins complexes qui vont recouvrir cette membrane. Les parois des cyanobactéries, sont semblables à celles des bactéries Gram-négative, à savoir un peptidoglycane (Hoiczky & Hansel, 2000). La diversité des microalgues Eucaryotes offre en revanche une diversité remarquable de structures pariétales.

Les diatomées, d'une importante diversité de taille et de forme se distinguent par l'élaboration d'une paroi siliceuse, la frustule. Parmi les Haptophyceae, les coccolithophoridées élaborent des structures complexes composées de carbonate de calcium. De forme discoïde, ces plaques de calcites recouvrent la cellule (Figure II-2).

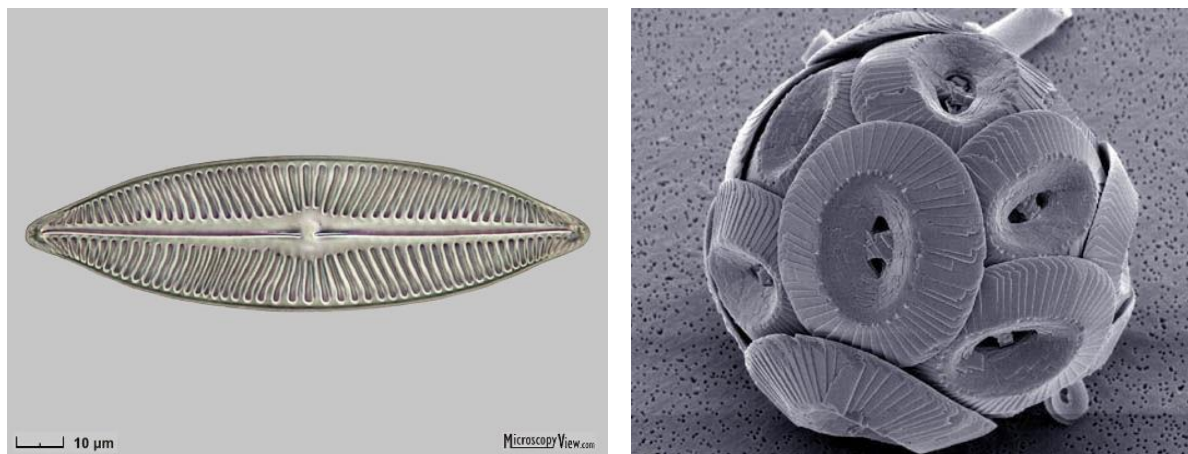


Figure II-2 : Exemples de structures pariétales remarquables pour – à gauche – la diatomée *Navicula yarrensii* (Bacillariophyceae) et, à droite, le coccolithophore *Coccolithus pelagicus* (Haptophyceae) (<http://planktonnet.awi.de/>).

Pour la plupart des microalgues présentant une paroi (à l'exclusion des configurations précédentes), la composition sera sensiblement similaire aux structures pariétales des plantes supérieures offrant des structures polysaccharidiques et protéiques plus ou moins complexes: 25-30 % de cellulose, 15-25% d'hémicellulose, 35% de pectine et 5-10% de glycoprotéines (Wang & Evangelou, 1995). La présence de ces parois est déterminante dans la fonction de résistance aux conditions environnementales délétères, aux lyses enzymatiques d'origine bactérienne ou lors du passage dans le tractus digestif des prédateurs (Cole, 1982). Algaenan et sporopollenin sont les deux polymères fréquemment associés à la résistance des parois. Pour de nombreuses espèces, la paroi est fortement chargée négativement du fait des groupes fonctionnels qui y sont associés et qui interagissent avec les cations présents dans le milieu. Cette propriété confère aux cellules une affinité importante vis-à-vis des ions métalliques. Cette propriété motive l'intérêt de l'utilisation des microalgues pour le

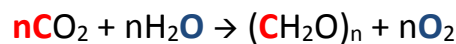
traitement des effluents chargés en métaux (Monteiro *et al.*, 2012). Enfin, la présence et la composition de ces structures externes constituent une barrière qui détermine l'accessibilité au contenu intracellulaire pour des attaques biologiques, physiques et chimiques pour les filières de valorisation de ces biomasses (Fu *et al.*, 2010, Gonzalez *et al.*, 2012).

II.1.4.3 Cytoplasme

Le cytoplasme d'une cellule de microalgue eucaryote se compose schématiquement de 3 organites majeurs :

- **Noyau** : contient le génome de la cellule ;
- **Mitochondries** : siège de la respiration ;
- **Chloroplastes** : organites capable de capter les photons de la lumière et de convertir cette énergie lumineuse en énergie chimique.

Ce sont dans les chloroplastes que se déroule la réaction de photosynthèse. Ce mécanisme consiste en une réaction d'oxydoréduction catalysée par l'énergie lumineuse, et qui convertit le dioxyde de carbone et l'eau en sucre simples et en oxygène.



Cette réaction globale se réalise en deux étapes (phase lumineuse et phase obscure) séparées dans l'espace et dans le temps (Figure II-3).

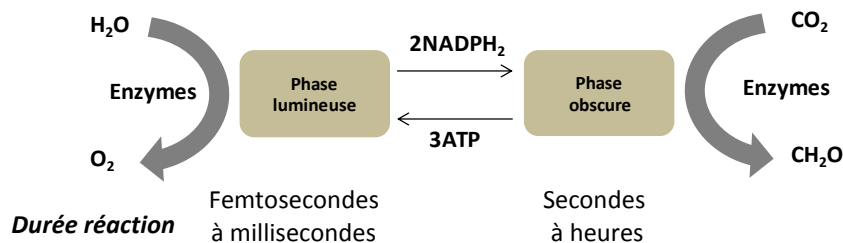


Figure II-3 : Phases lumineuse et obscure de la réaction de photosynthèse (D'après Masojidek *et al.* ; 2007)

• Phase lumineuse

Cette réaction rapide est réalisée dans la membrane du chloroplaste. Elle permet la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique pour produire du NADPH₂¹ et de l'ATP². L'oxygène libéré résulte de la dissociation de la molécule d'eau consommée. Cette réaction est particulièrement rapide.

¹ Forme oxydée du NADP. Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate est la principale source d'électrons dans les réactions biochimiques.

² Adénosine Tri-Phosphate, l'hydrolyse de l'ATP (en ADP+P) fournit l'énergie nécessaire à la réalisation des réactions chimiques dans la cellule.

- Phase « obscure » ou sombre

Le siège de la réaction est situé dans le stroma (voir Figure II-3) où les produits de la phase claire vont participer à la réduction du CO₂ en glucides. Cette étape est significativement plus lente que la précédente.

II.1.4.4 De l'efficacité photosynthétique à la productivité

La lumière solaire est la forme d'énergie la plus abondante et la plus distribuée sur terre. Ce flux continu constitue la ressource énergétique qui va permettre l'incorporation du carbone dans les biomasses photosynthétiques. A l'échelle de la terre, le flux carboné issu de ce métabolisme est presque équitablement réparti entre le phytoplancton et les plantes supérieures (Falkowski & Raven, 1997). Lors de son trajet du soleil vers la surface terrestre, le spectre lumineux est partiellement absorbé en traversant l'atmosphère pour atteindre une énergie à la surface du globe de l'ordre de 1000 W.m⁻². Les plantes mobilisent la chlorophylle « a » pour intercepter cette énergie et capter une partie de ce flux. Ce pigment majoritaire présente deux pics maximaux d'absorption à respectivement 400-450 et 650-700 nm (Figure II-4). Cela fixe les bornes du spectre lumineux utilisable pour les microalgues qui représente 45 % de l'énergie initialement reçue. Les autres pigments observés dans ces organismes (chlorophylle « b », phycoérythrine, phycocyanine, β-carotène) vont permettre d'augmenter la part d'énergie utilisable dans cette gamme du spectre. (Figure II-4).

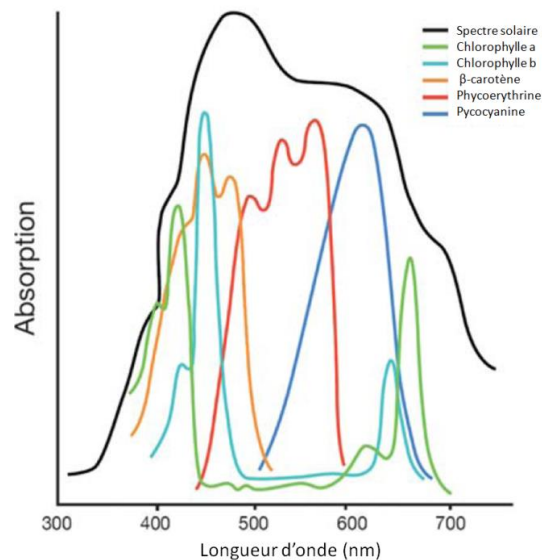


Figure II-4 : Comparaison des spectres d'absorption de la chlorophylle et des pigments accessoires par rapport au spectre solaire (d'après Williams & Laurens, 2010).

L'efficacité photosynthétique se définit comme la fraction de l'énergie solaire convertie en énergie chimique par les organismes photosynthétiques. En considérant (i) qu'une mole de CO₂ assimilée et convertie en sucre simple a un pouvoir calorifique de 475 KJ et (ii) que cette conversion requiert 10

photons (8 photons utilisés et 2 perdus au cours de la réaction) soit, en considérant l'énergie d'un photon égale à 217KJ, 2170 KJ et enfin (iii) que seul 45 % du spectre peut être captés par les pigments photosynthétiques, l'efficacité théorique de la photosynthèse est de l'ordre de : $475/2170 \times 45\%$, soit environ 10 %.

L'efficacité photosynthétique mesurée dans les systèmes de production en conditions extérieures s'étend de 2 % pour les procédés de culture les plus « simples » à presque 7 % pour des procédés particulièrement optimisés (Béchet *et al.*, 2013). A titre de comparaison, les efficacités photosynthétiques des plantes supérieures en C3 et C4³ sont respectivement de l'ordre de 4,6 et 6 % (Zhu *et al.*, 2008). Cette différence et la grande disparité observée dans la littérature est imputable à de nombreux facteurs : efficacité du transfert radiatif (diffusion atmosphérique, transmission dans la cellule), conditions de cultures (température, apport de CO₂, concentration en O₂ et présence d'autres inhibiteurs), turbulences et contaminations biologiques éventuelles (Williams & Laurens, 2010). Ces éléments vont être déterminants pour les productivités potentielles et réelles attendues et observées dans les différents systèmes de production.

Aussi, pour les systèmes de culture ouverts, la projection de l'efficacité photosynthétique vers une productivité surfacique doit inviter à une extrême prudence. Ce fait est soumis à une controverse déterminante. En effet, les enjeux associés aux perspectives énergétiques et par conséquent économiques autour du potentiel – toutefois avéré – de ces organismes motivent des extrapolations du laboratoire à la production de masse qui se révèlent risquées (Walker, 2009). Nombreuses sont les perspectives de productivité extrêmement disparates et qui peuvent fréquemment dépasser les limites thermodynamiques de la photosynthèse (Benemann *et al.*, 2012; Walker, 2009). En observant les productivités annuelles en conditions extérieures et ainsi proches d'une réalité industrielle (Tableau II-2), nous constatons que la production de microalgues eucaryote et procaryote, certes supérieure d'un ordre de grandeur au colza, maïs, switch grass et prairie mixte, reste cependant en deçà des productivités atteintes pour la canne à sucre (plante en C4).

³ correspondant au nombre d'atomes de carbone de la molécule organique formée en premier à partir du CO₂

Tableau II-2 : Productivité comparée de quatre espèces de plantes supérieures et de deux espèces de microalgues eucaryote et procaryote mesurée en conditions extérieures de cultures et exprimée en tonne de matière sèche par hectare et par an (adapté d'après (Dismukes *et al.*, 2008))

Plantes supérieures				Microalgues	
C3			C4	Tetraselmis suecica	Spiruline
Maïs	Switch Grass et prairie mixte	Colza	Canne à sucre		
7	3,6-15	2,7	73-87	38	27

Les productivités plus importantes résultent cependant d'une extrapolation sur l'année des périodes de production les plus importantes mesurées sous les conditions climatiques et les procédés les plus favorables.

II.1.5 Composition et nutrition

Les besoins nutritifs des microalgues sont similaires à ceux des plantes supérieures (Becker, 1994). Redfield (1934) a proposé pour les espèces marines une composition élémentaire C |N |P de 106|16|1. Cette composition est relativement constante dans le milieu naturel. Défini par Vonshak, (1986) le milieu de culture devra satisfaire les besoins en éléments majeurs (ou macroéléments) - C,H,N,O, P, S et en micro-éléments ou éléments traces. Le Tableau II-3 suivant, indique des ordres de grandeurs pour les principaux éléments constitutifs des microalgues.

Tableau II-3 : Composition élémentaire du phytoplancton

Élément	Composition cellulaire µg/mg de poids sec
C	176-650
O	205-330
H	29-100
N	10-140
Na	0,4-47
K	1-75
P	0-80
S	1,6-16
Mg	0,5-75
Fe	0,2-34
Zn	0,005-1
Mn	0,02-0,24
Si	0-230
B	0,001-0,25
Mo	0,0002-0,001
Cu	0,006-0,3
Co	0,0001-0,2

Enfin, le fractionnement biochimique se répartit suivant 4 familles de molécules : protéines, lipides, sucres et acides nucléiques (Tableau II-4). Cette composition est dépendante des espèces et des conditions de culture.

Tableau II-4 : Répartition du fractionnement biochimique d'une cellule de microalgue (Becker, 1994).

Compartiment biochimique	Fonction	Ordre de grandeur (% massique)
Protéines	Structure et métabolisme	40-60
Lipides	Structure et réserve énergétique	5-60
Sucres	Structure et réserve énergétique	8-30
Acides nucléiques	Support, vecteur et régulateur de l'information génétique	5-10

II.1.5.1 Nutrition carbonée

Avec une teneur comprise entre 20 et 65 %, le carbone est le constituant majeur des microalgues (Van Den Hende *et al.*, 2012). Si, vis-à-vis de cet élément, la plupart des microalgues mobilisent un métabolisme exclusivement photoautotrophe (*i.e.*, utilisation de lumière comme source d'énergie et du carbone inorganique), d'autres présentent un métabolisme hétérotrophe (*i.e.*, utilisation du carbone organique en absence de lumière) voire mixotrophe (*i.e.*, métabolisme photoautotrophe et hétérotrophe conjugué), simultanément ou séquentiellement (Bumbak *et al.*, 2011; Becker 1994).

Dans le cas du métabolisme photoautotrophe, le carbone inorganique pourra être introduit dans la culture sous forme gazeuse (CO₂) ou directement dans le milieu de culture sous la forme de carbonate (HCO₃⁻). Par rapport à d'autres mélanges gazeux (d'origine industrielle), l'air est relativement peu concentré en CO₂ (de l'ordre de 390 ppmv) et un apport supplémentaire va favoriser une croissance non limitée par le carbone et permettre d'atteindre des productivités plus importantes. Les effluents gazeux industriels issus de combustion constituent un gisement en carbone inorganique intéressant d'un point de vue économique et environnemental (Van Den Hende *et al.*, 2012).

Certaines espèces ont la capacité d'assimiler directement du carbone organique produit par d'autres organismes. Les substrats organiques « simples » préférentiels sont le glucose et l'acétate. Bien plus intéressants d'un point de vue économique, les mélasses et effluents d'activités sucrière et laitière ont été par exemple utilisés pour ce mode de nutrition (Bhatnagar *et al.*, 2011; Bumbak *et al.*, 2011).

Nous l'avons dit, la mixotrophie se définit comme la capacité des organismes à assimiler à la fois du carbone inorganique et du carbone organique (Lee, 2007). Dans ces conditions, le taux de croissance spécifique global sera sensiblement égal à la somme des taux de croissance obtenus dans les deux types trophiques.

II.1.5.2 Nutrition minérale

II.1.5.2.1 Azote

L'azote compte pour à 7-10 % de la composition de la biomasse. C'est un élément indispensable au métabolisme cellulaire qui intervient notamment dans la synthèse de protéines fonctionnelles et structurelles. Il est assimilé préférentiellement sous les formes ammonium (NH₄⁺) et nitrate (NO₃⁻), mais nitrites et urée pourront également répondre aux besoins azotés (Becker, 1994). La consommation de nitrate a pour effet d'augmenter le pH tandis que l'assimilation de l'ammonium provoque sa diminution. Dans ce dernier cas, un pH supérieur au pKa du couple NH₄⁺/NH₃ favorisera l'expression de la forme ammoniacale et par conséquent sa volatilisation potentielle ainsi qu'une perte nette pour les cellules. Certaines cyanobactéries, dites diazotrophes, ont la capacité d'assimiler

directement l'azote minéral atmosphérique (N_2) en mobilisant une enzyme inexistante chez les eucaryotes, la nitrogénase (Berman-Frank *et al.*, 2003). Décrit depuis 1949 par Spoehr & Milner, le contrôle des apports azotés constitue le mode de régulation le plus efficace et le plus employé pour contrôler la synthèse et le stockage de composés organiques de réserve dans la cellule : lipides, sucres et pigments (Hu *et al.*, 2008).

II.1.5.2.2 Phosphore

Le phosphore représente presque 1% du poids sec de la cellule. Il intervient pour l'essentiel dans le transfert d'énergie (ATP), la synthèse des acides nucléiques et la formation de la membrane cellulaire (Grobbelaar, 2007). La forme orthophosphate (PO_4^{3-}) est préférentiellement assimilée. Sous forme ionique, il va en effet former des complexes avec la plupart des cations métalliques en présence. Dans certaines conditions de pH notamment, il n'est plus disponible pour les cellules (Grobbelaar, 2007). Il est souvent d'usage de l'ajouter en excès dans les cultures pour pallier cette propriété (Chisti, 2007). Comme pour l'azote, la régulation des apports en phosphore est également un moyen de contrôler le stockage du carbone organique intracellulaire. Enfin, la gestion du ratio N/P dans les écosystèmes phytoplanctoniques complexes constitue un moyen de maîtriser l'équilibre entre les populations Eucaryotes et Procaryotes (Bulgakov & Levich, 1999).

II.1.5.2.3 Autres éléments

D'autres composés inorganiques sont déterminants dans l'activité métabolique du phytoplancton. Kaplan *et al.* (1986) relèvent environ 30 éléments. Parmi ceux-ci, le potassium, qui est le cation le plus abondant dans le cytoplasme, intervient comme co-facteur enzymatique et intervient dans les équilibres de charge des membranes (Becker, 1994). Le magnésium est indispensable au fonctionnement de la photosynthèse car il entre à la fois dans la composition de la chlorophylle et intervient comme cofacteur de la Rubisco⁴ (Becker 1994). La plupart des éléments traces inorganiques (B, Co, Cu, B, Zn, Mo, V) sont mobilisés dans la composition de l'appareillage enzymatique et participent à la biosynthèse de nombreux composés (Richmond, 2008). L'élément trace le plus indispensable est cependant le fer. Il intervient en effet dans des réactions enzymatiques fondamentales : au niveau des cytochromes des chaînes respiratoires, de l'assimilation de l'azote, de la synthèse de la chlorophylle et des acides nucléiques (Becker, 1994). Certaines microalgues à l'expression phénotypique singulière expriment par ailleurs des besoins spécifiques, comme les Diatomées. Elles doivent en effet assimiler de la silice pour l'élaboration de leur structure externe (Sarhou *et al.*, 2005; Sumper & Kruger, 2004). Enfin, un certain nombre de composés organiques sont

⁴ La Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate) est l'enzyme qui catalyse la première étape de l'assimilation photosynthétique du CO_2 .

identifiés comme des facteurs de croissance indispensables pour certaines espèces incapables de les synthétiser. La cobalamine (vitamine B12) est fréquemment citée (Croft *et al.*, 2006; Watanabe, 2007) ainsi que la thiamine (Vitamine B1) et la biotine (Vitamine B7). Les bactéries hétérotrophes libres ou associées aux microalgues en relation symbiotique peuvent subvenir à ces besoins en les excréant activement dans le milieu ou passivement au cours des lyses cellulaires (Croft *et al.*, 2005 ; Droop, 2007).

II.1.6 Applications

Dès les années 50, les microalgues ont suscité un intérêt notable lorsque les sociétés d'après-guerre appréhendaient les perspectives d'une expansion démographique et ses conséquences sur l'alimentation mondiale (Becker, 2004). Un taux de croissance plus important que celui des plantes supérieures et une fraction protéique remarquable ont alors positionné le phytoplancton comme un gisement d'intérêt à l'avenir de la nutrition humaine. Ces travaux, initiés dans l'Allemagne en guerre, ont marqué le début des enjeux scientifiques⁵ et industriels autour de ces cellules. La recherche et l'exploitation de métabolites d'intérêt pharmaceutique notamment, ont suivi ce mouvement (Borowitzka, 1994). Ainsi, si la nutrition constitue à l'heure actuelle l'essentiel des revenus industriels de ces organismes, ils s'adressent également de façon marginale aux marchés de la cosmétique, de la pharmacie et de l'environnement et bien plus récemment à celui de l'énergie. En 2006, la production mondiale de microalgues était estimée à un peu plus de 7000 t/an (Tableau II-5). Plus de 60 ans après un certain enthousiasme, l'ampleur de l'exploitation du phytoplancton demeure donc anecdotique par rapport à la production de macroalgues (15 millions de tonnes /an), des procaryotes non photosynthétiques⁶ et des levures et enfin à l'agriculture.

Tableau II-5 : Aperçu de la production mondiale de microalgues d'après Milledge *et al.* (2011) et Spoalare, (2006)

Algue	Production annuelle (t poids sec)	Pays producteur	Applications et produits
Spirulina	3,000	Chine, Inde, USA, République de l'Union du Myanmar, Japon	Nutrition animale et humaine, phycobiliprotéines, cosmétique
Chlorella	2,000	Taiwan, Allemagne, Japon	Nutrition humaine, aquaculture, cosmétique
Dunaliella	1,200	Australie, Israël, USA, Chine	Nutrition humaine, cosmétique, b-carotène
Aphanizomenon	500	USA	Nutrition humaine
Haematococcus	300	USA, Inde, Israël	Aquaculture, Astaxanthine
Cryptocodinium	240 t DHA	USA	Acide docosahexaénoïque DHA (Omega-3)
Schizochytrium	10 t DHA	USA	Acide docosahexaénoïque DHA (Omega-3)

⁵ Nous citerons à ce titre la découverte des voies de la photosynthèse en utilisant comme modèle d'étude une microalgue appartenant au genre *Chlorella* (Calvin, 1961).

⁶ La seule production de boues activées pour la France est de l'ordre de 1M T de MS/an (*Eléments de contexte et règlement Française relatif à la valorisation des boues issues du traitement des boues activées*, 2009).

II.1.6.1 Nutrition et santé

- **Alimentation humaine et animale**

Le phytoplancton en tant que producteur primaire des milieux aquatiques est tout « naturellement » exploité comme ressource nutritive pour l'aquaculture (Spolaore *et al.*, 2006). Dans cette filière majeure de la production mondiale (de l'ordre de 30 % - Milledge, 2011), les microalgues sont utilisées directement pour subvenir aux besoins des stades larvaires des mollusques bivalves et des crustacés (Muller-feuga *et al.*, 2003) ou indirectement comme complément alimentaire et comme substrat pour le zooplancton, base alimentaire de nombreuses espèces aquacoles. A l'exception de la Spiruline, la faible digestibilité de ces cellules, due à une paroi pseudo-cellulotique, rend difficile la consommation de cette ressource protéique par les animaux terrestres (Becker, 1994).

Depuis des millénaires, macroalgues et microalgues sont récoltées pour un usage alimentaire. Utilisée par les Maya, la Spiruline est par exemple encore récoltée et consommée par les habitants des bords du lac Tchad. Si certains pigments sont utilisés comme colorants alimentaires (β -carotène, phycobiliprotéines), la contribution à la nutrition humaine des sociétés modernes reste essentiellement confinée à la nutraceutique (Milledge, 2011).

- **Pharmaceutique et cosmétique**

A l'instar des plantes supérieures, un certain nombre de métabolites d'intérêts sont extraits des espèces exploitées à l'heure actuelle. Parmi ceux-ci, les caroténoïdes sont utilisés comme antioxydants (Astaxanthine) et comme colorants à usage alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (β -carotène, phycobiliprotéines). Les lipides constituent une très large classe de molécules que la plupart des microalgues peuvent accumuler dans d'importantes proportions de leur poids sec. Les acides gras polyinsaturés – qui dans le milieu naturel se retrouvent concentrés dans les organismes marins en position inférieure de la chaîne trophique – appartenant à la classe des oméga-3 et oméga-6 comme les DHA et EPA, rassemblent une grande part de ces lipides produits à échelle industrielle. Par ailleurs, d'autres molécules élaborées par des Diatomées, Dinoflagellées et Cyanobactéries sont particulièrement étudiées car elles présentent des propriétés anticancéreuses (Folmer *et al.*, 2010). D'autres composés aux propriétés antifongiques, antibactériennes, antivirales et antihistaminiques comptent également parmi les molécules à intérêt pharmaceutique.

II.1.6.2 Applications environnementales

II.1.6.2.1 Traitement des effluents liquides

Etant donné que leurs conditions de croissance et leur activité métabolique requièrent de l'eau et des éléments nutritifs (macro et micro-éléments), les microalgues sont susceptibles de croître sur une vaste gamme d'effluents. La littérature scientifique rapporte un grand nombre de gisements auxquels les microalgues furent confrontées : eaux résiduaires urbaines (Park *et al.*, 2011), effluents d'élevages An *et al.* 2003 (Bai *et al.*, 2012; Mulbry *et al.*, 2008) et effluents industriels comme les digestats (Levine *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Wilkie, 2002) ou encore les lixiviats de décharges (Lin *et al.*, 2007; Eminiémour-Muzalina *et al.*, 2011; Richards & Mullins, 2013). Récemment et pour la plupart des études récentes citées, une valorisation ultérieure de la biomasse vers une filière lipide carburant est conjointement étudiée.

Le traitement des effluents liquides générés par les activités humaines consiste en une élimination des contaminants de l'eau, qu'ils soient de nature physique, chimique et biologique avant le rejet dans le milieu naturel. Jusque dans les années 20, avant le développement des stations d'épurations « avancées », les effluents urbains étaient essentiellement canalisés et acheminés dans le milieu naturel. Les apports massifs d'éléments azotés et phosphorés provoquaient dans ces conditions (et provoquent encore) une augmentation de la production primaire qui s'exprime par une croissance en conditions non-limitantes des macroalgues et des microalgues entraînant un déséquilibre des écosystèmes naturels (eutrophisation). D'autres constituants de la charge polluante, comme les métaux lourds, les composés traces organiques et les organismes pathogènes (bactéries, virus, parasites) vont être responsables d'une toxicité directe sur les organismes vivants du milieu naturel et augmenter le risque sanitaire (qualité des eaux de baignades et de consommation...).

Pour répondre notamment aux conséquences environnementales de l'intensification des zones urbaines, les procédés dits à « boues activées » ont été développés. Dans ces solutions, l'oxygène de l'air est acheminé dans les bassins de traitement par forçage mécanique afin de permettre à une population bactérienne hétérotrophe de croître sur la fraction organique en assimilant les formes inorganiques de l'azote et du phosphore. L'élimination de l'azote se réalise conventionnellement en deux temps, une étape d'oxydation de l'ammonium en conditions aérobies (nitrification) suivi d'une étape en conditions anoxiques (dénitrification). Cette succession de procédés permet de transférer l'azote sous sa forme gazeuse, N₂ (Ahn, 2006). Le traitement du phosphate en excès nécessite en revanche l'emploi de processus dédiés et complémentaires. L'utilisation de flocculants chimiques ou organiques et les solutions biologiques de déphosphatation (cycles aérobie/anoxie) permettent de répondre aux seuils de concentration requis avant le rejet dans le milieu naturel (Morse *et al.*, 1998).

La « charge polluante » d'un effluent peut s'exprimer sous 2 fractions. La fraction abiotique comprend les formes organiques (matières en suspensions, molécules organiques plus ou moins complexes) et inorganiques (ions, sels et métaux lourds) et la fraction biotique rassemble les microorganismes potentiellement pathogènes (virus, bactéries et parasites essentiellement). En culture pure ou sous la forme d'écosystèmes complexes (une à plusieurs espèces différentes de microalgues associées à une flore bactérienne hétérotrophe), les microalgues vont avoir la capacité de réduire, voire d'éliminer, la plupart des éléments précités. A cette fin, les organismes sont utilisés sous forme libre, encapsulées (de-Bashan & Bashan, 2010) ou organisés en biofilms (Boelee *et al.*, 2012; Orandi *et al.*, 2012). Le tableau Tableau II-6 suivant présente les modes d'actions des microalgues sur les différents composants de la charge polluante.

Tableau II-6 : Mode d'action des microalgues sur la charge polluante constitutionnelle d'un effluent (d'après Munoz et Guiyesse, 2006)

Charge polluante	Mode d'action
Eléments minéraux	Assimilation de l'azote et du phosphore pour répondre à leurs besoins nutritifs. L'élévation du pH causée la consommation du CO ₂ dissous participe du stripping de NH ₃ et de la précipitation des ions phosphates.
Métaux	Adsorption directe sur la cellule ou indirecte sur des matrices extracellulaire
Matière organique	Dégradation de la matière par l'activité d'une flore bactérienne hétérotrophe associée
Organismes pathogènes	Effet direct par compétition et prédation et indirecte par effet de la température, de la concentration en oxygène dissous, de la qualité du milieu et de l'exposition au rayonnement ultra-violet.
Composés traces organiques	Certaines espèces peuvent utiliser des molécules organiques complexes comme ressource nutritive en résistant à une toxicité potentielle

L'action des microalgues sur les constituants polluants d'un effluent s'opère selon 2 mécanismes. Un mécanisme direct propre à leur activité métabolique leur permet d'assimiler les éléments azotés, phosphorés ainsi que les autres composés pour répondre à leurs besoins physiologiques. Les métaux lourds présents vont être adsorbés directement sur les parois ou indirectement par une matrice extracellulaire et éventuellement intégrés activement dans le cytoplasme. Un second mécanisme, indirect, résulte des conséquences de la croissance des microalgues sur leur milieu, en particulier l'élévation du pH au cours de la photosynthèse. En conséquence, ces conditions provoquent la précipitation des phosphates, des ions métalliques et favorisent l'expression majoritaire de la forme ammoniacale de l'azote et de son stripping. Enfin, ces conditions de pH alcalins (pouvant atteindre un pH>10) favorisent la réduction et l'élimination des organismes pathogènes. La production et

l'accumulation d'oxygène dissous contribue également à l'hygiénisation des effluents, au même titre que l'exposition aux UV.

Enfin, le milieu de culture spécifique aux espèces marines est décrit comme présentant des caractéristiques propres à réduire l'activité des bactéries enteropathogènes (Troussellier *et al.*, 1998). Dans les procédés de traitement par lagunage, la conjugaison des facteurs (biotiques et abiotiques) participe à l'efficacité du traitement sur l'ensemble de la charge polluante.

II.1.6.2.2 Traitement des digestats

Biogaz et digestat sont les deux produits qui résultent du traitement de la matière organique dans une filière méthanisation (présentée en partie II.3). Si le biogaz est valorisé pour un usage énergétique, le digestat, du fait de son pouvoir fertilisant est destiné généralement à un usage agricole. La qualité du digestat est fonction de la nature et de la composition de la matière organique initiale, du procédé de méthanisation employé ainsi que des paramètres opératoires appliqués. La qualité nutritive du digestat avérée en agriculture, le destine également à la culture de microalgues comme étudié dès les années 50 (Golueke & Oswald, 1959).

- **Composition**

La méthanisation est un processus conservatif pour l'ensemble des éléments qui ne se retrouvent pas dans le biogaz. Ainsi, à l'exception d'une partie du carbone (minéralisé en CO₂ et CH₄) et du soufre (H₂S), le digestat rassemble tous les constituants de la matière organique initiale (Möller & Müller, 2012). Ce milieu hétérogène est composé de la matière organique initiale partiellement dégradée, de la flore microbienne anaérobie et des éléments présents dans le substrat sous leur forme minérale, en particulier l'azote sous forme ammonium et le phosphore sous la forme orthophosphate, ainsi que magnésium, potassium, métaux lourds etc...

Par rapport à d'autres types d'effluents et à l'exception des effluents d'élevage, les digestats se distinguent par les concentrations en azote et phosphore les plus élevées (Cai *et al.*, 2013). Les digestats provenant de boues activées de traitement d'effluents urbains, de sous-produits animaux et de co-digestion de déjections animales sont les plus concentrés en ces éléments (RITTMO, 2011). Par ailleurs, sur l'ensemble des gisements de matière organique, les digestats de boues activées présentent les concentrations en métaux lourds et en composés traces organique les plus importantes.

Or, la composition en micro-éléments d'une série de digestats provenant de différents gisements de matière organique (Tableau II-7) nous indique qu'elle peut couvrir l'ensemble des besoins nutritifs essentiels à la croissance du phytoplancton décrits en partie II.1.5.

Tableau II-7 : Comparaison de la composition élémentaire exprimée en mg/L, en macro et microéléments pour des digestat de fumier bovin, porcin, de volaille et de boues activées (D'après Wu & Pond, 1981).

Elément	Fumier bovin	Boues activées	Fumier porcin	Fumier de volaille
K	116	12	366	592
Na	38	31	111	214
Mg	60	32	225	54
Ca	171	267	174	42
Fe	9,1	3	38	2,5
Cu	0,04	0,02	0,02	0,04
Zn	0,44	0,16	0,08	0,1
Co	0,02	0,12	0,09	0,12
Mn	0,12	0,26	1,15	0,1
Cr	0,002	0,012	0,05	0,047

La conservation des éléments nutritifs et l'amélioration de leur accessibilité, la diminution de la teneur en matières sèches du substrat initial ainsi que la réduction de la phytotoxicité confèrent aux digestats une valeur fertilisante d'intérêt (Berger & Couturier, 2008). Parmi les processus de gestion de cette matière (épandage direct, séchage, chaulage...), l'application d'une séparation de phase favorise une gestion optimale de ses composés. A l'issue de ce traitement, s'obtient une fraction liquide qui concentre l'essentiel des éléments minéralisés pour une valorisation agricole directe par épandage facilité ou indirecte par précipitation de struvite par exemple (Türker & Celen, 2007). Le résidu solide est usuellement composté, séché et/ou valorisé comme amendement organique (Al Seadi & Lukerhurst, 2012).

Cette étape de séparation dont l'efficacité peut être augmentée par l'ajout de flocculant organiques ou minéraux, impose une répartition différentielle des éléments qui composent le digestat et détermine leur biodisponibilité. Certains composés vont être adsorbés sur la fraction organique solide et les matières en suspension inertes, en fonction de leurs propriétés chimiques propres et des propriétés physico-chimiques de cette matrice. 40 à 86 % de la matière organique se retrouve aussi dans le résidu solide (Möller & Müller, 2012). Les composés traces organiques hydrophobes (par exemple les HAP), se trouvent liés à la matrice solide et les formes hydrophiles (par exemple les molécules pharmaceutiques) dans la phase liquide.

Les deux tiers du phosphore minéralisé se trouvent dans cette matrice, adsorbé directement ou piégé sous la forme de précipités formés avec Ca, Mg et N. Egalement des réactions de complexation vont participer à la forme des microéléments et de leur répartition à l'issue du post-traitement. Dans le cas de la méthanisation des lisiers de porcs (Marcato *et al.*, 2008), cuivre, zinc et manganèse sont adsorbés essentiellement sur les particules de plus petite taille (entre 1 et 60 μm), les mobilisant préférentiellement dans la phase liquide après séparation. En revanche, ce même auteur précise dans une autre étude (Marcato *et al.*, 2009) que ce phénomène ne semble pas affecter la

biodisponibilité des microéléments indispensables à la croissance des plantes. Toutefois, les travaux de Bjornsson *et al.* (2013) indiquent que la croissance de *Scenedesmus* sp. sur digestats de lisiers de porcs est limitée par une carence en magnésium. Le caractère variable de la composition des digestats ainsi que la biodisponibilité des éléments qui le compose constituent des facteurs importants pour les filières de valorisation en aval.

La phase liquide se caractérise par une faible proportion de matière organique, de phosphore et des concentrations plus élevées en potassium et en azote (jusqu'à 80 % sous la forme ammonium). En fonction des performances du digesteur, la phase liquide pourra contenir des acides gras volatils, des microorganismes (présents dans le substrat ou issus de la flore anaérobie). En outre, il est également possible de retrouver dans cette phase des résidus de floculant organique ou minéral. L'hétérogénéité de la composition de la phase liquide participe du caractère turbide du milieu. Si d'un point de vue nutritionnel strict, ce milieu peut répondre aux besoins nutritifs des microalgues, certaines caractéristiques propres pourraient cependant en affecter la croissance (Tableau II-8).

Tableau II-8 : Effets potentiels des constituants caractéristiques d'une phase liquide de digestat (d'après une étude de la bibliographie)

Composés	Effet potentiel	Références
Turbidité	Absorption d'une partie de la lumière destinée aux cellules	
Azote	Toxicité de la forme ammoniacale pour les cultures sans contrôle du pH par adjonction de CO ₂	Källqvist & Svenson, 2003 Ogbonna <i>et al.</i> , 2000
Acides gras	Stimulation de la croissance bactérienne hétérotrophe dans les cultures algues-bactérie (impact sur l'équilibre des populations). Stimulation de la croissance hétérotrophe pour certaines espèces de microalgues et de conditions de culture. Les acides gras longues chaînes (>C14) sont décrits comme étant toxiques pour certaines espèces.	Perez-Garcia <i>et al.</i> , 2011 Wu <i>et al.</i> , 2006
Floculants	Effet de coagulation sur les cellules entraînant une sédimentation non-contrôlée et une dégradation de performances de croissance. Les floculants peuvent également précipiter les éléments minéraux indispensables	
Microorganismes	Impact écologique potentiel (compétition) voire sanitaire en fonction de la filière de valorisation des microalgues	
Métaux lourds	Toxicité sur les cellules, accumulation et impact sanitaire potentiel en fonction de la filière de valorisation des microalgues	Monteiro <i>et al.</i> , 2012
Composés traces organiques	Toxicité potentielle sur les cellules et impact sanitaire potentiel en fonction de la filière de valorisation des microalgues	Munoz & Guieyese, 2006

L'utilisation d'un digestat pur n'est pas favorable à la croissance des microalgues comme le souligne les travaux de Levine *et al.*, (2010) et de Woertz *et al.*, (2009). Ce dernier obtient de meilleures performances de croissance en conditions extérieures pour des dilutions de 1:4 à 1:10. Il est intéressant de souligner que si l'on se réfère à l'utilisation des digestats pour une culture hors-sol de légumes, une dilution de 1:4 à 1:8 de ce milieu est également nécessaire pour permettre une croissance optimale des plantes (Liu *et al.*, 2009). Si cette dilution prévient une surcharge minérale et atténue l'effet de toxiques potentiels, elle permet également de limiter l'atténuation de la lumière causée par la turbidité du milieu. Enfin, comme le révèle Levine *et al.* (2010), la présence de la flore microbienne anaérobie dans la culture n'apparaît pas affecter la croissance. Nous observons que les conditions d'utilisation des digestats destinés à la croissance de microalgues ou pour le traitement des éléments qui le compose permet de limiter les effets toxiques potentiels.

II.1.6.2.3 Cas du traitement des métaux

Indispensables au métabolisme de tous les êtres vivants à l'état de trace, les ions métalliques se révèlent toxiques pour des concentrations excessives. A la différence des polluants organiques, ils sont non biodégradables et s'accumulent dans les organismes vivants, directement ou concentrés via la

chaîne trophique, et expriment alors leur toxicité (Fu & Wang, 2011). A ce titre et étant donné leur position dans la chaîne trophique des milieux aquatiques, ces organismes sont souvent utilisés comme indicateurs écotoxicologiques de la qualité des eaux (vis-à-vis des métaux lourds notamment). Monteiro *et al.*, (2012) décrivent un mécanisme de fixation des métaux qui se décompose en deux temps :

Adsorption : L'adsorption peut se réaliser directement sur la paroi des cellules et/ou indirectement dans un mucus exo-polysaccharidique. Cette première étape, rapide et réversible, mobilise les charges portées par les groupes fonctionnels chargés négativement portés par la paroi.

Assimilation dans le cytoplasme : Cette réaction est plus lente et mobilise un mécanisme actif et est irréversible. Les métaux rejoignent leur fonction métabolique ou expriment leur toxicité.

Si la concentration en métaux et en cellules dans le milieu compte parmi les facteurs affectant les performances d'adsorption, le pH est le paramètre clé de cette réaction (Monteiro *et al.*, 2012). Il détermine en effet le comportement chimique des ions en solutions et l'état électrique des groupes fonctionnels portés par les parois. Enfin, les espèces mobilisées, leur état physiologique ainsi que les seuils de tolérances vis-à-vis des métaux participent aux rendements épuratoires rapportés par la littérature. La désorption des ions par traitement chimique, légers ou poussé, peut également permettre d'envisager une récupération optimisée des métaux fixés (Monteiro *et al.*, 2012).

II.1.6.2.4 Traitement des effluents gazeux

La croissance des microalgues en conditions non limitantes en carbone compte parmi les enjeux clés de la production de masse (Benemann *et al.*, 2012). A partir d'un certain niveau d'irradiance, la concentration en CO₂ atmosphérique limite la productivité. L'utilisation de la photosynthèse pour la fixation de CO₂ d'origine anthropique répond ainsi à la fois à un enjeu environnemental du point de vue des activités industrielles particulièrement émettrices et à un enjeu économique sur le versant culture de masse des microalgues. En outre, le contrôle du pH via cet apport exogène de carbone inorganique prévient le stripping de l'ammoniac et la précipitation des phosphates afin de conserver leur biodisponibilité. Van Den Hende *et al.*, (2012) compare 21 études portant sur les réponses épuratoires de 28 espèces de microalgues différentes confrontées à des effluents gazeux synthétiques et industriels. Les performances épuratoires observées peuvent atteindre jusqu'à 70 % pour le CO₂, près de 96 % pour les NO_x et presque 100% pour le SO₂.

II.1.6.2.5 De l'utilisation d'écosystèmes complexes pour le traitement d'effluents

Les espèces appartenant au genre *Chlorella* et *Scenedesmus* sont parmi les plus étudiées pour les applications de traitement d'effluents mobilisant des microalgues (Cai *et al.*, 2013). Ces organismes dominent la plupart des écosystèmes mobilisés dans les procédés d'épuration par lagunage et motivent leur étude en conditions de cultures dite « pures ». D'un point de vue industriel cependant, la mono culture de microalgues et sa maîtrise- à l'exception relative de quelques espèces extremophiles – est particulièrement difficile dans des systèmes pour lesquels les moyens de maîtriser la qualité de la biomasse sont faibles (systèmes ouverts) et les contaminations biotiques et abiotiques potentiellement importantes (en provenance à la fois de l'environnement extérieur et des effluents à traiter). Par ailleurs, la toxicité de certains éléments ou composés présents dans les effluents ne permet pas de mobiliser une culture pure. Enfin, le principe de « monoculture », voire « d'axénie », appliqué aux microalgues reste une notion toute relative puisque complexe à maîtriser parfois même au laboratoire (Borisova & Nogina, 2000), bactéries et microalgues étant même associées physiquement (Croft *et al.*, 2005).

Dans les procédés de type lagunage ou plus avancés techniquement comme les bassins d'oxydation ou les étangs à haut-rendement (développés dans les années 50), c'est l'action conjointe des populations phytoplanctoniques et bactériennes qui détermine la qualité des performances épuratoires. En effet, à la différence des systèmes à boues activées, l'oxygène nécessaire au métabolisme de la population bactérienne hétérotrophe est fourni via l'activité photosynthétique du phytoplancton (Figure II-5).

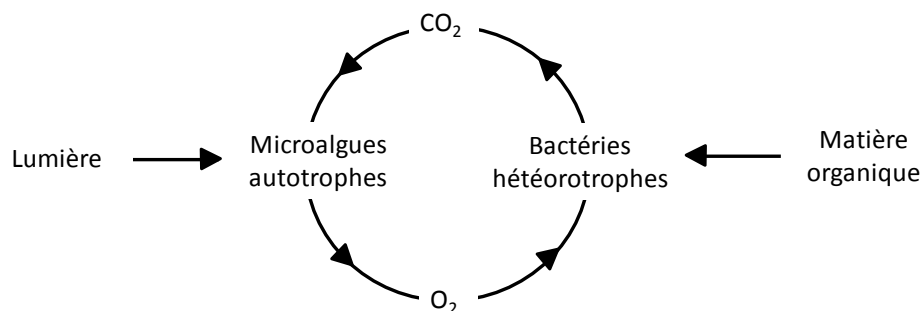


Figure II-5 : L'activité photosynthétique en soutien de la flore bactérienne hétérotrophe pour le traitement de la matière organique (d'après Oswald *et al.*, 1957, Munoz & Guiyesse, 2006).

Dans le milieu naturel, le phytoplancton se développe en association avec d'autres microorganismes (bactéries, virus, champignons, ...). Bactéries et microalgues dominent les populations dans les milieux aquatiques (Cole, 1982) et la qualité de leurs interactions pèse dans les cycles biogéochimiques (carbone, azote) auxquels ces organismes sont étroitement associés (Azam & Malfatti, 2007). Des corrélations positives sont fréquemment rapportées entre l'activité de la

production primaire par le phytoplancton et l'abondance bactérienne et son activité (Cole, 1982). Dans les filières de traitement d'effluents où la charge polluante est sous plusieurs formes (biotique et abiotique), l'association entre microalgues eucaryotes et bactéries hétérotrophes est décrite comme particulièrement bénéfique (Golueke & Oswald, 1959; Subashchandrabose *et al.*, 2011).

La mobilisation d'écosystèmes complexes peut dès lors garantir des performances de traitement élevées tout en assurant la résilience des fonctions d'intérêt exprimées par l'ensemble de la population (Elmqvist *et al.*, 2003). La construction d'écosystèmes microalgues et bactéries permet de mutualiser des fonctions recherchées pour parvenir à assimiler azote et phosphore, d'adsorber des métaux lourds et de dégrader des composés organiques complexes (Tableau II-9).

Tableau II-9 : Performances épuratoires remarquables sur des effluents urbains, des composés organiques et des métaux pour des associations artificielles et naturelles microalgues et de bactéries (CI : concentration initiale ; RE : rendement épuratoire)

Microalgue(s) + Bactérie(s)	Polluant	CI (mg.L ⁻¹)	RE (%)	Référence
<i>Chlorella sorokiniana</i>				
Bactéries de boues activées	COT	645	86	González <i>et al.</i> (2008b)
	NH ₄ ⁺	373	87	
<i>Chlorella sorokiniana</i>				
Bactéries de boues activées	COT	1247	9-61	de Godos <i>et al.</i> (2009a)
	NH ₄ ⁺	656	94-100	
	PO ₄ ³⁻	117	70-90	
<i>Euglena viridis</i>				
Bactéries de boues activées	COT	450	51	de Godos <i>et al.</i> (2010)
	PO ₄ ³⁻	19.4	53	
	NH ₄ ⁺	320	34	
<i>Chlorella sp.</i>				
<i>Rhodococcus sp., Kibdelosporangium aridum</i>				
	Cuivre	0.04	62	Safonova <i>et al.</i> (2004)
<i>Scenedesmus obliquus</i>				
	Nickel	0.21	62	
<i>Stichococcus sp.</i>				
	Zinc	0.1	90	
<i>Phormidium sp.</i>				
	Fer	6.43	64	
	Manganèse	0.20	70	
Biomasse microalgale de STEP				
	Cuivre	100	80	Loutseti <i>et al.</i> (2009)
Biomasse bactérienne de STEP				
	Cadmium	100	100	
<i>C. sorokiniana</i>				
<i>R. basilensis</i>	Sodium salicylate	500	76	Muñoz <i>et al.</i> (2006)
<i>C. sorokiniana IAM C-212</i>				
<i>Microbacterium sp. CSSB-3</i>	Propionate	125	100	Imase <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella sp.</i>				
<i>Rhodococcus, Kibdelosporangium aridum</i>				
	Phenols	0.48	85	
<i>Scenedesmus obliquus</i>				
<i>Rhodococcus, Kibdelosporangium aridum</i>	Hydrocarbure	40	96	Safonova <i>et al.</i> (2004)

Cette approche « écologique » se distingue de l'ingénierie moléculaire en ce qu'elle apparaît plus aisée à mettre en œuvre (Subashchandrabose *et al.*, 2011). Par ailleurs, ces associations d'organismes

peuvent se révéler stable dans la durée (Safonova *et al.*, 2004). En effet, à la différence de la monoculture, la diversité et la richesse d'un écosystème assure une occupation de l'ensemble des niches écologiques. Le principe de l'exclusion compétitive et du lien entre diversité et productivité peut se positionner avantageusement dans une perspective d'exploitation industrielle des ressources phytoplanctonique en milieu ouvert, comme souligné par Kazamia *et al.*, (2012).

Les milieux naturels et les milieux fortement anthropisés constituent des gisements de diversité phytoplanctonique dans lesquels il est pertinent de prélever des organismes et des populations originaux et adaptés à leur environnement biotique et abiotique. Cette démarche de « phycoprospection » (Wilkie *et al.*, 2011), en explorant la diversité, permet d'étendre les études à d'autres espèces et d'envisager d'autres écosystèmes aux fonctions d'intérêt.

Eland *et al.*, (2012) dressent le constat qu'en dépit des enjeux associés aux activités de ces communautés microbiennes appliqués au traitement des effluents, la connaissance de leur diversité et de leur dynamique est aujourd'hui encore peu étudiée et constitue une perspective particulièrement riche.

II.1.6.3 Production d'énergie

Dans un contexte énergétique et environnemental en pleine évolution, le potentiel offert par les microalgues pour la production d'énergie est depuis le début du XXI^{ème} siècle le moteur de l'engouement et des intenses activités de recherches mobilisées autour du potentiel (Chisti, 2007). A l'instar des gisements de biomasses mobilisés dans les filières bioénergies, et du fait d'expressions phénotypique métabolique identiques aux plantes supérieures, les travaux portant sur la valorisation énergétique des microalgues concernent pour l'essentiel les mêmes filières (Figure II-6). A l'exception d'autres modes de valorisation également explorés, comme la production directe d'hydrogène et l'utilisation de ces organismes dans des piles microbiennes.

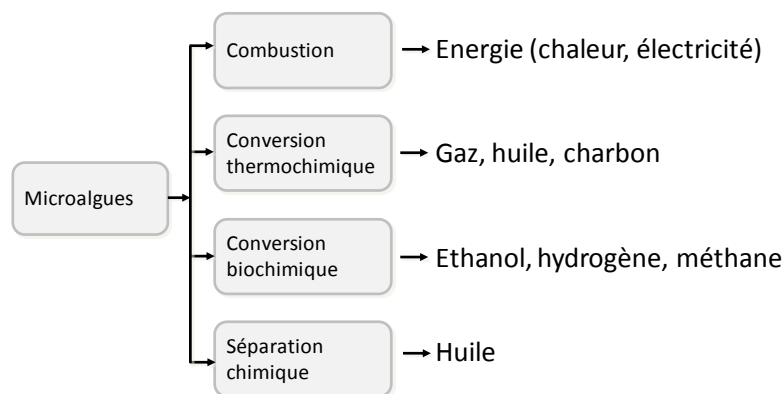


Figure II-6 : 4 principaux processus de valorisation énergétique des microalgues

La biomasse sèche peut en effet servir à produire de l'énergie par combustion directe (Kadam, 2001). Liquéfaction, pyrolyse ou hydrogénation de ces organismes permettent de produire un biocarburant gazeux ou une « huile » brute par conversion thermochimique (Mac Kendry, 2002, Miao and Wu, 2004). Méthane et éthanol peuvent être produits par conversion biochimique à partir de la biomasse entière ou raffinée par fermentation des sucres accumulés dans la cellule (Chisti, 2008; Sialve *et al.*, 2009). Cette filière de conversion permet également de produire de l'hydrogène par fermentation de la cellule entière ou de son résidu après extraction d'autres molécules d'intérêt (Carver *et al.*, 2011; Mussnug *et al.*, 2010). Enfin, les lipides intracellulaires peuvent être extraits par séparation chimique pour intégrer une filière biodiesel après transesterification (Hu *et al.*, 2008).

Dans ce champ des possibles, les filières lipides, éthanol carburant et méthanisation sont les voies qui suscitent le plus d'intérêt et, a priori, de larges potentiels de développement. En effet, comme pour les autres gisements de biomasse, ces formes d'énergie peuvent compléter ou se substituer à la plupart des énergies fossiles (gasoil, essence et gaz naturel) et, dans cette idée, bénéficier des mêmes filières de valorisation, de réseaux de distribution, et de stockage. Dans le cadre de nos travaux, nous

nous sommes intéressés en particulier à la filière lipides biocarburant (que nous détaillons dans la suite) et surtout à la méthanisation qui fait l'objet de la partie II.3 de ce chapitre.

II.1.6.3.1.1 Production de lipides carburant

L'accumulation de lipides dans les microalgues est un phénomène observé depuis le début du XX^{ème} siècle (Beijerinck, 1904) et décrit plus précisément à la fin des années 40 (Spoehr & Milner, 1949). La proportion de lipides mesurée dans les cellules s'étend de 5 à plus de 80 % du poids sec. Ils répondent pour l'essentiel à des fonctions de structure et de réserve énergétique. Cette concentration dépend des espèces et est fortement affectée par les conditions environnementales. Si la nature des lipides est très proche de celle élaborée par les plantes supérieures, une plus grande variabilité de composition est cependant rapportée chez les microalgues (Hu *et al.*, 2008).

Les lipides sont principalement synthétisés à destination des structures membranaires (chloroplaste, membrane plasmique ainsi que des divers organites endoplasmique). Glycolipides et phospholipides sont les formes majoritaires qui répondent à ces fonctions. Dans des conditions de croissance défavorables pour les cellules, le métabolisme s'oriente vers la biosynthèse de Tri-Acyl-Glycérides (TAGs). Les bouleversements métaboliques induits par des carences en azote et/ou en phosphore (pour la plupart des espèces) et en silice (pour les diatomées en particulier) vont permettre d'augmenter significativement la proportion de TAGs dans la cellule. Des conditions d'éclaircissement fortes et une élévation de la température contribuent également à ce mécanisme. La concentration de TAGs intracellulaires et la concentration en lipides totaux augmente en conditions de stress. Or, ce métabolisme de stockage de TAGs en conditions de stress s'accompagne d'un ralentissement, voire d'un arrêt complet, de la croissance. Ce mécanisme est cependant transitoire puisque le retour à des conditions favorables induit une consommation du stock de TAGs (Lacour *et al.*, 2012). Si la plupart des espèces contiennent des lipides de réserve, certaines d'entre elles se distinguent par des capacités de stockage remarquables. Ainsi, les espèces dites « oléagineuses » présentent une concentration massique de 25 % de TAGs en moyenne et qui pourra atteindre 45 % en conditions d'accumulation contrôlées (Hu *et al.*, 2008).

En termes d'application, le biodiesel synthétisé à partir de microalgues présente les qualités énergétiques requises pour les systèmes de combustion étudiés et peut répondre aux normes imposées à ces carburants (Xu *et al.*, 2006).

Dans la suite nous présentons une étude de la filière microalgues pour la production de biocarburant sous l'angle des impacts environnementaux, en utilisant l'Analyse du Cycle de Vie. Cette étude publiée dans Environmental Science and Technology a orienté nombre de nos études sur le sujet.

II.2 Analyse du cycle de vie de production d'énergie à partir de microalgues

II.2.1 Avant-propos

L'intégration des préoccupations environnementales dans le développement de nouveaux produits /nouvelles technologies est une approche relativement récente. Les effets conjugués des premiers chocs pétroliers et des préoccupations croissantes face aux atteintes environnementales des activités anthropiques ont motivé la mise en œuvre d'outils capables de réaliser des bilans énergétiques tout d'abord, puis environnementaux de plus en plus exhaustifs quant aux conséquences sur les milieux récepteurs. Formalisée au début des années 90, l'Analyse du Cycle de Vie est une méthode multi-étape (prise en compte de l'ensemble du cycle, « du berceau à la tombe ») et multicritère (plusieurs catégories d'impacts sont considérées). La conduite d'une ACV s'opère en quatre étapes, définies selon les normes ISO 14040 et 14044.

- Définition des objectifs et du champ de l'étude
- Inventaire des émissions et des extractions
- Impacts environnementaux associés aux émissions et extractions
- Interprétation des résultats

C'est une démarche itérative qui permet de préciser et de revenir sur les différentes étapes en fonction des résultats obtenus et aussi des optimisations possibles apportées sur chacune des composantes de l'objet de l'étude. L'interprétation et la valorisation des résultats du bilan permet également de considérer l'Analyse de Cycle de Vie comme un outil capable d'éclairer sur les améliorations à porter à ces systèmes existants et d'envisager le développement de systèmes en devenir à impact environnemental maîtrisé ou du moins cerné. C'est à ce titre que cette méthode se positionne avantageusement pour appréhender les conséquences que peut avoir le développement d'une nouvelle filière de production d'énergie sur l'environnement. Plus encore, l'analyse exhaustive de la chaîne des processus et de leurs impacts permet d'identifier les obstacles majeurs et d'évaluer la qualité des solutions possibles.

A cette fin nous avons réalisé l'Analyse de Cycle de Vie d'une filière de production de lipides à usage carburant en utilisant des microalgues et ce travail, présenté par la suite.

II.2.2 Analyse du cycle de vie de la production de biodiesel à partir de microalgues

Laurent Lardon, Arnaud Hélias, Bruno Sialve, Olivier Bernard, Jean-Philippe Steyer

Life-cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae

Environmental Science and Technology

Volume 43, Issue 17, pp 6475-6481, 2009

Abstract: This paper provides an analysis of the potential environmental impacts of biodiesel production from on micro-algae. High production yields of micro-algae have called forth interest of economical and scientific actors but it is still unclear whether the production of biodiesel is environmentally interesting and which transformation steps need further adjustment and optimization. A comparative LCA study of a virtual facility has been undertaken in order to assess the energetic balance and the potential environmental impacts of the whole process chain, from the biomass production to the biodiesel combustion. Two different culture conditions, nominal fertilizing or nitrogen starvation as well as two different extraction options, dry or wet extraction, have been tested. The best scenario has been compared to first generation biodiesel and oil diesel. The outcome confirms the potential of microalgae as an energy source but highlights the imperative necessity of decreasing the energy and fertilizer consumption. Therefore control of nitrogen stress during the culture and optimization of wet extraction seem to be valuable options. This study also emphasizes the potential of anaerobic digestion of oilcakes as a way to reduce external energy demand and to recycle a part of the mineral fertilizers.

II.2.3 Introduction

During the past ten years, fossil fuel depletion and global warming issues have strongly motivated research on fuel production from biomass. Biofuel based on vegetal oil or bioethanol have the key advantage of relying on existing distribution networks and current engine technology. In comparison to oil fuel, biofuel can represent an improvement in terms of emissions of fossil CO₂; however such a technology can also induce negative environmental impacts, caused for instance by pesticides and fertilizers, and can also create a competition for land use with food crops. Therefore the use of first generation biofuel as a sustainable alternative to fossil fuels is questionable and has been subjected to controversy (Crutzen *et al.*, 2008). On the other hand, microalgae seem to be an attractive way to produce biofuel due to their ability to accumulate lipids and to their very high actual photosynthetic yields; about 3 to 8% of solar energy can be converted to biomass whereas observed yields for terrestrial plants are about 0.5% (Huntley *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). These interesting properties lead to potential productivities (in terms of oil production per ha and per year) which are far higher than rape seed or sunflower (Chisti, 2008). This high productivity combined with both the moderate

competition with feed crop and the possibility to uptake industrial sources of CO₂ has motivated studies depicting microalgae as an alternative source of vegetal oil for biodiesel (Huntley *et al.*, 2007; Chisti, 2008). Despite strong interest from economical and scientific actors, up to this date, there is up to our knowledge no industrial facility producing biodiesel from microalgae. The studies undertaken on the subject restrict to lab and pilot scales. Hence, no thorough Life Cycle Assessment of the production chain from microalgae culture to biodiesel is currently available, with the exception of LCA studies about the co-firing of micro-algae with coal (Kadam, 2001). The aim of this study is therefore to assess the environmental impacts of this technologically non-mature process. To do so, we extrapolated laboratory observations combined with known processes developed for first generation biofuel, in order to design a realistic industrial facility. The potential pollution transfers are computed for various scenarios and guide the choice of selected steps in the process chain. In addition to the overall energetic balance of the production chain, the impacts of the combustion of algal biodiesel are compared to the ones produced by 2 first generation biofuel and diesel fuel. The considered functional unit of the LCA is the combustion of 1 MJ of fuel in a diesel engine; the boundaries include extraction and production of raw materials, facility construction and dismantling, biofuel elaboration and use in the engine. It is a “from cradle to combustion” analysis for the fuel and “from cradle to grave” for the facility. The key objective of this study is not to offer a LCA of the nowadays microalgal biodiesel technology, but to identify the obstacles and limitations which should receive a specific research effort to make this process environmentally sustainable.

II.2.4 Production system overview

As stated before, the analysed process chain refers to a hypothetical system based on extrapolation from lab-scale studies. The inventory is based on figures derived from academic resources, communications with industrial producers, and inventories carried out on similar transformation units and processes described in the Ecoinvent database (Frischknecht, 2007). Standard rules have been used for replacement of infrastructure: buildings have a 30 year lifespan, and are then dismantled, concrete is sent to ultimate landfill whereas steel-based and PVC products are recycled. Electrical engines are changed every 10 years. Electricity production is based on the European energetic mix, heat is produced with natural gas burned in industrial gas boilers. When a process leads to the production of several products, an energetic allocation has been done, sharing the environmental burden between co-products according to their relative energetic content. Figure II-7 gives an overview of the process chain, from algae culture to the use of biodiesel in a diesel engine. Pure culture of *Chlorella vulgaris* is achieved in open raceways, in a facility covering about 100 ha. Like many other micro-algae species, *Chlorella* is known to react to nitrogen deprivation by an accumulating lipids and carbohydrates but at the cost of a lower growth-rate (Illman *et al.*, 2000; Converti *et al.*, 2009). As it is

not evident which strategy will give better results, both options will be evaluated. However it is assumed that in both cases culture is carried out in one step, without using specific facility dedicated to nitrogen deprivation or inoculum's maintenance. Algae harvesting is achieved by continuous recirculation of culture ponds through a thickener; the flocculated stream is then dewatered. Oil extraction is subject to many discussions (Converti *et al.*, 2008) and it is not clear now which technology would be the more efficient. As a consequence, two options have been evaluated: either advanced drying followed by hexane extraction (similarly to soybeans), or direct extraction from the wet algal paste. Water collected at the thickener and dewatering unit is redirected to the pond. An oil extraction unit located in the facility extracts oil from the algal paste. The oil fraction is then shipped to an industrial transesterification facility where it is transformed into biodiesel.

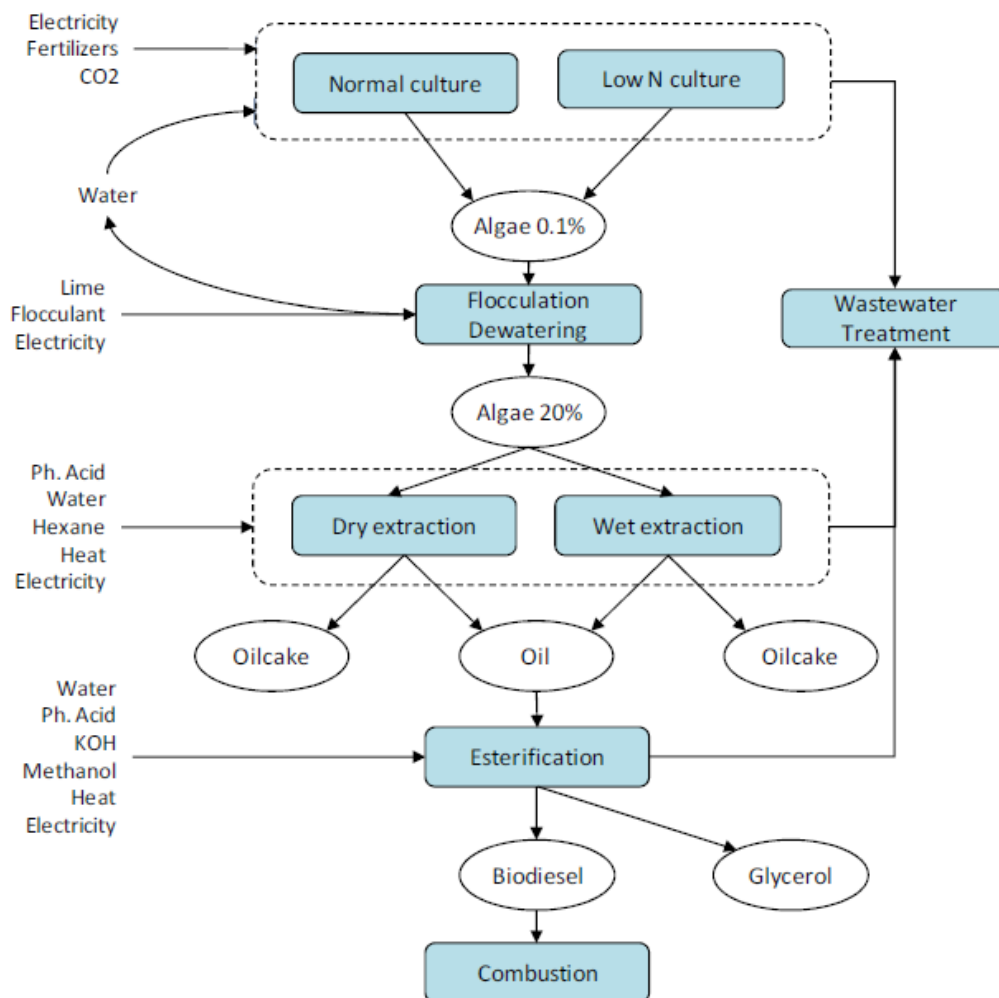


Figure II-7 : Process chain overview

Performance and efficiency of the various steps in the process are highly dependent on the chemical composition of the algae. In order to assess the implication of the culture condition on the whole environmental impact, the biochemical fractionation (protein / carbohydrates / lipid content) is used

to infer the CHON composition of different strains; this conversion is based on the gross elemental composition of biochemical classes for algae and cyanobacteria reported in (Geider and Laroche, 2002). In addition, experimental measurements reported in (Ilman *et al.*, 2000) for 4 strains of the genus *Chlorella* grown in two different conditions (normal or with low nitrogen) have been used to estimate net calorific values of each biomass fraction (summarized in Tableau II-10).

Tableau II-10 Biomass fractions.

Fraction	Molar mass (g.mol ⁻¹)	Net Calorific Value (MJ.kg ⁻¹)
Protein C _{4.43} H ₇ O _{1.44} N _{1.16}	100.1	15.5
Carbohydrate C ₆ H ₁₂ O ₆	180	13
Lipid C ₄₀ H ₇₄ O ₅	63.4	38.3

On the basis of Table IV-1, it is possible to estimate nitrogen requirements and heating value of oil and oilcakes according to algae composition. Other nutrients (Potassium, Magnesium, Phosphorus and Sulfur) are more closely associated to metabolic functions (e.g. photosynthesis) than to storage function. Their quota in the algae is thus assumed to be proportional to the protein content, and then indirectly to the Nitrogen fraction of the biomass. Mineral balance between N, P, K, Mg and S described for *Chlorella vulgaris* (Oh-Hama and Miyachi, 1988) has been used to determine the mineral composition depending on the protein content.

II.2.4.1 Algae culture

The culture device consists of open raceways, operated with an algae concentration of 0.5g.L⁻¹. Growth-rates observed in open raceways are usually lower than in laboratory photobioreactors since it is more difficult to maintain optimal and stable growth conditions (Chisti, 2007). Alternatively photobioreactors require much more energy for building and during process compared to the increase in productivity that they offer (Sheehan *et al.*, 1998). Assuming that the photosynthesis potential of a pond is equivalent to a 5 cm depth photobioreactor, growth-rates (expressed in day⁻¹) reported in (Ilman *et al.*, 2000) for photobioreactor lead to productivity rate between 20 and 30 g.m⁻².day⁻¹, which are in the range of usual performances of open raceways (Sheehan *et al.*, 1998). Nutrient and CO₂ supply to produce 1 kg of algae are determined for both culture methods from the elementary composition proposed in Tableau II-11 for both culture conditions. It is assumed that the total amount of nutrients is used with a perfect efficiency. Fertilizer mix has been chosen in order to minimize its environmental burden generated by its production or its use (e.g. nitrogen volatilization). Nitrogen is brought by calcium nitrate, phosphorous by single superphosphate, potassium by potassium chloride, and magnesium by magnesium phosphate. Distance from production sites to regional storage has been

assumed to be 100 km. Oligo-nutrients are usually provided in sufficient quantities by fresh water (Geldenhuis *et al.*, 1985) and are then neglected.

Tableau II-11 Composition and culture parameters of *C.vulgaris*

	Normal	Low N
Protein (g.kg ⁻¹)	282	67
Lipid (g.kg ⁻¹)	175	385
Carbohydrates (g.kg ⁻¹)	495	529
Lower Heating Value (MJ.kg ⁻¹)	17.5	22.6
C (g.kg ⁻¹)	480	538

The assumed pond design is consistent with industrial standards (Richmond, 2003): 10 meter width, 100 meter long and 30 cm deep oval-shaped built in concrete blocks, on a 10cm thick sole. A PVC liner covers the concrete to decrease roughness and to avoid biomass attachment. Culture medium velocity is kept at 25cm.s⁻¹ with a paddlewheel. Pond's water is flushed every two months to control development of bacteria and to avoid accumulation of toxic or inhibiting compounds. Flush water is treated in situ in a classical wastewater treatment plant. In a Mediterranean context, the annual balance between rainfall and evaporation results in a water loss of 300 mm. Since the fraction of the water left in the harvest cannot be recycled, a significant part of water is lost for each kg of algae leaving the culture system. Consequently the total water needs are around 4 L per kilo of dry algae. A pump for murky water of 750W collects the growth medium with a 15m³.hour⁻¹ flow rate. CO₂ is pressurized and injected along the pond through PVC pipes. It is evaluated in (Kadam, 2001) that CO₂ injection requires 22.2 Wh per kg of CO₂.

Harvesting has been pointed as one of the main bottleneck in algal culture (Grima *et al.*, 2003; Carlsson *et al.*, 2007) because of their low diameter (i.e. from 2 to 20 µm). Centrifugation is most of the time efficient but too expensive for an energetic production purpose (Grima *et al.*, 2003). However it is often possible to flocculate algae by pH adjustment and addition of synthetic or biological flocculants (Oh *et al.*, 2001; Yahi *et al.*, 1994; Gutzeit *et al.*, 2005). It is assumed here that the addition of 0.5 g.m⁻³ of a synthetic flocculant and the addition of lime up to a pH 11 (i.e. 300 g.m⁻³) flocculate 90% of the algal biomass. Resulting flocs are characterized by a settling speed of 2 m.h⁻¹ and a concentration of 20 kg.m⁻³. The algae stream is processed through a rotary press producing an algal cake with a dry weight concentration of 200 kg.m⁻³.

II.2.4.2 Algae oil extraction and transformation.

Results on micro-algal oil extraction are rare and difficult to extrapolate to industrial scale. According to (Sazdanoff, 2006), algae oil extraction is very similar to soybean extraction. However soybean has a solid content around 90%. Hence to preserve consistency of the study, algal paste has to be dried up to a solid content of 90% before being processed in the oil mill. Comparison of different processes commonly used for wastewater treatment plant sludge shows that belt dryer is one of the less demanding drying processes able to reach a 90% solid content with an energetic consumption of 400 Wh of electricity and 13.8 MJ of heat per kg of dry matter processed (Hassbrauck, 1996). The oil mill has been modeled on the basis of the description of soybean mills provided in the Ecoinvent database. Oil is separated from the biomass by counter-current circulation of a solvent, usually hexane: 2 g of hexane are lost for each kg of dry algae. Some studies (Shen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Rodriguez-Ruiz *et al.*, 1998) suggest that direct extraction on the wet paste is possible. Whereas it was possible to use pre-existing LCA for dry extraction, there is, to our knowledge, no description of an industrial-scale wet process available. We have thus proposed an alternative scenario to dry extraction, assuming that heat consumption and hexane loss are proportional to the total volume of processed material. Data reported in literature (Lee *et al.*, 2009) use a volume ratio of 1:1 between solvent and the material to process and obtained an extraction yield of about 70%. The oil mill leads to two products, crude oil and oilcake, which differ by their carbon and their energetic content. As a consequence energetic allocation does not match the mass flow; for instance in the case of the normal culture condition, the extracted oil represents 37.9% of the energy but accounts for only 27.4% of the initial carbon amount fixed in the algae. Therefore without proper correction, oil combustion will emit less carbon than it is supposed to have contributed to fix. Constituently with the use in the Ecoinvent database, a corrective emission term is hence added to correct the carbon balance. To determine the corrective term ε , we write the equation describing the conservation of carbon fraction between two allocation rules:

$$\alpha(N_c + \varepsilon) = \beta N_c$$

where α is the chosen allocation coefficient, N_c the amount of carbon in the initial product and β the fraction of carbon actually transferred to the product. Oil has to be esterified with an alcohol to become a biodiesel. This transformation is usually performed in industrial facilities centralizing oil from different origins. We assume that processing yields and required facilities are similar to the ones used for other types of biodiesel (like rapeseed or soybean oils).

II.2.4.3 Combustion

To compare biodiesel produced from microalgae to any other fuel, the chosen functional unit is the combustion of 1 MJ of fuel in a diesel engine. Impact assessment includes only emissions generated

by the combustion and not the transport from storage to the distribution network. There is currently no data about the emissions of a petrol engine working with microalgal biodiesel. However related study (Scragg *et al.*, 2003) and algal biofuel characterization (Xu *et al.*, 2006) let assume that algal biodiesel has the same behavior in diesel engine than other biofuel.

II.2.5 Production chain Analysis

II.2.5.1 Mass-flow

Tableau II-12 summarizes the most impacting emissions and consumption generated by the production of 1 kg of algal biodiesel. Contrary to the standard LCI, this inventory is done without any allocation but reflects the flows really generated by the process chain. The distribution of energy production and consumption shows that all configurations have high energetic requirements compared to the energy contained in the biofuel (37.8 MJ/kg). However, it turns out that both fertilizers and energetic requirements are lower for the low-N culture condition. Wet oil extraction significantly reduces heat requirements but lower extraction yields erode slightly the benefit of this technique. It is worth nothing that only the wet extraction on algae grown in low N condition requires less energy than the one obtained in the oil flow.

Tableau II-12 : Most impacting flows generated by the production of 1 kg of biodiesel.

Step	Operation	Normal		Low N	
		Dry	Wet	Dry	Wet
Algae culture and harvesting	Algae (kg)	5.93	8.39	2.7	3.81
	CO ₂ (kg)	10.4	14.8	5.32	7.52
	Electricity (MJ)	7.5	10.6	4	5.7
	CaNO ₃ , as g N	273	386	29.4	41.6
Drying	Heat (MJ)	81.8		37.1	
	Electricity (MJ)	8.52		3.9	
Oil extraction	Heat (MJ)	7.1	22.4	3.2	10.2
	Electricity (MJ)	1.5	8.4	0.7	3.9
	Hexane loss (g)	15.2	55	6.9	25
Transesterification	Methanol (g)	114	114	114	114
	Heat (MJ)	0.9	0.9	0.9	0.9
Total energy	Consumption (MJ)	106.4	41.4	48.9	19.8
	Production (MJ)	103.8	146.8	61	86
	Balance (MJ)	-2.6	105	12	66

A cumulative energy analysis has been performed, to analyze the total energetic debt of 1 MJ of biodiesel and its distribution within the production chain (see Figure II-8). The Cumulative Energy

Demand (CED) includes energy used at the facility but also energy required for the production of the required inputs (fertilizers) and construction of infrastructure buildings (Frischknecht *et al.*, 2007). When taking into account all the energetic debt of the process chain, it appears that only the wet extraction on low-N grown algae has a positive balance. Other scenarios lead to negative energetic balance despite a 100% energy extraction from the oilcake. It can also be noticed that the application of a nitrogen stress improves the CED by 60% whereas CED is only increased by 25% with the wet extraction. Obviously low-N culture has lower fertilizer requirements but also implies a lower drying and extraction effort whilst the wet extraction needs a larger initial production due to its lower extraction yield.

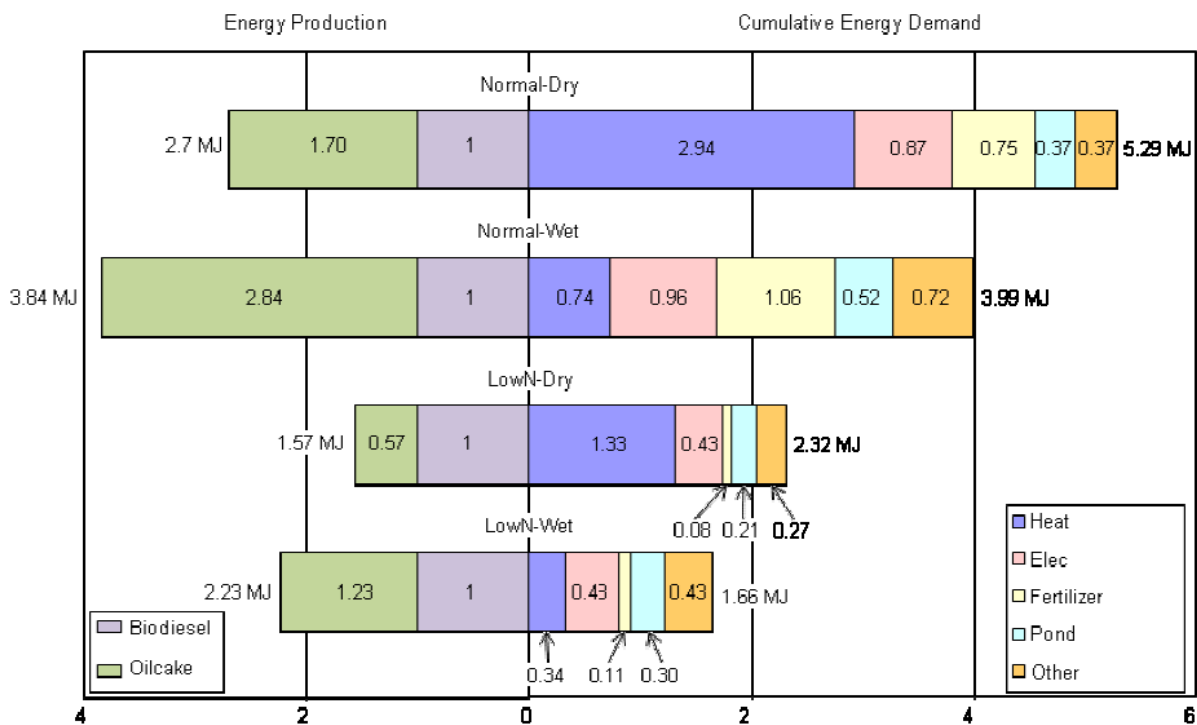


Figure II-8 : Cumulative Energy Demand and Energy production associated with the production of 1 MJ of biodiesel.

II.2.5.2 Potential impacts analysis

Potential impacts are assessed by using the CML method, described in (Guinee, 2002). Several impacts have been chosen among the whole set of impacts described by CML, in order to evaluate potential effects on human health, ecosystem quality and resources. Selected impacts are abiotic depletion (AbD), which is relative to the extraction of mineral and fossil fuels, potential acidification (Ac) by the emission of acidifying substances, eutrophication (Eu), which consists in the effect of releasing excessive amounts of nutrients, global warming potential (GWP), determined for a time horizon of 100 years, ozone layer depletion (Ozone), determined on a time horizon of 40 years, Human (HumTox) and

marine (MarTox) toxicity measuring impacts of emissions on humans and marine ecosystem over a period of 100 years, land competition (Land) accounting usage of earth surface, emission of ionizing radiations (Rad), and finally photochemical oxidation (Photo) referring to emissions of reactive substance injurious to human health and ecosystems. To analyze the contribution of the process chain to the different impacts, production steps have been grouped in 7 categories:

- Energy refers to the impacts created by the production of energy required on the facility (algae culture and oil esterification),
- Production includes emissions and consumption implicated in algae production, which includes harvesting and preparation of the biomass to a readily transformed product, but excludes fertilizer and energy,
- Fertilizer refers to the extraction and production of fertilizers,
- Transformation covers oil extraction and transesterification,
- Combustion is the use of fuel in a combustion engine,
- Infrastructure includes building and recycling of the facility,
- Waste is the treatment of wastewater produced during algae culture and processing,

The contribution of each step of the production chain is shown on Figure II-9 for all culture configurations. Each impact is standardized with the value of the worst scenario for this impact. It is noticeable that most of the impacts are mainly driven by energy consumption, fuel combustion and fertilizer use. Moreover, in agreement with conclusions brought by the mass-flow analysis, a low N condition with a wet extraction scenario, which was characterized by lower energy and fertilizer needs, always showed lower impacts. Switching from normal to low-N always improved all the impacts; the wet extraction usually reduced the impact except for the photochemical oxidation which is directly related to the hexane emissions. Ozone depletion stems from emissions by natural gas furnace used to provide heat; the radiation impact comes from the origin of the electrical energy used on the facility. Indeed the European energy mix includes 30 % of nuclear energy (UCTE, 2007). It can also be noticed that the four scenarios have similar electricity consumption.

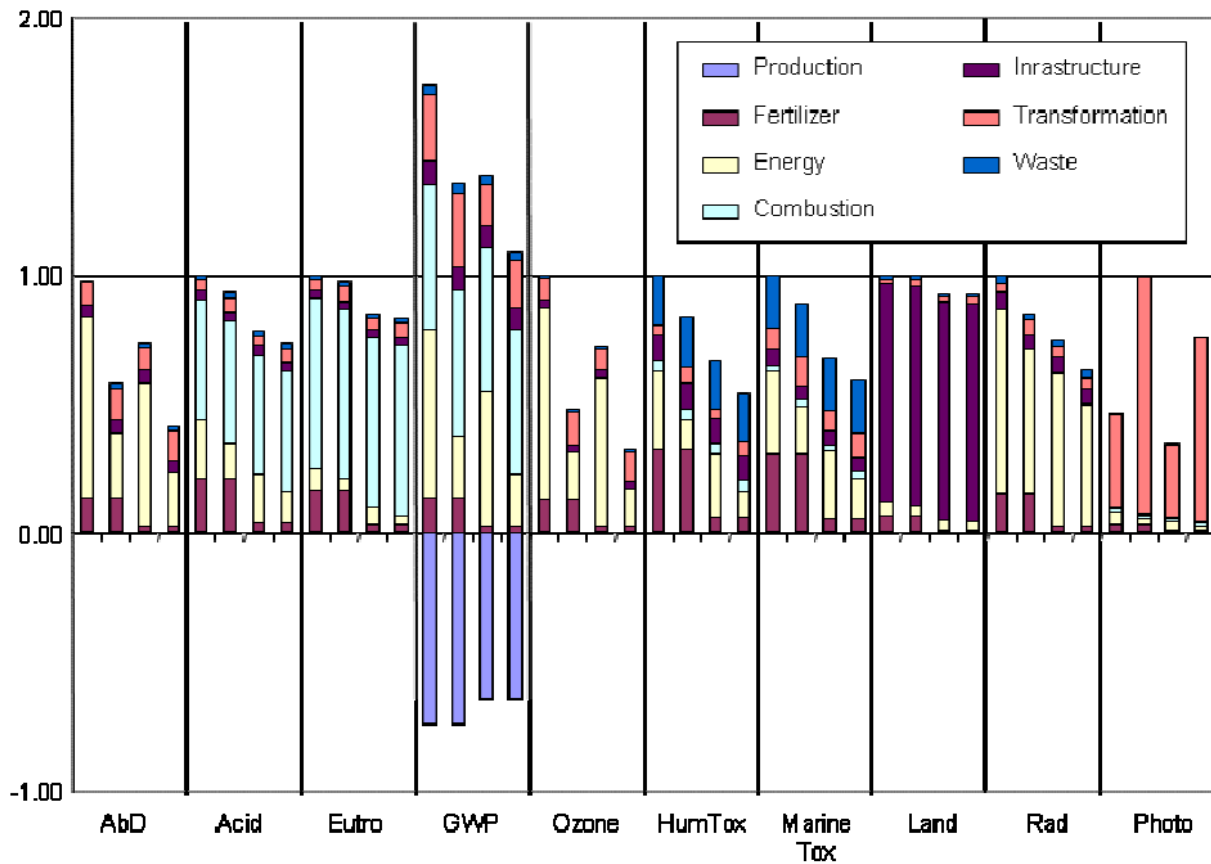


Figure II-9 : Distribution of impacts relative to the combustion of 1 MJ of algal fuel in a diesel engine. For each impact, the 4 bars refer to respectively Normal-Dry, Normal-Wet, LowN-Dry and LowN-Wet. Impacts are normalized by the impact value of the production with the highest impact.

These LCA results have been compared to LCA of other fuels in order to have a better insight of advantages and drawbacks of algal biodiesel. These assessments are based on inventories already published (Jungbluthal *et al.*, 2007; Hirschier *et al.*, 2007) and included in the Ecoinvent database and deal with rapeseed methylester, soybean methylester, palm methylester and oil diesel. Rapeseed biodiesel is supposed to be produced in Europe, analysis of palm tree biodiesel refers to Malaysian production and soybean biofuel analysis refers to US context. Consistently with the rest of this study, energetic allocation has been chosen. Since low N culture condition has shown in this study the better performances, only this system will be compared to the other ones.

Figure 4 compares impacts of the combustion of 1 MJ of fuel. Algal biodiesel based on existing technologies appears as the worst option regarding ionizing radiation, photochemical oxidation and marine toxicity, and the second worst regarding abiotic depletion. However it shows very low impacts for eutrophication and land use, and average impacts for acidification, human toxicity and ozone depletion. Lower eutrophication and human toxicity effects can be attributed to better control of fertilizers fate as well as the absence of pesticide. Extremely low land use is easily explained by high

biomass production yields reached by algae. Indeed, annual oil production can reach 26 t/ha/year for algae while soybean annual production is 0.47 t/ha/year, rapeseed reaches 1.3 t/ha/year and palm tree yields 4.7 t/ha/year (Zah *et al.*, 2007). Due to heat and electricity requirements, the algal biodiesel is out-competed by other biofuel in terms of global warming, mineral resource and ozone depletion. The high radiation impact is directly related to the electricity consumption which is a specific feature of algal cultures compared to other biomasses. However no other biodiesel source outperforms algal biodiesel in every impact (Figure 4).

II.2.6 Discussion

As a reminder, this work assesses the life cycle of a process which does not exist at this stage at industrial scale, and for which many technological problems are still unsolved. Moreover when relevant technological solutions exist, they still need to be strongly revisited during the optimization phase of the process. In this study we used reasonable assumptions and tried to minimize the proportion of arbitrary choice to design the best microalgal based biofuel process based on to date available technology. *Chlorella vulgaris* has been chosen as a model species mainly because it was significantly studied and quantitative estimates of both composition and productivities in various conditions were available. This work must therefore not be interpreted as a real and stable assessment of microalgal based biodiesel impacts, but more as a LCA driven study to identify the bottlenecks in such processes. The main objective of our LCA study is to identify the parameters or the transformation steps which have the most impact on the energy balance and the environmental performance of the whole chain. Finally we highlighted the key research pathways that must be furthered in order to make microalgal based biofuel production environmentally relevant. Energetic balance of biodiesel production from microalgae shows that it can be rapidly jeopardized ending up with a counter-productive production chain. Whereas production of fuel differs slightly from the simple production of energy (production of a storable product useable in automotive engine requires specific properties), it is mandatory to have at least positive energetic balance. In our analysis, we showed that any improvement of oil extraction technique would have a direct impact on the sustainability of this production; indeed 90% of the process energy consumption is dedicated to lipid extraction (70% when considering the wet extraction). It is then clear that specific research must investigate new processes in lipid recovering with limited drying of the biomass. The dry extraction is possible only with an alternate method for drying the algae; solar drying is regularly cited, like in (Kadam, 2001), but its practical feasibility has never been demonstrated whereas lipid stability during solar drying is also questionable. The wet extraction seems promising; however data used here to estimate impacts and mass-flows of wet extraction are questionable. Finally, the choice of the microalgal species must probably be considered in agreement with this factor, and species for which oil recovery is easier must

be considered in priority. Analysis of the distribution of environmental impacts and their comparison to impacts generated by other biofuel also demonstrate that a better control of the energetic consumption not only improves the energy balance but would also significantly decrease numerous impacts (Abiotic depletion, Ozone depletion, Radiation, Global Warming potential, and to a lower extent Acidification and Human toxicity) and will hence improve the overall environmental performance compared to other biofuel. Comparison of low N and normal culture conditions for both extraction modes shows the high sensitivity of results to the algal lipid productivity. Similar effect would have been observed with selected or modified strains harboring high lipid content and expressing decent growth-rates. Depending on the considered hypotheses, some authors (Chisti, 2007) have assumed very high productivities (up to 110 tons per ha of raceways). Such figures, which have not been obtained on the long term at pilot scale, would of course considerably decrease the process impact per produced oil MJ. However, there is a clear and underestimated difficulty to reach these productivities. The nitrogen deficiency is necessary to induce a significant lipid production (Spoehr and Milner, 1949), but such culture conditions strongly affect the growth rate, and thus the net productivity (Rodolfi *et al.*, 2009). Looking for a species which can maintain a high productivity under nitrogen limiting conditions is thus a key challenge. It is shown in (Rodolfi *et al.*, 2009) that the eustigmatophyte *Nannochloropsis* could have such a property, leading to extrapolated productivities of 20 tons of lipids per hectare and per year under the Mediterranean climate. On the other hand such a small size (2 to 5 μm) might make harvesting and extraction steps more difficult. Importance of fertilizers and the high energetic debt due to the pond construction had a significant impact on the cumulated energetic balance. Process optimization could have opposite dynamics on these two expenses, as nitrogen deprivation will reduce the fertilizer consumption but will also reduce production yields and then potentially increase the share of the energetic debt supported by each kilogram of algae. When fertilizer flows are reduced, numerous impacts are reduced (abiotic depletion, acidification, and toxicity). Here only the low N culture has been evaluated as a way to reduce fertilizer consumption; however other options are possible, as shown by the successful culture of *Chlorella* on hydroponic wastewater, reported in (Bertoldi *et al.*, 2006). Another improvement we believe to be promising is the in situ anaerobic digestion of algal oilcakes, as suggested in (Chisti, 2007; Sialve *et al.*, 2009). According to the scenario, between 35 and 73% of the accumulated energy is stored in the oil cake, mainly under non-lipid form (carbohydrate and proteins). Despite technical obstacles (low bio-availability of particulate matter and the high N content, known as inhibiting anaerobic digestion), direct anaerobic digestion of oilcakes should produce biogas which can be directly used to provide heat and electricity to the oil extraction unit but also remineralize part of the nutrients stored into the algae, mainly under the form of ammonium and phosphate. Hence a proper recirculation of the liquid fraction

of the digestate into the algal pond, would recycle part of mineral fertilizers and could reduce their net consumption.

Biodiesel production from microalgae is an emerging technology considered by many as a very promising source of energy, mainly because of its reduced competition for land. However the impact assessment and the energy balance show that algal biodiesel suffers from several drawbacks at the current level of maturity of the technology. In comparison to conventional energetic crops, high photosynthetic yields of microalgae reduce significantly land and pesticide use but not fertilizer needs. Moreover production, harvesting and oil extraction induce high energy consumption, which can jeopardize the overall energetic balance. It appears that even if the algal biodiesel is not really environmentally competitive under current feasibility assumptions, there are several improvement tracks which could contribute to reduce most of its impacts. A large-scale production can be seriously considered under the achievement of the following improvements: the choice of microalgal species maintaining high lipid and low protein contents with sustained growth-rates (e.g. low-N culture, strain selection or modification), the set-up of an energetically efficient extraction method, and the recovery of energy and nutrients contained in the oilcake. More generally, LCA appears as a relevant tool to evaluate new technologies for energy production. Even when dealing with young and immature technologies, this tool identifies the technological bottlenecks and therefore supports the ecodesign of an efficient and sustainable production chain.

II.3 Digestion anaérobie et microalgues

L'analyse de cycle de vie d'une filière de production de lipides à usage carburant à partir de microalgues nous éclaire sur les origines des impacts majeurs associés : demande en éléments nutritifs et en énergie du système de production et d'extraction des lipides. Le positionnement avantageux des microalgues par rapport aux plantes supérieures en terme notamment de productivité lipidique est dès lors remis en question. En considérant que le résidu après extraction offre un potentiel énergétique significatif, nous mettons en avant l'intérêt de l'intégrer dans une filière méthanisation pour en valoriser ce potentiel sous la forme de méthane et utiliser la matière organique minéralisée résiduelle comme ressource nutritive. L'analyse de Cycle de vie d'un système associant la culture de microalgues et la digestion anaérobie pour le traitement d'effluents, montre que si les impacts sont évités en recyclant les éléments nutritifs, la consommation électrique nécessaire pour assurer le fonctionnement de l'ensemble de l'unité de production cristallise l'ensemble des contraintes (Collet *et al.*, 2011). Par ailleurs, sur le versant énergétique seul, et à la différence des filières énergétiques lipides et éthanol, la conversion énergétique des microalgues par la méthanisation ne requiert pas de déshydratation poussée.

La question du recyclage des éléments nutritifs dans des cultures de masse de microalgues compte parmi les enjeux clés de la filière d'un point de vue environnemental et économique (Benemann *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). En effet, dans une perspective de substitution de seulement 5% du carburant consommé par an aux Etats-Unis par un carburant élaboré à partir de microalgues, la demande en azote et en phosphore représenterait respectivement de 44 à 107 % et de 20 à 51 % de la consommation dévolue à l'ensemble de l'agriculture sur ce territoire (NAS, 2012). Dans ces conditions, un déploiement de la filière pour une substitution de cette consommation même marginale n'est en aucun cas soutenable ni réaliste. Cet exemple illustre la nécessité de mobiliser un gisement nutritif qui n'entre pas en compétition avec les activités agricoles. La capacité des microalgues à se développer sur une vaste gamme de rejets anthropiques, et notamment les digestats issus de méthanisation est abordée en partie I.6.2.2 de ce document. L'association étroite entre ces deux filières a fait l'objet de premiers travaux publiés à la fin des années 50. Golueke et Oswald (1959) ont démontré la faisabilité d'un système couplé dans lequel l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique sous forme de méthane. Ces travaux font suite à la première publication traitant de la méthanisation d'une biomasse complexe de microalgues issue d'un procédé de traitement d'eau résiduaires urbaines (Goelueke et al, 1957) qui a démontré que ce gisement pouvait constituer une ressource de matière organique à part entière pour la filière méthanisation.

II.3.1 Avant propos

La digestion anaérobie appelée également méthanisation est un processus biologique de transformation de la matière organique en biogaz valorisable énergétiquement et en un résidu, le digestat valorisable agronomiquement. Cette réaction est réalisée par un écosystème microbien complexe composé d'archaebactéries et de bactéries anaérobies strictes et facultatives. Le processus peut se simplifier en 4 étapes (Figure II-10) :

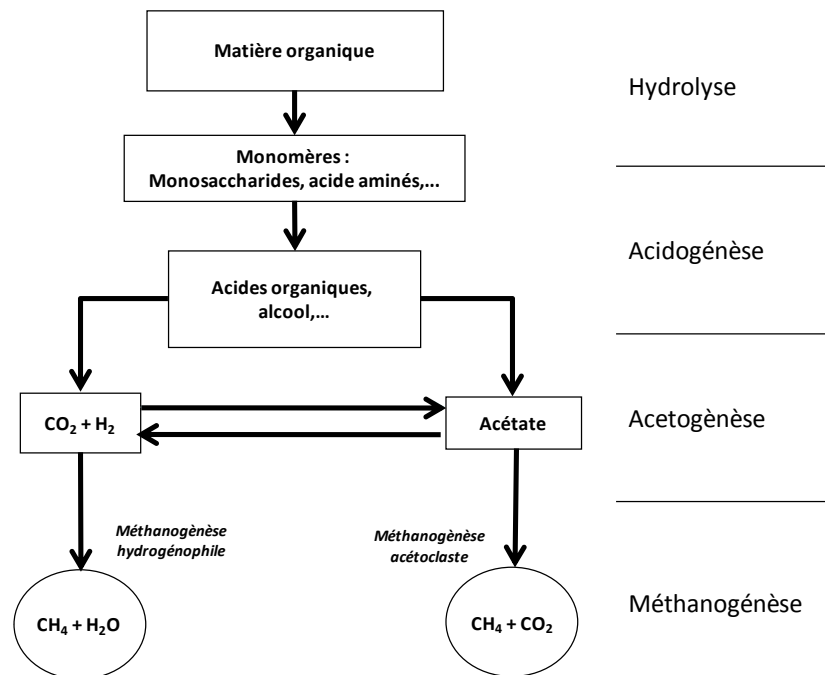


Figure II-10 : Processus de méthanisation en 4 étapes

Les structures et molécules complexes qui composent le substrat sont tout d'abord dégradées en molécules et structures plus simples sous l'action d'une population de bactéries hydrolytiques. Les produits de cette étape, monomères (acides aminés, monosaccharides...) sont pour l'essentiel convertis en acides organiques. Une étape d'acétogénèse transforme les formes inorganiques et organiques qui résultent de l'acidogénèse en acétate. Enfin, au cours de la méthanogénèse, l'acétate est converti en CH_4 et CO_2 au cours de la réaction méthanogène acétoclaste, et H_2 et CO_2 accumulés au cours des étapes précédentes sont condensés pour former CH_4 et H_2O par la voie hydrogénéophile de la méthanogénèse.

L'ensemble des composés gazeux produits lors de la digestion anaérobie constituent le biogaz composé en majorité de méthane (CH_4) et de CO_2 . Le résidu organique, le digestat, se compose d'une fraction soluble qui contient la plupart des constituants du substrat organique qui ont été minéralisés et partiellement dégradés ainsi que d'éventuels métabolites intermédiaires de la réaction de méthanisation. La fraction solide rassemble à la fois la biomasse anaérobie qui s'est développée au cours du processus biologique ainsi que le substrat organique résiduel partiellement ou non dégradé.

D'un point de vue industriel, la méthanisation constitue un procédé de traitement des déchets organiques et de production d'énergie. Elle offre la possibilité de réduire les nuisances olfactives et le volume du déchet (dans le cas des déchets solides) et de réduire voire d'éliminer la flore pathogène. La digestion anaérobie intéresse ainsi un vaste ensemble d'activités de production ou de transformation de la matière organique : industries agro-alimentaires, traitement de l'eau et des déchets (ordures ménagères, boues activées de STEP), agriculture et élevage. Le biogaz produit peut être valorisé par (1) cogénération pour produire électricité et chaleur, (2) purifié et injecté dans le réseau de gaz naturel, et enfin (3) être utilisé comme carburant pour le transport. Le pouvoir fertilisant du digestat permet de l'utiliser comme amendement organique et minéral à destination des surfaces agricoles.

Particulièrement développé dans les pays d'Europe du Nord, et en Allemagne, ce secteur connaît en France un développement important ces 10 dernières années. En 2011, le territoire national comptait presque 200 installations pour une puissance électrique produite de 150 GWh/an et 1100GWh d'énergie thermique (ATEE Club Biogaz, 2011).

Nous présentons dans la partie suivante un article de revue portant sur l'analyse de la filière de digestion anaérobie des microalgues. Ce travail met en avant trois limites potentielles quant à l'utilisation de ce gisement:

- la production potentielle de méthane à partir de microalgues est liée d'une part à leur composition et peut être limitée par l'accessibilité à cette matière organique,
- la fraction protéique élevée qui caractérise les microalgues favorise une concentration importante d'ammonium dans le milieu qui peut être toxique pour la flore anaérobie via l'expression de sa forme ammoniacale,
- le sodium présent dans les milieux de culture des microalgues marines pourra inhiber l'activité méthanogène.

Les stratégies usuelles d'optimisation du processus de méthanisation (prétraitement et codigestion) permettent de gérer ces contraintes et sont également présentées.

II.3.2 Digestion anaérobie appliquée aux microalgues

Bruno Sialve, Nicolas Bernet, Olivier Bernard

Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable

Biotechnology Advances

Volume 27, Issue 4, pp 409-416, 2009

Abstract : The potential of microalgae as a source of biofuels and as a technological solution for CO₂ fixation is subject to intense academic and industrial research. In the perspective of setting up massive cultures, the management of large quantities of residual biomass and the high amounts of fertilizers must be considered. Anaerobic digestion is a key process that can solve this waste issue as well as the economical and energetic balance of such a promising technology. Indeed, the conversion of algal biomass after lipid extraction into methane is a process that can recover more energy than the energy from the cell lipids. Three main bottlenecks are identified to digest microalgae. First, the biodegradability of microalgae can be low depending on both the biochemical composition and the nature of the cell wall. Then, the high cellular protein content results in ammonia release which can lead to potential toxicity. Finally, the presence of sodium for marine species can also affect the digester performance. Physico-chemical pretreatment, co-digestion, or control of gross composition are strategies that can significantly and efficiently increase the conversion yield of the algal organic matter into methane. When the cell lipid content does not exceed 40%, anaerobic digestion of the whole biomass appears to be the optimal strategy on an energy balance basis, for the energetic recovery of cell biomass. Lastly, the ability of these CO₂ consuming microalgae to purify biogas and concentrate methane is discussed.

II.3.3 Introduction

The potential of photosynthetic microorganisms as an alternative to biofuel crops together with their potential as a promising technology for CO₂ fixation is a subject of strong interest (Chisti, 2007, 2008; Li *et al.*, 2008). Indeed, some eukaryotic microalgae and prokaryotic (cyanobacteria) microorganisms (abusively gathered under the term microalgae in the following) can synthesize lipids under certain environmental conditions (Metting, 1996). The perspective of large scale production of microalgae for biofuel applications is motivated by the high productivity which can be reached (Huntley and Redalje, 2007; Chisti, 2007; Carlsson *et al.*, 2007). Chisti (2007) considered a scenario where productions up to 127 tons.ha⁻¹.year⁻¹ can be achieved in high-rate raceway ponds while Carlsson *et al.* (2007) suggested a hypothesis of 50 to 60 tons ha⁻¹ year⁻¹. Photobioreactor productions of up to 150 tons ha⁻¹.year⁻¹ have already been obtained (Carlsson *et al.*, 2007), and Chisti (2007) suggested an upper value of 263

tons ha⁻¹ year⁻¹. On the basis of an average composition of microalgae given by CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01} (Grobbeelaar, 2004) the nitrogen and phosphorus requirement per unit of surface and per year can be estimated. This leads to a nitrogen amendment that varies from 8 to 16 tons N ha⁻¹ year⁻¹. This figure is in a range 55 to 111 times higher than for rapeseed (Halleux *et al.*, 2008). This shows that microalgae will involve huge quantities of nitrogen and phosphate for which environmental and economic impact may not be sustainable. A process to recycle nitrogen and phosphorus contained in algal waste after lipid extraction is therefore required in order to reduce the use of fertilizers. Anaerobic digestion can be an answer to this problem, since this biotechnological process can mineralise algal waste containing organic nitrogen and phosphorus, resulting in a flux of ammonium and phosphate that can then be used as a substrate for the microalgae (Olguín, 2000; Phang *et al.*, 2000). Furthermore, to reach an economical balance, Chisti (2007) has shown that the resulting biomass after lipid extraction needs to be transformed into methane. Thus, if anaerobic digestion is used to process algal waste, it will not only recycle nitrogen and phosphorus but also produce methane. The energetic value of the produced methane can potentially lead to an energetic balance of the microalgae to biofuel process. Anaerobic degradation of phytoplanktonic cells is a process which takes place naturally in aquatic environments. When algal cells sink towards the anoxic and aphotic zones, they eventually die and break up. Nutrient remineralisation in these anoxic layers of aquatic environments is a key process, responsible for recycling nutritive elements. It leads to ammonium and phosphate release, which can eventually sustain growth of phytoplanktonic communities. This decomposition is a slow and incomplete process. Some cell structures can still be found in the sediments after many years, some being identified in kerogen rocks (Vandenbroucke & Largeau, 2007). Kinetics of these anaerobic degradation processes is highly dependent upon both the species degradability as well as the environmental conditions, eventually resulting in various fractions (Vandenbroucke and Largeau, 2007). The resistance of the cell wall is generally one of the limiting factors for cell digestibility (Chen, 1987; Afi *et al.*, 1996; Chen and Oswald, 1998). Studies of kerogen rocks have shown that remaining fractions of TLS (TriLaminar Sheaths) are correlated to the sedimentation of Chlorophyceae (Derenne *et al.*, 1992). These parietal structures characterizing some species enhance resistance to decomposition and intervene in selective safeguarding during the process of fossilization (Vandenbroucke and Largeau, 2007). This natural process has been the subject of research studies since the fifties when energy recovery of microalgae by anaerobic digestion was investigated. Golueke *et al.* (1957) published the first study on anaerobic digestion of an algal biomass. In 1960, they proposed an integrated process associating the production of microalgae in an open pond for the treatment of sewage water and the energetic recovery of the algal biomass by anaerobic digestion (Oswald and Golueke, 1960). This scientific enthusiasm for methane production as a source of renewable energy awoke again in the nineteen seventies in relation to the first oil crisis.

The strong and recent re-interest for anaerobic digestion is correlated to its ability to treat and to convert a wide range of organic wastes into renewable energy. However, in the specific case of microalgal biomass, the available literature is, at present, particularly scarce. Besides the need for the management of algal waste biomass and the energetic interest, the idea of domesticating the microbial loop that takes place in the natural environment (Caron, 1994), and thus the nitrogen and phosphorus recycling is the major issue that we address.

This paper reviews the potential of microalgae as a substrate for anaerobic digestion. First, the characteristics of microalgae regarding their biochemical composition are described and the theoretical methane yield is proposed, based on their gross composition. Secondly, experiments of anaerobic digestion of microalgae and the strategies to improve their conversion into methane are reported.

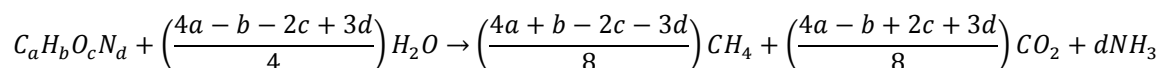
II.3.4 Anaerobic digestion of microalgae

II.3.4.1 Microalgae composition

Determining the composition of microalgae is a way to apprehend their digestion potential. The mineral composition of microalgae meets the nutrient requirements of the anaerobic microflora. Besides carbon, nitrogen and phosphorus which are major components in microalgae composition, oligo nutrients such as iron, cobalt, zinc are also found (Grobbelaar, 2004) and are known to stimulate methanogenesis (Speece, 1996). These organisms have proportions of proteins (6-52%), lipids (7-23%) and carbohydrates (5-23%) that are strongly species dependent (Brown *et al.*, 1997). For several species the high proportion in proteins is characterized by a low C/N especially if compared with terrestrial plants. This ratio has an average of 10.2 for freshwater microalgae while it is 36 for terrestrial plants (Elser *et al.*, 2000). Cell composition is also deeply affected by environmental conditions (Droop, 1983; Leadbeater, 2006). Variations in this composition may affect the performance of the anaerobic digestion.

II.3.4.2 Theoretical approach of methane potential and ammonium release

According to Angelidaki and Sanders (2004), when the composition of the organic matter is known, it is possible to evaluate the theoretical methane and ammonium yields that can be expected from the anaerobic digestion. These yields can be calculated with the following formula adapted from Symons and Buswell (1933). However, it must be kept in mind that this theoretical approach does not take into account needs for cell maintenance and anabolism.



In this equation, the organic matter is stoichiometrically converted to methane, carbon dioxide and ammonia. The specific methane yield expressed in liters of CH₄ per gram of volatile solids (VS) can thus be calculated as:

$$B_0 = \frac{4a + b - 2c - 3d}{12a + b + 16c + 14d} * V_m$$

where V_m is the normal molar volume of methane.

The ratio rG of methane to carbon dioxide can therefore be computed from $n = -b + ac + 3d$, the average carbon oxidation state in the substrate (Harris and Adams, 1979), as follows:

The biogas composition however also depends on the amount of CO₂ which is dissolved in the liquid phase through the carbonate system, and is therefore strongly related to pH. The ammonium production yield in the digester can be evaluated using Eq. (1):

$$Y_{N-NH_3} (mg \cdot gVS^{-1}) = \frac{D * 17 * 1000}{12a + b + 16c + 14d}$$

Eq. (1) is a theoretical approach that allows estimation of the maximum potential yields. However, as it will be discussed later on, if the cells are directly injected into the anaerobic process, the accessibility of the intracellular components is limited for some species by the specific nature of their cell wall (Becker, 1988). On the contrary, yield can be enhanced by cell disruption after extracting a specific subproduct such as lipids for biofuel (Chisti, 2007) and/or molecules of pharmaceutical interest (Spalore *et al.*, 2006). In this case, the remaining intracellular components become accessible for the anaerobic bacteria.

Tableau II-13 : Specific methane yield of three types of organic compounds

Substrate	Composition	L CH ₄ g VS ⁻¹
Proteins	C ₆ H _{13.1} O ₁ N _{0.6}	0,851
Lipids	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	1,014
Carbohydrates	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	0,415

Tableau II-13 (extracted from Angelidaki and Sanders (2004)) compiles specific methane yields for carbohydrates, lipids and proteins. For the specific case of proteins, the formula was calculated with the average composition in amino acids weighted by their frequency in *Chlorella vulgaris* (Becker, 2007). In terms of theoretical methane potential, the higher the lipid content of the cell, the higher the potential methane yield. The high energetic content of lipids makes them attractive substrates for anaerobic digestion due to their higher gas production potential compared with carbohydrates and proteins (Cirne *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2002). However, lipid hydrolysis is considered to be slower than

protein and carbohydrate hydrolysis. Thus, Pavlostathis and Giraldo-Gomez (1991) calculated the minimum values of limiting generation time for anaerobic treatment of various substrates and they found values of 0.18, 0.43 and 3.2 days for carbohydrates, proteins and lipids respectively. Similar results are given by Christ *et al.* (2000) when estimating first-order hydrolysis constants for these substrates. The raw estimate from Table IV-1 can be refined considering the organic composition of specific microalgae species. Using Eq. (1), it is possible to compute a theoretical specific methane yield associated to a theoretical ammonia release (Table IV-2). As expected, the species that can reach higher lipid content (e.g. *Chlorella vulgaris*) have a higher methane yield. Obviously, in the case where lipids are extracted from algae before digestion, the potential methane yield is lower while the released ammonium is higher (See Tableau II-14).

Tableau II-14 : Gross composition of several microalgae species (Becker, 2004) and calculated (using Eq.(1)) theoretical methane potential and theoretical ammonia release during the anaerobic digestion of the total biomass.

Species	Proteins (%)	Lipids (%)	Carbohydrates (%)	CH ₄ (L CH ₄ g VS ⁻¹)	N-NH ₃ (mg g VS ⁻¹)
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18	0.53-0.8	54.3-84.9
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17	0.69	44.7
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	0.8	53.1
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17	0.63-0.79	47.5-54.0
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	0.68	53.1
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16	0.63-0.74	55.9-66.1
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	8-14	0.47-0.69	42.8-58.7
<i>Scenedesmus</i>	50-56	12-14	10-17	0.59-0.69	46.6-42.2

II.3.4.3 Operating conditions

Compared to other organic substrates, studies dealing with anaerobic digestion of algae are scarce. Microalgae have received less attention than macroalgae as a substrate for anaerobic digestion. Two main approaches can be distinguished for unicellular algae. Either a multispecific biomass is harvested from a waste water treatment pond (Chen, 1987; Chen and Oswald, 1998; Yen and Brune, 2007), or a monospecific biomass grown in the laboratory (Asinari Di San Marzano *et al.*, 1982; Samson and LeDuy, 1982, 1986; Chen 1987; Sanchez and Travieso, 1993; Munoz *et al.*, 2005). Tableau II-15 summarizes the experimental conditions and the corresponding methane conversion yield for these reported studies. It shows that the methane yield varies from 0.09 to 0.45 L g VS⁻¹ depending on the species and culture conditions.

Tableau II-15 : Experiments with anaerobic digestion of microalgae species and algal sludge: substrate characteristics, methane yield and process conditions.

Reactor	Substrate	T ^a (°C)	HRT ^b (d)	Loading rate (g VS L ⁻¹ j ⁻¹)	Methane yield (L CH ₄ g VS ⁻¹)	CH ₄ (% vol)	References
Batch	Chlorella-Scenedesmus	35-50	3-30	1.44-2.89	0.17-0.32	62-64	(Golueke <i>et al.</i> , 1957)
	Algal biomass	35	28	1	0.42	72	(Chen, 1987)
	Spirulina	35	28	0.91	0.32-0.31		
	Dunaliella	35	28	0.91	0.44-0.45		
CSTR ^c	Tretraselmis (fresh)	35	14	2	0.31	72-74	(Asinari Di San Marzano <i>et al.</i> , 1982)
	Tretraselmis (dry)	35	14	2	0.26	72-74	
	Tretraselmis (dry)+NaCl 35 g/L	35	14	2	0.25	72-74	
Batch 5 L	Chlorella vulgaris	28-31	64	-	0.31-0.35 ^d	68-75	(Sanchez and Travieso, 1993)
Semi-continuous	Spirulina maxima	35	33	0.97	0.26	68-72	(Samson and LeDuy, 1982)
Fed batch	Spirulina maxima	15-52	5-40	20-100	0.25-0.34	46-76	(Samson and LeDuy, 1986)
CSTR ^c	Chlorella-Scenesmus	35	10	2-6	0.09-0.136	69	(Yen and Brune, 2007)

^a Temperature.

^b Hydraulic Retention Time.

^c Continuous Stirred-Tank Reactor.

^d Estimated from data given in L CH₄ gCOD⁻¹ using a COD/VS ratio of 1.5 (where COD is the Chemical Oxygen Demand).

II.3.4.3.1 Temperature effect

The increase in temperature, from 15 to 52°C, improves the methane conversion of *Spirulina maxima*, and the productivity together with the volatile solids reduction is enhanced up to 35°C (Samson and LeDuy, 1986). For a multispecific algal biomass, as studied by Golueke *et al.* (1957), a temperature increase from 35 to 50°C can enhance the rate of algae biodegradability from 5 to 10%. The energetic balance is then negative if we consider the energy supplied for heating. However, mesophilic temperatures appear to be optimal conditions as confirmed by Chen (1987) who found maximal methane productivity at 40°C.

II.3.4.3.2 Hydraulic retention time and loading rate

The hydraulic and solid retention time (HRT and SRT) are key parameters in anaerobic processes. They should be high enough to allow the active populations to remain in the reactor, especially methanogens, and not to limit hydrolysis which is generally the limiting-step of the overall conversion of complex substrates to methane. In the case of slowly degradable complex organic pollutants, HRT is a deciding factor (Speece, 1996). When the process is operated at low loading rate and high hydraulic retention time, the methane yield (L CH₄/g VS fed) is constant and maximal. On the contrary when the maximal loading rate or minimum hydraulic retention time is reached, a decrease of the yield occurs. For an efficient conversion of organic matter, optimal loading rates and hydraulic retention times must

be chosen depending on the type or composition of the algal substrate. When the cells are directly injected into the anaerobic process, accessibility of the intracellular content to the anaerobic microflora is limited by the resistance of the algal cell wall to hydrolysis. Thus, characteristics of the species makes the difference for a given loading rate or hydraulic retention time as shown by Asinari Di San Marzano *et al.* (1982) and Chen (1987).

II.3.4.3.3 Biogas quality

The proportion of methane in the biogas produced is in a similar range (69 to 75%) for the majority of the studies, regardless of species and operating conditions. This reveals a good quality of conversion of the algal organic matter into methane. The most important factor impacting CH₄ proportion in the biogas is the pH, which controls the speciation of the carbonate system and the release of CO₂. If the pH is high, due to high alkalinity from NH₃ release, then the gas content will shift more to CH₄. The oxidation state of the biomass, which drives the proportion of released methane (see Eq. (3)), also influences the biogas quality. Since microalgae hardly contain sulphurated amino acids (Becker, 1988), their digestion releases a lower amount of hydrogen sulphide than other types of organic substrates. The potential presence of ammonia in the biogas, as detected by Golueke *et al.* (1957), due to the high microalgal protein content should receive particular attention.

II.3.5 Inhibitions induced by microalgae as substrate

Two factors can have a significant impact on the methane yield and on productivity, inducing an inhibition of some of the anaerobic bacterial populations. On one hand, the high protein content of the algal biomass leads to a high ammonium release, thus inhibiting the anaerobic microflora. On the other hand, in the case of marine species, high sodium concentrations may alter the anaerobic process.

II.3.5.1 Ammonium toxicity

As described by Eq. (1), and already discussed, the high nitrogen concentrations in the algae lead to a significant release of ammonia during fermentation. During anaerobic digestion, proteins are degraded and ammonia accumulates in the liquid phase. The pH value triggers the proportion between ammonium ions (NH₄⁺) and free ammonia (NH₃). If the biomass concentration in the influent is high, this will cause high NH₃ concentrations and alkalinity and, as a consequence, inhibition of the process by free ammonia may occur (Mc Carty, 1964). The unionized hydrophobic form of nitrogen diffuses passively across the cell membranes where it expresses its toxicity. This phenomenon has been reported in many studies (Golueke *et al.*, 1957; Eisenberg *et al.*, 1981; Samson and LeDuy, 1982, 1983b, 1986; Chen, 1987). Anaerobic digestion of the protein rich cyanobacteria *S. maxima*,

containing up to 60% of proteins, releases an extremely high concentration of ammonia (up to 7000 mg/L) (Samson and LeDuy, 1986). Two studies, Samson and LeDuy (1982) and Sanchez and Travieso (1993), observed a strong concentration of volatile fatty acids as a consequence of the toxic effect of ammonia on the anaerobic flora. The acetoclastic methanogen bacteria are probably among the most sensitive to NH_3 (Koster and Lettinga, 1984; Angelidaki and Ahring, 1993). Inhibiting concentrations vary in a wide range from 1.7 to 14 g L⁻¹ and depend on several factors as the acclimation period, the nature of substrate and inoculum together with operating conditions (Angelidaki and Ahring, 1993). Thermophilic conditions enhance the inhibition effect. It can be related to the increase in free ammonia concentrations with increasing temperatures and thus with the process stability (Braun *et al.*, 1981; Angelidaki and Ahring, 1994). High concentrations of ions such as Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , which increase alkalinity and decrease the fraction of unionized NH_3 , can lower the inhibition effects (Chen *et al.*, 2008).

It is worth noting that methanogenic bacteria can however acclimate to high concentrations of ammonium. Indeed, adaptation of the methanogenic ecosystem may increase the toxicity threshold level (Chen *et al.*, 2008), even if the methane productivity remains low. For example, Koster and Lettinga (1988) reached a toxic threshold 6.2 times higher after an adaptation phase.

As a consequence of high ammonium concentrations, nitrogen can be found in the biogas in proportions correlated to the algal nitrogen content, as reported by Golueke *et al.* (1957). This phenomenon has been recently highlighted for more general nitrogen rich substrates (Strik *et al.*, 2006).

II.3.5.2 Sodium toxicity

Sodium ions are required by the anaerobic microflora for its metabolism in a range from 0.002 to 0.004 M, but above 0.14 M, they become strongly inhibitory (Kugelman and McCarty, 1965; Mc Carty, 1964; Rinzema *et al.*, 1988). Marine microalgae require a culture medium with high sodium chloride content (0.5-1 M). Chen (1987) observed that the sodium chloride concentration has no particular effect up to 0.3 M. For 0.4 M, the methane production becomes affected and above 0.5 M toxicity is reported.

However, it has been proved feasible to use salt-adapted microorganisms capable of withstanding high salinities. The selection of salt-tolerant micro-organisms involves an adaptation of the sludge to high salt concentrations (Chen *et al.*, 2008). Furthermore, the effluent organic loading rate and salt concentration should be equalised as far as possible, as these micro-organisms are sensitive to environmental shocks, especially in anaerobiosis (Lefebvre and Moletta, 2006). Hence, Aspé *et al.* (1997) adapted a marine inoculum to the treatment of a fishmeal industry effluent. This explains why no inhibiting effect occurred in some studies of saline waste anaerobic digestion for concentrations close to marine water (Asinari Di San Marzano *et al.*, 1982; Omil *et al.*, 1995). In mesophilic conditions

the sodium turns out to be less inhibitory than in thermophilic conditions (Chen *et al.*, 2008). The presence of other ions (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) can also play a significant, antagonistic or synergistic role, on the potential toxicity of sodium (Chen *et al.*, 2008).

II.3.6 Anaerobic digestion enhancement

The composition of the organic substrates is one of the most important factors determining the methane conversion yield (Chynoweth & Isaacson, 1987). However, if the algal biomass does not result from any cell disruption process, the cell walls could strongly modulate this aspect by protecting the cell against the enzymes produced by the anaerobic consortium, and thus reducing the cell biodegradability. Indeed, some microalgae species can be very resistant to hydrolysis, which drastically reduces their anaerobic biodegradability (Golueke *et al.*, 1957; Uziel, 1978; Sanchez and Travieso, 1993). During their experiments, Golueke *et al.* (1957) identified intact cells in the digester and Uziel (1978) reported the same observation even after 30 days. Sanchez and Travieso (1993) observed that the chlorophyll concentration increased in the digester during the first two weeks of the experiment, and was still detected after 64 days; the presence of oxygen in the biogas was also reported as a consequence of the photosynthetic activity from the recalcitrant cells. For example, *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* are known to have a recalcitrant cellulosic cell wall (Okuda, 2002). Pretreatment can be successfully applied in order to lower the recalcitrant organic fraction and thus increase the methane conversion (Tsao, 1987).

II.3.6.1 Pretreatment of algal biomass

Pretreatment of a substrate prior to anaerobic digestion allows to significantly improve its biodegradability while acting on its physicochemical properties: this step makes the organic matter more accessible to the anaerobic microflora and thus more easily degraded. One generally distinguishes physical and chemical pretreatment processes. Separation techniques, concentration or dehydration, mobilize and maximize the proportion of organic matter in the fraction to be digested (Angelidaki and Ahring, 2000). Chemical treatments (acids, bases, ozonation), thermal treatment and ultrasonic lysis improve the disintegration of the most refractory organic fractions (Bonmati *et al.*, 2001; Bougrier *et al.*, 2006). These operations increase kinetics of production and/or methane yield. Ultrasonic pretreatment can enhance the crude protein digestibility, as shown with experiments on the digestibility of *Chlorella vulgaris* in rats (Janczyk *et al.*, 2007). The same effect has been observed with high pressure homogenization (Komaki *et al.*, 1998). These techniques have turned out to be efficient means for improving the methane conversion yields (Samson and LeDuy, 1983a; Chen and Oswald, 1998). Chen and Oswald (1998) studied different pretreatments for an algal biomass produced in sewage treatment ponds. The effect of temperature, duration of the treatment, substrate

concentration and sodium hydroxide addition were investigated. These pretreatments enhanced the methane specific gas production. The temperature appeared to have the most important effect, and the optimal pretreatment consisted in heating at 100°C during 8 h resulting in a 33% improvement of methane production. Samson and LeDuy (1983a) obtained the best performance for *S. maxima* with a thermal pretreatment at 150°C and a pH=11. The example of a full-scale plant for the thermal hydrolysis of sewage sludge reported by Kepp *et al.* (2000), demonstrates that the improvement of the methane yield can energetically balance the thermal pretreatment.

II.3.6.2 Increasing the theoretical methane potential: a metabolic approach

The variation in the composition of microalgae is directly influenced by their growth conditions (Qiang, 2004; Spoehr and Milner, 1949). Most microalgae have the capacity, under certain conditions, to accumulate important quantities of carbon in the form of starch or lipids (Qiang, 2004). This capacity of accumulation, especially for lipids, has stimulated research aiming at the production of lipid biofuel (Chisti, 2007). The nitrogen deficiency is a well-known condition to stimulate this accumulation (Ketchum and Redfield, 1949). Illman *et al.* (2000) evaluated the calorific value of five different species of *Chlorella* grown under low nitrogen concentrations and showed that the calorific value was directly correlated with the lipid content. The protein content was significantly reduced (Tableau II-16) and the lipid accumulation resulted in a significant increase in the calorific value of the biomass.

Tableau II-16 : Effect of low nitrogen growth conditions on the composition of three *Chlorella* species (adapted from Illman *et al.*, 2000) and estimation of the theoretical methane potential and theoretical ammonia release (in brackets: computed theoretical methane potential and ammonia release of the residual biomass after lipid extraction).

Species	Growth conditions	Proteins (%)	Lipids (%)	Carbohydrates (%)	Calorific value (kJ/g)	CH ₄ (L CH ₄ g VS ⁻¹)	N-NH ₃ (mg g VS ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	-	29	18	51	18	0.64(0.56)	27.0(32.9)
<i>C. vulgaris</i>	Low N	7	40	55	23	0.69(0.48)	6.5(10.9)
<i>C. emersonii</i>	-	32	29	41	21	0.74(0.62)	29.8(42)
<i>C. emersonii</i>	Low N	28	63	11	29	0.92(0.76)	26.1(70.5)
<i>C. protothecoides</i>	-	38	11	52	19	0.65(0.6)	34.5(39.8)
<i>C. protothecoides</i>	Low N	36	23	41	24	0.71(0.62)	33.5(43.6)

A nitrogen limitation leads to an increase in the concentration of intracellular lipids (Table 4), but also to a reduction in the growth rate. From Eqs. (2) and (4), it is possible to calculate the effect of nitrogen limitation on the cell stoichiometry, and thus on the theoretical methane potential and the theoretical ammonia release (Table IV-2). It is worth underlining that nitrogen limited cells have a lower protein content which leads to a lower release of ammonia. These two phenomena may therefore improve both the conversion efficiency and the stability of the process by limiting the toxic effect of ammonia. When the anaerobic process is dedicated to digestion of cell residues after lipid extraction, biodiesel

and methane are recovered, thus strongly increasing the energetic productivity of the microalgal culture (see Tableau II-17). As mentioned by Chisti (2008), the anaerobic production of methane with cell residues is a key issue to balance both energetic and economic aspects. However, in this case the fraction of energy recovered under the form of methane is reduced (theoretical methane potential is decreased) and the ammonium release increased. The high ammonium concentration may then strongly limit and even jeopardize the process stability. To manage this rich nitrogen substrate, a codigestion with a poor nitrogen substrate is thus necessary.

Tableau II-17 : Energetic content (KJ/g VS) of microalgae according to two scenarii based on data from Illman *et al.*, 2000.

Species	Growth conditions	S1: algal biomass		S2: algal biomass residues		Energetic added value with lipid recovery	
		Methane ^a		Methane ^a	Lipids ^b	Total energy	Additional energy
<i>C. vulgaris</i>	-	2.3		20.1	6.6	26.7	3.7
<i>C. vulgaris</i>	Low N	24.9		17.2	14.7	3.2	7.1
<i>C. emersonii</i>	-	26.4		22.4	10.7	33.1	6.6
<i>C. emersonii</i>	Low N	33.1		27.6	23.2	50.8	17.7
<i>C. protothecoides</i>	-	23.4		21.8	4.1	25.8	2.4
<i>C. protothecoides</i>	Low N	25.5		22.2	8.5	30.7	5.2

^a Computed with a methane calorific value of 35.6 kJ/L.

^b Computed with the calorific value of rapeseed crude oil: 36.87 MJ/t (Labeckas and Slavinskas, 2009).

II.3.6.3 Codigestion

The association of various substrates is a strategy to increase the performance of a digester by ensuring an optimal influent composition. It has been shown to strongly enhance the biogas productivity (Mata-Alvarez *et al.*, 2000). When C/N is lower than 20, there is an imbalance between carbon and nitrogen requirements for the anaerobic microflora (Speece, 1996) leading to nitrogen release, which can become inhibiting and results in an accumulation of volatile fatty acids. Yen and Brune (2007) reported a significant enhancement of the methane production with an addition of waste paper to algal sludge feedstock, the optimum C/N was observed to be between 20 and 25. In mesophilic conditions, for a 10-day retention time and a loading rate at $4\text{gVSL}^{-1}\text{d}^{-1}$, the blend with 50% waste paper based on volatile solids concentration doubles the methane production rate compared to direct anaerobic digestion of algal biomass ($1.17\text{L L}^{-1}\text{d}^{-1}$ vs. $0.57\text{L L}^{-1}\text{d}^{-1}$). In the same conditions, with a loading rate of $5\text{g VS L}^{-1}\text{d}^{-1}$, the algal sludge mixed with 60% of waste paper, leads to a maximum methane production rate of $1.61\text{L L}^{-1}\text{d}^{-1}$.

The improved performance with such an approach is confirmed by Chen (1987) who associated algae with effluent from canning facility and protein-extracted algae. In this case the optimal methane specific gas production was reached for a C/N ratio between 25 and 35. In these studies, the optimal C/N ratio was found between 20 and 35. This value is close to the described range known to have a

positive effect on the methane yield (Angelidaki *et al.*, 2003). Lower ratios lead to potential inhibition due to the presence of free ammonia whereas higher ratios may lead to potential nitrogen limitations. By increasing the C/N ratio (from 4.2 to 6.2) using sewage sludge, Samson and LeDuy (1983b) enhanced both methane yield and productivity during the codigestion of *S. maxima*. Some co-substrate can have a co-effect in the sense that they stimulate enzymatic synthesis that can also improve the anaerobic digestion yield. Indeed, Yen and Brune (2007) showed an increase in the cellulase activity stimulated by the specific nature of the waste paper. It probably had a positive effect on the digestion of algal cell walls and therefore on the anaerobic digestion itself. Finally, codigestion leads to the dilution of certain toxic compounds maintaining them under their toxic threshold.

II.3.7 Biogas purification

Autotrophic photosynthesis of microalgae supposes a continuous CO₂ consumption during the light phase. This property advantageously points to these fast-growing organisms as a promising technology for CO₂ fixation (Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). In the 60s, Oswald and Golueke (1960) demonstrated the feasibility of mitigating gas effluents resulting from a power plant with a high-rate pond. Furthermore, the addition of CO₂ in algal ponds enhances algal growth (Olaizola, 2003; Doucha *et al.*, 2005) provided that pH is regulated. It also maintains a low pH that decreases the gaseous ammonia emission (Heubeck *et al.*, 2007). The CO₂ concentration in a biogas in the range 30 to 50% appears to be compatible with the toxicity and inhibition thresholds reported for the commonly exploited species (Maeda *et al.*, 1995). The filtration of the biogas by algal cultures supplies CO₂ to the culture, thus enhancing the algal growth and productivity (Travieso *et al.*, 1993). Moreover, methane does not induce any toxicity on the growth of algae (Travieso *et al.*, 1993; Mandeno *et al.*, 2005; Heubeck *et al.*, 2007).

Biogas purification through the algal culture can be very efficient. Indeed, Travieso *et al.* (1993) evaluated the capacity of a culture of *Arthrospira* sp. to filter a biogas resulting from the digestion of molasses of a sugar refinery. The influent biogas was composed of 55 to 71% of CH₄. Once the microalgal culture had filtered the biogas, the methane concentration had increased up to 88-97% CH₄ while CO₂ had decreased down to 2.5-11.5% CO₂. In another study, (Mandeno *et al.*, 2005) a counter-current pit was used for the treatment of a synthetic biogas composed with 60% N₂ and 40% CO₂. A 90% decrease in CO₂ was observed, while the produced oxygen did not exceed 6%. Finally the nitrogen gas content increased up to 95%. Biogas produced from anaerobic digestion of organic matter is mainly composed of methane and carbon dioxide, but also in a smaller fraction, of hydrogen sulphide, dinitrogen, dihydrogen and other volatile compounds (Rasi *et al.*, 2007). As already discussed, with a high nitrogen content, the biogas can also contain ammonia (Strik *et al.*, 2006).

The effects of the minor components in the biogas on the algae vary from one study to another. They seem highly related to the algal species and concentrations, their state and the presence of other inhibiting compounds. Some species have a higher tolerance towards NO_x and SO_x components (Michiki, 1995; Chae *et al.*, 2006). Olaizola (2003) showed that the main effect of SO_x and NO_x is indirect due to their acidity since they lead to a drop in pH. A pH control procedure therefore strongly limits their effect on the algae. Travieso *et al.* (1993) showed that the concentration of H_2S in the gas decreased after filtration by *Arthrospira* sp. from 1 % to 0.3-0.4 %. This reduction was however mainly attributed to the gas solubility. The quality of biogas is a key issue for the longevity and efficiency of the thermic process converting methane into energy, and the algae can significantly reduce the cost associated to biogas filtration. Moreover algae increase the methane content which facilitates the biogas energetic conversion (Heubeck *et al.*, 2007). However, because of certain corrosive or toxic compounds which remain in the biogas even after algal filtration and cannot be removed, the biogas still requires a necessary stage of purification.

II.3.8 Is it worth to recover lipids from an energetic point of view?

In this section we provide several elements in order to compare the direct strategy (methanizing the whole biomass) and the indirect one, including lipid recovery and methane production with the algal waste. Table 5 highlights the comparison between these two scenarios. For an algal lipid content lower than 40%, the energetic added value when recovering lipids is lower than 21% of the recovered energy. However, the energetic cost of biomass harvesting and lipid recovery is probably higher than 30% of the recovered energy, especially since most of the existing techniques involve biomass drying (Carlsson *et al.*, 2007), while the direct strategy would involve only a sedimentation and preconcentration stage in a settler. This put an emphasis on the idea that direct energy recovery can be of interest in the case where the lipid content is lower than 40%. This point is consolidated when considering the triacylglycerols which are the actual substrate to produce biodiesel. They may represent only a small fraction of total lipids when no nitrogen limitation is induced, and thus in the situations when lipid content is low (Rodolfi *et al.*, 2009). This assumption is further confirmed when the productivity is taken into account. A nitrogen limitation induces a strong decrease in growth rate (Droop, 1983). Consequently the increase in the lipid content is generally not compensated and eventually productivity is decreased (Rodolfi *et al.*, 2009). Hence, even the energetic advantage for the indirect scenario appearing in Table II-17 for algal lipid contents higher than 40% could be strongly reduced due to a decrease in productivity.

II.3.9 Conclusion

The perspective of large scale microalgae production for CO₂ fixation and/or lipid fuel production assumes large amounts of fertilizers, especially if compared to terrestrial plants. Nitrogen and phosphorus remineralisation using anaerobic digestion can support this strong nutrient requirement and moreover recover additional energy through methane. However this operation is not straightforward and three main aspects have to be considered:

- 1- In the case of marine algae, sodium can inhibit anaerobic digestion. However this issue has already been addressed and adapted bacteria seem to be efficient.
- 2- The release of nitrogen is toxic at high concentrations. This effect should be exacerbated if pH increases. To control and limit the risk of destabilizing the anaerobic process by free ammonia, several strategies have been investigated. A microalgae codigestion with a nitrogen poor substrate can be an answer to this problem. The second answer would be to use species with a higher C/N ratio, and to apply culture conditions that maximize this ratio. However the strategy needs to be adapted, depending whether lipids have been recovered in a preliminary step.
- 3- If the cell lipid content does not exceed 40%, the anaerobic process appears to be the optimal strategy on an energy balance basis, for the energetic recovery of cell biomass.

This study justifies the exploration of the potential of the direct scenario, without lipid recovery, and provides new motivations to more accurately identify the lipid content threshold under which recovering the oil is no more relevant from an energetic point of view. Explored about fifty years ago, the promising integration process coupling anaerobic digestion and microalgal culture deserves sustained research and development efforts and will probably re-emerge in the coming years either as a mandatory step to support large scale microalgal cultures or as a standalone bioenergy producing process.

II.4 Production de masse et récolte

La récolte de microalgues dans le milieu naturel a longtemps constitué le principal mode de production et d'exploitation toujours employé à l'heure actuelle par un petit nombre de sociétés dans le monde. La production d'une biomasse de microalgues maîtrisée à un coût économique et environnemental supportable constitue un des enjeux majeurs du développement de la filière en général et de l'application bioénergie en particulier. La nature de ces systèmes de production a un impact sur les coûts d'investissements et de fonctionnement associés, et par conséquent sur le prix de la biomasse produite.

La croissance des microalgues est essentiellement dépendante de 3 classes de facteurs (Figure II-11): environnementaux (lumière, température), opérationnels (conception, mélange, nutrition minérale et nutrition carbonée) et biologiques (prédations, virus, contaminations eucaryotiques et procaryotiques) (Park *et al.*, 2011a). La lumière est le facteur limitant de la croissance en conditions extérieures (Pulz & Sheibenbogen, 1998) et contraint la conception et la gestion des systèmes de culture soumis aux variations journalières et saisonnières,

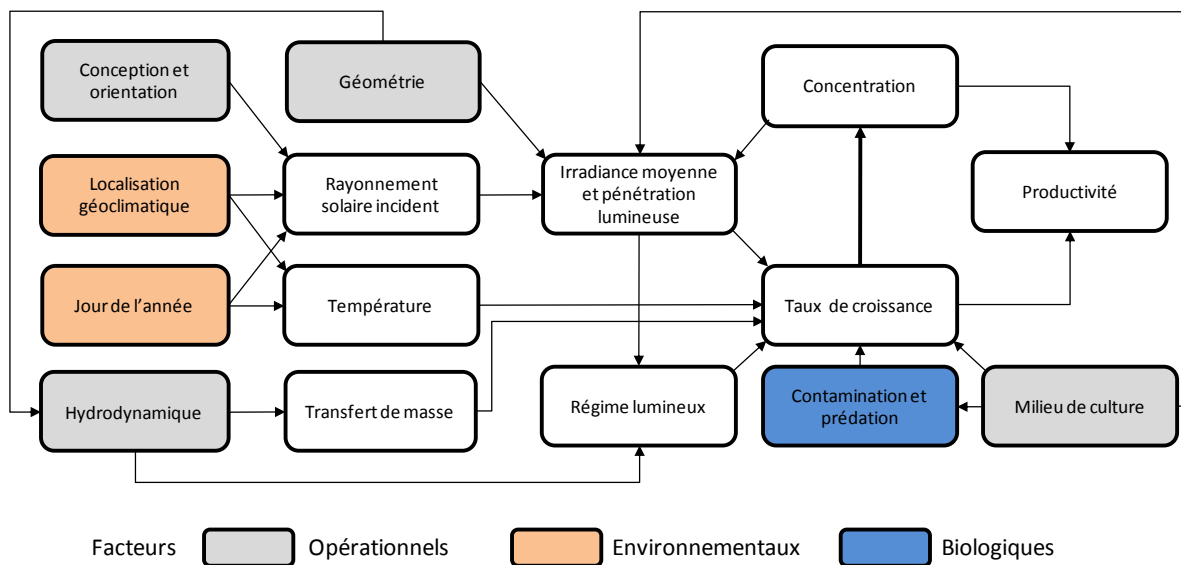


Figure II-11 : Facteurs majeurs et interactions qui influent sur la productivité (adapté et augmenté d'après Molina Grima, 2002)

II.4.1 Cultures en condition photoautotrophe : systèmes ouverts et fermés

- **Configuration et géométrie**

Mis en œuvre depuis plus d'un siècle, les systèmes ouverts (Figure II-12) sont les procédés les plus utilisés pour la culture de masse. Ils s'étendent des milieux aquatiques naturels (lacs, mares) aux bassins de culture libre ou à haut rendement. Utilisés depuis les années 50 (Borowitzka, 1999) ces dernières configurations consistent en des structures de faible profondeur utile (de 0,2 à 0,5 m). Les

bassins ouverts sont essentiellement construits en béton ou en terre butée pour former les parois. L'application d'un liner pour étanchéifier les structures est fréquemment employée, même si dans un contexte géologique favorable, un sol argileux peut suffire (Benemann et al, 2012).

Les systèmes fermés (Figure II-13) encore appelés photobioréacteurs (PBRs) rassemblent un ensemble très hétérogène de procédés. Ils consistent en des structures en verre ou en matière plastique transparente, planes ou tubulaires disposées verticalement ou horizontalement (Acién-Fernández *et al.*, 2012) dont la section est en général de 5 à 10 cm. Présentés souvent comme plus innovants que les systèmes ouverts, les dispositifs déployés à l'heure actuelle diffèrent cependant peu de la plupart des configurations décrites dès les années 50 (Figure II-13B).



Lac Hutt Australie : exploitation de *Dunaliella salina*



Etang à haut rendement de Spiruline (Earthrise, USA)

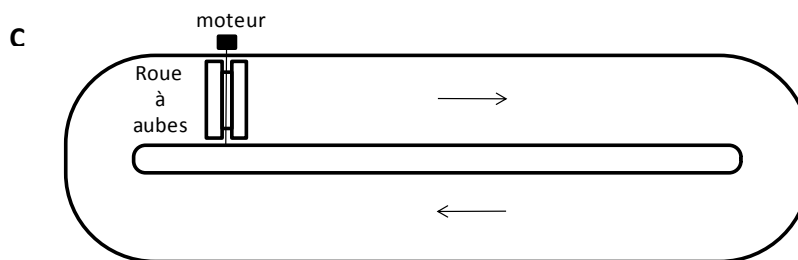


Figure II-12 : (A) Lac exploité pour la production de *Dunaliella salina* (B) Bassin de culture optimisé pour la production de Spiruline (C) Schéma d'un système ouvert de culture de type raceway

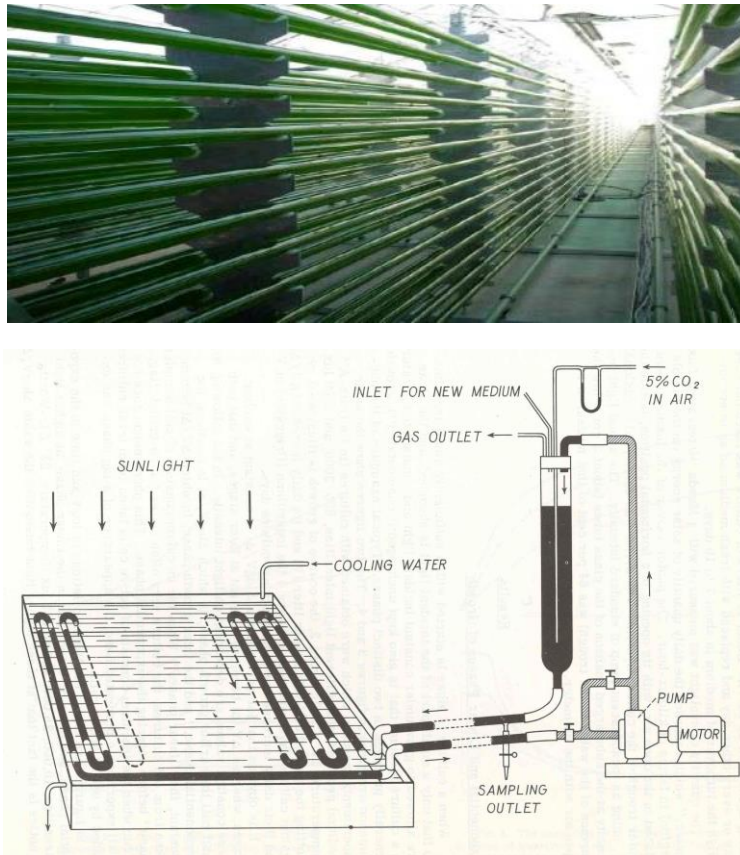


Figure II-13 : (A) Photobioréacteur tubulaire (B) Schéma de principe d'un photobioréacteur tubulaire immergé (Burlew, 1953).

- **Mélange**

La fonction de l'agitation des systèmes de culture assure l'homogénéité réactionnelle: la dispersion des éléments nutritifs et l'accès à la lumière pour l'ensemble de la population. Elle prévient dans certaines conditions et configurations les phénomènes de floculation-décantation et la formation de biofilms. Le mélange des systèmes ouverts est communément assuré par une roue à aube, cet agitateur étant généralement considéré comme le dispositif le moins coûteux d'un point de vue énergétique. D'autres solutions sont également envisageables comme par exemple un mélangeur à hélice associé à une diminution de la hauteur d'eau permettent d'envisager une réduction de 65 % de l'énergie dévolue au mélange tout en maintenant une productivité identique (Chiaramonti *et al.*, 2012).

Par rapport aux systèmes ouverts, la réduction de l'encombrement surfacique est réalisée lors de la conception des PBRs. Cette configuration implique alors une augmentation des pertes de charges pour assurer la recirculation de la culture.

Enfin, par rapport aux systèmes ouverts, la dépense énergétique associée au mélange dans les photobioréacteurs peut être plus importante d'un facteur 50 à 500 (Acien-Fernandez *et al.*, 2012).

- **Transferts de gaz**

Dans un système ouvert, la température est difficile à réguler et l'évaporation peut être importante. Soumis aux aléas climatiques, la productivité sera plus faible que dans les systèmes fermés. L'adjonction d'un apport en CO₂ permettra cependant d'atteindre des productivités plus élevées. Dans ce cas, la nature du contacteur gaz/liquide est déterminante : la faible hauteur d'eau ne permet pas d'assurer un temps de séjour du gaz suffisant pour favoriser un transfert optimal. Les puits d'injection à contre courant constituent une solution permettant de contourner ce problème (Mandeno *et al.*, 2005). D'un point de vue environnemental, les systèmes ouverts présentent un risque majeur d'émission d'ammoniac si le pH n'est pas régulé par un apport en CO₂, ce qui participe en revanche au traitement de l'azote dans les procédés de lagunage. De plus, les pertes en CO₂ imputables à un transfert peu efficace contribuent aux émissions de gaz à effet de serre. De même, l'émission de N₂O et de CH₄ (Ferrón *et al.*, 2012) aux potentiels de réchauffement global (PRG) respectifs de 300 et 23 peuvent se produire dans ces procédés. Dans un système fermé, l'absence d'échange gazeux avec l'atmosphère entraîne une accumulation importante d'oxygène produit au cours de la réaction de photosynthèse. Le stress oxydatif induit peut affecter par ailleurs la productivité par le biais d'une accumulation des formes réactives de l'oxygène dans le cytoplasme et ce processus induit des effets délétères sur le métabolisme cellulaire et l'intégrité de la paroi (Ledford & Niyogi, 2005).

- **Contaminations**

Par nature, les systèmes ouverts sont particulièrement sensibles aux contaminations (virus, prédateurs, bactéries et autres organismes photosynthétiques) et l'utilisation de microalgues se développant dans des environnements « extrêmes » peut permettre d'en limiter l'impact. *A contrario*, les PBRs sont moins sensibles aux affections biologiques et peuvent être stérilisés, ils offrent ainsi les conditions requises pour la mono-culture (Borowitzka, 1999).

II.4.2 Comparaison des systèmes de culture

Le Tableau II-18 présente une comparaison des deux technologies de culture présentées plus-haut. La bibliographie abonde en discussions autour du choix de l'une ou l'autre de ces solutions pour répondre aux besoins d'une culture de masse dans une filière bioénergie. Deux « écoles » se distinguent clairement mais l'absence d'unité de production à grande échelle, quelle que soit la configuration, opérée sur une échelle de temps significative, ne permet pas de faire émerger distinctement une solution. Les PBRs résolvent la plupart des limites identifiées dans les systèmes ouverts. Ces dispositifs permettent en général d'atteindre des productivités plus élevées pour des concentrations de biomasse plus importantes que les systèmes ouverts. Cette propriété se répercute positivement sur les étapes de post-traitement (récolte et concentration notamment) positionnés en aval de la production. Les

nombreux avantages offerts par les systèmes fermés ne peuvent pas soutenir les coûts associés au déploiement et au fonctionnement de ces procédés dans une filière bioénergie (Benemann *et al.*, 2012). D'un dimensionnement facilité, les systèmes ouverts sont en effet les dispositifs les moins coûteux à déployer, à entretenir et sont les plus durables. Ils sont toutefois contraints par la surface requise et la nécessité de disposer à proximité d'une ressource en CO₂ et en éléments nutritifs à faible couts (eaux usées).

Tableau II-18 : Comparaison des systèmes ouverts et fermés d'un point de vue biologique, opérationnel, et économique (adapté d'après Brennan & Owende, 2010 et Mata *et al.*, 2010).

Biologie	Systèmes fermés	Systèmes ouverts
Contrôle des contaminations	Aisé	Difficile
Risque de contamination	Réduit	Elevé
Stérilisation	Réalisable	Inapplicable
Contrôle des espèces	Aisé	Difficile sauf espèces extremophiles
Densité cellulaire	Elevée	Faible
Stress hydrodynamique	Bas-Elevé (procédé dépendant)	Très faible
Inhibition O ₂	Problème majeur	Faible
Opération		
Mode de culture	Batch ou semi-continu	Batch ou semi-continu
Contrôle du procédé	Facilité	Difficile
Contrôle de la température	Température plus uniforme	Difficile
Mélange	Uniforme	Uniforme à complexe
Ratio surface/volume	Elevé (20-200 m ⁻¹)	Bas (5-10 m ⁻¹)
Efficacité d'utilisation de la lumière	Elevée	Faible
Productivité	Elevée	Basse
Evaporation	Basse	Elevée
Contrôle du transfert gaz/liquide	Elevé	Elevé à faible (dépendant du contacteur)
Dimensionnement	Complexe	Facilité
Economique		
Investissement	Elevé	Bas
Fonctionnement	Elevé	Bas

II.4.3 Récolte

Les opérations de récolte et de concentration sont les étapes charnières des filières de production de microalgues. Dans le cas des systèmes ouverts, les opérations de récolte et de déshydratation comptent de 20 à plus de 50 % des coûts de production et pourraient représenter jusqu'à 90 % des investissements (Milledge & Heaven, 2012). Cette étape est également déterminante en ce qu'elle affecte les filières de valorisation en aval et la gestion du procédé de culture en amont.

L'accès à la lumière et son optimisation est un paramètre essentiel de la conception des systèmes de cultures. Cette contrainte suppose de faibles concentrations cellulaires de l'ordre de 0,5

g/L pour les systèmes ouverts et autour de 5 g/L dans les systèmes fermés. Les cellules peuvent être d'une densité relativement proche de celle de l'eau, de petite taille et présentent des parois fortement chargées négativement. Ces conditions impliquent que les suspensions de microalgues sont en général relativement stables par comparaison aux boues activées. Si les espèces sont mobiles et qui plus est en milieu marin, la stabilité de la suspension est encore plus importante (Milledge & Heaven, 2012; Vandamme *et al.*, 2013). Les microorganismes rencontrés dans les écosystèmes complexes tels que décrits dans les procédés de traitement d'eaux usées font exception en ce qu'ils présentent dans certaines conditions des capacités d'autoflocculation et de décantation qui peuvent être mises à profit pour la récolte (Park *et al.*, 2011b).

Les opérations de récolte et de concentration des cellules sont régies par 2 principes : (1) séparation par différence de masse volumique (sédimentation, flocculation-décantation ; flottation et centrifugation) et (2) séparation par exclusion (tamisage ; procédés à membranes : ultra et microfiltration). La comparaison des avantages et inconvénients de ces techniques est présentée dans le Tableau II-19. Parmi les solutions citées, la flocculation et la sédimentation se distinguent par leur faible coût de mise en œuvre et cette stratégie est décrite avantageuse pour en terme d'efficacité et de coût (Park *et al.*, 2011b). Olguín (2012) souligne toutefois qu'il existe encore peu d'études économiques disponibles pour comparer ces différentes technologies de récolte.

Tableau II-19 : Avantages et inconvénients des 5 technologies usuelles de récolte et de concentration pour les cultures de microalgues (d'après Milledge & Heaven, 2012).

Technique	Inconvénients	Matière sèche (%)
Sédimentation Avantages Coût faible, utilisation possible en amont d'un autre mode de séparation.	Efficacité espèces dépendantes. Adaptée aux cellules denses non-mobiles. Réaction lente et concentration finale faible.	0.5-3
Flocculation-décantation Vaste gamme de flocculants disponibles, prix variables mais peuvent être peu coûteux.	Elimination des flocculants et risques de contamination chimique.	3-8
Flottation Peut être plus rapide que la sédimentation. Association possible avec le transfert de gaz.	Dépend des espèces. Coûts d'investissement et de fonctionnement élevés.	7
Centrifugation Mobilisable pour la plupart des espèces de microalgues avec une bonne efficacité de récolte.	Coûts d'investissement et de fonctionnement élevés.	10-22
Filtration Importante diversité de solutions techniques	Technique particulièrement espèce dépendante et destinée aux cellules de grande taille. Colmatage problématique.	2-27

II.5 Conclusions

Ubiquistes de tous les environnements terrestres, les microalgues rassemblent un vaste ensemble hétérogène de microorganismes capables de réaliser la photosynthèse oxygénique. Une productivité plus importante que la plupart des plantes supérieures associée à la capacité à produire un grand nombre de métabolites d'intérêts positionne ces organismes comme une ressource d'intérêt, qui n'entrent pas en concurrence avec les terres arables pour la production de masse. L'exploitation de ces organismes s'adresse aux mêmes filières que les plantes supérieures : alimentation animale et humaine, pharmaceutique et cosmétique, environnement et plus récemment énergie. Explorée il y a près de 60 ans, l'exploitation de ce potentiel reste à l'heure actuelle restreint à des marchés de niches. Pourtant, le phytoplancton présente une activité métabolique remarquable qui permet notamment à certaines espèces d'accumuler une grande quantité de lipides à intérêt énergétique ou des molécules à fort potentiel de valorisation (Chimie, alimentation, pharmaceutique...).

Appliquées au traitement des effluents et à la différence des procédés à boues activées, l'activité photosynthétique des microalgues permet de s'affranchir des apports exogènes en oxygène pour l'élimination de la matière organique. Dans la même unité d'espace et de temps, il est possible en effet de traiter l'azote et le phosphore sans nécessairement recourir pour ce dernier à des traitements complémentaires chimiques ou biologiques. Les propriétés physiques de ces cellules permettent également de fixer une quantité importante de métaux potentiellement toxiques. Enfin, pour atteindre les productivités les plus élevées, un apport en carbone inorganique est nécessaire et ouvre ainsi le procédé au traitement d'effluents gazeux d'origine anthropique. Les microalgues démontrent dans ce contexte une capacité à mobiliser opportunément autour de leur croissance des flux (liquides et gazeux) dont elles peuvent assurer le traitement.

L'inventaire des impacts associés au développement d'une filière de production d'énergie qui exploite le potentiel des microalgues met en avant le poids majeur des apports en éléments nutritifs et de l'énergie dévolue au procédé de production et d'extraction de valorisation de la biomasse. Le potentiel énergétique et nutritif de la matière organique résiduelle inexploité dans ce contexte se révèle comme une des solutions pour palier cette contrainte.

La conversion en éléments nutritifs et conjointement en énergie de ce résidu peut se réaliser via la digestion anaérobie. Cette technologie mature est une filière de traitement et de valorisation des déchets organiques et de production de bioénergie qui connaît un développement notable en France notamment depuis moins d'une dizaine d'année. L'étude d'une bibliographie encore peu abondante autour de cette thématique indique que la méthanisation de ces organismes est tout à fait possible et que des limites inhérentes à l'hydrolyse des structures pariétales semblent justifier les écarts observés

entre la production potentielle de méthane obtenue expérimentalement et la composition des cellules. La concentration importante en protéines nous alerte également sur le risque potentiel de toxicité exprimé par la minéralisation de l'azote et l'expression de sa forme ammoniacale. Nous observons enfin, que la production d'énergie réalisée à partir de ce gisement de matière organique est dépendante des espèces mobilisées, de leur composition et de composés inhibiteurs potentiels. La gamme de potentiels énergétiques rapportés pour cette filière se situe dans la même gamme que la plupart des gisements de matière organique exploités industriellement.

La production de cette biomasse mobilise deux familles de systèmes de culture : les procédés ouverts et fermés. Ces technologies sont utilisées depuis des décennies pour assurer une production massive de microalgues. Si les systèmes fermés permettent d'atteindre une productivité plus importante en préservant efficacement la culture du milieu extérieur, les coûts d'investissements et de fonctionnement de ces procédés ne permettent pas en l'état actuel de leur développement de les destiner à la production d'énergie. *A contrario*, les systèmes ouverts offrent des coûts moindres et sont positionnés à ce titre avantageusement à cette fin. Si un grand nombre d'auteurs font le constat qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune exploitation industrielle de ce gisement, ils s'accordent également sur le fait que la disponibilité de données expérimentales à échelle pré-industrielle fait défaut pour une évaluation plus fine des limites et des perspectives de développement durable de cette filière.

De la même façon, l'utilisation d'écosystèmes complexes, qui se révèlent, à l'exception des organismes extrémophiles, particulièrement adaptées au traitement d'effluents complexes (d'origines différentes et caractérisés par une certaine variabilité qualitative) souffre d'un manque de connaissances fondamentales.

Afin d'éclairer les problématiques énoncées ci-dessus, nous allons dans un premier temps évaluer le potentiel des microalgues comme gisement destiné à la digestion anaérobie. L'étude des réponses de cette matière organique dans un digesteur et l'évaluation des solutions permettant d'en augmenter la dégradabilité et *in fine*, la production d'énergie et d'éléments nutritifs, fera l'objet du chapitre III de ce document. L'étude de la croissance d'un écosystème complexe réalisée sur un digestat synthétique puis d'origine industrielle, et les performances associées sera étudiée et discutée dans le chapitre IV. Enfin, la conception d'un procédé pilote à échelle pré-industrielle couplant la culture de microalgues et la méthanisation sera présentée en chapitre IV. Les premiers résultats expérimentaux obtenus seront également présentés dans cette partie du document.

III Digestion anaérobie des microalgues

SOMMAIRE

III Digestion anaérobie des microalgues.....	76
III.1 Digestion anaérobie d'une espèce modèle : <i>Chlorella vulgaris</i>	78
III.1.1 Introduction.....	78
III.1.2 Methods	80
III.1.3 Results and discussion.....	83
III.1.4 Conclusion	91
III.2 Stratégies d'optimisation de la biodégradabilité.....	92
III.2.1 Effet des traitements thermiques sur un écosystème phytoplanctonique d'eau douce 94	
III.2.2 Introduction.....	94
III.2.3 Materials and methods	96
III.2.4 Anaerobic digesters.....	96
III.2.5 Thermal pretreatment procedure.....	97
III.2.6 Analysis.....	97
III.2.7 Results and discussion.....	98
III.2.8 Conclusions.....	103
III.2.9 Comparaison des performances entre traitement thermique et ultrasonique sur la production de méthane.....	104
III.2.10 Introduction.....	104
III.2.11 Methods	105
III.2.12 Results and discussion.....	107
III.2.13 Conclusion	114
III.3 Discussion	115

III Digestion anaérobie des microalgues

Avant propos

Pour des conditions de température et de configuration de digesteur données, la conduite d'un procédé de méthanisation se réalise par action sur 2 paramètres opératoires (Bernet & Buffiere, 2008) :

- la **charge volumique appliquée (CVA)** va déterminer la quantité de matière organique apportée dans le digesteur par unité de volume et par unité de temps. Une charge volumique appliquée qui dépasse les capacités de dégradation de l'écosystème anaérobie entrainera une surcharge organique se traduisant par une accumulation des produits intermédiaires (AGV) et une dégradation des performances globales du procédé.
- Le **temps de séjour** détermine la durée moyenne de la matière organique passée dans le digesteur. Ce paramètre se décline pour les liquides en temps de séjour hydraulique (TSH) et pour les solides en temps de séjour des solides (TSS). Le temps de séjour (liquide ou solide) appliqué à un gisement donné dépendra de sa digestibilité, une faible digestibilité imposera les temps de séjour les plus longs pour assurer une biodégradabilité optimale.

La détermination de ces paramètres optimums pour un gisement de matière organique permet de définir le périmètre de fonctionnement du procédé à échelle industrielle. Les performances associées à la digestion anaérobie d'une microalgue modèle (*Chlorella vulgaris*) fait l'objet de la première partie de ce chapitre. Nous avons étudié l'effet du temps de séjour sur la production de méthane et la minéralisation de l'azote pour une CVA imposée par une récolte par décantation. Les espèces appartenant au genre *Chlorella* sont des organismes très fréquemment rencontrés dans les eaux douces mais aussi les sols. La famille des Chlorophycées à laquelle appartient ce groupe, à l'origine des plantes supérieures, et des espèces de ce groupe se caractérisent par la présence d'une paroi rigide. Comptant parmi les premiers organismes unicellulaires photosynthétiques identifiés, les chlorelles sont confrontés depuis des décennies à presque tous les champs de recherche de la thématique microalgue : nutrition, traitement d'effluents liquides (Cai *et al.*, 2013) assimilation du CO₂ dans des effluents gazeux (Van Den Hende *et al.*, 2012), production de lipides à vocation énergétique (Widjaja *et al.*, 2009). Elles constituent à ce titre une espèce modèle pour aborder la problématique de la digestion anaérobie de ces biomasses et nous l'avons retenue de fait comme première étape d'une démarche expérimentale d'analyse de la filière.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons cherché à améliorer les performances de production de méthane et de minéralisation des éléments nutritifs d'un écosystème complexe microalgues-bactéries isolé d'une lagune de traitement d'eaux résiduaires urbaines (Mèze, 34). La

microalgue *Scenedesmus sp.* est l'espèce de microalgue dominante de cette population. Comme pour les espèces appartenant au genre *Chlorella*, *Scenedesmus sp.* est fréquemment rencontrée dans les systèmes d'épuration par lagunage et a fait l'objet de nombreuses études dans ce contexte (Cai *et al.*, 2013). Sélectionnés pour leur capacité à croître sur des effluents complexes comme le digestat, nous avons cherché à améliorer leur biodégradabilité par l'application de prétraitement physique : thermique et ultrasoniques.

III.1 Digestion anaérobie d'une espèce modèle : *Chlorella vulgaris*

Monique Ras, Laurent Lardon, Bruno Sialve, Nicolas Bernet, Jean-Philippe Steyer

Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*

Bioresource Technology

Issue 102, pp 200-206, 2011

Abstract: The main goal of this present study is to investigate the feasibility of coupling algae production (*Chlorella vulgaris*) to an anaerobic digestion unit. An intermediate settling device was integrated in order to adapt the feed-flow concentration and the flow rate. Digestion of *C. vulgaris* was studied under 16 and 28 days hydraulic retention times (HRT), with a corresponding organic loading rate of $1 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ L}^{-1}$. Increasing the HRT achieved 51% COD removal with a methane production measured at $240 \text{ mL g}^{-1}_{\text{VSS}}$. Performing different HRTs and dynamic monitoring during degradation highlighted differential hydrolysis of microalgae compartments. However, 50% of the biomass did not undergo anaerobic digestion, even under long retention times. This points out the interest for further studies on pre-treatment performances and more generally speaking on the need for intensifying microalgae biomass digestion.

III.1.1 Introduction

Depleting supplies of fossil fuel as well as growing environmental concern of the public towards global warming has driven increasing productions of biofuel from biomass. Although biodiesel or bioethanol from terrestrial plants stands for a renewable source of energy, the process has received great criticism (Crutzen *et al.*, 2008). Indeed, using fertile land for energy crops, applying pesticides and deforesting natural land are the main arguments questioning biodiesel production processes. Moreover, regarding the extent of arable land which is necessary to satisfy global demand for energy, other alternative solutions are to be developed. Production of photosynthetic micro-organisms, or microalgae, has been proved efficient by its rapid conversion of sunlight energy to organic exploitable biomass. Above all, microalgae can be grown on barren lands and do not require pesticides. As demonstrated by Chisti (2007), microalgae is a promising source of energy, due to its higher content in lipids compared to terrestrial plants, but providing the production of the biomass is economically improved. In addition, several studies have shown that microalgae can increase its lipid content in specific environmental conditions (Illman *et al.*, 2000). However, energy and life cycle assessments of algal biodiesel production have shown that the high needs in fertilizers as well as the high energy demand of lipid extraction and harvesting pro-On the other hand anaerobic digestion is a spontaneous process mediated by micro-organisms converting biomass into biogas, a mixture of mainly CO_2 and CH_4 , without requiring advanced dewatering nor further chemical extraction. Anaerobic digestion of

microalgae for energy use was first mentioned by Golueke *et al.* (1957), whose aim was to process microalgae biomass (mainly *Chlorella* and *Scenedesmus* species) growing in wastewater treatment ponds. These authors showed that the degradation rate of microalgae was 60-70% slower than activated sludge and raised possible limitations of the process. Ammonia toxicity, high pH levels (due to ammonium) and algae cell resistance whether linked to their biochemical composition or to their active resistance to microbial attack were suggested. Golueke and Oswald (1959) were the first authors to present a coupled process of microalgae production and digestion, in view of converting sunlight energy to chemical energy. The produced algal biomass (mainly *Scenedesmus* and *Chlorella*) was directly supplied to the digester, and in turn the digestate, containing mineralised products (ammonium and phosphate) was supplied as nutrients for the microalgae culture. Unfortunately, this closed system based on recirculating biomass and nutrients only reached an efficiency of 2% to convert solar energy into methane. Authors underlined that the main cause of this low conversion factor was the low organic load applied to the digester and suggested that efficiency could be improved by increasing the volume ratio in favour of the microalgae growth unit. Since this seminal paper, several studies have shown efficient digestion of microalgae under HRTs between 10 (Yen and Brune, 2007) and 30 days (Golueke *et al.*, 1957; Samson and Leduy, 1982), with methane yields, respectively, ranging between 0.1 and 0.4 L gVSS⁻¹. Therefore, in order to comply with high methane yields, long HRTs are recommended which in turn forces maximal biomass concentration in the feed-flow. Because of the small size of microalgae cells (3-30 µm), recovery of biomass can be a significant technical problem depending on the aimed concentration. Grima Molina *et al.* (2003) reviewed existing technical solutions which can be adapted to microalgae biomass, such as flocculation-settling, floatation or centrifugation. However, they point out the high energy requirement of recovery based on centrifugation techniques. Such an energy demand can negatively impact the global process of microalgae digestion, which aim is to produce energy in the first place. Studies stated previously have underlined one major issue in a coupled production-digestion unit of microalgae. Indeed, the biomass concentration in a microalgae production unit is too low for optimal digestion, which puts forward the need for prior harvesting and moderate dewatering. On the other hand, harvesting microbial cells is an energy consuming process which can affect the energy outcome of the production chain. It is hence fundamental to choose microalgae species which are compatible with cheap harvesting techniques such as settling or floatation. This study provides a coupled production-digestion unit including an intermediate concentration step, based on natural gravitational settling. To our knowledge, such an additional step has not yet been integrated in coupled production-digestion systems of microalgae. This intermediate concentration unit allows the variation of substrate concentration and flow rate in the anaerobic reactor in order to keep retention time and loading rate within favorable ranges for anaerobic digestion.

The benefit of coupling a production and digestion unit is of environmental and economic order. Such an integrated set-up bypasses transport of algae as well as transport of nutrients for algae growth. Indeed, recycling the digestate can be source of nutrients (ammonium and phosphates) for the algae production unit. As stated previously, this partially self-sufficient energy conversion system could be viable providing algae biomass is produced and concentrated in sufficient amounts. The main goal of the present study will be to focus on the anaerobic conversion of microalgae to methane, processed inside a coupled production-digestion unit, which can hence provide process information for possible up-scaling. The *Chlorella* species are well referenced in literature (Chinnasamy *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) whether studying general algae composition or production rates. This is liable to bring comparative data or complementary information respectively on its production and digestion potential. Therefore, *Chlorella vulgaris* will be grown, concentrated and digested in an experimental coupled production-digestion set-up. Digestion will be performed under two different hydraulic retention times (HRT). Methane yields obtained with *Chlorella vulgaris* will be thoroughly discussed by comparing results with literature data obtained on microalgae or other organic feedstock. Organic degradation rates and total nitrogen mineralisation will also be related to these two HRT applications.

III.1.2 Methods

III.1.2.1 The experimental set-up

The experimental set-up consisted in three compartments. A microalgae production unit (photobioreactor) coupled to a digester and equipped with an intermediate settling facility in order to harvest and concentrate microalgae cells before introduction in the digester. The photo-bioreactor was a twenty-litre cylindrical glass container which received continuous light, supplied by six 25 W daylight neon lamps. The reactor outlet led to a 0.2-L funnel shape settling glass tank via a peristaltic pump (1 mL min^{-1}). Supernatant of the settler was recycled towards the photo-bioreactor. The settler outlet led to a collector where the harvested biomass was characterised and fed to the digester. The digester was represented by a 1-L effective volume, double wall glass reactor.

III.1.2.2 Anaerobic biomass

The anaerobic sludge was collected in a tertiary wastewater treatment pond (Mèze, France) receiving clarified wastewater. This seed inoculum was sampled during spring where duckweed grew on the pond surface. The methanogenic biomass was then adapted to mesophilic conditions by incubating the collected biomass at 35°C , in a glass container which received continuous stirring, during 1 month before the beginning of the experiment.

III.1.2.3 Microalgae production, harvesting and monitoring

Chlorella. vulgaris (pure strain 211/11B) was produced in the photobioreactor. The culture received continuous light exposure and continuous mixing by magnetic stirring. The microalgae were fed with carbon gas, rating 5 g of CO₂ per day, and on a modified Z8 nutrient broth (Staub, 1961). NaNO₃ commonly used as nitrogen source was here replaced by CINH₄ to mimic the composition of the anaerobic digestate. The nutrient input rate as well as the outlet pumping rate (5 mL min⁻¹) were regulated in order to maintain constant biomass concentrations in the reactor. Micro-algal bio-mass was concentrated in the settling tank by natural sedimentation. The supernatant was continuously removed and recirculated through the photobioreactor whereas the densified fraction accumulated at the bottom of the funnel was regularly harvested. The sides of the glass tank as well as the plastic tubing were regularly scrapped in order to collect the fixed biomass. The photobioreactor as well as the settling tank and collector were left at ambient temperature (non-controlled). Over 6 months of operation, temperature ranged between 20 and 30°C. For a better control of experimental conditions, the concentrated stream was not directly fed to the anaerobic digester but stored at 4 C for prior characterisation. Biomass growth and settling were monitored by optical density values scanned between 450 and 750 nm (UV/Visible spectrophotometer Schimadzu). Maximal absorbance values revealed at 685 nm. Samples were diluted in order to give an absorbance range between 0.1 and 1.0 because optical densities above 1.0 might be underestimated. Cell density measurements were undertaken by microscopic cell counts (Olympus microscope, model BX60F).

III.1.2.4 Anaerobic digester design and operational conditions

The digester was continuously mixed with a magnetic stirrer (Fig. III-1). The entire reactor was covered in order to reduce light penetration and hence prevent photosynthetic growth. The temperature was maintained at 35°C by recirculating temperature-controlled water through the double wall. pH was monitored but not controlled. Biogas outlet led to a continuous monitoring device. The reactor was fed with the concentrated stock of *C. vulgaris*, harvested after settling and thoroughly characterised. The amount of organic biomass introduced in the digester per day was fixed by the harvesting rate and was maintained constant. In order to undergo constant and controlled HRTs over long periods, the concentration of the influent was standardised with demineralised water.

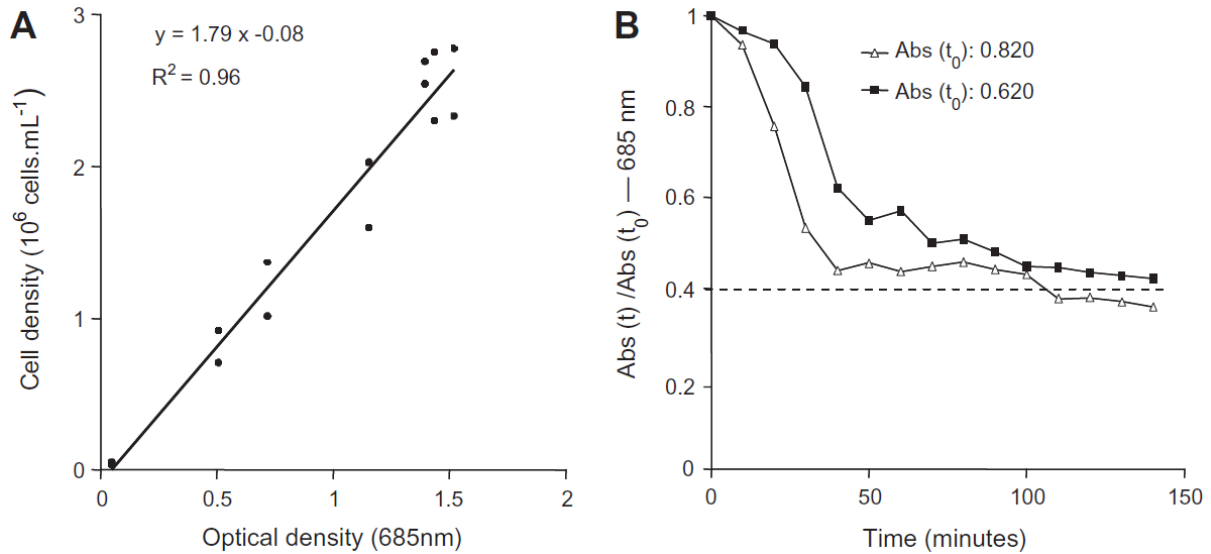


Figure III-1 : (A) Calibration curve and equation of optical density at 685 nm to cell density of *Chlorella vulgaris*. (B) Standardised settling curves of *Chlorella vulgaris* cells measured at initial absorbance values (Abs₀ at 685 nm) of 0.620 (■) and 0.820 (△).

III.1.2.5 Fermentation parameters

Biogas volume was measured by water displacement and sampled for analysis with a syringe every day. The biogas composition was determined by gas chromatography (Shimadzu GC-8A) equipped with a CTRI Alltech column and with argon as the carrier gas. Detection was performed with a thermal conductivity detector and connected to an integrator (Shimadzu C-R8A). Internal calibration allowed the measurement of CO₂, CH₄, H₂, O₂ and H₂S. Soluble fractions were obtained after centrifugation (BECKMAN, 12,000 rpm, 15 min, 2 C). Volatile fatty acids (VFA) concentrations were measured in the soluble phase by using gas chromatography (GC-8000 Fisons instrument), equipped with a flame ionisation detector and an automatic sampler AS 800. The maximum temperature of injection and the regeneration temperature are 250 and 200°C, respectively. The internal standard method allowed the measurement of acetate, propionate, butyrate and iso-butyrate, valerate and iso-valerate concentrations. Ammonium ions were analysed in the soluble phase by ion chromatography system (DIONEX 100) using conductivity detection. Total solids (TS), total volatile solids (TVS), total suspended solids (TSS), pH, and total nitrogen Kjeldahl (TNK) were measured according to the standard methods (American Public Health Association, 1992). Chemical oxygen demand (COD) was measured by a colorimetric method (Jirka and Carter, 1975) using Hach 0-1500 mg L⁻¹ vials. In addition, soluble and particulate total organic carbon were measured by combustion (680°C) catalytic oxidation/NDIR (non-dispersive infrared gas analyser) method using a Shimadzu TOC-VCSN analyser. Methane conversion efficiency from microalgae biomass was calculated considering the theoretical production yield of 380 mLCH₄ g-1COD (at 35°C). Design parameters for the photobioreactor, the settler and the anaerobic digester are summarised in Table III-1.

Table III-1 : Operational parameters of the experimental set-up.

	Photobioreactor	Settling tank	Anaerobic digester
Reactor volume (L)	22	0.2	1
Temperature (°C)	25	25	35
pH	6-8	9	6.9-7.2
HRT	Nd	10 h	16-28 d

III.1.3 Results and discussion

The main target of this present study is to evaluate the feasibility of an associated production and anaerobic digestion unit for biogas production from *C. vulgaris*. Major concern will be given to understand the influence of process parameters on the methane yield. Hydrolysis step and ammonia accumulation are often stated as the main limiting factors towards microalgae digestion. In order to estimate the extent of these parameters on the degradation efficiency of *C. vulgaris*, authors studied steady-state reaction parameters at different hydraulic retention time (HRT) but also the dynamic behaviour of the reaction in fed-batch conditions. The anaerobic process was monitored through the COD conversion, methane production, VFA accumulation and the nitrogen mineralisation.

III.1.3.1 *C. vulgaris* production and chemical characteristics

For practical reasons algal concentration was directly estimated by optical density measurements. Therefore, a calibration curve was established between optical density and cell density measurements (Fig. 1A). Optical density predicted correctly cell density ($R^2 = 0.98$) and was hence used to monitor algal biomass during the experiment, according to the regression equation. *C. vulgaris* maximal growth rate was estimated at 0.62 day^{-1} . Optical densities in the bioreactor reached a maximum of 3 at 685 nm, i.e. $5.3 \cdot 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$, which is stated in the literature as high density cultures (Chiu *et al.*, 2008). In reality, microalgae concentrations in the bioreactor varied between $3 \cdot 10^6$ and $5.3 \cdot 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ due to fluctuations in on-line harvesting and dilution from the nutrient supply.

Microalgae were concentrated by gravitational settling without any addition of flocculants. The natural settling properties of *C. vulgaris* were determined in situ by following the decrease of absorbance versus time. This test was performed on fractions collected in the photo-bioreactor before supplying with CO_2 . The settling curve presented in Fig. 1B, shows that sixty percent of the biomass, which density varied between 0.620 and 0.820 OD at 685 nm, settled after 1 h. Beyond that time, the gain in biomass was not significant. Such biomass removal efficiencies obtained by gravitational settling is lower compared to studies implying the use of sodium hydroxide (Yahi *et al.*, 1994) which increased flocculation properties at pH values between 11 and 12, thereby removing 95% of the algal biomass. The use of metal ions has also proved to be as efficient, and particularly the use of aluminium sulphate

above 25 mmol L⁻¹ which allows between 85% and 95% of biomass removal (Jiang *et al.*, 1993). Whether increasing the pH to 12 or associating the microalgae to alum input reverts to increasing the recycle ratio of algae and hence the energy input to the system. Moreover the production-harvesting system evaluated here is operated in a closed loop by recycling the supernatant; therefore it is important to prevent any risk of accumulation or settling substances which may occur in the production unit. In addition, the use of additives to improve the sedimentation would also affect the overall environmental benefit of such a process. Chemical properties of the harvested algae biomass were measured in terms of chemical oxygen demand (COD), total nitrogen kjeldahl (TNK), total organic carbon (TOC), volatile suspended solids (VSS) and total suspended solids (TSS). Results revealed that the algae biomass was mainly a particle substrate (between 5% and 10% soluble COD), composed of microbial cells. The organic fraction represented between 85% and 90% of the biomass (between 10% and 15% minerals). Authors revealed a conversion factor relating the algae concentration to COD mass, between 5.1 and 7.7 COD and between 1.33 and 1.43 gCOD gV1SS. The TOC/TNK ratio of *C. vulgaris* was estimated at 6, which is in agreement with several studies investigating microalgae composition and showing that carbon/nitrogen (C/N) ratios of microalgae varied between 6 and 9 depending on the species (Geider and La Roche, 2002). Within 10 h of settling, between 7×10^9 and 10^{10} algae cells were harvested per day. When converted to COD values, the harvesting rate was estimated between 1 and 1.9 g COD day⁻¹, and was controlled by measuring the COD content of the concentrated biomass in the settler outlet. The COD concentration in the harvested fraction varied between 25 and 30 gCOD L⁻¹, i.e. between 35 and 40 times higher than in the photo-bioreactor. These results hence indicate that harvesting microalgae by natural gravitational settling steps managed to concentrate the biomass within ranges recommended for anaerobic digestion. High levels of nitrogen are often reported in microalgae and are related to their high protein content which can vary between 20% and 65% of the dry weight (Becker, 2007). However, the distribution of biochemical compounds in microalgae can be modified by forcing environmental parameters. Indeed, several studies succeeded in stimulating the lipid content in microalgae thereby increasing the C/N ratio, by applying stressful environmental conditions, but at cost of a lower growth-rate. In terms of anaerobic digestion processes, a too low C/N ratio can compromise the efficiency of the process, especially when high input concentrations and/or long retention times are applied. This is primarily due to the amount of ammonium which is likely to be released during the hydrolysis step, prior to methanogenesis. Indeed it is well known that ammonia exerts negative effects on animal and microbial cells and the concentration must be monitored in order to prevent toxic amounts to be reached. Moreover, among anaerobic microbial populations, methanogens have been proved particularly sensitive to ammonia and especially acetoclastic methanogens (Koster and Lettinga, 1984). Several studies have succeeded in reducing the ammonia concentration during anaerobic digestion of microalgae, by co-digesting the biomass with

waste paper (Yen and Brune, 2007) or wastewater sludge (Samson and Leduy, 1983). However, it has to be noticed that in the perspective of a mass-production facility, finding and carrying co-substrates with high carbon content could be problematic. Reducing the nitrogen content in algal cells with nitrogen limited growth conditions could also be an alternative to reduce plausible ammonia toxic events, but as stated above, at the cost of a lower algae production rate. This explains why, in this study, authors focused on pure algae digestion, grown in non-limiting conditions.

III.1.3.2 Biodegradability of *C. vulgaris*

The COD load applied to the digester was limited by the harvesting rate of *C. vulgaris* biomass, i.e. between 1 and 1.9 gCOD day⁻¹. By ways of precaution, authors selected a secured loading rate of 1 gCOD day⁻¹ L⁻¹ reactor. The COD balance was determined over the whole experimental time and based on the difference between the reactor inlet and outlets. The COD balance revealed an underestimation of 6%, meaning that 6% of the COD fed to the digester was not converted to methane nor to any other forms of COD. This COD loss was explained by the detection of a fixed biomass on the inner sides of the digester, which presumably accumulated with time. The fixed biomass represented 7% of total COD amount received by the reactor during both experimental periods and results were corrected accordingly. For each investigated HRT, constant methane production yields were reached which indicated stabilised biological performances. COD removal as well as total nitrogen mineralisation efficiencies of *C. vulgaris* were calculated respectively over the last 65 and 35 days of each applied HRT, 16 and 28 days respectively. Results are reported in Table IV-2. Under a HRT of 16 days, the COD removal and total nitrogen mineralisation efficiency of *C. vulgaris* biomass were respectively 33% and 19%. By increasing the HRT from 16 to 28 days, COD removal increased to 51% and the total nitrogen mineralisation efficiency increased to 68%. These results show that long residence times of *C. vulgaris* (28 days) benefited both COD removal and nitrogen mineralisation, however, not in the same proportions. Indeed a large amount of COD was still reluctant to degradation whereas most of the nitrogen compounds were already hydrolysed. Regarding evolutions of COD removal compared to nitrogen mineralisation over different HRTs, results suggest that the rapidly degradable fraction (i.e. evidenced by short HRT) was characterised by a high C/N ratio; on the other hand, longer HRTs solubilised another fraction, rather slowly degradable, which released less soluble carbon than nitrogen. These observations let authors assume that the most reluctant fraction of the substrate has a high C/N ratio. The low mineralisation rate, mentioned for a short HRT, points out that the cell integrity is partially preserved in these conditions. This can be related to the high resistance of *C. vulgaris* to microbial degradation observed by Golueke and Oswald (1959). Our results also join those from Foree and McCarty (1970), who revealed a resistant organic fraction which could reach a mean value of 41% of the initial input, after degrading anaerobically 20 different microalgae substrates over

200 days. However, this fraction was found to be highly variable between different species (e.g. 21% for *C. pyrenosioda* versus 50% for *Anabaena* species).

The pH was not regulated in the anaerobic digester during the experiment but stayed in the narrow range between 6.9 and 7.2. Ammonia concentrations were calculated according to the dissociation constant of ammonium at 35°C (pKa = 8.95). Table III-2 shows the maximum levels of ammonium and free ammonia concentrations reached in the digester operated under both HRTs.

Tableau III-2 : Chemical characteristics of digested *Chlorella vulgaris*: maximal values recorded under constant methane production yields.

	HRT 16 days	HRT 28 days
Total COD (mg L ⁻¹)	6913	9251
Soluble COD (mg L ⁻¹)	215	639
VFA (mg eq. acetate L ⁻¹)	5-10	6-11
NH ₄ (mg L ⁻¹)	160	820
NH ₃ (mg L ⁻¹)	2-3	10-13
pH	6.9-7.1	7.1-7.2

Free ammonia concentrations varied between 2 and 3 mg L⁻¹ under 16 days HRT and increased to 10-13 mg L⁻¹ under 28 days HRT. VFA levels, primarily acetate, in the digester were close to the detection limit under both HRT applications (between 5 and 14 mg L⁻¹). This indicates that VFA accumulation, as a response to free ammonia toxicity, did not occur. Moreover, as stated previously, methane production remained constant for each applied HRT. These results are in agreement with Van Velsen (1979) who showed that free ammonia levels below 24 mg NH₃ L⁻¹ did not affect methanogenic activity when digesting a mixture of VFA compounds. Consequently, the low free ammonia levels as well as low VFA concentrations reached in this present study (under 15 mg L⁻¹ for both compounds) leaves considerable leeway to increase the residence time and/or the organic loading rate without affecting degradation processes.

III.1.3.3 Methane production during anaerobic digestion of *C. vulgaris*

Methane productions were calculated over the last 65 days operating under 16 days HRT, and over the last 35 days operating under 28 days HRT. Methane conversion of *C. vulgaris* reached 110 mLCH₄ CODin under 16 days and 180 mLCH₄ gC1 HRT. In order to compare the present productions to literature data, results were converted to mLCH₄ gVSS respectively to 147 and 240 mLCH₄ g VSS). Fig. 2 compares the achieved methane productions in this study to literature data, where microalgae were digested under HRTs between 10 and 50 days. Literature data first shows that the methane productions obtained from mixed cultures of *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. (Yen and Brune, 2007; Golueke *et al.*, 1957; Chen,

1987), fit an inverse exponential curve, characterised by a rapid increase between 10 and 30 days HRT before reaching a plateau above 30 days HRT. Methane conversion yields obtained from *C. vulgaris* alone, achieved in our study, fit this exponential trend, hence suggesting that our data are in good agreement with studies performing anaerobic digestion of microalgae in similar conditions (organic loading between 1 and 2.6 gVSS L⁻¹ d⁻¹). Under 15 days HRT, anaerobic digestion performances of organic fractions from municipal solid waste (OF-MSW) can reach 250-300 mLCH₄ gVSS (Mata-Alvarez *et al.*, 1990) while 2-fold less is reported for anaerobic digestion of hemicellulose wastes or grass (Ghosh *et al.*, 1985). However, both cases are still more efficient than microalgae digestion mentioned above, and in spite of their complex and hemicellulosic composition respectively. Optimisation of methane production from microalgae feedstock is hence expected, providing appropriate processes are undertaken.

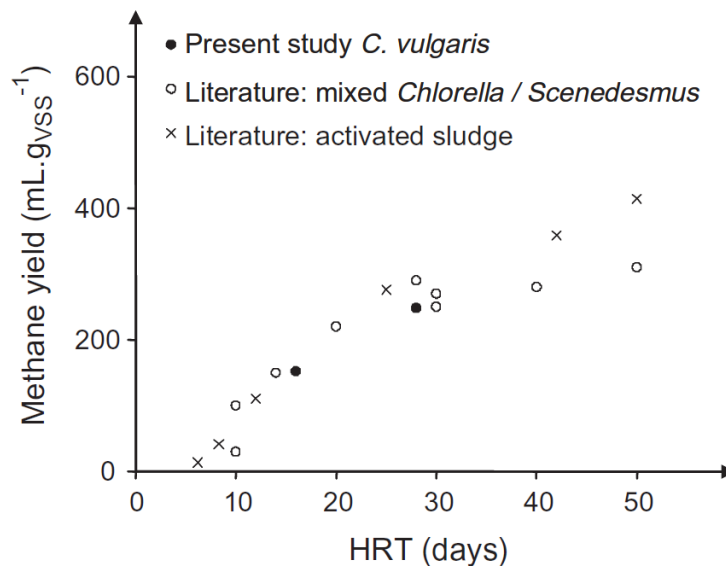


Figure III-2 : Comparison of methane yields obtained with *Chlorella vulgaris* in this study (d) with literature data obtained from different particulate substrates: mixed cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* (Yen and Brune 2007; Golueke *et al.*, 1957; Chen 1987) and activated sludge (Converti *et al.*, 2009).

Methane conversion efficiencies reached 29% and 49% under 16-days and 28-days HRTs respectively. These results are relatively similar to those obtained by Converti *et al.* (2009) with activated sludge (between 21% and 52% methane conversion efficiencies), when performing digestion under HRTs between 12 and 25 days. Figure III-2 also illustrates the similar methane productions obtained from activated sludge digestion and microalgae digestion under HRTs between 10 and 30 days. For HRTs above 30 days, methane yields from sludge digestion increase, while methane yields from microalgae tend to be constant. This result is in agreement with Chen (1987) who showed that above 30 days HRT, conversion efficiencies from sludge reached 80% while those obtained from microalgae did not exceed 60%. Golueke *et al.* (1957) had already compared digesting raw sludge and a mixed culture of microalgae (*Chlorella* and *Scenedesmus*), and underlined that the degradation rate of the latter was

60-70% slower. Therefore, it appears that above a retention time of 30 days, either microalgae require more time than sludge to be degraded or can no longer be degraded. This limitation could be related to the presence of a resistant organic fraction as discussed previously. Indeed, microalgae cell walls are often described in literature as refractory towards bacterial degradation (Foree and McCarty, 1970). Studies relating the biochemical composition of cell walls from several green freshwater and marine microalgae from the class Chlorophyceae, Dinophyceae, Eustigmatophyceae encountered the presence of insoluble, non hydrolysable biopolymers termed algeanans (Gelin *et al.*, 1999). These highly resistant aliphatic compounds, when detected, are mainly found entangled in a tri-laminar structure (TLS) which can occur on the outer-membrane of certain microalgae species such as *Nanochlorum eucaryotum* or *Chlorella emersonii* (Allard and Templier, 2001). *C. vulgaris*, on the other hand, is deprived of TLS, therefore algeanans cannot figure as a refractory fraction of the biomass during anaerobic degradation in this present study. Authors highlight the similar trend between microalgae biomass and activated sludge digestion, as well as their relatively close structural and biological composition (particle microbial live biomass). Sludge digestion has been extensively studied (Bolzonella *et al.*, 2005), optimised (Dumas *et al.*, 2010) and industrialised. Therefore, designing biogas production units from microalgae, which is a new substrate not yet well known, can be inspired by knowledge acquired for optimising sludge digestion. For instance, pre-treatments, such as heat, acid-alkalin or mechanical treatments have already been proved efficient for increasing methane production by accelerating bio-degradation kinetics of activated sludge (Valo *et al.*, 2004). Besides, microalgae thermochemical pre-treatment has been investigated by Chen and Oswald (1998), who succeeded in increasing methane production by 33%, by pre-treating the algal biomass at 100°C for 8 h. This upgrading factor figures among performances achieved when applying comparable heat pre-treatment conditions for sludge digestion: between 20% and 32% methane production increase (Barjenbruch and Kopplow, 2003). This comparison proves that microalgae behaviour towards pretreatment and technical optimisation can be as efficient as for activated sludge.

III.1.3.4 Dynamic study of the anaerobic degradation of *C. vulgaris*

In order to provide a further insight into anaerobic degradation of microalgae, fed-batch experiments were undertaken on the same reactor. The microalgae substrate loaded in the digester was increased by successive batch inputs of 1, 2, 4 and 6 g of COD. Care was taken for nominal state to be recovered before introducing the next batch. In other words methane production rate and COD levels returned to those recorded before introducing the algal substrate. During the whole experiment, a constant hydraulic retention time of 16 days was applied by feeding the reactor with a stable water volume. Methane yields obtained for all four batch supplies reached a mean value of 112 ml CH₄ g⁻¹.COD. Hence methane yields collected on the fed-batch experiment are comparable

to those obtained under steady state conditions, presented earlier in the paper. Dynamics of dissolved and total COD are plotted in Fig. III-3A, and evolutions of the methane flow rate and the VFA (presented in equivalent acetate) are represented in Fig. III-3B. Kinetic profiles show that the recovery time (to obtain the nominal state) is fairly proportional to the total amount of substrate introduced. One gram of COD is degraded in 1 day and 6 g of COD is degraded in 6 days. In other words, the average degradation speed did not change between the four fed-batch experiments, indicating that reaction kinetics are not significantly impacted by the initial concentration.

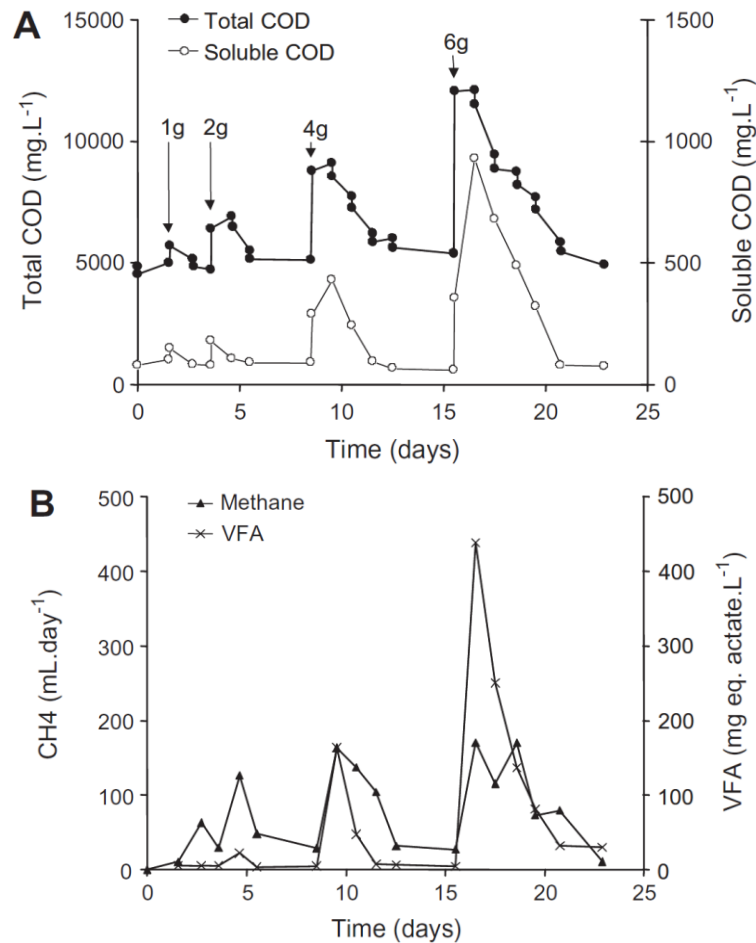


Figure III-3 : (A) Degradation kinetics of *Chlorella vulgaris*: soluble COD (○) and Total COD (●) dynamics during successive batch inputs of 1, 2, 4 and 6 g COD. (B) Degradation kinetics of *Chlorella vulgaris*: VFA concentration (X) and methane flow rate (▲) dynamics during successive batch inputs of 1, 2, 4 and 6 g COD.

However, the evolution of the soluble and particulate COD brings interesting information. For the batch experiments, soluble COD and total VFA increased significantly in the digester when loading 4 gCOD L⁻¹ as well as 6 gCOD L⁻¹ of microalgae. This trend shows that in our case study, when microalgae concentration in the reactor was higher than 4 gCOD L⁻¹, the hydrolysis step was not limiting but rather acetogenesis and methanogenesis. For a batch load of 6 g L⁻¹ of microalgae, the VFA increase in the digester was much higher than for the 4 g L⁻¹ reactor batch load, but without an increase in the

instantaneous methane flow rate. This shows that the selected inoculum starts to suffer of methanogenesis inhibition for a total VFA concentration between 200 and 400 mg L⁻¹. Finally for the two last batches, different phases can be recognised on the total COD curve. A first decrease occurs rapidly, causing an immediate increase in soluble COD; this first phase can be described as the methanogenesis of easily biodegradable particulate matter. A second phase occurs with a slower decrease and a lower methane production, which corresponds to the washing-out of the reactor and to the slow hydrolysis of more resistant fractions of the microalgae.

3.5. Teaching to improve and scale-up microalgae anaerobic digestion of microalgae

In the present study, methane productivity ranged from 40-174 mL Lreactor day⁻¹, when increasing the HRT from 16 to 28 days. These values are relatively low compared to literature data. For instance, Yen and Brune (2007) reported a production rate of 570 mL Lreactor day⁻¹ when digesting microalgae harvested from a wastewater treatment pond. However, this figure cannot be directly compared to the present study as the organic loading rate and total COD removal rate differed. When dividing productivities by organic loading rates, the methane yield obtained by Yen OD, which is in the same order of magnitude than the production obtained here. This reference as well as the behaviour of the reactor exposed to increasing loads let authors assume that higher organic loading rates could be applied without compromising the equilibrium of the anaerobic consortium. For instance, applying an organic loading rate of 2.5 gCOD L⁻¹ day⁻¹ with a HRT of 28 days (i.e. concentrating the algal stream up to 70 gCOD L⁻¹) should lead to a methane productivity of 450 mL Lreactor day⁻¹. However, increasing the input concentration also impacts the ammonium concentration in the reactor. In the latter case, forecasted free ammonia concentrations could reach 20-30 mg L⁻¹ which is close to inhibition levels. Increasing the organic loading rate implies higher concentration of the algae in the feed-flow or shorter HRTs. As the present study shows that algal biomass is slow to degrade in anaerobic conditions; larger organic loading-rates will mainly be obtained by increasing the algae concentration. This underlines the importance of using a settling unit between the photobioreactor and the anaerobic digester. However higher concentrations of the input cannot be obtained by passive settling only; hence the algal concentrated stream coming from the settler should be further concentrated by an additional centrifugation step. The other and non exclusive improvement option would be to increase the reaction speed and especially the hydrolysis step which has been shown to be limiting. As mentioned previously, pre-treatment could increase the bio-available fraction of the COD as well as the reaction speed. Another alternative would be to use a two-stage anaerobic digester. These two last improvements are currently under study. The species chosen for the algae production has also a strong influence on the performance of the coupled system. Indeed some algae characterised by the lack of cell wall could exhibit better performances. An environmental and energetic assessment of a coupled production/concentration/digestion system at an industrial scale has been performed by Collet *et al.* (2011) and concluded on the importance of reducing electrical

consumption and increasing methane yields in order to guaranty the environmental friendliness of the whole system. It is also important to keep in mind that in a bio-energy perspective of biogas production, the algae feedstock represents an energetic investment which has to be converted through the anaerobic digestion process. As a consequence, it is of major importance to also maximise the methane yield (i.e. the biomass conversion) rather than to increase the anaerobic plant productivity alone. Finally, this study showed that a long HRT increased not only the methane yield but also the nitrogen release. In the perspective of a closed loop system where the output of a process is the input of the other, it is important to maximise the recycling of nutrients between both processes. A low nitrogen release during anaerobic digestion would indeed lead to a lower nitrogen flow into the algal production unit which implies an additional supply of fertilizers. As a consequence, HRTs and more generally the whole process configuration should not be chosen only to maximise the methane production but also to maximise the recycling of nutrients.

III.1.4 Conclusion

Methane production from a coupled production-digestion unit of microalgae, equipped with a concentrating device, was studied under two HRTs. The highest degradability of *C. vulgaris* was achieved under a HRT of 28 days with 51% of COD removal and a methane production of 240 mL gVSS. However carbon and nitrogen fractions of the microalgae showed different responses towards anaerobic degradation. Indeed, fast nitrogen release is liable to limit intensification capacities of the process. Higher methane production from algal feedstock requires investigating such as pretreatments to improve the bio-availability of resistant compounds or the selection of algal species without cell walls.

III.2 Stratégies d'optimisation de la biodégradabilité

Nous venons de voir que l'étude de la digestion anaérobie de *Chlorella vulgaris* met en avant l'effet du temps de séjour sur la biodégradabilité pour une charge volumique appliquée contrainte par un procédé de récolte par décantation. Le temps de séjour le plus élevé (28 jours) favorise une meilleure production de méthane et de minéralisation de l'azote. Si ces résultats suggèrent par ailleurs que dans ces conditions de traitement anaérobie, cette espèce se comporte comme des boues activées, il devient également possible comme pour ce gisement de matière organique de chercher à en augmenter la biodégradabilité en appliquant en amont du digesteur une étape de prétraitement.

Pour un temps de séjour donné et une charge volumique appliquée, les performances de dégradation anaérobie (vitesse et rendement) seront en effet directement dépendantes de la qualité de la matière organique mais également de l'accessibilité à celle-ci (paragraphe II.3.4.2). Pour un même substrat, il est observé que le système digestif des animaux est souvent plus performant que les procédés anaérobies industriels (Bayané & Guiot, 2010). En plus de l'appareillage enzymatique diversifié impliqué dans ces réactions, ils mobilisent des actions chimiques (pH acide de l'estomac par exemple) et mécaniques (mastication, rumination). La matière organique ligno-cellulosique, consommée par les mammifères herbivores et les insectes xylophages est décrite comme particulièrement difficile à dégrader dans les procédés industriels de valorisation énergétique (filières bioéthanol ou biométhane). L'organisation particulière de la structure de ce substrat dans lequel l'accès aux fractions les plus digestes (cellulose et hémicellulose) est limité par la présence d'une structure ligneuse, ralentit considérablement les vitesses de réaction et le rendement final de conversion du carbone organique. Les attaques physiques et chimiques vont avoir pour effet de réduire les tailles des particules, « d'ouvrir » les polymères et de favoriser l'activité microbienne en leur offrant alors plus de surface d'adhésion et d'accès aux enzymes. A l'image de ce que réalise le règne animal, des stratégies de prétraitements ont été développées pour augmenter les performances des digesteurs (Bayané & Guiot, 2010). D'un point de vue industriel, l'application de prétraitements sur la biomasse initiale se répercute positivement sur l'économie globale du procédé puisqu'il est possible d'atteindre un ratio énergétique favorable (Carrère *et al.*, 2010; Passos *et al.*, 2013).

Dans notre cas de figure, nous avons souligné (paragraphe II.3.3) que la présence de parois chez certaines espèces pouvait limiter de façon significative l'accessibilité du contenu intracellulaire à l'écosystème anaérobie. Des performances observées dans le digesteur proches de celles rapportées pour les boues activées, nous incitent à employer les mêmes stratégies d'optimisation de la biodégradabilité et qui sont communément étudiées pour ce gisement (Carrère *et al.*, 2010).

Les prétraitements appliqués à la filière méthanisation se divisent en trois catégories : physiques, chimiques et biochimiques. Les prétraitements physiques comprennent les traitements thermiques,

ultrasoniques, mécaniques et micro-ondes tandis que les prétraitements chimiques mobilisent des acides et des bases fortes voire des oxydants puissants comme l'ozone. L'utilisation directe d'enzymes ou encore de champignons permet également d'augmenter au préalable l'accès aux fractions d'intérêt. Il est donc fréquent d'associer plusieurs types de traitement : ex. traitements thermo-chimiques ce qui permet d'obtenir un effet synergique et une relative économie de réactifs, de temps de réaction et d'énergie (Valo *et al.*, 2004). Ce mode de gestion de l'intrant se répercute également positivement sur la minéralisation des autres éléments constitutifs de la matière organique. En effet, à l'issue de cette étape puis au cours de la digestion anaérobie, une augmentation de concentration en ammonium et en phosphate dans le milieu est fréquemment rapportée (Carrère *et al.*, 2010). Ce point renforce l'intérêt de cette stratégie dans notre cas de figure où la question du recyclage des éléments nutritifs constitue un enjeu majeur.

Nous allons dans un premier temps étudier l'action d'un traitement thermique sur l'écosystème phytoplanctonique et dans un second temps en comparer les performances à l'action d'un traitement ultrasonique vis-à-vis de la production potentielle de méthane et de la minéralisation de la matière organique.

III.2.1 Effet des traitements thermiques sur un écosystème phytoplanctonique d'eau douce

Cristina González-Fernández, Bruno Sialve, Nicolas Bernet, Jean Philippe Steyer

Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass.

Biomass and Bioenergy

Volume 40, pp 105-111, 2012

Abstract : Research into the development of renewable and sustainable fuels has been a major concern during last decades. Microalgae, as a potential resource, have gained great attention for energy purposes. In this context, anaerobic digestion seems to be the most direct energy generation process. Nevertheless, the efficiency of this process is hampered due to the hard cell wall of some microalgae. In order to enhance its anaerobic biodegradability, the present research investigated the effect of thermal pretreatment at two temperatures (70 and 90 C) applied to *Scenedesmus* biomass. No differences were detected in terms of organic matter or ammonium release upon the two tested temperatures. Nevertheless, a different fact was observed for their anaerobic biodegradability. While raw and pretreated at 70 C microalgae attained 22–24% anaerobic biodegradability, microalgae pretreated at 90 C achieved anaerobic biodegradability of 48%. Even though similar profiles were obtained for both temperatures along the pretreatment period, the damage caused in the cell wall at 90 C seemed to be greater and rendered this substrate readily degradable for anaerobic digestion.

III.2.2 Introduction

The concern regarding depletion of fossil fuel and climate change has caused the search for a renewable energy source. Nevertheless, a great controversy regarding potential renewable resources has emerged. Resources classified as first (derived from terrestrial crops) and second (derived from lignocellulosic crops) generation biofuels pose serious drawbacks which include the need of arable land, large amounts of water and low biomass productivities. Algae based feedstock, a third generation, is regarded as a very good resource overcoming the above mentioned drawbacks. Among the possible technologies to produce energy employing algal biomass, research is nowadays focused on biodiesel. Nevertheless, life cycle analysis revealed that biodiesel from algae is an energetically unbalanced process (energetic costs were higher than the energy recovered) (Lardon *et al.*, 2009).

These authors pointed out some strategies to decrease economic and energetic costs, namely control of nutrients and harvest, oil extraction optimization and anaerobic digestion of oil cakes. Calculations presented by Sialve *et al.* (2009) also highlighted the energetical infeasibility of biodiesel production for biomass lipid concentration below 40%. On the other hand, anaerobic digestion is a more straightforward process to produce energy since no intense concentration, drying or oil extraction is

required. Furthermore, not only the lipid fraction is profitable as it is in the case of biodiesel. Mainly due to their ability of growing in wastewater and thereby decreasing costs for nutrients, *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* are the most common studied microalgae (Gonzalez *et al.*, 2008; Mulinuevo-Salces *et al.*, 2010). Those algae do not present high percentage of lipids (Becker, 2004) while carbohydrates and proteins are prevailing fractions. Out of the three macromolecules, lipids present the highest specific methane yield, however hydrolysis of this macromolecule has been reported to be slow (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991). On the other hand, due to microalgae ability for nitrogen uptake, algae may present a high percentage of protein. Thus, special attention should be given to protein-rich substrates since their anaerobic digestion may be hampered by ammonia release during protein degradation. This inorganic nitrogen form has been addressed as a potential inhibitor for methanogenic activity (Hansen *et al.*, 1998). Algae consist of complex organic matter which implies a difficult enzymatic hydrolysis and hence limiting the efficiency of anaerobic digestion. The limited hydrolysis is due to the biomass structural features such as biochemical composition, microalgae strain and cell wall characteristics. The most important parameter for anaerobic digestion is the cell wall characteristics which would determine the methanogenic conversion efficiency of the substrate. *Scenedesmus obliquus* cell wall has been described as a rigid wall constituted by glucose, mannose and galactose (Takeda, 1996). As sugars, their anaerobic biodegradability should be high, however their linkage forming cellulose and hemicellulose together with the presence of some other cell components (sporopollenin-like biopolymer (Burczyk & Dworzanski, 1988) confer the cell wall a high resistance to bacterial attack. Thus, even though the anaerobic biodegradability of sugars is high, their availability for hydrolysis and subsequent AD is limited by the structure of the cell wall (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2011). In order to improve the hydrolysis and therefore AD of the complex structure of the cell wall, a wide range of pretreatments have been studied. Microalgae pretreatments found in literature include acid pretreatment for bioethanol production (Harun and Danquat, 2010), microwave, autoclaving and sonication for lipids extraction (Lee *et al.*, 2010) and thermal treatment for hydrocarbon recovery (Kita *et al.*, 2010). Regarding pretreatments to improve anaerobic degradation of microalgae, Mussgnug *et al.* (2010) reported a decrease on biogas production when biomass was dried previously to anaerobic digestion. As a matter of fact, microalgae feedstock for methane production as well as possible pretreatment for its enhancement is in its early stage. The purpose of the current work was to study thermal pretreatment to enhance methane production of microalgae biomass (mainly composed by *Scenedesmus sp.*). Microalgal biomass was subjected to two different temperatures (70 and 90°C) and solubilisation of organic matter and ammonium along 3 h was studied. Finally, the effectiveness of this pretreatment was determined by anaerobic digestion of those substrates (raw and pretreated biomass).

III.2.3 Materials and methods

III.2.3.1 Scenedesmus biomass and photobioreactor culture conditions

The microalga *Scenedesmus sp.* was collected during spring from an open pond of the urban wastewater treatment plant located at the geo-coordinates 43 250 4000 North, 3 3602100 East (Meze, France). The biomass (substrate) was mainly composed of *Scenedesmus* (identified microscopically) but also bacteria in a minor extent. Microalgae biomass was grown at 20°C in synthetic medium Z-8 nutrient broth (Staub & Erna, 1961) and incubated under continuous illumination with fluorescent lamps (Edison, 58W). The photobioreactor consisted of an open plastic bag of 0.2 m³. Air flow of 12 L min⁻¹ was provided for culture broth mixing. Microalgae were grown in batch conditions. In this manner approximately every two weeks, culture broth reached a plateau in terms of absorbance (680/800 nm). Once this plateau was achieved, the biomass was allowed to settle by natural gravity at ambient temperature.

III.2.4 Anaerobic digesters

III.2.4.1 Anaerobic biomass and semi-continuous reactor conditions

Anaerobic biomass (inoculum) employed came from a reactor digesting *Chlorella vulgaris* (Ras *et al.*, 2010). One-liter working volume digester with magnetic agitation was used for anaerobic digestion. In order to prevent any photosynthetic activity, the digester was covered with aluminium foil. Operational temperature was set at 35 °C and pH was monitored by an in situ probe. Biogas production was measured by water displacement and composition was analyzed periodically. Hydraulic retention time (HRT) was 23 days. The organic loading rate (OLR) of the reactor (1L) was fixed at chemical oxygen demand (COD) of 1 g day⁻¹. Substrate fed was settled microalgae obtained from the photobioreactor with a COD/ (volatile solids) VS of 0.6. At this point it should be stressed out that only sedimentation was used as harvesting procedure. Thus, substrate was diluted to the desired OLR with distilled water.

III.2.4.2 Anaerobic biomass and batch anaerobic biodegradability test

Anaerobic biomass was granular sludge collected at a sugar factory in Marseille (France). 0.5 L glass bottles were used as reactors. Incubation time was approximately one month. Batch tests were carried out in triplicates for each sample and blanks. For the determination of endogenous methane production, blanks containing only anaerobic sludge were run. Microalgae biomass and anaerobic sludge were mixed to attain a ratio COD substrate/VS inoculum of 0.5. Quantities were calculated to get a final liquid volume of 0.35 L, allowing gas headspace of approximately 0.15 L. 50 g L⁻¹ of calcium carbonate was added to provide medium buffer capacity. pH ranged 7e8 in all the reactors before the test started. In order to remove any oxygen, headspaces were flushed with nitrogen for 10 min. Then,

the reactors were placed in a constant temperature room (35°C). The volume of biogas produced was calculated by measuring the pressure of the bottle headspace. Substrates tested include fresh microalgae harvested from the photobioreactor and thermal pretreated samples (described below).

III.2.5 Thermal pretreatment procedure

In order to avoid any misleading effect of water vapour pressure, an open to the atmosphere reactor was used. Two mild temperatures were tested, namely 70 and 90°C. Temperatures were achieved by means of a water bath. This water was pumped in the reactor jacket. Set point temperatures (70 and 90°C) were achieved within the first 15 min. However it should be noted that elapsed time was defined as the moment that microalgal biomass started to be heated. Biomass was continuously stirred during the thermal treatment to avoid temperature gradients. Out of the 1 L reactor employed, only 0.6 L of liquid matrix was subjected to thermal pretreatment. Microalgae suspension COD was adjusted to 14 g L⁻¹. Thermal pretreatment lasted for a total of 3 h. Samples were taken every 15 min for the first hour and every 30 min for the following 2 h. Those samples were analyzed for volatile fatty acids (VFA), soluble COD and ammonium (NH₄⁺). Hydrolysis rate was calculated as $[(sCOD-sCOD_0)/tCOD_0-sCOD_0]*100$ where sCOD refers to soluble chemical oxygen demand, tCOD refers to total oxygen demand and the subscript “o” stands for before pretreatment.

III.2.6 Analysis

Total solids and volatile solids were measured according to standard methods (Eaton *et al.*, 2005). COD was analyzed by a colorimetric method using Hach 0-1500 mg L⁻¹ vials. Soluble fractions were obtained after centrifugation (mini-spin Eppendorf, 15 min, 12000 g). VFA were measured in the soluble phase by using gas chromatography (GC-8000 Fisons Instrument) equipped with a flame ionisation detector. Ammonium was analyzed in the soluble phase by ion chromatography system (DIONEX 100) using conductivity detection. Biogas composition was determined by gas chromatography (Shimadzu GC- 8A) equipped with a thermal conductivity detector.

A dual-fluorescence based method was employed for determining cell integrity of the pretreated biomass as well as the non treated one. Viability was assessed using the vital stain Sytox Green (Invitrogen S7020). Sytox penetrate cells with damaged plasma membranes and exhibit a high affinity for nucleic acids, which are stained green while red cells represent undisrupted cells. Optimal final concentration used was 5 mol m⁻³ solution in DMSO and incubation time of 5 min. The Sytox Green coloration of microalgal cells was performed as previously described by Sato *et al.* (2004). Samples were observed using an Olympus BX60 microscope equipped with a “fluorescein filter” (500 nm). Fluorescence images were acquired with a CCD camera (Nikon Digital Camera 1200F).

III.2.7 Results and discussion

III.2.7.1 Methane production of not-pretreated *Scenedesmus sp.* biomass under semi-continuous conditions

Anaerobic digestion of *Scenedesmus sp.* biomass under semi-continuous conditions resulted in low methane production. More specifically, methane yield on COD basis was around 84 dm³ kg⁻¹ while methane content in the biogas ranged between 58 and 60%. Based on the methane production it can be calculated that only 24% of the biomass was converted in biomass. This fact proved the high resistance of *Scenedesmus sp.* to anaerobic bacterial attack. Similar conditions were employed to anaerobically digest *C. vulgaris* and methane yields on COD basis ranged 110 and 180 dm³ kg⁻¹ for 16 and 23 days HRT (Ras *et al.*, 2010). According to these findings, it could be concluded that *Scenedesmus sp.* presents a higher resistance to anaerobic degradation when compared with *C. vulgaris*. Indeed, those results are in agreement with data presented by Mussgnung *et al.* (2010). Batch anaerobic biodegradability test carried out by those authors revealed methane production on VS basis of 178 dm³ kg⁻¹ for *Scenedesmus obliquus* whereas *Chlorella kessleri* digestion attained 217 dm³ kg⁻¹. The difference on methane production was attributed to the presence of sporopollenin-like polymers (hardly biodegradable), hence hampering organic matter hydrolysis and subsequent methane conversion.

III.2.7.2 Effect of thermal pretreatment on *Scenedesmus sp.* biomass

- Solubilisation of organic matter during thermal pretreatment

In order to enhance methane production of *Scenedesmus sp.*, this biomass was subjected to thermal treatment. Fig. 1 shows the increase in soluble COD, VFA-COD and NH₄ concentration along the two pretreatment temperatures (70 and 90°C). Soluble COD increased along pretreatment elapsed time. As it can be seen in Figure III-4 (a), organic matter hydrolysis rate at 70°C was decreasing along the pretreatment time until sampling at 60 min after which it remained constant and release of solCOD was negligible. For biomass pretreated at 90°C, first point of sampling showed a higher hydrolysis rate than at 70°C. Additionally, organic matter solubilisation did not follow the same trend. More specifically, sampling point at 30 and 120 min decreased markedly with the previous sampling point. Nevertheless, during consecutive sampling points at 45 and 150 min, organic matter solubilisation resumed. Therefore it can be assumed that thermal decomposition of organic matter took place in several stages, probably related to different chemical reactions taking place along with time at this temperature. Haug *et al.* (1978) determined time of thermal treatment less important than temperature. It should be stressed that this conclusion was withdrawn when applying high temperatures (175-200°C), while at mild temperatures (90°C) elapsed time of thermal treatment

seems to have an effect on COD release. At the first sampling point (30 min), soluble organic matter increased by 2.1 and 2.4-fold for 70 and 90°C respectively, and increased up to 4 and 4.4 at the end of the thermal pretreatment (180 min). Those values were quite low when compared with data presented by Appels *et al.* (2010) when thermal pretreatment was applied to sludge. This study showed increase of soluble organic matter by 2.9 and 25.6-fold when applying temperatures of 70 and 90°C for an hour. Nevertheless, those authors did not mention if an open or closed to the atmosphere reactor was employed for the thermal pretreatment. The use of a closed system would entail an increase of pressure which would also cause an important effect on hydrolysis of particulate organic matter. Indeed, previous experiment carried out with the same microalgal biomass but with closed reactor evidenced increases of solCOD by 7 and 11-fold at 70 and 90°C, respectively (Gonzalez-Fernandez *et al.*,2012).

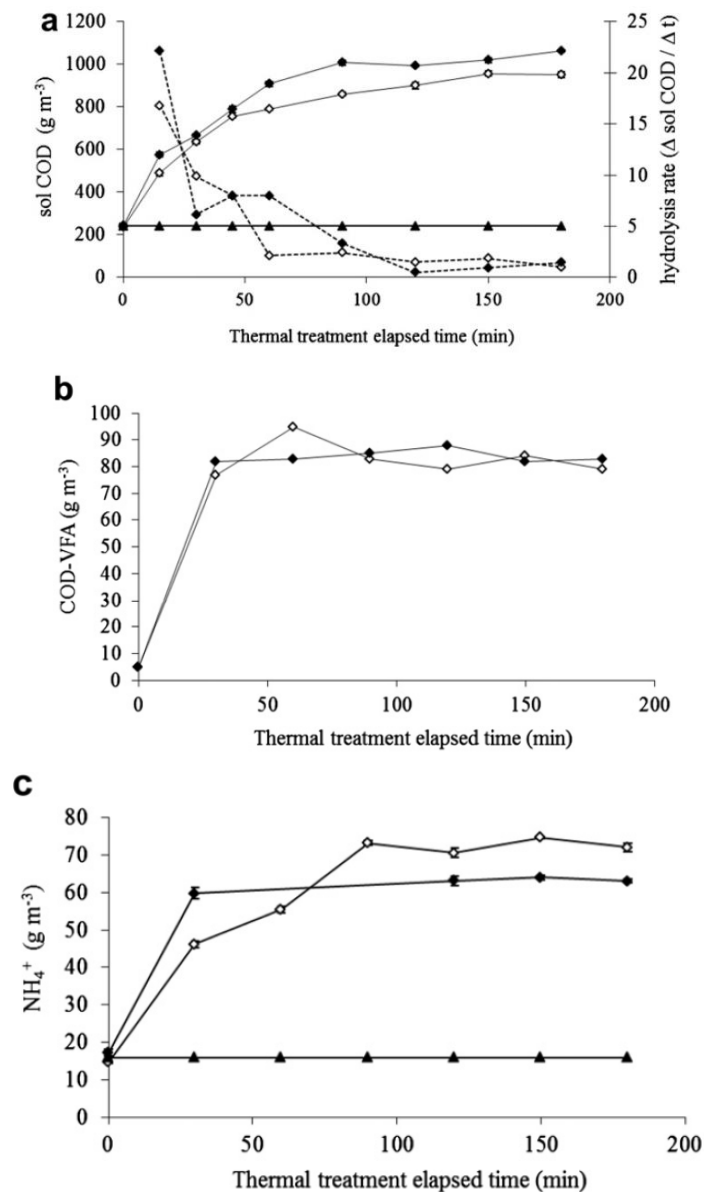


Figure III-4 : Time course of organic matter solubilisation in terms of (a) sol COD, (b) COD-VFA and (c) NH_4^+ concentration upon the two temperatures tested, namely 70 and 90°C represented by open and closed circles, respectively. Triangles refer to not-pretreated biomass (control). Discontinuous line in (a) refers to the hydrolysis rate of sol COD.

A different trend may be observed in Fig. III-4 (b) for the COD corresponding to VFAs. VFA were only released to the medium during the first 30 min of pretreatment and remained constant onwards. With regard to the temperatures employed, no differences were attained. Therefore, after 30 min release of VFA was constant regardless the temperature and elapsed time of thermal pretreatment. Even though VFA concentration was constant, soluble COD increased with time, thus it may be concluded that organic matter solubilised was constituted by more complex molecules.

As shown in Fig. III-4 (c) ammonium was released at a higher rate during the first sampling point (30 min) for both applied temperatures. In the case of the temperature of 70°C, this release slightly increased with time while at 90°C no changes were recorded. Differences in concentration were too low to be considered significant. Release of ammonium could be attributed to exopolymers or intracellular protein decomposition. *Scenedesmus* sp. has been described to have a cell wall formed by carbohydrates. Furthermore carbohydrate cell wall of this microalgae is formed by cellulose and hemicellulose, which solubilisation does not take place at this range of temperature. More specifically, temperatures of 150°C were pointed out by Garrote *et al.* (1999). However, temperatures applied may have broken weak hydrogen bond linking cellulose and hemicellulose (Laureano-Perez *et al.*, 2005). For all these reasons, it was hypothesised that ammonium released was caused by intracellular protein thermal decomposition.

- **Evaluation of cell wall integrity after thermal pretreatment**

Bougrier *et al.* (2005) raised the need of finding an indicator to elucidate whether the cell wall was damaged or not during biomass pretreatment. Microscopic image evaluation of microalgal biomass before and after thermal pretreatment can be used to evaluate the cell wall disintegration degree. Change in structural integrity or breakdown of microalgal cells was not detected under normal microscopic observation. In order to go one step further than ordinary microscopical observation, the use of Sytox Green dye employed in the present study helped to withdrawn important conclusions. Sytox Green application is quite common to evaluate cell integrity when exposed to chemicals (Ribalet *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010). However to the best of our knowledge, this methodology was never applied for the assessment of microalgae cell wall integrity after pretreatment of biomass. In fact, the use of the dye would not only prove the cell wall disruption but also the location (extra or intracellular) of organic matter release during pretreatment. In this context, when Sytox Green dyes the cell, organic

matter release could be intra or extracellular while if the only extracellular organic matter is released, microalgae cell would not be stained. In our particular case, Sytox Green dye was employed to determine whether cell wall disruption of microalgae occur during the two tested temperatures. Results of not treated and microalgae biomass treated at 70°C showed similar behaviour. Cells were not stained in green, thus no cell wall disruption was taking place under thermal pretreatment at 70°C. Soluble organic matter can be attributed to exopolymers attached in the cell wall forming a mucus layer that was likely detached during the pretreatment. In this manner, the hypothesis of ammonium release during thermal treatment of 70°C attributed to cell wall breakage was not correct. Nevertheless, it can be inferred that the mucus layer of *Scenedesmus* was composed to some extent of proteins and these molecules were degraded to ammonium.

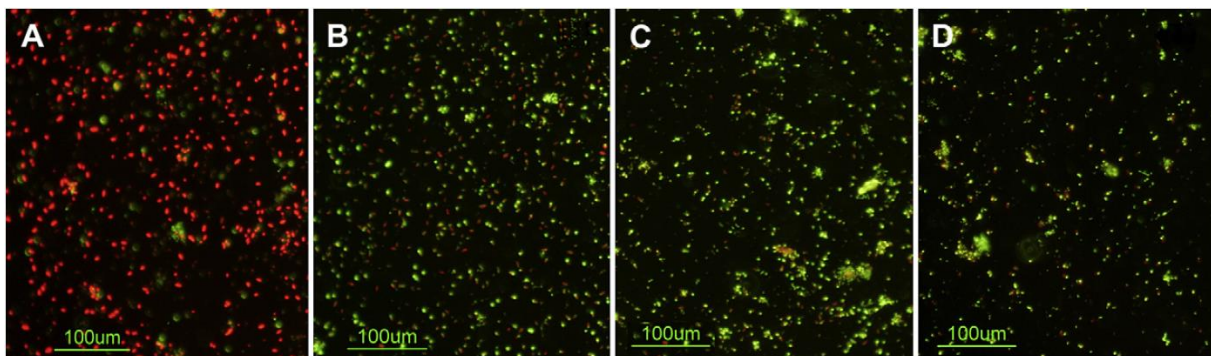


Figure III-5 : Sytox staining *Scenedesmus* ecosystem of not thermally pretreated biomass (A) and thermally treated at 90°C after (B) 30 min, (C) 60 min and (D) 180 min.

Different trend was observed for microalgal biomass pretreated at 90°C (Fig. III-5). Not treated *Scenedesmus* biomass exhibited undisrupted cells (red color). Nevertheless after 30 min of thermal treatment, the high number of cells dyed on green clearly evidenced cell wall disruption. Moreover, visual observation of the microscopic images also revealed that after 1 h treatment even more cells were disrupted. Under this scenario of 90°C pretreatment, organic matter released was the results of exopolymers as well as intracellular compounds. Furthermore it can be observed in Fig. III-5 (B) and (C) the formation of aggregates. The reason for such a fact is the re-flocculation process taking place due to the release of intracellular molecules. This process was already described previously by Gonze *et al.* (2003) on activated sludge. Positively charged molecules released during pretreatment bind negative sites of microorganisms and polysaccharides inducing the agglomeration of particles.

- **Methane production enhancement by means of thermal pretreatment**

The suitability of raw and pretreated microalgal biomass as substrate for the anaerobic digestion was evaluated by following the methane production over a period of 33 days (Fig. III-6). Methane production rate was maximal during the first 8 days and decreased markedly onwards. Over the first

8 days of digestion, strong differences among samples were observed. Raw microalgal substrate produced methane yield on COD basis of $37 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1}$ whereas pretreated samples at 70°C and 90°C resulted in 61 and $133 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1}$, respectively. At the end of the experimental time of 33 days, anaerobic digestion of raw microalgae attained $76 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1}$. This number compared quite well with the value obtained for the reactor operated under semi-continuous conditions at HRT of 23 days. Therefore, *Scenedesmus* sp. biomass without pretreatment reached anaerobic biodegradability of 22%.

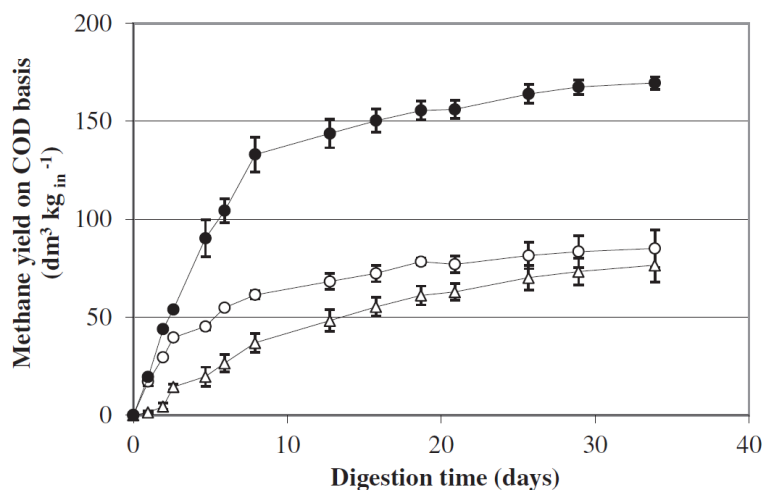


Figure III-6 : Evolution of methane production per gram of COD initial for raw microalgae (triangle) and pretreated microalgae at 70°C (open circles) and 90°C (closed circles).

Literature regarding thermal treatment to improve methane production by using microalgal substrate is quite scarce and contradictory. Chen and Oswald (1998) increased algal methane fermentation up to 33% by applying 100°C for 8 h, while de Schamphelaire and Verstraete (2009) did not detect any effect when pretreating a mixture of microalgae at 80°C for 2.5 h. In our study, thermally treated microalgae biomass showed a different behaviour depending on temperature applied. At the end of the experimental time, methane production enhancement was almost negligible for sample pretreated at 70°C . Methane production on COD basis reached $85 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1}$. Thus, the organic matter dissolved by the thermal pretreatment was converted to methane during the first days of experimentation. Nevertheless, the hard cell wall of this microalgae was again confirmed and limited the subsequent methane production. According to Fig. 1, similar solCOD was released to the medium under both applied temperatures, however a different trend was observed for methane production at 90°C . Methane production achieved at the end of the experiment was increased by 2.2-fold with regard to untreated microalgae substrate. In this manner, methane production on COD basis was $170 \text{ dm}^3 \text{ kg}^{-1}$ at the end of the experimental time (33 days). Then, it may be concluded that even though a similar amount of solCOD was dissolved under both temperatures, the damage caused in the cell at the highest temperature was greater. As a matter of fact, this conclusion was confirmed by the microscopic

analysis carried out with Sytox Green dye. Anaerobic biodegradability enhancement taking place at 90°C was not only due to solCOD released but also to the cell wall breakage rendering the substrate more accessible for anaerobic degradation. Indeed Kita *et al.* (2010) observed that *Botryococcus braunii* also showed a high temperature dependency in terms of hydrocarbon recovery. While at 80°C hydrocarbon recovery yielded 3.4%, this value increased to 86.7% at 85°C. The reason for such a fact was the bond's weakness in the cell structure that may be broken at a certain temperature threshold. It should also be stressed that since day 21, methane production was really low and almost comparable to the value attained at day 33. Thus, maximum anaerobic biodegradability that may be achieved for these microalgae is approximately 50% under these conditions, while the rest of organic matter is still hardly degradable. These results highlighted the potential of thermal pretreatment for enhancing anaerobic biodegradability of *Scenedesmus* biomass. However to improve this value, further research is needed to determine the effect of higher temperatures, the distribution of macromolecules before and after pretreatment, as well as performance in a continuously fed reactor.

III.2.8 Conclusions

Anaerobic digestion of *Scenedesmus sp.* was confirmed to be low (approximately 22% anaerobic biodegradability) under batch and semi-continuous operational conditions. The efficiency of thermal pretreatment on microalgae was found to differ according the temperature applied. Both tested temperatures, 70 and 90°C, showed solubilisation of organic matter and ammonium in the same range. Nevertheless, after 33 days of digestion, different trend was elucidated depending on the temperature applied. While no significant effect was observed with substrate pretreated at 70°C, the microalgae biomass subjected at 90°C enhanced the anaerobic biodegradability up to 48%. Microscopic analysis with Sytox Green dye was confirmed as a helpful tool to identify location of organic matter released as well as proving cell wall disruption. Soluble COD release to the medium during thermal pretreatment was not directly responsible of this increase but rather the damage caused in the microalgae cell wall. Therefore, cell wall disruption resulted in an efficient strategy to increase anaerobic digestion, however in order to clarify its feasibility further research including energetical and economical balances is required.

III.2.9 Comparaison des performances entre traitement thermique et ultrasonique sur la production de méthane

Cristina González-Fernández, Bruno Sialve, Nicolas Bernet, Jean-Philippe Steyer

Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production

Bioresource Technology

Volume 110, pp 610-616, 2012

Abstract : Ultrasound at 20 Hz was applied at different energy levels (E_s) to treat *Scenedesmus* biomass, and organic matter solubilization, particle size distribution, cell disruption and biochemical methane potential were evaluated. An E_s of 35.5 and 47.2 MJ/kg resulted in floc deagglomeration but no improvement in methane production compared to untreated biomass. At an E_s of 128.9, cell wall disruption was observed together with a 3.1-fold organic matter solubilization and an approximately 2-fold methane production in comparison with untreated biomass. Thermal pretreatment at 80°C caused cell wall disruption and improved anaerobic biodegradability 1.6-fold compared to untreated biomass. Since sonication caused a temperature increase in samples to as high as 85°C, it is likely that thermal effects accounted for much of the observed changes in the biomass. Given that ultrasound treatment at the highest E_s studied only increased methane production by 1.2-fold over thermal treatment at 80°C, the higher energy requirement of sonication might not justify the use of this approach over thermal treatment.

III.2.10 Introduction

Algae are a potential feedstock for the production of chemicals and energy. One of the processes for conversion of algae biomass is anaerobic digestion, a process that allows utilization of all the biomolecules (proteins, carbohydrates and lipids) for energy production (Sialve *et al.*, 2009). The biogas produced during this process can serve as a source of energy and the CO₂ released can serve as carbon source for the algae cultivation system (hence mitigating CO₂ emissions). The mineralized nitrogen and phosphorus in the digested residue can be recycled to provide nutrients for the algae and hence help offset nutrients costs. Anaerobic digestion can also be used in a combination of processes to reach a more energy efficient balance, and economical and energetical considerations regarding microalgae for biofuel production envision the biorefinery concept as a future approach (Ehimen *et al.*, 2010; Sialve *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). For this reason, a renewed interest has arisen in assessing microalgae for methane production. The ease with which methane can be produced from microalgae depends largely on the structure and composition of the cell wall (González-Fernández *et al.*, 2011a). Microalgae such as *Nannochloris* and *Dunaliella* with a proteinaceous cell wall are more

easily digested than algae such as wall *Scenedesmus* and *Chlorella* with a carbohydrate-based cell (Ras *et al.*, 2011; González-Fernández *et al.*, 2011b). In order to improve the digestibility of algae, treatments already applied for lipid extraction such as microwave heating, autoclaving, alkaline hydrolysis and sonication can be envisioned (Kita *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Converti *et al.*, 2009); however, the forces applied during ultrasound treatment disrupted not only the membrane but also the cell wall (Azencott *et al.*, 2007). Different energy levels applied resulted in different extents of disruption (Bougrier *et al.*, 2005).

The goal of the present study was to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. Ultrasound at different energy levels was examined as pretreatment in terms of organic matter solubilization and cell wall disruption in order to elucidate its effect on anaerobic biodegradability. Due to the rise in temperature during ultrasound treatments, this treatment was also compared to thermal pretreatment without ultrasound.

III.2.11 Methods

III.2.11.1 Algae culture

The microalgae *Scenedesmus sp.* was collected from an open pond of an urban wastewater treatment plant located in Meze (France). This organism was selected due to its ability to grow in wastewater, a potential renewable source (Molinuevo-Salces *et al.*, 2010). The algae, along with adherent bacteria and other microorganisms, were inoculated into synthetic Z-8 nutrient broth (Staub, 1961) and incubated under continuous illumination with fluorescent lamps (Edison, 58 W) at 20°C. The photobioreactor consisted of an open tank of 0.5 m³. Mixing was provided by mechanical agitation and air flow of 12 L min⁻¹. Microalgae were grown in batch conditions and every 2 weeks, the culture reached a plateau in terms of absorbance (680/800 nm). Once this steady state was achieved, the biomass was allowed to settle by natural gravity.

The microalgae biomass used for the pretreatments had a total solids (TS)/chemical oxygen demand (COD) of 0.56, a total Kjeldahl nitrogen (TKN)/COD_t of 0.09, and ammonium (NH₄⁺)/TKN of 0.005. According to Pulz (2001), the total solid concentration in a raceway system is approximately 0.4 g L⁻¹, therefore, assuming a settling step between an hypothetical microalgae cultivation and pretreatment systems which allows around 10-fold increase on concentration, the microalgae suspension COD would be around 8 g O₂ L⁻¹.

III.2.11.2 Ultrasonic and thermal pretreatment

The ultrasonic apparatus was manufactured by Vibracell W75043. The probe was operated at a constant frequency of 20 Hz, but at varying power levels. The algae suspension was diluted with

distilled water to reach a predicted COD of about 8 g O₂ L⁻¹ and 0.25-L samples were treated in batch mode. Solutions were placed in a plastic vessel without temperature regulation. Treatment time was 15 min, except for one test that lasted 30 min. Tableau III-3 lists the set-up conditions for the pretreatments.

Tableau III-3 : Initial set-up conditions during ultrasound pretreatment applied to *Scenedesmus* ecosystem.

Power amplitude (%)	Ultrasonic time (min)	Es (MJ/kg)	Temperature achieved (°C)
40	15	35.5	56
50	15	47.2	62
70	15	76.5	75
90	15	100.7	85
70	30	128.9	85

Es: energy supplied.

Specific supplied energy (Es) ranged from 0 to approximately 130 MJ/kg, calculated according to Eq. (1): $ES = Pt / VTS_0$

where P is the ultrasonic power, t is the ultrasonic time, V is the volume of solution treated and TS₀ refers to the initial total solids. Since no cooling system was used to decrease the inherent increase of temperature caused during sonication, thermal treatment at temperatures observed during sonication (70 and 80°C) were also carried out. Heated water was pumped into the reactor jacket, and the final temperatures were achieved within approximately 25 min. The elapsed time was defined as the amount of time required to heat the microalgal biomass to the desired temperature. Biomass was continuously stirred during thermal treatment to avoid temperature gradients. Similarly to the ultrasonic pretreatment, microalgae suspension was adjusted to a COD of 8 g O₂ L⁻¹.

III.2.11.3 Batch anaerobic biodegradability test

Reactors consisted of 0.6 L glass bottles. The tests were run at 35°C for approximately 30 days. Batch tests were carried out in duplicates for each sample and blanks. Anaerobic biomass was granular sludge collected at a sugar factory in Marseille (France) with a total solids (TS) concentration of 62 g L⁻¹ and VS/TS of around 76%. For the determination of endogenous methane production, blanks containing only anaerobic sludge were run. Microalgae biomass and anaerobic sludge were mixed to attain a ratio of COD substrate/VS inoculum of 0.5. Quantities were calculated to achieve a final liquid volume of 0.23 L, allowing a gas headspace of approximately 0.37 L. Fifty grams per liter of calcium carbonate was added to provide buffering capacity and a pH of 7-8 was observed at the beginning of the experiments. In order to remove oxygen, the headspaces were flushed with nitrogen for 10 min. The

reactors were placed in a constant temperature room. The volume of biogas produced was calculated by measuring the pressure of the bottle headspace.

III.2.11.4 Analysis

Total solids (TS), volatile solids (VS) and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were measured according to standard methods (Eaton *et al.*, 2005). COD was analyzed by a colorimetric method using Hach 01500 mg L⁻¹ vials. Soluble fractions were obtained after centrifugation (mini-spin Eppendorf, 15 min, 12,100 g). Volatile fatty acids (VFA) were measured in the soluble phase by gas chromatography on a GC-8000 Fisons instrument equipped with a flame ionization detector. Ammonium and phosphate were analyzed in the soluble phase by ion chromatography (DIONEX ICS 3000) using conductivity detection. Biogas composition was determined by gas chromatography utilizing a Shimadzu GC-8A instrument equipped with a thermal conductivity detector.

Particle size measurement was performed by using a LS 200 laser diffraction particle size analyzer (Beckman Coulter). A dual-fluorescence based method was employed for determining cell integrity. Viability was assessed using the vital stain Sytox Green (Invitrogen S7020). Damaged cells stained green, while intact cells were red. Optimal final concentration used was 5 mM in DMSO and incubation time of 5 min. The Sytox Green coloration of microalgal cells was performed as described by Sato *et al.* (2004). Samples were observed using an Olympus BX60 microscope equipped with a “fluorescein filter” (500 nm). Fluorescence images were acquired with a CCD camera (Nikon Digital Camera 1200F).

III.2.12 Results and discussion

III.2.12.1 Effect of pretreatments on particle size distribution

The effect of specific energy on particle size distribution is reported in Fig. III-7A. For untreated microalgae biomass, the particle size profile presented a first peak with the highest volume percentage (5.8%) at 7.4 μm while the other three peaks were centered at 36, 84 and 213 μm . Different profiles were registered for the pretreated samples. The peak with the highest volume percentage was shifted to 5.1 μm . The lowest E_s resulted in an increase in the volume percentage (6.5%) of particles with this lower diameter while the region with three peaks observed in the untreated samples changed to a single peak centered at 76 μm . The volume of particles encountered at 5.1 μm decreased for the rest of the E_s applied. A different trend was observed for the bigger particles as a high percentage of particles in the region ranging from 58 to 400 μm was observed. Furthermore, a narrow peak with a high volume percentage (4.4%) was obtained at 234 μm . The lowest supplied energy resulted in an increase in smaller particles while higher E_s values had a high impact on larger-sized particles because of reflocculation processes taking place due to the release of intracellular molecules (Gonze *et al.*,

2003). Low energy levels as well as low sonication times causes the deagglomeration of flocs (Gonze *et al.*, 2003; Tiehm *et al.*, 2001) while increasing one of the two parameters promotes the disruption of the cell wall. In this manner, it can be inferred that the two lower Es evaluated in the present study resulted in floc deagglomeration while higher Es caused the disruption of cells. The cell lysis induced the reflocculation of particles, thereby shifting particle size towards higher diameters.

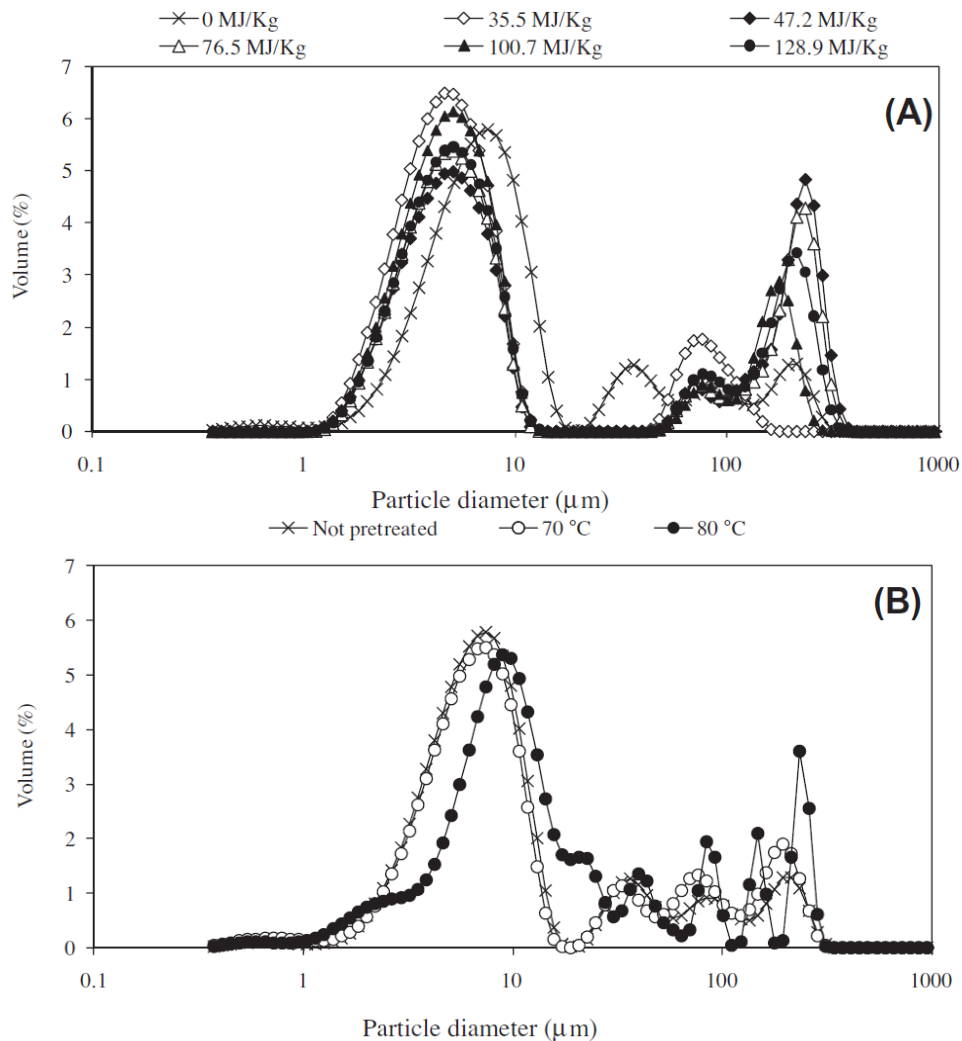


Figure III-7 : Particle size distribution for different Es applied during ultrasound (A) and different temperatures applied during thermal pretreatment (B) of Scenedesmus biomass

The thermally pretreated samples exhibited different behaviors (Fig. III-7B). Pretreated samples at 70°C presented almost the same profile as untreated microalgae biomass. None of the two evaluated temperatures caused a decrease in particle size. Nevertheless, at 80°C, the highest volume percentage shifted to a higher particle diameter (9.8 μm) compared to the untreated sample (7.4 μm). Additionally, the first peak became wider, ranging from 1.3 to 33 μm, while no clear differences with regard to the other samples was discernible for the multi-peaked area. Similarly to the trend observed during ultrasound pretreatment, the thermally pretreated biomass at 80°C showed reflocculation. The

reflocculation of particles suggested that cell wall disruption was taking place. Tableau III-4 shows values obtained for d50, defined as the diameter at which 50% of the volume of particles presented that diameter or lower. The lowest E_s applied (35.5 MJ/kg) resulted in a decrease in the d50 by 44% with regard to the untreated sample. E_s of 47.2-128.9 MJ/kg resulted in similar values, averaging 21%. The opposite tendency was observed with thermally treated microalgae biomass. While biomass treated at 70°C presented a similar d50 as the untreated sample, treatment at 80°C increased the d50 to 11.2 μm .

Tableau III-4 : d50 for different energy levels supplied by ultrasound and different temperatures applied during thermal treatment

		Es (MJ/kg)					
		0	35.5	47.2	76.5	100.7	128.9
d50 (μm)	8	5.3	6.7	6.4	5.8	6.3	
		T(°C)					
		20	70	80			
d50 (μm)	8	8.2	11.2				

It should be stressed out that microalgae biofuel production as well as pretreatments are still in their infancy and data is scarce. Even though the similarities between activated sludge (AS) and microalgal biomass may not be as extensive as claimed (González-Fernández *et al.*, 2011a), both sonicated substrates will be compared due to some resemblance. The highest particle size reduction on microalgae biomass was achieved by the lowest E_s (35.5 MJ/kg). With regard to the d50 decrease, better results were attained when sonicating AS. A 50-60% decrease in d50 was observed when applying an E_s of 12-15 MJ/kg (Gonze *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2010). This higher impact on particle size of ultrasound on AS (25-67 μm , Gonze *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2010) compared to microalgal biomass (8 μm for *Scenedesmus*) may be attributed to the initial mean size of particles. Macroflocs are more susceptible to ultrasound disruption due to larger surface areas and weaker binding forces compared to microflocs (Show *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2009).

III.2.12.2 Effect of pretreatments on soluble organic matter

Ultrasonic pretreatment provided the highest release of CODsol (Fig. III-8). CODsol increased 2.2 to 3.1-fold with increasing E_s . These values are quite low when compared with CODsol release during sonication of AS. As depicted in Fig. III-9, at low E_s , COD solubilization can reach almost 32% for AS (Bougrier *et al.*, 2005) compared to 3% attained with *Scenedesmus* biomass. A similar higher impact can be observed for larger E_s . While AS CODsol increased to 61% (Yan *et al.*, 2010), the highest E_s applied on microalgal biomass led to %COD of around 8 (present study).

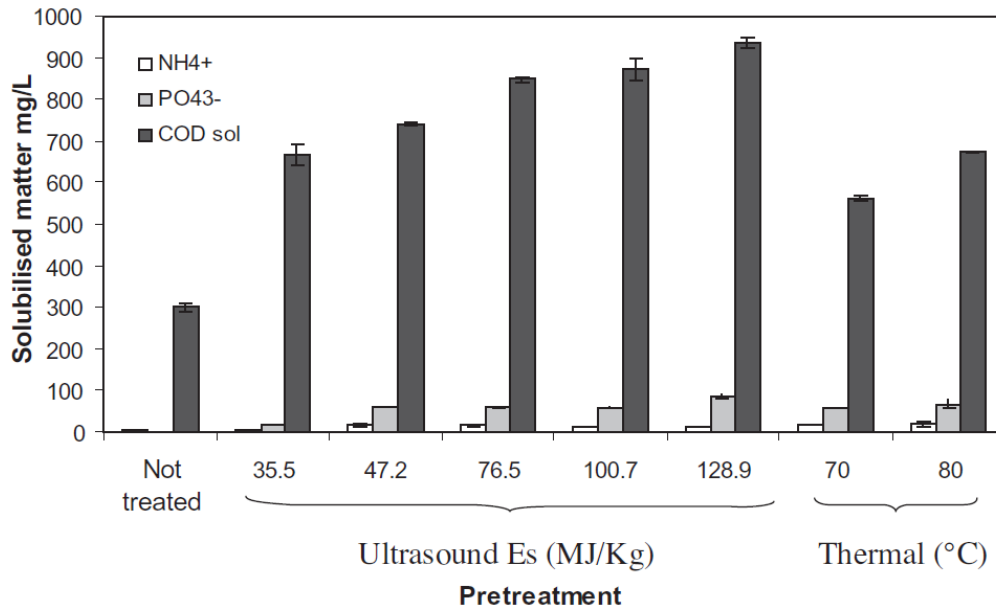


Figure III-8 : Ammonium, phosphate and soluble chemical oxygen demand at different Es applied during ultrasound and different temperatures during thermal application.

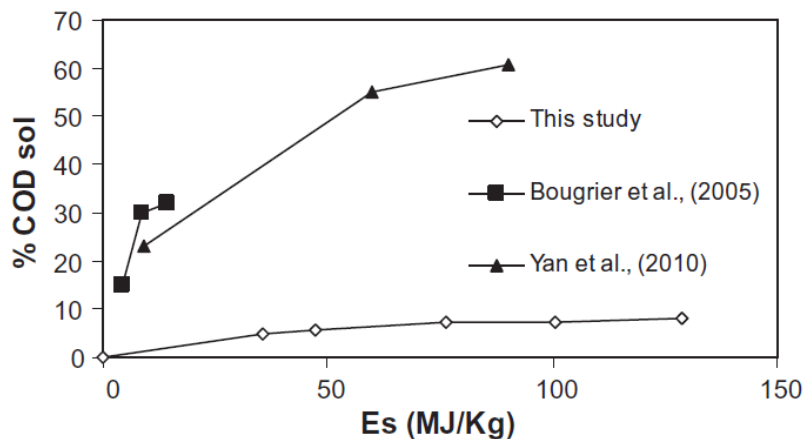


Figure III-9 : Comparison of COD solubilization obtained with activated sludge and *Scenedesmus* biomass under different ultrasound energy inputs. (Triangles and squares correspond to sonicated AS while rhombus shapes represent *Scenedesmus* biomass.)

The lowest Es of 35.5 MJ/kg increased the ammonium and phosphate content 1.1 and 8-fold, respectively. Higher Es (47.2-128.9 MJ/kg) increased ammonium and phosphate levels 3.5 and 30-fold, respectively, regardless of the Es. The opposite trend was observed with AS. Ammonium was released to a greater extent than phosphate (Yan *et al.*, 2010). AS sonicated at 90 MJ/kg increased ammonium and phosphate 12- and 2.5-fold, respectively. The difference in release of phosphate and ammonium between AS and algae biomass could be due to the fact that glycoproteins are the main component of the cell wall of AS microorganisms whereas *Scenedesmus* presents a carbohydrate-based cell wall (Takeda, 1996). The thermally pretreated samples exhibited lower solubilization of organic matter while similar values were obtained for ammonium and phosphate (Fig. III-8). CODsol increased 1.9- and 2.3-fold for biomass treated at 70 and 80°C. Those values are quite low when compared to sludge

data presented by Appels *et al.* (2010) who showed a 2.9- and 25.6-fold increase in soluble organic matter when applying temperatures of 70 and 90°C for an hour. Once again, these data are evidence of the *Scenedesmus* cell wall's resistance towards thermal and ultrasound pretreatments.

Biomass treated at 70°C released ammonium and phosphate in the same range as biomass treated at high Es. Slightly higher values were obtained for biomass treated at 80°C, achieving increases of 4.8-fold for ammonium and 33-fold for phosphate.

III.2.12.3 Effect of pretreatments on microalgal cells

Sytox green was employed to determine whether cell wall disruption of microalgae occurs. No counting of cells was performed since this analysis was only employed to qualitatively elucidate cell disruption. Results of Sytox staining of untreated, sonicated and thermally pretreated biomass are shown in Supplementary Fig. S1. Untreated biomass and biomass treated at an Es of 35.5 and 47.2 MJ/kg only contained intact (red) cells. Therefore, organic matter solubilized during these pretreatments did not correspond to intracellular material but likely to exopolymers released from the cell wall. This mucilaginous layer has been described for microalgae (Hegewald *et al.*, 1975). Application of an Es of 76.5 MJ/kg caused some cell damage as green cells were observed. Application of an Es of 100.7 and 128.9 MJ/kg resulted in higher numbers of green cells and hence cell wall disruption was confirmed. Under these Es pretreatments, organic matter released was the results of exopolymers and intracellular compounds.

Alteration of cell wall integrity was also observed for the thermal pretreated biomass. While a few cells turned green in biomass pretreated at 70°C, cells pretreated at 80°C exhibited a large number of green cells. Furthermore, the picture corresponding to 80°C pretreated biomass not only exhibited cell wall damage but also the formation of aggregates as mentioned in Section III.2.12.1.

III.2.12.4 Effect of pretreatments on batch anaerobic digestion

Cumulative methane production over a period of 34 days is shown in Fig. III-10. All sonicated biomass exhibited higher methane production during the first days of digestion compared to untreated biomass whereas at the end, samples treated with the two lowest Es did not show improvement in methane yields. During the first 12 days of digestion, methane production rates were 2-fold higher for the two lowest levels of Es and 4-fold higher for the other three levels of Es. After that, methane production rates started to decrease for all samples subjected to ultrasound treatment.

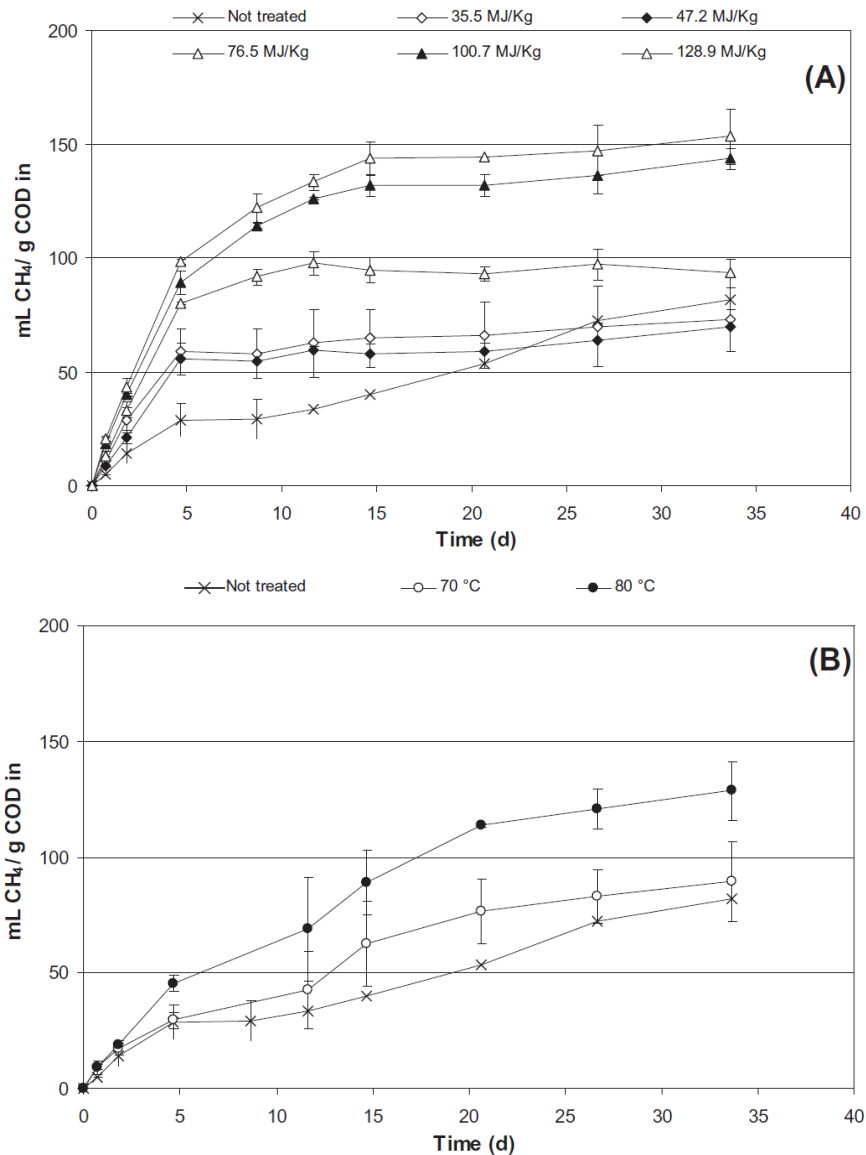


Figure III-10 : Methane production per gram of initial COD for each sample (untreated and pretreated) and each pretreatment (A) ultrasound and (B) thermal application.

As shown in Table III-5, at the end of the experimental time (34 d), no differences were observed for the two lowest Es (35.5 and 47.2 MJ/kg).

Tableau III-5 : Overview of different measured and calculated parameters obtained during anaerobic digestion of untreated and ultrasound- and thermally pretreated *Scenedesmus* biomass.

	Ultrasound treatment (MJ/kg)						Thermal treatment (°C)	
	Not treated	35.5	47.2	76.5	100.7	128.9	70	80
Biogas CH ₄ (%)	62.3	63.7	63.6	64.8	65.1	65.1	64	63.9
Methane production (mL CH ₄ /g COD in)	81.8	73	69.5	93.3	143.5	153.5	89.3	128.7
Methane enhancement	1	0.9	0.8	1.1	1.8	1.9	1.1	1.6
Biodegradability (%)	23.4	20.9	19.9	26.7	41	43.9	25.5	36.8

Low methane yield enhancement (14%) was recorded for Es of 76.5 MJ/kg, while the two highest Es supported enhancements of 75% and 88%. The methane content of biogas was slightly higher in

sonicated samples than in the untreated sample. The highest anaerobic biodegradability (44%) was reached with biomass exposed to the highest Es. Sonication with specific energies higher than 76.5 MJ/kg allowed faster digestion. Untreated microalgae biomass only attained 23% anaerobic biodegradability. A closer look at the relation of CODsol released during sonication pretreatment and methane production illustrated the importance of determining which type of organic matter was released (Fig. III-11). Even though an Es of 35.5 and 47.2 MJ/kg released COD, the absence of cell lysis proved this organic matter to be the result of exopolymer dissolution which did not increase methane production. In contrast, higher Es showed slight differences in CODsol; however, this slight increase together with the disruption of the cell contributed to enhanced methane production. Thermally treated and untreated microalgae biomass did not show any difference in methane production during the first days, but from day 5 onwards, biomass treated at 70°C presented a methane production rate slightly higher than untreated biomass and biomass treated at 80°C showed a markedly higher methane production rate. At the end, the methane yield increased by 9% and 57% for pretreated samples at 70 and 80°C, respectively. No differences in methane content of biogas were detected regardless of the temperature applied. Similarly to ultrasound, thermal pretreatment lowered retention times. More specifically, biomass treated at 80°C achieved the same methane yield as untreated biomass after 12 days while biomass treated at 70°C required 23 days. Ultrasound treatment at 76.5 MJ/kg raised the temperature to as high as 75°C and higher Es levels caused temperatures to rise to 85°C (Table IV-1). When the efficiency of conversion of sound energy into thermal energy was calculated according to Feng *et al.* (2009), the conversion efficiency of sonication into thermal energy ranged from 31% to 48%. Exposure to high temperatures during sonication could thus account for a significant part of cell disruption observed. The difference in methane production in samples that underwent thermal pretreatment or high Es sonication is likely not enough to justify the use of sonication as pretreatment approach. The slightly higher temperature reached during sonication may be the responsible for the higher biodegradability rather than the ultrasound pretreatment itself. A second possibility for this higher biodegradability could be the nature of soluble COD released. Bougrier *et al.* (2006) showed that the different pretreatments applied to AS released different organic matter. Likewise, this fact was proven for microalgal biomass when CODsol released during the pretreatment was compared with methane productivity (Fig. III-11). While a similar amount of CODsol was dissolved under sonication with a specific energy of 35.5 MJ/kg and by thermal treatment at 80°C, methane production was almost double after thermal treatment.

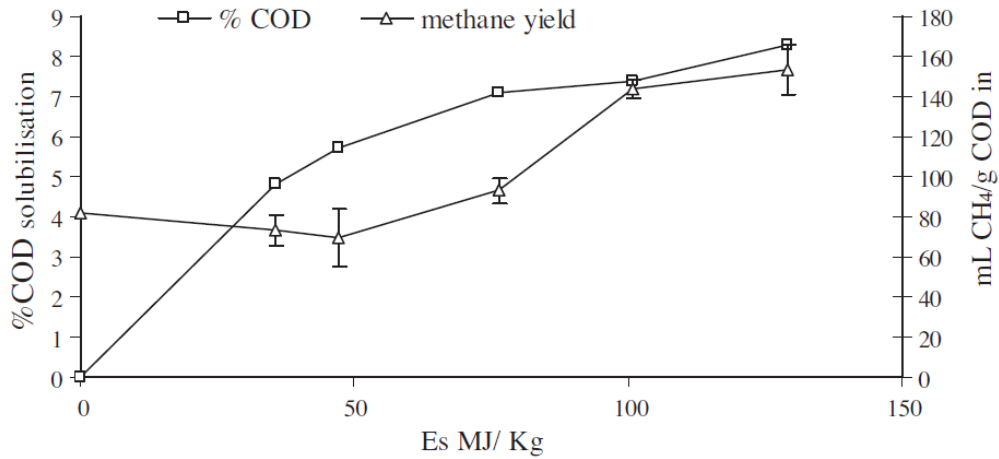


Figure III-11 : COD solubilization and methane production for the different Es applied during ultrasound pretreatment.

III.2.13 Conclusion

Scenedesmus biomass was subjected to ultrasound at different Es and compared with thermal pretreatment in order to enhance the inherent low methane production of this substrate. Particle size reduction was detected at low Es, while high Es resulted in floc formation. All pretreatments exhibited organic matter solubilization. The highest methane production was attained with biomass sonicated at 130 MJ/kg, but thermally treated biomass at 80°C produced only slightly lower amounts. Due to lower energy requirements, thermal treatment might be preferable to sonication.

III.3 Discussion

Pour un même temps de séjour, le consortium phytoplanctonique dominé par *Scenedesmus sp.* se distingue par une biodégradabilité particulièrement faible comparativement à *Chlorella vulgaris* (22% pour TSH=23 J contre 48% pour un TSH=28J). Si le fait d'avoir utilisé un inoculum anaérobie adapté au préalable à la dégradation de cette dernière microalgue peut contribuer à ce phénomène, d'autres travaux (Mussnug *et al.*, 2010) abondent en ce sens. Ces auteurs ont même retrouvé des cellules de *Scenedesmus obliquus* intactes après 6 mois dans un digesteur isolé de la lumière. Si il est envisageable que dans ces conditions défavorables, les algues puissent mobiliser un métabolisme hétérotrophe permettant leur survie, la présence d'une paroi résistante peut vraisemblablement expliquer ce phénomène. Pourtant d'autres études (Frigon *et al.*, 2013; McGinn *et al.*, 2012) rapportent pour le genre *Scenedesmus* des rendements de production de méthane particulièrement élevés comparativement (d'un facteur 3 à 4). Dans ces travaux cependant, la biomasse récoltée a été congelée au préalable, ce qui a vraisemblablement favorisé une atteinte de l'intégrité des parois, comme admis par un des auteurs (Frigon *et al.* 2013). La congélation est en effet susceptible de favoriser la biodégradabilité en agissant comme un prétraitement de la biomasse (Montusiewicz *et al.*, 2010; Schwede *et al.*, 2011). Enfin, dans notre cas, le stockage prolongé des cellules à 4°C avant utilisation dans le méthaniseur a pu favoriser l'expression d'un mécanisme physiologique qui dans des conditions environnementales défavorables permet aux cellules de renforcer leur paroi afin de survivre dans le tractus digestif de leur prédateurs (Donk & Liirling, 1997). La présence durable et fréquente des espèces appartenant au genre *Scenedesmus* dans les lagunes de traitement d'effluents et leur capacité à croître sur de larges qualités de rejets anthropique suppose une capacité avantageuse d'adaptation aux contraintes du milieu. Dans ces conditions, une conversion énergétique optimale par voie biologique seule n'apparaît pas suffisante.

Nous avons cherché à augmenter la biodégradabilité de cet écosystème en appliquant des prétraitements en amont du digesteur. La comparaison des performances obtenues avec un traitement thermique et ultrasonique montre un faible gain pour cette dernière technique. Ces résultats s'accordent aux travaux de Schwede *et al.* (2011), qui montrent par ailleurs que le traitement ultrasonique peut provoquer une modification de la matière organique entraînant une diminution des performances de conversion en méthane. D'un point de vue énergétique, le traitement thermique à basse température est une solution pertinente en ce qu'elle peut mobiliser la chaleur en excès produite lors de la valorisation du biogaz (Carrère *et al.*, 2010). Si la durée d'exposition est un facteur secondaire de l'efficacité par rapport à la température de traitement comme souligné par Passos *et al.* (2013) et Carrère *et al.* (2010), la concentration de la biomasse est déterminante pour atteindre un équilibre voire un bénéfice énergétique. Les travaux de Passos *et al.* (2013) ont fixés ce seuil à partir

d'une concentration de 3% de MV. La quantité d'eau présente détermine en effet, la quantité d'énergie consommée en excès pour atteindre la température voulue (Tang *et al.*, 2010).

Ces stratégies d'augmentation de la biodégradabilité anaérobie favorisent également une augmentation de la fraction d'éléments minéralisés dans la phase soluble. Cet effet est parfois recherché pour maximiser la valorisation des éléments minéraux notamment dans les filières de méthanisation des boues activées (Carrère *et al.*, 2010). Nous observons dans nos travaux une augmentation de la concentration en ammonium et en phosphate corrélée à l'intensité énergétique appliquée. De la même façon, l'étude de la méthanisation de *C.vulgaris* nous éclaire sur l'effet du temps de séjour appliqué au digesteur sur la minéralisation de l'azote, un temps de séjour plus long favorise une minéralisation plus importante. Si dans ces travaux nous n'avons pas atteint les seuils de toxicités de la forme ammoniacale de l'azote, ni observé ses effets sur l'activité du digesteur, l'augmentation de la charge organique supposera une augmentation de la concentration de ce toxique potentiel. Nous nous confrontons alors à une problématique ambivalente, dans une perspective d'optimisation du recyclage, la maximisation de la biodégradabilité *i.e* de la minéralisation suppose l'expression d'une toxicité potentielle de l'azote dans le digesteur.

IV Croissance sur digestat

SOMMAIRE

IV Croissance sur digestat.....	119
IV.1 croissance d'un écosystème phytoplanctonique marin sur un digestat synthétique	120
IV.2 Introduction	120
IV.3 Methods.....	122
IV.3.1 The marine consortium selected and culture conditions prior to experiments	122
IV.3.2 Experimental design	122
IV.3.3 Chemical measurements.....	123
IV.4 Biological measurements	123
IV.4.1 Optical density.....	123
IV.4.2 Microalgae abundance and carbon content conversion.....	124
IV.4.3 Bacterial abundance and carbon content conversion.....	124
IV.4.4 Estimation of carbon conversion efficiency and growth rates.....	125
IV.4.5 Bacterial diversity	125
IV.4.6 Statistical test	126
IV.5 Results and discussion	126
IV.5.1 Dynamics of the microalgal C content.....	127
IV.5.2 Dynamics of the bacterial carbon and diversity using acetate	127
IV.5.3 Dynamics of the bacterial C content and diversity associated with microalgae.....	128
IV.6 Conclusions	135

IV Croissance sur digestat

Avant propos

Comme souligné précédemment, l'utilisation d'un digestat comme ressource nutritive pour la croissance de microalgues est un aspect primordial sur lequel nous nous sommes focalisé et qui est au cœur de ce chapitre. Nous avons rapporté à la fois l'enjeu que constitue le recyclage des éléments nutritifs dans une perspective de déploiement industriel durable et également les capacités de ces organismes à croître sur un large spectre d'effluents. La composition de la plupart des digestats permet en effet de répondre aux exigences métaboliques majeures du phytoplancton.

Cette phase liquide peut être utilisée directement pour la culture de microalgues (Levine *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2011). Dans le contexte de ces travaux, il n'existe cependant que peu de données dans la littérature quant aux effets de la composition d'un digestat sur les interactions algues-bactéries dans un écosystème complexe. A cette fin, ce chapitre s'intéresse à la croissance d'un écosystème marin dominé par *Nannochloris sp.* sur un digestat synthétique. Il s'agit d'appréhender la dynamique des populations eucaryotes et procaryotes qui composent ce consortia, pour différentes conditions de température, de pH et d'irradiance, et de préciser l'effet, sur ces populations de la présence d'un composé organique, intermédiaire réactionnel de la digestion anaérobie, l'acétate.

IV.1 croissance d'un écosystème phytoplanctonique marin sur un digestat synthétique

Christophe Vasseur, Gaël Bougaran, Matthieu Garnier, Jérôme Hamelin, Christophe Leboulanger, Myriam Le Chevanton, Behzad Mostajir, Bruno Sialve Jean-Philippe Steyer, Eric Fouilland.

Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae–bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion.

Bioresource Technology

Volume 119, pp 79-87, 2012

Abstract : Association of microalgae culture and anaerobic digestion seems a promising technology for sustainable algal biomass and biogas production. The use of digestates for sustaining the growth of microalgae reduces the costs and the environmental impacts associated with the substantial algal nutrient requirements. A natural marine algae–bacteria consortium was selected by growing on a medium containing macro nutrients (ammonia, phosphate and acetate) specific of a digestate, and was submitted to a factorial experimental design with different levels of temperature, light and pH. The microalgal consortium reached a maximum C conversion efficiency (i.e. ratio between carbon content produced and carbon supplied through light photosynthetic C conversion and acetate) of 3.6%. The presence of bacteria increased this maximum C conversion efficiency up to 6.3%. The associated bacterial community was considered beneficial to the total biomass production by recycling the carbon lost during photosynthesis and assimilating organic by-products from anaerobic digestion.

IV.2 Introduction

Sustainable production of biogas by coupling microalgal mass production and anaerobic digestion is a promising technology for supplying bioenergy, in terms of production rates (Sialve *et al.*, 2009) and environmental impact (Collet *et al.*, 2011). The advantages of such coupling for large scale energy production are based on the direct use of organic residues (or by-products of biomass extracts/residues) of anaerobic digestion such as volatile fatty acids (e.g. acetate), phosphorus and nitrogen compounds (phosphate and ammonia) which sustain the growth of photosynthetic biomass and reduces the cost of culture media and final effluent reduction.

Not all algal species can grow efficiently using acetate and ammonia (NH₄) as main substrates. A few algal species have shown potential mixotrophy when growing on acetate (Perez-Garcia *et al.*, 2011) while microalgae usually assimilate ammonium more easily than nitrate (Eppley *et al.*, 1969). However, the assimilation of the ammonium cation is dependent on pH which may vary considerably especially

in non-buffered freshwaters resulting in the ammonia being toxic at high pH (Källqvist and Svenson, 2003). The use of marine waters as culture media appears to be a sustainable alternative for algal mass production freshwaters. Seawater is naturally buffered by carbonates and the salt could be considered to provide an osmotic barrier to the invasive growth of potential competitors.

A marine consortium constituted mainly of *Nannochloris spp* and an associated diverse bacterial community was isolated from a naturally highly-productive temperate marine coastal ecosystem (Thau Lagoon: Western Mediterranean). This consortium resulted from a 7-months batch culture using artificial seawater supplemented with PO_4 , NH_4 and acetate as P, N and C sources, without added vitamins. In this type of consortium, heterotrophic bacteria assimilate acetate naturally for their metabolism and may act as probiotics providing essential compounds (such as vitamins, CO_2) for microalgal growth (Grossart and Simon, 2007). Negative effects of bacteria are however possible when acting as parasites on microalgae leading to the death of their hosts and when efficiently competing for limiting nutrients (Grossart and Simon, 2007 and reference therein). As in natural conditions, the growth of the algal-bacterial consortium and resulting biomass will be driven by physical and chemical factors such as temperature, light and pH, with growth optima being potentially different for bacteria and microalgae. *Nannochloris spp* has been studied since the early 1980s for its potential in large-scale open air culture (Witt *et al.*, 1981). It was grown on a large scale to serve as food for rotifers, copepods, and oysters in aquaculture (Witt *et al.*, 1981). *Nannochloris spp* was found to be dominant in highly eutrophic waters of low salinity as well as in sea water/waste water mixtures. This marine species proved to be euryhaline, eurythermic and insensitive to nutrient changes (Cho *et al.*, 2007). Previous studies have suggested that given its adaptability, rapid growth rate and high nutritional value, *Nannochloris* is an excellent marine primary producer for industrial purposes (Cho *et al.*, 2007). The halotolerant species *Nannochloris oculata* had an optimum temperature of 23- 25°C (Cho *et al.*, 2007; Henley *et al.*, 2002). This suggests that growth of *Nannochloris spp* is well adapted to high light and high temperature environments such as those encountered in Mediterranean areas and is also tolerant to variations in pH and salinity (Henley *et al.*, 2002).

Although the culture of freshwater algae-bacteria consortia in sewage has been studied since the 50's (Oswald *et al.*, 1953), little is known about the potential of natural assemblages of marine microbial consortia to produce high biomass when coupled with an anaerobic digester.

A factorial experimental design with different levels of temperature, light and pH in batch culture was performed in order (i) to optimize the growth conditions of the algal-bacterial consortium under macronutrients specific of a simplified digestate and (ii) to investigate the relative effects of these factors, and their synergetic interactions, on the production of biomass and associated bacterial diversity. The factorial design appeared to allow effective evaluation of limiting factors in phytoplankton communities, saving time and space and providing statistical robustness (Leboulanger

et al., 2006).

IV.3 Methods

IV.3.1 The marine consortium selected and culture conditions prior to experiments

The natural marine microbial consortium, algae-bacteria, was originally isolated from Thau Lagoon, southern France (432405300N, 3 4101600E). The primary production of this lagoon supports one of the most productive oyster farms in France, as the highly productive microalgal communities are fed by recycled nutrients such as ammonium (Fouilland *et al.*, 2004). Prior to the experiment undertaken in the present work, this consortium was maintained for 7 months at 20°C in batch culture in seawater enriched using a modified Conway medium.

Anaerobic digestion is a biological process which converts organic matter into biogas and a nutrient rich subproduct, the digestate mineralizing organic matter containing nitrogen and phosphorus. In addition to methane, anaerobic digestion of organic matter produces ammonium and phosphate, which can then be used as a substrate for the microalgae, and volatile fatty acids such as acetate (Sialve *et al.*, 2009). In the present modified Conway medium, besides all trace elements in enrichment media, ammonium (NH₄Cl) replaced nitrate (NaNO₃) as the sole source of nitrogen, NaH₂PO₄ was added as source of phosphorus and acetate (NaC₂H₃O₂) was added as well. The initial acetate concentration was 92.5 ± 2.1 mg L⁻¹, phosphate concentration was 30 mg L⁻¹, and the ammonia concentration was 47.5 ± 1.9 mg L⁻¹. The nitrogen, phosphorus and carbon concentration used in this study were in the range of concentrations measured in various liquid digestates from previous studies (Albuquerque *et al.*, 2012; Ehimen *et al.*, 2011), and using a dilution factor of 10, as in Wang *et al.* (2009) where *Chlorella* was cultivated on an anaerobic digested dairy manure. In the present study, these macronutrients (N and P) are provided in non limiting concentrations, allowing the study of the effect of acetate on the algae-bacteria consortium. Light was maintained at an average of 261 ± 20 μE m⁻² s⁻¹ using OSRAM L18W/954 daylight fluorescent tubes.

IV.3.2 Experimental design

In order to optimize growth conditions of the algae-bacteria consortium, a 2^{3*} central composite design (CCD) was used (Lundstedt *et al.*, 1998). Optimization focused on temperature, irradiance and pH known to influence biomass production significantly. There were 17 photobioreactor (PBR) conditions in a single set of experiments generated around a proposed central point (temperature: 25°C, irradiance: 230 μE m² s⁻¹ and pH: 8). A combination of the 5 levels of the experimental factors was applied in 14 PBRs and 3 PBRs were replications at the central point allowing for the evaluation of experimental variance. The optimal culture conditions for microalgal, bacterial and total organic

content were estimated by statistical analysis using Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., USA). The experimental equipment used was described in detail in Marchetti *et al.* (2012). Each of the 17 PBRs was filled with 250 mL of freshly prepared, optically clear microbial consortium culture (initial concentration of microalgae = $7.3 \cdot 10^6$ cell mL⁻¹, and optical density at 680 nm of 0.069) limiting self-shading within the cells. During the 10 day batch experiment, photosynthetically available radiation (PAR, 400-700 nm) was continuously supplied through fiber optics into each photobioreactor. The PAR ranged from 11 to 450 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The pH was controlled by injecting CO₂ to acidify the media as required and the temperature was controlled. The pH ranged from 6 to 10 and the temperature ranged from 15°C to 35°C. The temperature, irradiance and pH were set to encompass the natural and culture conditions encountered under the Mediterranean climate and to allow a better definition of the optimal culture conditions for the microbial consortium. Continuous air bubbling (0.1 L min⁻¹) was provided for culture homogenization and preventing sedimentation.

IV.3.3 Chemical measurements

To determine the acetate concentrations, 2 mL subsamples were collected every 2 days and filtered through a GF/F filter (Whatman) to remove particulate matter and potential consumers and stored in the dark at 4°C. Acetate concentrations were then measured within 2 days using gas chromatography (GC-8000 Fisons instrument), equipped with a flame ionization detector (temperature of the oven and the detector were 120°C and 280°C, respectively). The maximum injection temperature was 250°C and the regeneration temperature was 200°C. An internal standard was used for quantification of the acetate concentrations. Subsamples were collected at the beginning and end of the experiment in order to determine the total carbon and nitrogen content of microbial assemblage (i.e. total C and N biomass). Three milliliter of the subsamples were filtered through precombusted (500°C for 5 h) Whatman GF/F glass-fiber filters. The filtered samples were dried at 60°C for 24 h, pelleted and analyzed for total carbon and nitrogen content using an Integra CN elemental analysis-mass spectrometry system (PDZ Europa Scientific, UK) and calibrated with glycine references every batch of 10-15 samples.

IV.4 Biological measurements

IV.4.1 Optical density

The optical density at 680 nm (OD) was measured as a proxy for biomass (Hulatt and Thomas, 2010). Three hundred microliter samples were collected from each photobioreactor and immediately analyzed using a spectrophotometer. A linear relationship between OD and besides total C content only measured at the beginning and at the end of the experiment, total C content (expressed in mg C

L⁻¹) was determined along the 10 days experiment.

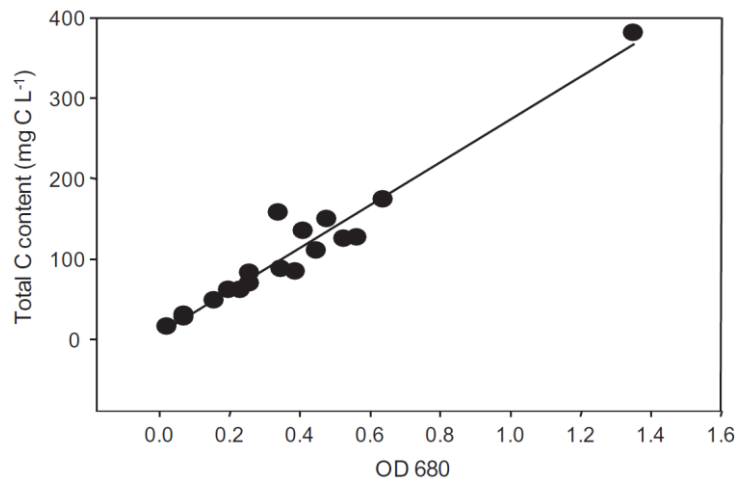


Figure IV-1 : Relationship observed between Total Carbon content (mg C L⁻¹) and Optical Density measured at 680 nm (OD 680) during the experiment for the whole data set.

for this consortium ($R^2 = 0.94$, $n = 18$, $p < 0.0001$, Fig.IV-1) giving Eq. (1):

$$\text{Total C content} = 266.06 \times \text{OD} + 7:34 \quad (1)$$

IV.4.2 Microalgae abundance and carbon content conversion

For microalgae abundance, 1.6 mL samples were collected daily from each culture and were fixed with formaldehyde (2% final concentration) and frozen at 80°C prior to analysis using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled argon laser (488 nm, 15 mW). Samples were thawed and beads of 2, 6, 10 and 20 µm diameter (YG polysciences) were added as internal fluorescence and size standards. The flow rate was calibrated using Trucount beads (ca. 4.5 µm, Becton Dickinson). Microalgae cells were detected using the red chlorophyll pigment fluorescence (>650 nm). The data were analyzed using Cell Quest Pro software (Becton-Dickinson). The abundances were converted into carbon content using the conversion factor of 2 pgC cell⁻¹ for *Nannochloris* (DuRand and Olson, 1998).

IV.4.3 Bacterial abundance and carbon content conversion

For bacterial abundance, 1.6 mL subsamples were collected daily from each culture, fixed with formaldehyde (2% final concentration) and frozen at 80°C prior to flow cytometric analysis. Samples were then thawed at room temperature and using an anionic detergent, Tween 80, was used to release bacteria attached to microalgal cells and aggregates. Tween 80 (0.2% final concentration) was added to 500 µL aliquots of the samples. The samples were mixed for 1 min and incubated for 15 min at room temperature. The bacteria were detached physically by 15 min sonication (75 W) in an ice bath to avoid heating the samples. Three hundred microliter aliquots of sonicated culture were sub-sampled and stained as described below.

The nucleic acids in the bacterial samples were stained for 15 min in the dark at room temperature with SYBR Green I (1:10,000 vol:vol, Molecular Probes). The bacteria were enumerated using the FACSCalibur flow cytometer detecting the 530 nm green fluorescence (FL1) of the stained nucleic acids of each bacterial cell. One micrometer and 2- μm yellow-green fluorescent cytometry beads (Polysciences) were added to the samples as internal standards for cell size and fluorescence emission, and Tru-Count control beads (Becton Dickinson) were added to determine the volumes analyzed. The bacterial carbon content was calculated using a conversion factor of 30 fgC cell⁻¹ for productive waters (Fukuda *et al.*, 1998).

IV.4.4 Estimation of carbon conversion efficiency and growth rates

The carbon conversion efficiency was calculated using Eq. (2):

$$\text{CE}(\%) = (\text{C content Produced} / \text{C supplied}) \times 100 \quad (2)$$

where the C content Produced was the difference between the maximal or final and initial carbon content estimated for each biological compartment during the incubation period. C Supplied was the initial concentration of acetate in the culture medium and/or the maximum photosynthetically fixed CO₂. The maximum photosynthetic fixed CO₂ was calculated from the light energy received during the whole incubation period and using the calorific content of phytoplankton factor of 541 kJ mol C⁻¹ (Williams & Laurens, 2010). The specific growth rate (μ , days⁻¹) was calculated according to the Eq. (3)

$$\mu = \ln(\text{Ct} - \text{C0}) / (\text{T} - \text{T0}) \quad (\text{Eq. 3})$$

where Ct and C0 are the abundances at the end and the beginning of the exponential phase, respectively, and t-t0 is the duration of the exponential phase (Jiang *et al.*, 2011).

IV.4.5 Bacterial diversity

In each PBR, 1.5 mL subsamples for bacterial diversity were collected daily. Each sample was immediately centrifuged for 5 min at 3000g. The pellets were kept frozen at -80°C prior to analysis. The bacterial diversity was determined by Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) analysis. The universal 16S rRNA gene primers W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG, *Escherichia coli* position F331) and 5'-fluorescein phosphoramidite labeled W104 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC, *E. coli* position R533) were used (Delbes *et al.*, 2001). Each PCR mixture (50 μL) contained 1X Pfu Turbo DNA polymerase buffer, 200 μM of each dNTP, 130 ng of each primer, 0.5 U of Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene) and 1 ng of genomic DNA. PCR was carried out in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf). The 16S rRNA genes were amplified at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles performed at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, with a final

extension at 72°C for 10 min. The size of the PCR products (200 bp) was assessed by 2% gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. One microliter of diluted PCR products was mixed with 18.8 µL of formamide and 0.2 µL of internal standard GeneScan ROX (Applied Biosystems). Samples were heat-denatured at 95°C for 5 min and immediately cooled in ice. CE-SSCP electrophoresis was performed in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) with 50 cm long capillary tubes filled with a non-denaturing 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems). Samples were eluted at 12 kV and 32°C for 30 min. The CE-SSCP profiles were aligned with the internal standard to take account of inter-sample electrophoretic variability. The CE-SSCP profiles were normalized using the StatFingerprints R library (Michelland *et al.*, 2009) using a standard procedure (Fromin *et al.*, 2002). The Simpson diversity index was estimated using the default parameter of StatFingerprints, which takes into account the number of species (number of peaks) as well as their relative abundance (area under each peak).

Bacteria populations were identified using 16S rDNA phylogeny. Partial 16S rDNA sequences were amplified and cloned in TOPO® TA Kit (Invitrogen), and then twenty clones were selected for sequencing. Sequences were aligned and the phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method. Distance matrices were calculated using Kimura's 2-parameter distances. The robustness of the topologies was assessed by the bootstrap method with 500 replicates.

IV.4.6 Statistical test

A systematic experimental method to optimize total and microbial biomass was designed using Central Composite Design (CCD). Temperature (T), irradiance (I), and pH were studied as the three independent variables. Statgraphics (StatPoint Technologies Inc. (USA)) was used for regression analysis and analysis of variance (ANOVA). All statistics were considered significant at $p < 0.05$.

IV.5 Results and discussion

Very few studies have evaluated the biomass production and accumulation of marine algae-bacteria consortia within a biotechnological context (Fouilland, 2012). Selected marine microalgae cultivated using wastewaters or fertilizers showed maximal growth rates varying between 0.15 and 0.54 days⁻¹ and a maximal abundance reaching 1×10^6 and 55×10^6 Cell mL⁻¹ for *Chaetoceros coarctatus* and *Nannochloropsis*, respectively (Jiang *et al.*, 2011; Kim and Jeune, 2009; Rocha *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2006). The maximal growth rate (0.72 days⁻¹) and the maximal cell abundance (70.2×10^6 Cell mL⁻¹) observed in the present study (Table IV-1) were greater than previously observed with marine microalgae. The influence of three variables (temperature, T; irradiance, I and pH) on the microbial community biomass and diversity was examined. The experiment lasted for 10 days allowing the microalgae mass to reach its maximum carrying capacity. The light, temperature and pH

conditions used in this study, detailed in Table IV-1, were selected to cover a wide range of natural climatic and culture conditions ($15^{\circ}\text{C} < T < 35^{\circ}\text{C}$; $11 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1} < I < 450 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; $6 < \text{pH} < 10$).

IV.5.1 Dynamics of the microalgal C content

The maximum C content of *Nannochloris* spp varied between 16.7 and 165 mg C L⁻¹ (Table IV-1) and was observed on average after 8 ± 1 days of incubation (Fig. IV-2A). It was always greater than the initial C content concentration (14.6 mg C L⁻¹). The highest value was measured under the highest light conditions (450 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, PBR 4). Irradiance and temperature had a statistically significant effect on the maximum carbon content (Table IV-2). High pH conditions did not seem to have a strong influence on microalgal C content production. The optimal conditions predicted for the maximum C content (134.5 mg C L⁻¹) were close to those for PBR 4 which had the highest level of light supplied (Table IV-1). The microalgal C conversion efficiency (equivalent to the photosynthetic efficiency, i.e. the conversion of light energy into microalgal carbon content) ranged between 0.03 % and 3.64 %, and with a mean of 0.52 ± 0.82 % over the 17 conditions. The highest C conversion efficiency was measured at the lowest light intensity (11 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the lowest C conversion efficiency was observed at the highest temperature (31°C) and pH (9.2), resulting in the lowest final algal C content observed. The optimized microalgal C conversion efficiency was 4.0 % (Table IV-3). The mean microalgal C conversion efficiency measured in the experiment was one order of magnitude lower than the theoretical maximum photosynthetic efficiency but was close to the empirical values reviewed by Williams and Laurens (2010). The range of C conversion efficiency observed in this study is in agreement with the photosynthetic efficiency of 1% observed by Hulatt and Thomas (2011) for an outdoor photobioreactor in a mid-temperate zone. These results suggest that marine microalgae using anaerobic digester effluent as a medium will have a similar microalgal C conversion efficiency to those in a more conventional culture medium.

IV.5.2 Dynamics of the bacterial carbon and diversity using acetate

The bacterial carbon content was 0.6 mg C L⁻¹ at the beginning of the experiment. A first peak of bacterial carbon content occurred within the first two days of the experiment in all the PBRs (Fig. IV-2B), coinciding with acetate exhaustion. The dissolved organic carbon potentially exudated by microalgae was considered negligible at the beginning of the incubation period. Prokaryotic diversity (in this case heterotrophic bacterial diversity as no cyanobacteria were observed) measured during the first peak of bacterial C content was 1.6 ± 0.4 (simpson diversity index). This suggested that a specific group of bacteria grew on a single source of carbon. The bacterial community was dominated by γ -proteobacteria; mainly *Pseudomonas stutzeri* and α -proteobacteria related to *Labrenia*, *Hoefflea* and *Sulfitobacter*. Bacterial diversity seemed, therefore, to be constrained by the single organic carbon

source that was available (Fig. IV-3).

The maximum bacterial C content observed during the first days of the experiment varied between 5.9 and 19.9 mg C L⁻¹. The bacterial C conversion efficiency based on acetate (i.e. the conversion of acetate into bacterial C content) ranged between 1% and 20%, being maximum when the temperature was 19°C at pH 6.8 and minimum when the temperature was 25°C at pH 10. The pH and temperature had a significant effect on the maximum bacterial C content from acetate. However, the optimum temperature and pH conditions were close to those for the maximum C content of *Nannochloris spp.* This suggested that both bacterial and phytoplankton C production may be optimal under similar growth conditions. The addition of acetate increased the mean microbial C conversion efficiency by 40% (i.e. conversion of light energy and initial acetate into C content of both *Nannochloris* and bacteria) in comparison with the mean C conversion efficiency based on microalgae only (Table IV-1). Anaerobic digester effluents (ADE) may contain high quantities of volatile fatty acids (VFA). Of these, acetate is one of the major products of anaerobic fermentation of organic matter. Acetate is also preferentially consumed by heterotrophic bacteria in both freshwater and marine systems. The bacterial C content decreased rapidly after peaking, at acetate exhaustion (within 2 days) in this study, confirming the importance of acetate for the growth of this bacterial community. Previous mixed cultures of bacteria and one microalgae species were shown to be capable of simultaneous removal of organic acids, pollutants and inorganic elements (Tang *et al.*, 2010). The association between microalgae and bacteria in mass cultures is, therefore, clearly important.

IV.5.3 Dynamics of the bacterial C content and diversity associated with microalgae

A second bacterial C content maximum in the PBRs occurred towards the end of the experiment (Fig. IV-2B). This increase in bacterial C content followed the growth of *Nannochloris spp.*, when the readily available carbon source was exhausted. This suggested that this bacterial community was more dependent on microalgal exudation at the end of incubation. This second maximum of bacterial C content was observed on average 9 ± 1 days after the beginning of incubation. This maximum bacterial C content was assumed to depend directly on microalgae exudation and varied between 1.8 and 26.6 mg C L⁻¹. As for the maximum microalgal C content, irradiance and temperature were the two factors that had a significant effect on this second maximum bacterial C content. The optimum conditions for the maximum bacterial C content on exudates were obtained for the PBRs 2 and 4 corresponding to the highest microalgal C content (Table IV-1). The optimized irradiance condition was similar to that obtained for the maximum C content of *Nannochloris spp.* However, the optimum conditions for the maximum bacteria C content on exudates suggested more light and higher temperature conditions than for the maximum bacterial C content on acetate (Table IV-2). These results suggest that this

bacterial community was different from that observed during the first 2 days. The prokaryotic simpson diversity index increased from 1.6 ± 0.4 to 2.1 ± 0.4 from the first to the last incubation period. A drastic change in the prokaryotic community occurred during the experiment from the initially dominating *Pseudomonas* genus to the finally dominating genus *Cytophaga*, and *Flavobacterium*, closely related to the genus *Kordia*. The α -proteobacteria group remained constant throughout the experiment (Fig. IV-3). During the culture period strong algal-bacterial coupling was observed as has been suggested for productive systems (Fouilland and Mostajir, 2010). Such coupling suggested that bacteria used organic carbon released by microalgae for their own growth. Microalgal exudates may represent a significant fraction of carbon fixed by the algae from 2% to 10% during exponential growth rising to 10-60% in the stationary phase. Hulatt and Thomas (2010) and reference therein reported that the release of algal dissolved organic matter (DOM) in natural systems could reach 80% of that fixed by photosynthesis. The presence of bacteria growing on microalgal exudates recycles various dissolved by-products, potentially lost by microalgae, into biomass and, therefore, reduces the loss of algal biomass productivity reported by Hulatt and Thomas (2010). Without introducing any other nutrient inputs, the presence of such bacteria increased the mean C conversion efficiency by 62% and 17% compared with the presence of such bacteria increased the mean C conversion efficiency by 62% and 17% compared with the presence of (i) microalgae only and (ii) microalgae and bacteria using acetate, respectively (Table IV-1). The associated marine bacterial community could be, therefore, considered beneficial to the total C production, allowing a significant increase in C conversion efficiency.

Tableau IV-1 : Experimental conditions for the 3 variables: Temperature (T), irradiance (I) and pH. Experimental results for concentrations of C content, total content C:N ratio, microalgal abundance and growth rates, index of microbial diversity, and carbon conversion efficiency (%) obtained for (i) microalgae, (ii) microalgae & bacteria on acetate and (iii) microalgae & bacteria on acetate & bacteria on exudates, obtained after the 10 day experiment in the 17 photobioreactors. n.d. no data (MA : microalgal; BA Bacterial)

PBR	Parameters			Total content		Max MA C content (mg C L ⁻¹)	Max BA C content		Microalgal		Simpson index		Conversion efficiency (MA+BA)		
	I	T	pH	C:N ratio (mg C L ⁻¹)	C:N		Acetate (mg C L ⁻¹)	Exudates (mg C L ⁻¹)	Max abundance (10 ⁶ cell mL ⁻¹)	Growth rate (days ⁻¹)	Prokaryotic	Eukaryotic	MA C (%)	on acetate C (%)	on acetate + exudate C (%)
1	230	25	8	135.2	5.4	97.8	17.9	9.3	31.5	0.38	1.9	1.4	0.58	0.7	0.77
2	360	31	6.8	157.9	6.6	93.4	18.1	30.7	0.5	0.55	1.9	2.4	0.4	0.49	0.65
3	230	25	6	82.3	5.9	6.5	9.6	4.9	21.4	0.47	2	1.4	0.31	0.37	0.4
4	450	25	8	173.3	6.9	165.6	11.2	26.6	67.8	0.43	2	n.d.	0.48	0.51	0.6
5	11	25	8	27.6	0.6	33.2	14.8	5.5	8.8	0.16	2.1	1.2	3.64	5.36	6.27
6	230	35	8	15.8	10.1	42.5	11.9	11.3	0.0	0.72	n.d.	n.d.	0.79	1.07	1.38
7	360	19	9.2	125.4	9.6	49.5	7.4	2.4	24.7	0.61	1.9	1.8	0.18	0.21	0.23
8	360	31	9.2	126.3	1.2	26.3	1.5	4.8	1.2	0.13	2.8	1.9	0.04	0.09	0.11
9	100	19	6.8	61.8	0.5	45.7	19.9	2.6	22.7	0.43	1.6	1.2	0.4	0.64	0.68
10	230	25	8	87.6	5.2	76.1	19.6	3.5	29.1	0.39	2.1	1.3	0.38	0.5	0.52
11	100	31	9.2	14.9	24.1	16.7	14.3	6.6	4.3	0.18	3.2	0.9	0.03	0.25	0.36
12	100	31	6.8	48.1	6.3	3.5	13.2	7.3	70.2	0.19	2.2	n.d.	0.26	0.42	0.51
13	230	15	8	69.3	5.5	54.9	5.9	4.2	24.6	0.4	1.9	1.1	0.28	0.32	0.35
14	360	19	6.8	83.9	4.9	8.0	12.4	1.8	29.3	0.47	1.5	1.3	0.26	0.31	0.31
15	230	25	10	380.2	48.1	4.3	1.4	4.3	9.1	0.45	2.6	2.2	0.18	0.18	0.21
16	230	25	8	11.0	6.7	75.1	18.2	172	3.5	0.29	2.2	1.7	0.34	0.44	0.53
17	100	19	9.2	60.7	10.5	27.2	8.4	1.9	7.9	0.27	n.d.	n.d.	0.23	0.37	0.4

Tableau IV-2 : Optimized T, I and pH conditions maximizing C content of each microbial compartment.

Optimization	I	T	pH	Optimum	R2
Microalgal C content (mg C L ⁻¹)	450.0 ^a	24.7 ^a	7.5	134.5	78.6
C content of bacteria on acetate (mg C L ⁻¹)	200.3	25.9 ^a	7.6 ^a	18.8	76.2
C content of bacteria on exudate (mg C L ⁻¹)	450.0 ^a	35.0 ^a	6.4	48.9	76.5
Total C content (mg C L ⁻¹)	45.0	22.1	10.0 ^a	331.5	69.8

Tableau IV-3 : Optimized T, I and pH conditions maximizing the C conversion efficiency for each microbial compartment.

Optimization	I	T	pH	Optimum
Microalgae C conversion efficiency	11.0 ^a	2.5	0.8	0.4
Microalgae + bacteria on acetate bacteria C conversion efficiency	11.0 ^a	2.5	0.8	4,9
Microalgae + bacteria on acetate and exudate C conversion efficiency	11.0 ^a	2.5	0.8	5,4

^a Variable having a significant effect.

3.4. Dynamics of the total C content and pH influence

Over the course of the 10 day experiment, the total C content increased from 29 mg C L⁻¹ to a maximum of 380 mg C L⁻¹ (Table IV-1, Fig. IV-2C). The total content C:N ratio was 6.8 ± 0.3 at the beginning of the experiment and ranged from 4.9 and 48.1 at the end of experiment at the lowest (6.8) and highest pH (10.0), respectively, (Table IV-1). The pH had a significant effect on the total C content and the C:N ratio (Table IV-2). When the pH was >9 a well marked increase in total C content (>150 mg C L⁻¹) was measured (Table IV-1). The optimum conditions for the maximum total C content were close to those for PBR 15 and were characterized by very high pH (Table IV-2).

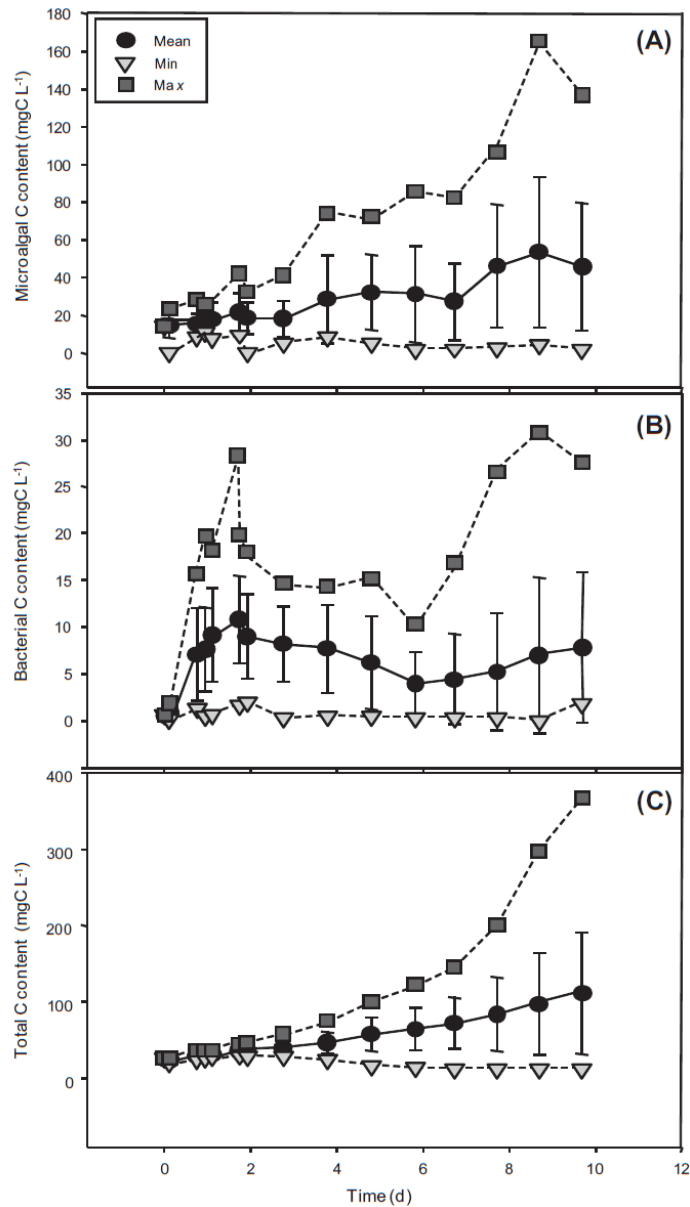


Figure IV-2: Temporal variations of the Carbon content (mg CL^{-1}) during the 10 days experiment for: (A) Microalgae, (B) Bacteria and (C) Total C content. Minimal (min), maximal (max) and mean values measured under the 17 experimental conditions.

The high C:N ratio (up to 48) measured in this study suggested that this total C content was probably largely exudated microalgal carbohydrates which precipitated and accumulated in particulate form at high pH. Chin *et al.* (1998) showed that free marine DOM can aggregate to form particulate matter. They showed that an increase in seawater pH (from 8.5 to 9), as observed in microenvironments in conditions of high productivity, could explain the flocculation of marine DOM through the formation of organic marine snow and aggregates leading to an increase in sedimentation. The presence of a polysaccharide-enriched organic matter responsible for the adsorption of natural marine organic matter at pH 10 was also shown by Quigley *et al.* (2001). In this experiment, a pH above 9 induced a strong, rapid sedimentation of particulate matter (visual observation during the experiment). This suggested that artificially increasing the pH in marine cultures might greatly improve the recovery of particulate carbon and facilitate culture harvesting as has been suggested by other authors (Chen *et al.*, 2011).

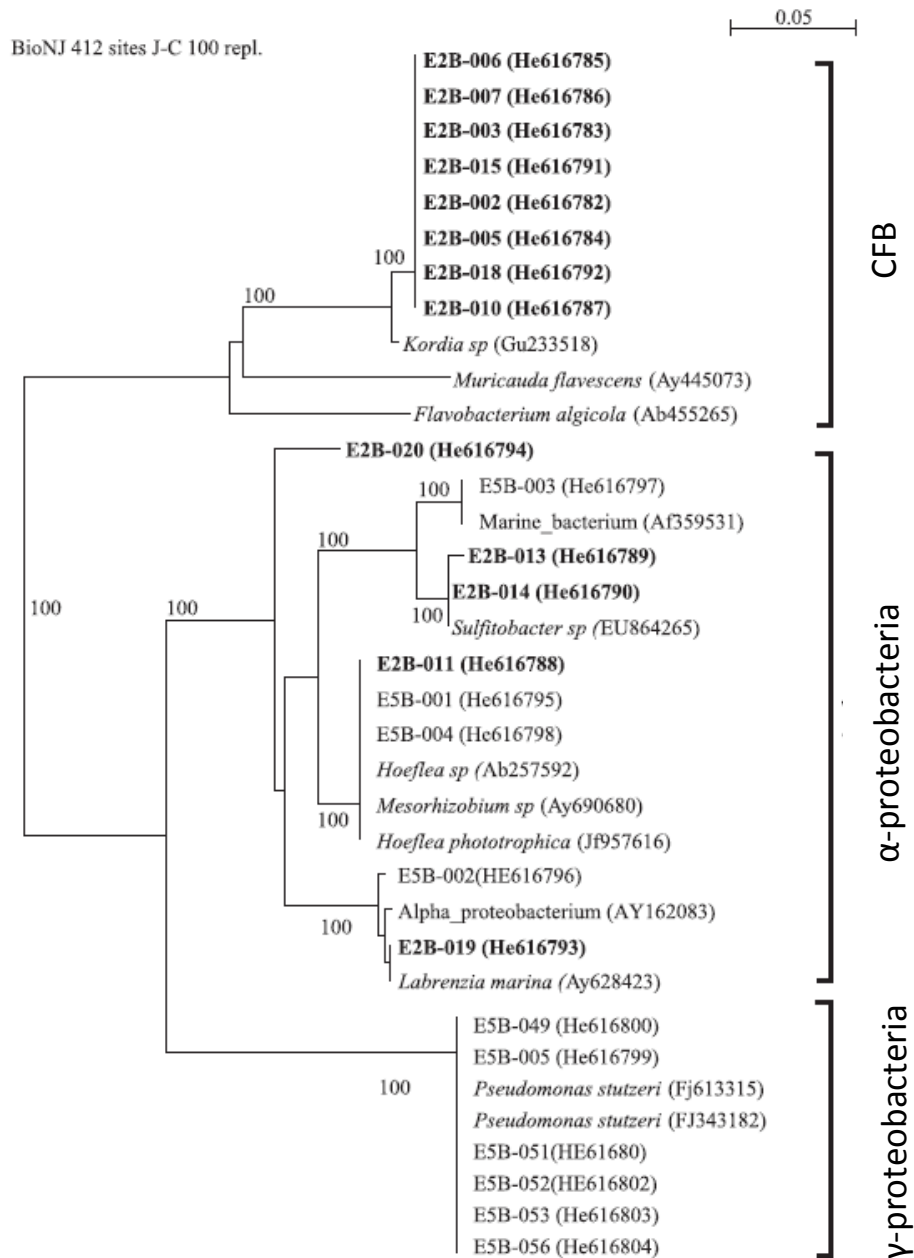


Figure IV-3: Neighbor-joining phylogenetic tree of 16S-rDNA sequences from bacterial communities during the first (day 2) and last period (day 10). Sequences of the last period are shown in bold. Bootstrap values are expressed as a percentage of 100 replicates.

IV.6 Conclusions

A marine algae-bacteria consortium dominated by *Nannochloris spp* growing on a synthetic anaerobic digester effluent reached a maximum C conversion efficiency of 3.6%. The efficiency reached 6.3% when the bacterial communities were included. This study showed the presence of various bacteria within the consortium improved the carbon conversion efficiency recycling the carbon lost during photosynthesis and originated from anaerobic digesters. Further investigations are required for assessing the effect of (i) various organic effluents on the C conversion efficiency of marine microbial consortia, and (ii) other components such as micronutrients, organic matter residues and turbidity which characterize the complexity of a real microalgae digestate.

V Culture à échelle préindustrielle :
de la compréhension vers l'optimisation

SOMMAIRE

V	Culture à échelle préindustrielle : de la compréhension vers l'optimisation	138
V.1	Conception et mise en œuvre du pilote	139
V.1.1	Système de culture	139
V.2	Etudes de l'hydrodynamique et de la diversité microbienne	142
V.2.1	Caractérisation de l'écoulement	142
V.2.2	Dynamique des communautés microbienne d'un écosystème phytoplanctonique d'eau douce	147

V Culture à échelle préindustrielle : de la compréhension vers l'optimisation

Avant propos

Notre démarche d'identification des paramètres clés qui déterminent la dégradabilité anaérobie des microalgues et la dynamique des populations confrontées à un digestat synthétique a été complétée par la mise à l'épreuve d'un système intégré à l'échelle pilote. Le manque de données à une échelle pré-industrielle est souligné pour appréhender une extension du concept dans une perspective de déploiement (Benemann *et al.*, 2012 ; Chiamonti *et al.*, 2012).

En considérant que la conception et la géométrie du procédé de culture sont déterminés, les facteurs d'influence de la croissance des cellules reviennent aux conditions environnementales, à l'hydrodynamique et à la dynamique propre de la biomasse phytoplanctonique (Figure V-5). Les systèmes ouverts ne permettant pas de contrôler les effets de l'environnement, nous nous intéressons en particulier à l'hydrodynamique et à la dynamique des populations mobilisées.

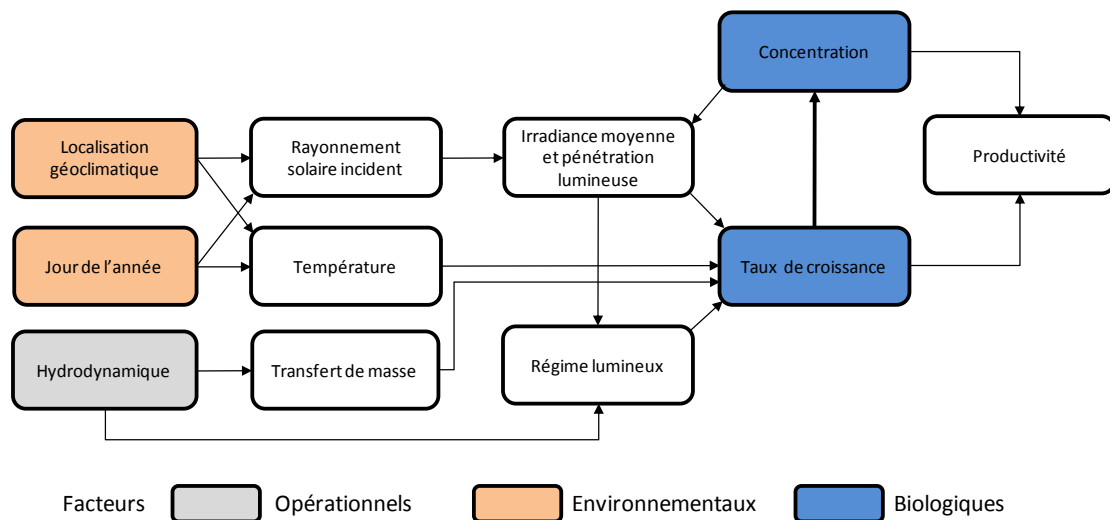


Figure V-1 : Facteurs majeurs et interactions qui influent sur la productivité pour une géométrie et une implantation fixées (adapté et augmenté d'après Molina Grima, 2002).

Dans un premier temps, nous décrivons la conception et la mise en œuvre d'un procédé pilote de culture de microalgues. Nous rapportons succinctement dans un second temps des résultats obtenus après une série d'expérimentations portant spécifiquement sur la question de la dépense énergétique du système de culture et de son optimisation, ainsi que sur la dynamique de la population qui s'opère au sein de l'écosystème microalgues-bactéries mis en culture dans le pilote.

V.1 Conception et mise en œuvre du pilote

V.1.1 Système de culture

Le procédé de culture consiste en un bassin ouvert. Les arguments qui motivent le choix de cette solution sont le dimensionnement simplifié par rapport à un système fermé, la mise en œuvre et la maintenance facilitée et la durabilité du procédé. Dans notre cas, et comme pour la plupart des bassins ouverts, le mélange de la culture est assuré par une route à aube. Le transfert de CO₂ à destination des microalgues est assuré par un contacteur gaz/liquide immergé dans le bassin.

- **Bassin**

Le bassin consiste en une structure elliptique en béton, formée de deux canaux de 15 m de long et de 1,9 m de large, séparés par une paroi centrale et recouvert d'un liner blanc pour limiter les efforts de frottement. La surface du bassin est de 56 m² pour une hauteur de 0,6 m (Figure V-2).

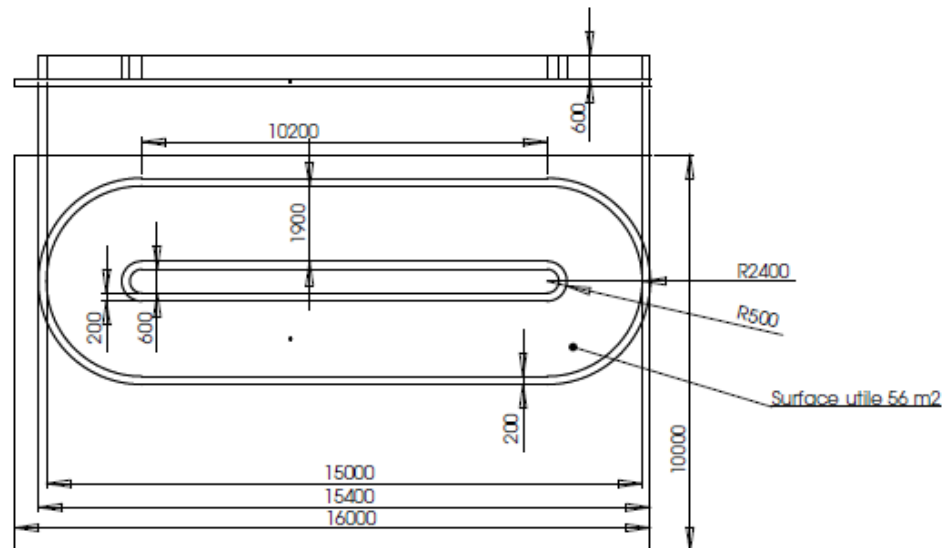


Figure V-2 : Plan et réalisation du bassin de culture

- **Roue à aube**

Le dispositif de mélange permet d'assurer la recirculation de la culture dans le bassin. La roue qui occupe toute la largeur du bassin est constituée de 3 segments indépendants équipés de pales amovibles. La hauteur d'emprise de ces pales dans la culture est variable. La mise en mouvement et son contrôle sont assurés par un moteur d'une puissance de 370W associé à un variateur de fréquence pour en moduler la vitesse de rotation. La plage de fonctionnement permet d'assurer une vitesse de circulation du milieu de culture dans la lagune, de 10 à 35 cm s⁻¹ conformément à la plupart des installations comme rapporté par Chiaramonti *et al.* (2012).

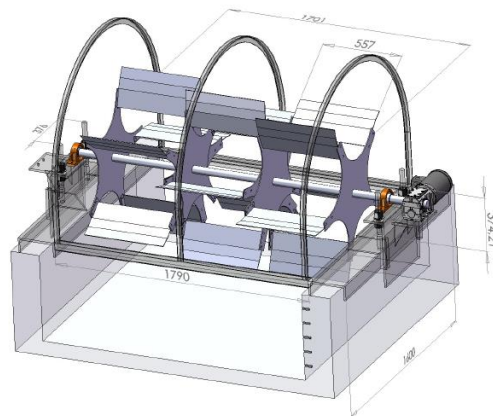


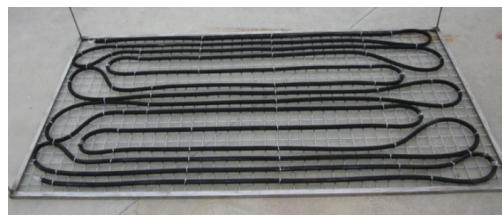
Figure V-3 : Vue de la roue à aube positionnée sur le bassin

- **Transfert de CO₂**

Parmi les solutions possibles pour assurer le transfert de CO₂ dans un système ouvert de culture (colonne d'injection, puits à contre courant), nous avons choisi d'utiliser un dispositif simple consistant en un tuyau microporeux immergé dans la culture. Il est composé de particules discrètes d'élastomère vulcanisé liées par une résine thermoplastique. Cette composition hétérogène destinée initialement au transfert de l'eau dans les cultures de plantes supérieures via la formation de gouttes, assure la génération de microbulles lorsqu'on y injecte un gaz. La stratégie de gestion de transfert de CO₂ dans les cultures est assurée via le contrôle du pH.



Tube microporeux



Unité de transfert



Emplacement des deux unités de transferts de CO₂ dans la lagune

Figure V-4 : Contacteur gaz/liquide employé pour assurer le transfert de CO₂.

V.1.1.1 Capteurs

L'instrumentation du dispositif pilote est une condition nécessaire dans le but de suivre le bon fonctionnement des différents organes qui le composent, d'évaluer l'activité biologique du système de culture de microalgues et enfin, d'acquérir des données à une fréquence d'acquisition pouvant rendre compte de la dynamique du système. Par ailleurs, les conditions de culture en système ouvert asservissent l'activité de la biomasse phytoplanctonique aux conditions environnementales. Dans ce but, la connaissance des données météorologiques permet d'appréhender les effets éventuels de ces contraintes sur l'activité biologique (irradiance, température) et sur la dynamique physique de la culture (évaporation, dilution). Dans ce but, nous avons associé une station météorologique aux capteurs disposés dans la lagune. Les données mesurées sont suivies par l'opérateur via un logiciel de supervision, stockées en continu dans une base de données et peuvent également être consultées à distance (Figure V-5).

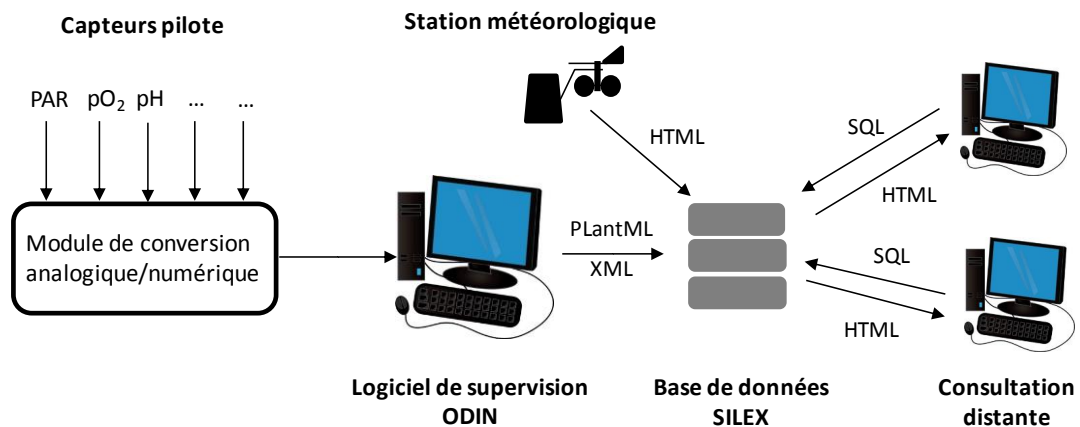


Figure V-5 : Architecture du réseau assurant l'acquisition, le suivi et le stockage des données capteurs

V.2 Hydrodynamique ediversité microbienne

V.2.1 Caractérisation de l'écoulement

L'analyse du cycle de vie d'un procédé couplant culture de microalgues et digestion anaérobie a montré que la majorité des impacts environnementaux est associée à la dépense énergétique liée au mélange du bassin de culture des microalgues (Collet *et al.*, 2011). Cette étude souligne par ailleurs que le procédé de culture compte pour 31 % de cette dépense, imputable au fonctionnement continu de la roue aube. Cet agitateur sert à maintenir les cellules en suspension, à permettre un accès à la lumière et enfin, à disperser les apports en éléments nutritifs dans le milieu. Dans une perspective d'optimisation de cette dépense énergétique, nous cherchons au préalable à comprendre les phénomènes hydrodynamiques qui s'opèrent au sein de la lagune. Notre démarche s'est employée, d'une part, à caractériser les écoulements qui se réalisent dans le bassin et d'autre part, à caractériser la capacité de la roue à aube à assurer le mélange de la culture. Les données produites au cours de deux campagnes expérimentales sont destinées à caractériser les écoulements et à valider des simulations d'écoulements dans cette géométrie et à évaluer des stratégies d'optimisation possibles.

V.2.1.1 Cartographie des vitesses d'écoulements

La cartographie précise des vitesses d'écoulements pour l'ensemble de la lagune a été effectuée. Nous avons réalisé un « maillage » de toute la superficie du système de culture, constituant 48*3 points de mesure : 16 sections longitudinales dans le sens d'écoulement du milieu (A à P), 3 positions radiales (1 à 3), 3 profondeurs (5, 20 et 30 cm par rapport à la surface libre) (Figure V-6). Les vitesses ont été mesurées en chacun des points du maillage pour 3 fréquences appliquées au moteur (10, 25 et 40 Hz).

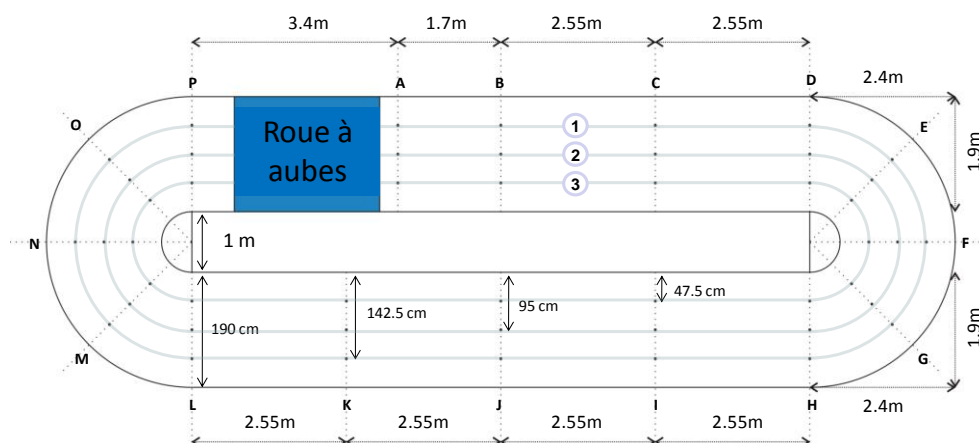


Figure V-6 : Points de mesure des vitesses d'écoulements, de A à P et pour les lignes 1 à 3.

V.2.1.2 Cartographie des vitesses d'écoulements

- Evaluation de la vitesse d'écoulement

Le contrôle de la vitesse de rotation est assuré par un variateur de fréquence. Nous avons réalisé une mesure de la vitesse moyenne en fonction de la fréquence appliquée afin d'établir précisément la vitesse d'écoulement en fonction de la consigne appliquée (Figure V-6).

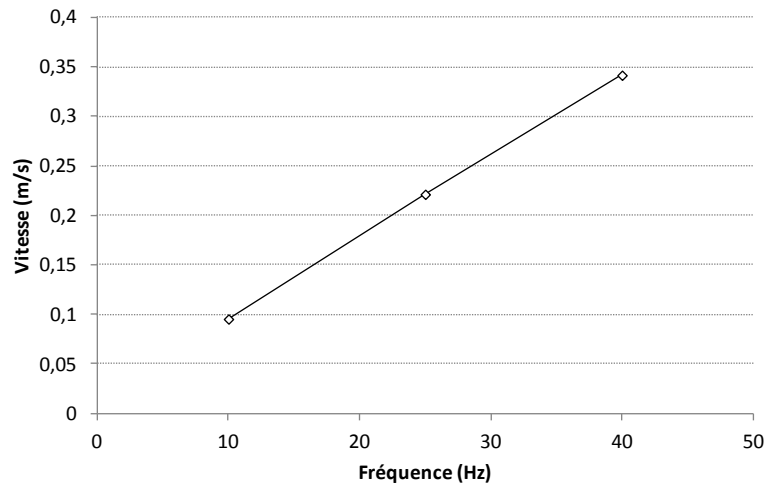


Figure V-7 : Vitesse moyenne d'écoulement en fonction de la fréquence de rotation appliquée au moteur

- Effet de la vitesse

La Figure V-8 représente les vitesses mesurées en chacun des points de mesure pour une vitesse de 10 cm.s^{-1} , à une profondeur de 20 cm (pour une hauteur d'eau totale de 40 cm).

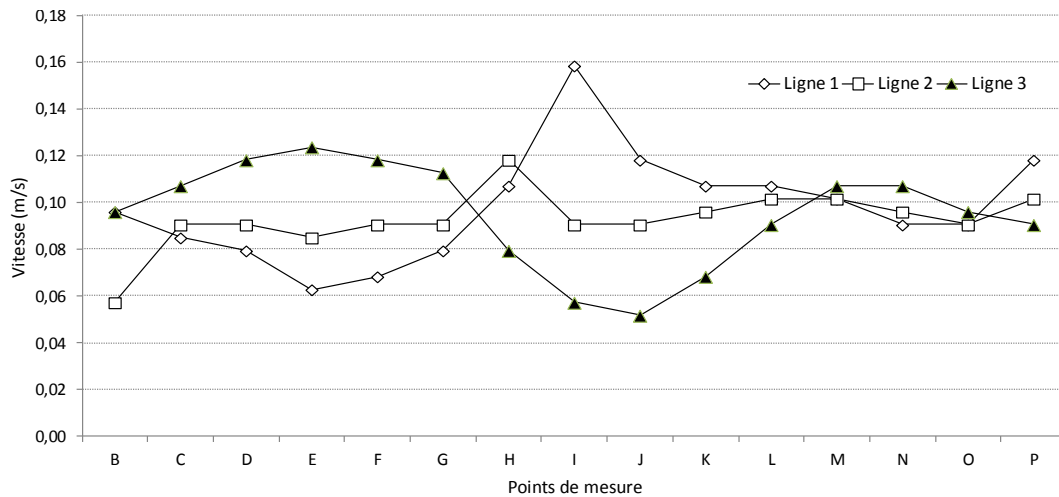


Figure V-8 : Evolution des vitesses d'écoulement pour l'ensemble des points de mesures

La ligne centrale (n°2) présente une vitesse d'écoulement relativement constante. Lors du passage de du milieu dans la courbe (point E) s'amorce une augmentation de la vitesse pour la ligne 1 tandis que la vitesse diminue dans la ligne 3. A proximité de la roue, les vitesses hétérogènes (en A, B, et C puis en O et P) sont causées par les turbulences et les macro-instabilités générées par les pales. Si les 2 autres vitesses présentent les même profils d'évolution, l'effet d'une augmentation de la vitesse (de 10 à 35 cm.s^{-1}) tend à augmenter dans cette partie du bassin (de E à L) l'amplitude entre les vitesses

les plus élevées (ligne 1) et les plus faibles (ligne 3). Le déplacement du fluide dans le virage provoque un écoulement hétérogène dans le canal opposé à l'agitateur. Dans cette zone du bassin les deux vitesses d'écoulement distinctes ne permettent pas d'assurer le maintien en suspension des cellules (Figure V-9). La sédimentation observée témoigne de la difficulté de maintenir une suspension homogène pour une surface d'environ 10 m² soit 17 % de la surface totale du bassin est ainsi affectée.

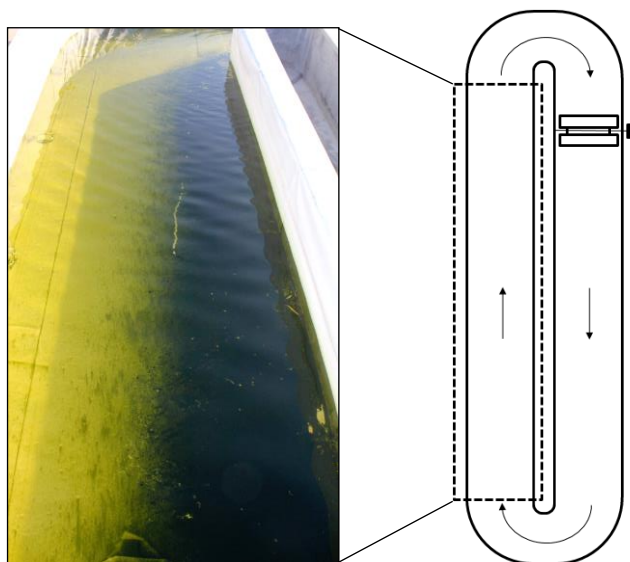


Figure V-9 : Effet de l'hétérogénéité de l'écoulement sur la sédimentation des cellules pour la zone de H à L

- **Distribution des vitesses d'écoulement selon la profondeur**

Afin d'évaluer le profil des vitesses dans la colonne d'eau et au cours du cheminement de la culture dans la lagune, nous avons effectué dans les mêmes conditions les mesures de vitesses pour trois profondeurs, au plus près de la surface à 30 cm, 20 cm, puis à 5 cm du fond. Après avoir caractérisé les profils sur l'ensemble des points de mesures, nous excluons dans ces expériences, les points E à H et M à O pour nous attacher au comportement des écoulements dans les zones de fortes amplitudes.

Les résultats présentés pour une vitesse de 25 cm.s⁻¹ (Figure V-10), nous indiquent que, sur la profondeur du bassin, les vitesses sont relativement homogènes et répondent de la même façon au parcours dans la lagune. Nous sommes dans le cas de figure d'un écoulement globalement homogène sur la hauteur, à l'exception de la proximité de la roue à aube qui favorise un décollement de la vitesse sur les couches supérieures. Les turbulences observées au niveau de la roue à aube vont avoir pour effet de modifier la position des cellules dans la colonne d'eau.

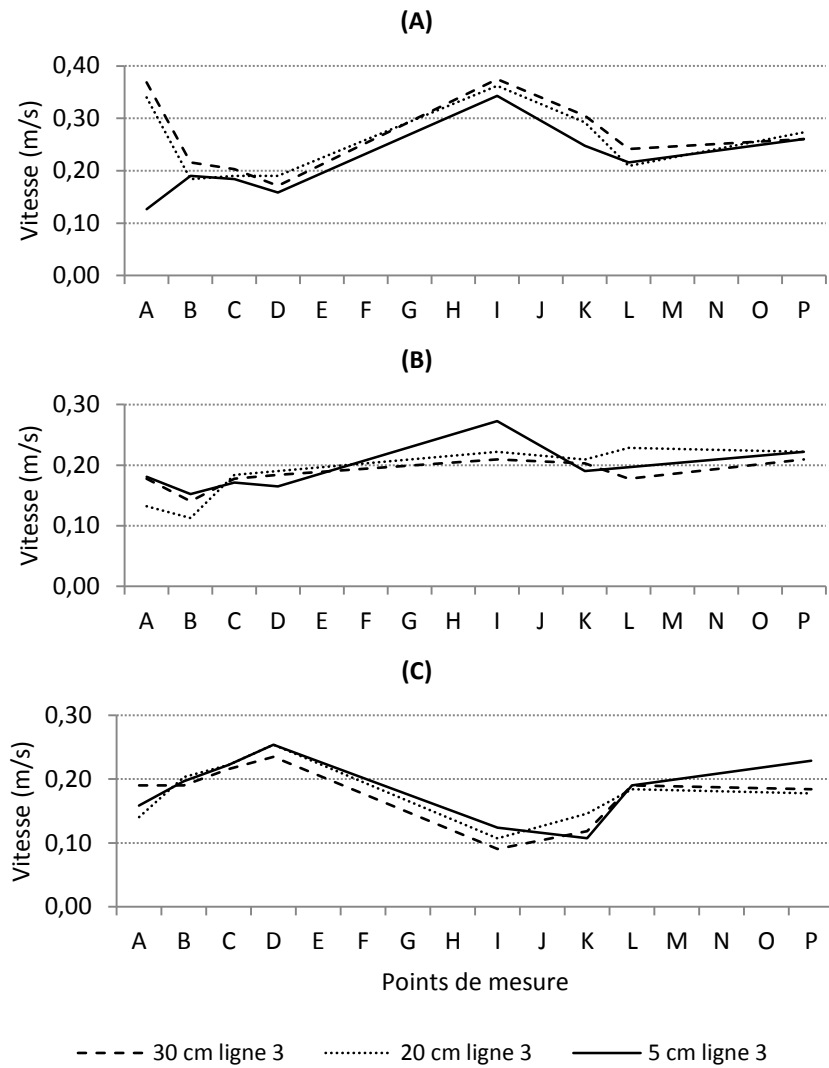


Figure V-10 : Evolution des profils de vitesse pour une vitesse de 25 cm s^{-1} en fonction de la hauteur de mesure dans la colonne d'eau : (A) ligne 1, (B) ligne 2, (C) ligne 3.

V.2.1.3 Discussion

Ces expérimentations nous permettent de caractériser les écoulements dans le bassin de culture. Dans l'ensemble du bassin, et à l'exclusion des zones proches du système de mélange, nous observons un écoulement homogène sur la hauteur d'eau. L'effet des turbulences et des instabilités provoquées par le mouvement des pales de la roue à aube modifie seulement à proximité de celle-ci l'organisation spatiale des couches d'eau. Le second résultat marquant de ces mesures est la conséquence du passage de la culture dans le virage opposé à la roue à aube. La réduction de la vitesse d'écoulement ne permet pas d'assurer une circulation homogène de la biomasse. Cet effet pose la question de l'activité du phytoplancton dans une zone qui représente 17% de la surface de la culture. Ce phénomène de décrochage des vitesses est connu (Ben Amotz, 2008) et des solutions techniques permettent d'en limiter les effets (réduction de la largeur du bassin en sortie de virage, utilisation de parois de séparation dans les virages...).

La mesure des vitesses verticales apparaît nécessaire pour compléter ces travaux afin de préciser les mouvements des cellules dans la hauteur et l'impact potentiel de ces trajectoires sur la fréquence de l'accès à la lumière. Le développement de modèles hydrodynamiques spécifiques à l'issue de ces premiers essais (par les équipes du LISBP de Toulouse et des équipes Bang et Biocore de l'INRIA) peut permettre de concevoir d'autres géométries et d'en évaluer l'efficacité sur le mélange et également la dépense énergétique associée dans une perspective d'optimisation. Cette approche est cruciale en ce qu'elle permet d'appréhender le comportement hydrodynamique (et par extension, les pertes de charges et la dépense énergétique associées) pour des configurations originales à échelle industrielle.

V.2.2 Dynamique des communautés microbienne d'un écosystème phytoplanctonique d'eau douce

Après avoir étudié les phénomènes hydrodynamiques qui caractérisent le système de culture, nous avons utilisé ce dispositif pour cultiver un écosystème d'eau douce afin d'évaluer la dynamique des communautés microbienne qui le compose. Cet écosystème associe plusieurs niveaux trophiques : producteurs primaires, producteurs secondaires et décomposeurs (bactéries et microalgues hétérotrophes) et enfin les consommateurs primaires (prédateurs herbivores). Nous avons réalisé une campagne expérimentale mobilisant cet écosystème et soumis à des perturbations d'origines anthropiques et environnementales (épisodes pluvieux, ensoleillement...).

V.2.2.1 Conditions opératoires

Pour s'affranchir des évolutions potentielles de la qualité du milieu nutritif, nous avons alimenté régulièrement la culture en utilisant un milieu synthétique. Les éléments nutritifs ont été dilués dans une eau douce issue du Canal du Bas Rhône. Ces apports réguliers ont permis de compenser l'évaporation et d'assurer une concentration non-limitante en éléments nutritifs. Le suivi des conditions opératoires s'est accompagné d'un échantillonnage pour analyser la diversité des populations procaryotes et eucaryotes. Les conditions de culture sont présentées dans le Tableau V-1 suivant.

Tableau V-1 : Conditions de culture appliquées au bassin ouvert.

Période	15.06 au 31.08.2011
Origine de l'écosystème	Lagune de traitement d'effluents urbains
Milieu de culture	Effluent synthétique dilué dans l'eau du canal du Bas Rhône
Température^a	23.2 ± 3.2 °C
PAR^a	600 ± 143 µE.m ² .s ⁻¹
Niveau^a	287 ± 33 mm
Surface	56 m ²
Volume^a	16,1 ± 1,7 m ³
Mode de culture	Batch/Fed batch

^a valeurs moyennes sur la période expérimentale

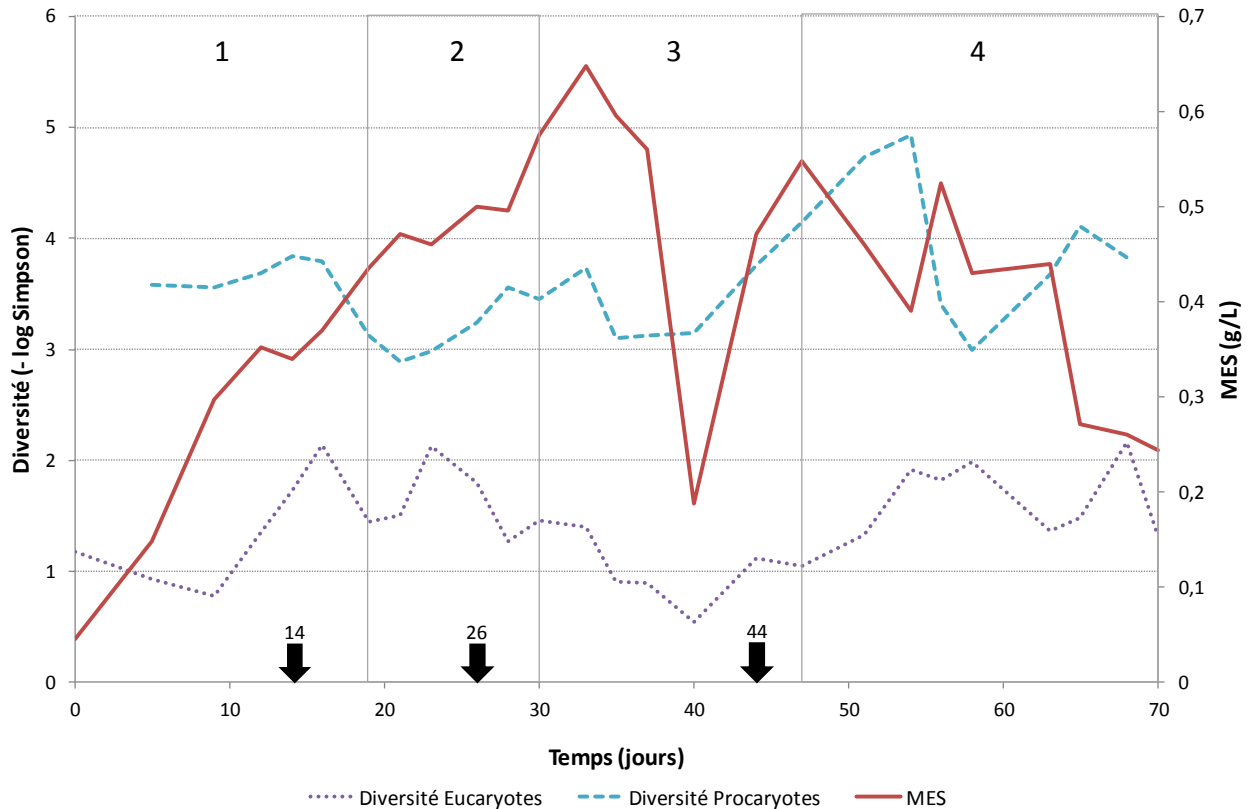
Au cours de cette période expérimentale, nous avons procédé à une analyse régulière des paramètres opérationnels de la culture (Matières en suspension) et un suivi des données produites par les capteurs in-situ (pH, pO₂, T°, PAR). Par ailleurs, des prélèvements de biomasse ont permis de caractériser la diversité eucaryote et procaryote par la technique SSCP (présentée en IV-4-5) et d'identifier les espèces majoritaires pour certains échantillons caractéristiques par la technique de pyroséquençage.

Nous présentons brièvement l'analyse de ces données et la recherche de corrélations associées.

V.2.2.2 Dynamique de la diversité des communautés procaryotes et eucaryotes

La diversité eucaryote et procaryote, exprimée par l'indice de Simpson est confrontée à l'évolution des matières en suspensions dans la culture (**Figure V-11**), indicateur de la production de biomasse totale.

Figure V-11 : Evolution de la diversité Eucaryotes et Procaryotes et de la concentration en matières en



suspension (MES) au cours de la période expérimentale. Les flèches indiquent les jours de prélèvements destinés au pyroséquençage en plus du prélèvement initial à J0.

L'examen de l'évolution de la diversité exprimée par l'indice de Simpson (présenté en IV.4.5) nous indique une évolution des communautés eucaryotes et procaryotes au cours du temps d'une amplitude respective de 2 et 1,5 ordre de grandeur. Si la diversité apparaît découplée de l'évolution de la quantité de biomasse (exprimée en MES), pour certaines périodes cependant, nous observons une coévolution de la diversité de ces deux groupes avec celle-ci. Ces éléments témoignent de la difficulté d'établir un lien clair entre la diversité et la fonction exprimée. L'examen de l'histoire de la culture, en 4 phases, peut concourir à nous éclairer (Tableau V-2).

Tableau V-2 : Décomposition de la culture en 4 phases opérationnelles

Phase	Période (jours)	Evènements
-------	-----------------	------------

1	0-16	Inoculation de la lagune
2	16-30	Mise en place de la régulation du pH (consigne pH 8) par injection de CO ₂
3	30-47	Augmentation significative de la concentration en biomasse qui s'accompagne d'une sédimentation dans le fond du bassin (J33 à J40). La remise en suspension des cellules organisées en floccs est assurée par une augmentation de la vitesse d'écoulement (de 25 à 32 cms ⁻¹).
4	47-70	Dégradation des performances de production et fin de la culture

Le nombre d'espèces identifiées par pyroséquençage au cours des phases 1 à 3 nous permet d'apprécier une évolution remarquable de la diversité, en particulier pour les espèces Eucaryotes (Tableau V-3). L'inoculum a été préparé en utilisant une eau potabilisée mais fut néanmoins cultivé dans les mêmes conditions extérieures ; l'utilisation d'une eau douce provenant du milieu naturel pour alimenter le bassin (Canal du Bas Rhône) a vraisemblablement contaminé la préculture initiale.

Tableau V-3 : Evolution du nombre d'espèces Eucaryotes et Procaryotes en fonction du temps

	Phase 1 (J0)	Phase 1 (J14)	Phase 2 (J26)	Phase 3 (J44)
Eucaryotes	3	11	15	19
Procaryotes	282	379	270	232

- **Evolution de la communauté procaryote**

En analysant la dynamique de la diversité au sein d'une même communauté, il est possible de d'observer des associations de diversité. Dans la Figure V-12 suivante, l'Analyse en Composante Principale de la diversité de la communauté procaryote indique une organisation en 4 groupes.

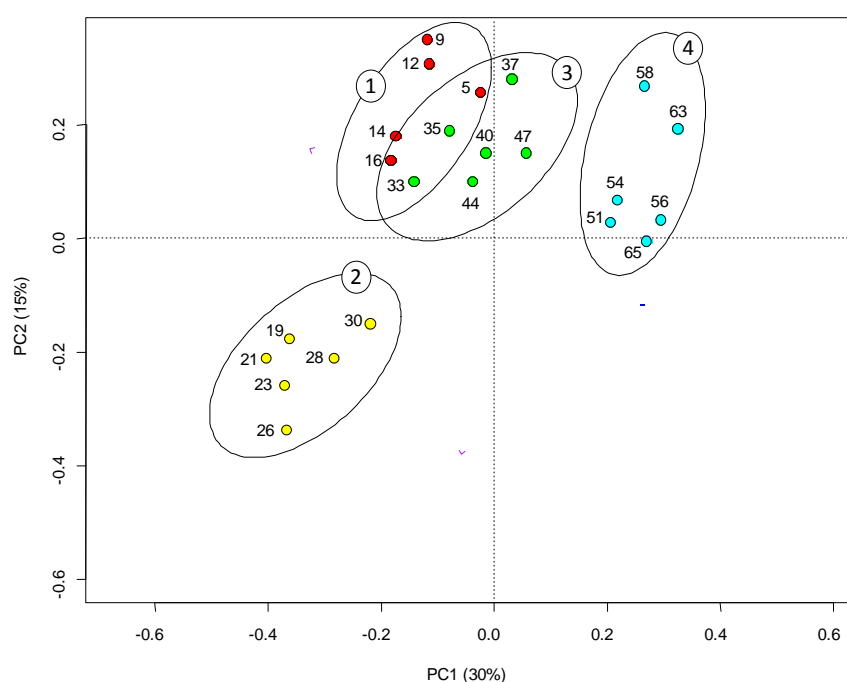


Figure V-12 : Analyse en Composante Principale de la structure de la communauté procaryote (Les nombres près des points correspondent aux jours de culture ; les ellipses regroupent les différentes phases de culture décrites dans le tableau V-2).

Le groupe 1, correspond à la une structure de communauté bactérienne initiale qui est modifiée dès la mise en place de la régulation du pH par ajout de CO₂ (1→2). La croissance importante de la culture puis la décantation provoquée par une évolution de la qualité de la biomasse entraine un retour de la structure bactérienne à un état proche des premiers temps de la culture (2→3). Enfin, la dégradation des performances du système, malgré la tentative de resuspension de la biomasse se distingue par une nouvelle structure de la communauté bactérienne (3→4).

- **Evolution de la communauté Eucaryote.**

La diversité de la population Eucaryote est particulièrement faible par rapport à la population procaryote (1,25 vs 4). 25 espèces Eucaryotes ont été rencontrées sur la période expérimentale contre 470 pour la communauté Procaryote. La microalgue *Scenedesmus littoralis* est l'espèce dominante de la communauté Eucaryote et elle représentait plus de 99% de cette diversité dans l'inoculum initial et est restée dominante tout au long de la période. *Spizellomyces sp.* a connu une dominance remarquable en fin de phase 1. Cette famille de Fungi, décrite comme prédateur parasite des microalgues et notamment du genre *Scenedesmus* (Becker, 1994), a vraisemblablement affecté la croissance de la microalgue dominante de l'écosystème (Tableau V-4).

Tableau V-4 : Evolution de l'abondance des organismes Eucaryotes majoritaires (>10%) identifiés au cours de la période expérimentale (CP : consommateur primaire ; PP : producteur primaire)

Espèces	Niveau trophique	Phase 1 (J0)	Phase1 (J14)	Phase 2 (J26)	Phase 3 (J44)
<i>Dileptus mucronatus</i>	CP	0	0	16	0
<i>Powellomyces geranomyces variabilis</i>	CP	0	0	2	21
<i>Scenedesmus littoralis</i>	PP	100	32	57	42
<i>Spizellomyces sp.</i> , nbrc 105423	CP	0	65	9	4

L'écosystème a pourtant démontré une capacité de résilience puisque la microalgue dominante de la communauté Eucaryote a pu se rétablir (Phase 2). En fin de phase 3, la dominance d'un autre représentant des Chytrids, *Powellomyces geranomyces variabilis*, témoigne d'une activité de prédation importante dans la culture. Les chytrids sont ubiquistes des environnements aquatiques dulcicoles et marins et sont décrits pour parasiter le phytoplancton (James *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'apparition d'un cilié prédateur, *Dileptus mucronatus* (J26) (Penard, 1922) nous alerte sur une autre activité de prédation vis-à-vis des microalgues.

V.2.2.3 Discussion

L'étude de l'écosystème complexe mobilisé dans le système de culture nous a permis de rendre compte d'une dynamique microbienne décorellée de la production de biomasse. En effet, à l'échelle « macroscopique », l'évolution de la culture traduit une augmentation de la concentration en matière en suspension jusqu'au jour 33, tandis qu'évoluent différemment les communautés eucaryotes et procaryotes. Cette dernière communauté apparaît aux modifications du milieu et en particulier, la régulation en CO₂ semble avoir eu une influence sur la structure de cette communauté. Cet état fut transitoire puisque un retour à une structure de communauté proche de l'état initial fut observé. Également, l'évolution de la communauté eucaryote indique la présence constante de *Scenedesmus littoralis* en dépit des effets de prédation. Au cours de la période étudiée, l'activité des prédateurs reste à un niveau minimal, bien que des épisodes ponctuels apparaissent perturber l'abondance relative de la microalgue dominante. La production de biomasse a été assurée dans ces conditions. La qualité de l'eau utilisée (Bas-Rhône) a une influence potentielle en ce que la diversité eucaryote a augmenté après inoculation du bassin dans une eau de rivière. Ces résultats vont dans le sens d'une relation positive entre diversité et productivité présentée en partie II.1.6.2.5 et mise à profit avantageusement dans notre cas. Par ailleurs, nous pouvons nous interroger si l'utilisation d'une eau de rivière et sa cohorte de microorganismes n'a pas concouru à la qualité de ces interactions, en augmentant le niveau de diversité initial. L'environnement atmosphérique local a pu également contribuer à une contamination. Si ces résultats ne nous permettent pas d'éclaircir ce point, il apparaît crucial d'en évaluer la contribution dans cette capacité de résilience.

VI Conclusions et perspectives

VI Conclusions et perspectives

L'exploitation massive et séculaire des énergies fossiles a conduit depuis une décennie les pouvoirs publics à mobiliser de nouvelles ressources pour répondre notamment aux impacts sur l'environnement et aux perspectives d'épuisement des gisements conventionnels. Dans les filières du transport, l'incorporation des agrocarburants aux carburations essence et diesel ont pour objectif de substituer une partie des ressources pétrolières par un gisement offrant à priori une meilleure durabilité. La mise en œuvre d'une politique incitative à l'échelle européenne a cependant révélé les effets délétères de cette ressource et les conséquences sur les détournements d'usages des filières agricoles, et à nouveau, sur l'environnement. Les perspectives offertes par les biocarburants de 3^{ème} génération laissent espérer une meilleure maîtrise des impacts de la filière. Dans ce contexte, les microalgues, qui présentent une productivité plus importante et l'élaboration des mêmes vecteurs énergétiques que les plantes supérieures en s'affranchissant des surfaces arables, sont particulièrement attrayantes. Pourtant, les perspectives d'exploitation et de production de masse de ce gisement se heurtent à des besoins en éléments nutritifs et à une demande énergétique tels que le bénéfice escompté est difficile à obtenir.

Ce travail de thèse s'est intéressé à la digestion anaérobie, une solution permettant à la fois de recycler les éléments nutritifs présents dans la biomasse et de fournir de l'énergie au système de production voire de transformation. Si l'intégration de ce procédé dans une filière de production énergétique à partir de microalgues peut répondre aux contraintes décrites plus haut, cette association permet d'étendre le périmètre à d'autres problématiques. En effet, les microalgues offrent des nouvelles perspectives de recherche pour la méthanisation, et par ailleurs, le couplage de ces deux procédés biologiques favorise le développement de solutions capables de recycler les éléments azote et phosphore vers par exemple, les filières agricoles.

Dans cette perspective, nous nous sommes attachés en particulier à apporter des réponses à la problématique du couplage étroit entre la culture de microalgues et la méthanisation. L'association de ces deux procédés suppose d'utiliser la biomasse algale ou le résidu après extraction de molécules à haute valeur ajoutée comme substrat pour la méthanisation et d'utiliser le digestat obtenu comme une ressource pour subvenir aux besoins nutritifs des microalgues.

L'exploitation du potentiel énergétique des microalgues par digestion anaérobie est dépendante à la fois de la qualité biochimique du contenu intracellulaire et de son accessibilité. Les espèces utilisées et leurs conditions de cultures vont déterminer les performances de conversion énergétique. Les potentiels de production de méthane rapportés dans la revue de Gonzalez *et al.* (2012) recouvrent la plupart des gisements usuels mobilisés dans cette filière (Figure VI-1).

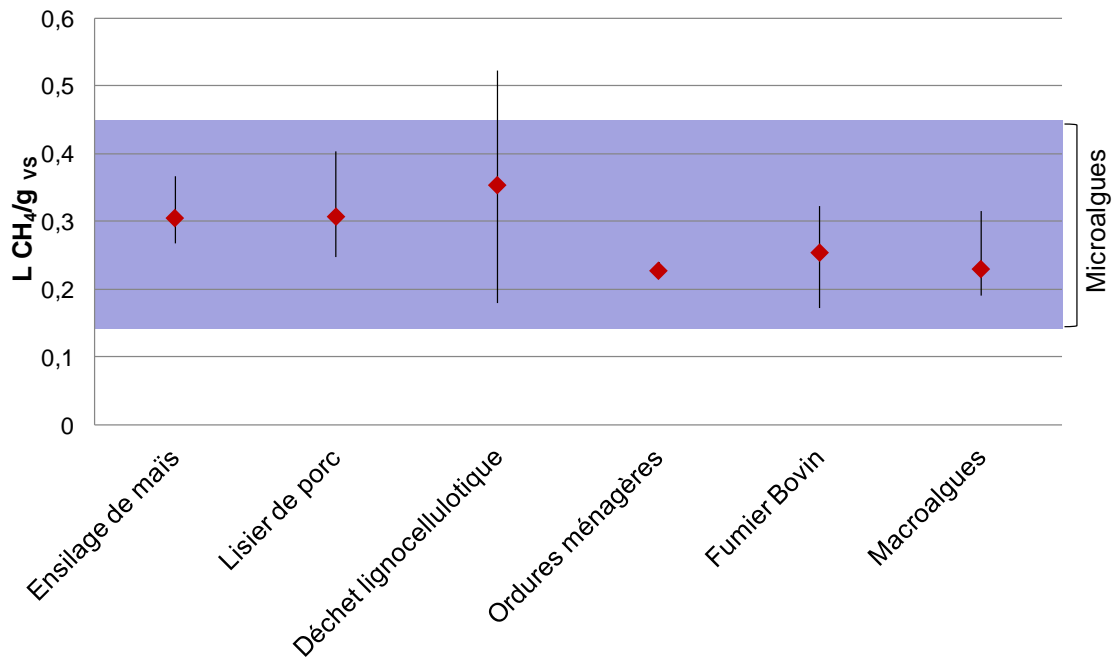


Figure VI-1 : Production potentielle de méthane pour différents gisements de matière organique et pour (encadré grisé) l'ensemble des microalgues étudiées dans Sialve *et al.* (2009) et Gonzalez *et al.* (2012).

La plasticité métabolique des microalgues est un avantage permettant d'augmenter la part des fractions d'intérêt et ce levier est communément utilisé pour augmenter la proportion de lipides ou d'amidon. En conséquence, comme nous le proposons, il devient possible d'augmenter la production potentielle de méthane pour une même espèce en favorisant l'expression des formes de stockage du carbone. Cette hypothèse a par ailleurs été récemment confirmée par Markou *et al.* (2013). L'augmentation de la concentration intracellulaire en composés de réserve (lipides et sucres) permet d'augmenter le rapport C/N qui est bas pour les microalgues. La codigestion avec de la matière organique présentant un rapport C/N élevé permet également de diluer le taux d'azote tout en augmentant la biodégradabilité.

L'accès aux fractions d'intérêt par la flore anaérobie est cependant limité pour certaines espèces par la présence d'une paroi rigide. L'avantage écologique de ces dernières vis-à-vis de leurs prédateurs naturels et des conditions potentiellement délétères de leur environnement se répercute négativement sur la biodégradabilité au sein du digesteur. En réponse, l'application d'un temps de

séjour suffisamment élevé montre, dans le cas de la méthanisation de *Chlorella vulgaris*, qu'il permet de maximiser la biodégradabilité et la minéralisation de la matière organique. Comme pour d'autres gisements de matière organique, nous montrons qu'au cours du processus anaérobie, l'étape d'hydrolyse reste l'étape limitante de la conversion biologique. En conséquence, nous avons adopté les stratégies d'augmentation de la biodégradabilité mobilisées dans les filières de méthanisation. Ainsi, l'application d'un traitement thermique à basse température restreignant au minimum la dépense énergétique associée, a permis d'augmenter la biodégradabilité -particulièrement faible- d'un écosystème d'eau douce dominé par *Scenedesmus sp.*. Par comparaison, le traitement aux ultrason, n'a, quant à lui, pas offert d'avantage significatif. Comme souligné par Schwede *et al.* (2011), l'intégration de la méthanisation dans un contexte de bioraffinerie peut permettre de s'affranchir de la contrainte portée par l'hydrolyse en bénéficiant des flux de chaleur issus de la valorisation du biogaz. En revanche, maximiser la concentration de biomasse pour limiter les déperditions énergétiques est la condition indispensable pour atteindre un équilibre énergétique.

L'effet de ces traitements s'observe également sur la minéralisation des autres constituants de la biomasse initiale, et en particulier sur l'azote et le phosphore. Cependant, comme nous l'avons souligné dans notre revue bibliographique, la teneur en protéines particulièrement élevée des microalgues augmente le risque dans le digesteur d'une inhibition potentielle de l'activité des archae méthanogènes acétoclastes, particulièrement sensibles à la forme ammoniacale de l'azote. L'utilisation de la digestion anaérobie pour répondre à la nécessité de réaliser un recyclage des éléments nutritifs via une minéralisation maximisée montre dans ces conditions ses limites. Par ailleurs, comme nous l'avons présenté, le type de procédé de méthanisation mobilisé, le mode opératoire et la nature des substrats vont influencer la qualité du digestat produit. En conséquence, la quantité et la biodisponibilité des éléments nutritifs (micro et macro éléments) pourra en être affecté et influencer les performances de croissance et de traitement.

Dans le quatrième chapitre, nous avons caractérisé la productivité de biomasse d'un écosystème naturel complexe confronté à un digestat. Ce travail a permis de confirmer le rôle majeur de la communauté bactérienne associée, en ce qu'elle permet de maximiser la conversion du carbone (i) présent dans l'effluent et (ii) libéré en excès dans le milieu par les microalgues. En retour, le produit de la consommation hétérotrophe de cette matière organique, le CO₂, peut être à nouveau utilisé par les microalgues comme source de carbone. Le stockage du carbone sous forme organique est ainsi maximisé dans l'ensemble des communautés qui composent la biomasse. Dans une perspective de couplage, la gestion des flux de carbone est dans ce cas avantageusement optimisée par la présence et l'activité des populations bactériennes associées.

La démarche expérimentale opérée dans un système fermé, à l'échelle du laboratoire, affranchit la population d'une influence externe (biologique et climatique) et garantit dans ce cas les conditions d'une productivité optimale. Les systèmes ouverts de culture en conditions extérieures constituent les solutions les plus adaptées pour contribuer à la durabilité de la filière. En revanche, la recherche de stabilité vis-à-vis des contraintes environnementales est la condition nécessaire pour maîtriser la productivité. En effet, ces procédés ne permettent pas d'assurer le même niveau de contrôle que pour les systèmes fermés. Cet équilibre entre productivité et stabilité est ainsi asservi par les caractéristiques propres du procédé de culture (profondeur, surface, mélange, contrôle du mélange et des apports en éléments nutritifs) en interaction avec la dynamique de l'environnement (climat, événements météorologiques, contaminations portées par les aérosols et les effluents ou le milieu de culture).

Dans ce contexte, la mobilisation d'un écosystème complexe démontre un avantage majeur. En dépit de la présence d'une population prédatrice relativement diversifiée, l'activité photosynthétique et la productivité sont maintenues. Plus généralement, le niveau de contamination porté par les aérosols et l'eau utilisée n'a pas altéré la stabilité de l'écosystème. Un optimum de productivité est maintenu pour une diversité importante et la présence et l'activité d'une seule population d'algue témoigne de cette stabilité. Les procédés ouverts disposent, essentiellement au travers du mélange mais également du taux de recyclage de la biomasse vers la culture après récolte (Park et al., 2011b), d'un levier de contrôle sur la qualité de l'écosystème. Ces deux paramètres permettent par exemple de maintenir dans la culture les espèces, ou plus précisément les organisations cellulaires qui présentent la meilleure décantabilité.

La recherche d'une d'optimisation énergétique en maintenant une stabilité de l'activité biologique impose de caractériser et de comprendre au mieux les interactions entre les compartiments physiques et biologiques. Sur le versant écologique, les techniques de biologie moléculaire contribuent remarquablement à la compréhension de ces mécanismes complexes et se confirment comme étant des outils adaptés à la caractérisation des écosystèmes et le suivi de leur dynamique. La production de données expérimentales issues de toutes les composantes de l'ensemble du système permettra de mieux évaluer ces interactions et d'opérer un contrôle efficient de la production.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux nous incitent à considérer l'exploration de nouvelles pistes de recherche et pour les différents compartiments d'un procédé couplé et au-delà, son interaction avec son environnement.

Impacts environnementaux et sanitaires

Les émissions de GES dans les systèmes ouverts de culture sont une problématique encore assez peu étudiée. Dans ce contexte, les émissions de N₂O vers l'atmosphère souffrent d'un manque de compréhension phénoménologique et de mesures quantitatives. Bien que supposées comme « raisonnables » (Benemann *et al.*, 2012), il nous semble indispensable d'éclaircir cette problématique. La caractérisation des populations phytoplanctoniques (et l'activité des organismes nitrifiants et dénitrifiants), leur dynamique propre en lien avec la quantification des émissions de l'ensemble des GES in situ, pourra contribuer à mieux comprendre et décrire ces phénomènes. Ces éléments serviront à enrichir et affiner les études d'impacts environnementaux.

Un autre type d'émission qui n'a pas fait l'objet de travaux notables dans ce contexte concerne les émissions biologiques vers l'atmosphère. Dans le milieu naturel, cette question est particulièrement renseignée et atteste de la présence, voire de l'activité de microalgues dans le compartiment atmosphérique. La mobilisation d'effluents ou d'autres ressources hydriques contenant potentiellement des pathogènes vers la culture nous incite à évaluer si le caractère extensif des unités de production et leur gestion favorise l'aérolisation de ces organismes. Dans cette idée, la recherche des déterminants biotiques et abiotiques qui influencent cette dispersion permettra d'appréhender et de caractériser un risque sanitaire potentiel et de prévenir les contaminations éventuelles du milieu naturel et des autres systèmes de culture.

Optimisation du procédé de méthanisation et de gestion du digestat.

Les procédés de méthanisation employés dans nos travaux et dans la plupart des études citées dans ce document sont des réacteurs à biomasse libre, infiniment mélangés et opérés en mode batch ou continu. Etant donné la faible concentration en microalgues dans les bassins, l'alimentation de ce type de digesteur nécessite impérativement une étape préalable de concentration de la biomasse, puis, afin de mobiliser les éléments nutritifs minéralisés de la phase liquide vers la culture, une étape de séparation de phase du digestat. Une alternative à cette succession d'étapes réside dans l'utilisation d'un biofiltre anaérobie. Pour ce type de digesteur, la biomasse fixée sur un support ou organisée sous la forme de granules, présente une porosité suffisamment faible pour piéger les matières en suspension. Il est possible dans cette configuration de dissocier le temps de séjours des solides du temps de séjour des liquides et de transférer ainsi un effluent moins concentré en matières en suspension que dans les procédés à biomasse libre. Egalement, l'organisation spatiale de la flore anaérobie dans les procédés à biomasse fixée lui confère une meilleure résistance à la présence de toxiques et une meilleure stabilité aux charges organiques élevées (Rajeshwari *et al.*, 2000). Cette approche démontrée avec succès par El Maleh *et al.* (1988) appliquée à la méthanisation des

microalgues d'une lagune de traitement d'effluents urbains a été évaluée plus récemment par Zamalloa *et al.* (2012). Cette technologie n'améliore pas pour autant la biodégradabilité des espèces les plus récalcitrantes et l'application conjointe d'un prétraitement thermique pourrait permettre d'en augmenter la biodégradabilité.

Conduite du procédé de culture

La culture en conditions extérieures se réalise dans un contexte dynamique (cycles jour/nuit, saisonnalité, évènements climatiques...) et l'activité métabolique du phytoplancton est dépendante de cette dynamique. Comme présenté dans le chapitre précédent, dans un bassin ouvert, la fonction de la roue à aube est d'assurer un accès optimal à la lumière et à l'ensemble des individus ou des groupes d'individus de la population et d'en prévenir la décantation. L'examen des systèmes de mélange dans la littérature n'indique pas d'autres modes de gestion qu'une vitesse d'écoulement appliquée en continu. La recherche d'une économie énergétique peut supposer d'intégrer la dynamique pour opérer un contrôle optimal de la vitesse d'écoulement en fonction des fluctuations environnementales et de l'activité physiologique. Aussi, le développement de lois de contrôle nous apparaît comme indispensable pour piloter cette recirculation en tenant compte par exemple de l'intensité lumineuse reçue et de la décantabilité des cellules voire de l'évolution de l'hétérogénéité de la biomasse dans la colonne d'eau. Le développement d'un capteur dédié (non présenté dans ce manuscrit pour des raisons de confidentialité, un brevet étant en cours de dépôt) nous permettra d'aller dans cette voie.

La gestion optimale des apports en éléments nutritifs constitue également une voie d'optimisation nécessaire. L'évolution du pH ou de la pO_2 au cours du temps est un indicateur fiable et robuste de l'activité photosynthétique des cellules. Par ailleurs, le contrôle du pH par l'apport de CO_2 permet d'assurer une croissance en conditions non limitantes en carbone. Tenir compte de ces facteurs qui témoignent de l'activité métabolique (en réponse à la dynamique environnementale) permet d'ajuster au mieux les apports en éléments nutritifs pour maintenir la culture dans les conditions optimales de croissance. Cette stratégie peut permettre par ailleurs de limiter les effets de surcharge nutritive et des effets toxiques associés.

De l'agroécologie vers une algo-écologie ?

Schématiquement, l'algoculture et l'agriculture sont des pratiques similaires en de nombreux points. Liés d'un point de vue phylogénique, microalgues et plantes présentent une activité métabolique commune et répondent globalement aux mêmes filières de valorisation. Par ailleurs, ces organismes aux besoins nutritifs similaires peuvent bénéficier de la même façon du pouvoir fertilisant des effluents de la méthanisation. Leurs activités sont intimement liées à l'ensemble de l'écosystème proximal dans

lequel ces organismes évoluent et l'évolution de cet écosystème en réponse à la dynamique de l'environnement. La qualité de ces interactions écosystémiques détermine la qualité de leur activité et *in fine*, la productivité et les molécules d'intérêt synthétisées.

Dans un contexte agricole pour lequel les pratiques d'une agriculture intensive se révèlent préjudiciable d'un point de vue environnemental, sanitaire, économique et social, l'application des principes de l'agro-écologie permet d'apporter des réponses positives et d'offrir des perspectives durables. Cette approche récente intègre l'ensemble des facteurs qui compose l'agrosystème et son exploitation pour proposer de nouveaux modes de gestion et de nouvelles pratiques plus durables.

L'histoire de l'agriculture et de son évolution doit nous interroger sur les pratiques « alga-coles » en devenir dans la perspective éventuelle d'une exploitation de masse de microalgues. Les préoccupations qui furent les nôtres, en cherchant à identifier et maîtriser les impacts, en travaillant sur la question du recyclage des éléments nutritifs et de son optimisation, en mobilisant un écosystème complexe et en évaluant sa dynamique en réponse à son environnement et enfin en cherchant à optimiser les étapes de production et de transformation s'inscrivent dans la même démarche. Aussi, au-delà de cette approche intégrative et nécessairement pluridisciplinaire, la formalisation des principes d'une algo-écologie pourra permettre de garantir une production et une exploitation durable, et de proposer de nouveaux modes de gestion. L'agroécologie reste une démarche à construire qui peut favoriser le développement durable de la filière microalgue. En retour, la proximité phylogénique des microalgues avec les plantes, une expression phénotypique et une dynamique écologique similaires laisse augurer l'utilisation de ces organismes comme « modèle » pour l'agriculture et l'évaluation voire l'optimisation de sa pratique, et de sa valorisation.

VII Références bibliographiques

- Acién, F. G., Fernández, J. M., Magán, J. J., & Molina, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology advances*, 30(6), 1344–1353.
- ADEME (2012). Analyse rétrospective des interactions du développement des biocarburants en France avec l'évolution des marchés français et mondiaux (productions agricoles, produits transformés et coproduits) et les changements d'affectation des sols.
- Afi, L., Metzger, P., Largeau, C., Connan, J., Berkaloff, C., Rousseau, B. (1996). Bacterial degradation of green microalgae: incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. *Proceedings of the 17th International Meeting on Organic Geochemistry*. 25(1-2), 117-130.
- Ahn, Y.-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, 41(8), 1709–1721.
- Al Seadi, T., & Lukerhurst, C. (2012). Quality management of digestate from biogas plants used as fertiliser. IEA Bioenergy. Task 37- Energy from Biogas
- Albuquerque, J.A., de la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M., Bernal, M.P., (2012). Assessment of the fertiliser potential of digestats from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy* 40, 181-189.
- Allard, B., Templier, J., (2001). High molecular weight lipids from the tri-laminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* 57 (3), 459-467.
- American Public Health Association, (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 18th ed., Washington.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., (1994). Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research* 28, 727-731.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., (2000). Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science Technology* 41(3),189-194.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., (1993). Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 560-564.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K. (2003). Applications of the anaerobic digestion process. In: Ahring BK, editor. *Biomethanation*. Berlin: Springer; 1-33.

- Angelidaki ,I., Sanders ,W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macro- pollutants. *Rev Environmental Science Biotechnology* 3,117-129.
- Appels, L., Degrève, J., Van der Bruggen, B., Van Impe, J., Dewil, R., (2010). Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilization heavy metal release and anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 101, 5743–5748.
- Asinari Di San Marzano , C.M., Legros ,A., Naveau ,H.P., Nyns, E.J. (1982). Biomethanation of the marine algae *Tetraselmis*. *International Journal of Sustainable Energy* 1,263-272.
- Aspé ,E., Marti ,M.C., Roeckel ,M., (1997) Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. *Water Research* 31,2147-2160.
- Assunção, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., Jara, A., Carmona, L., Freijanes, K., & Mendoza, H. (2011). Phylogenetic position of *Dunaliella acidophila* (Chlorophyceae) based on ITS and rbcL sequences. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 635–639.
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature reviews. Microbiology*, 5(10), 782–91.
- Azencott, H.R., Peter, G.F., Prausnitz, M.R., 2007. Influence of the cell wall on intracellular delivery to algal cells by electroporation and sonication. *Ultrasound Med. Biol.* 33 (11), 1805–1817.
- Bai, A., Stündl, L., Bársony, P., Fehér, M., Jobbágy, P., Herpergel, Z., & Vaszkó, G. (2012). Algae production on pig sludge. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(3), 611–618.
- Barjenbruch, M., Kopplow, O., (2003). Enzymatic, mechanical and thermal pre- treatment of surplus sludge. *Advances in Environmental Research.* 7 (3), 715-720.
- Becker, E.W., (2007). Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25, 207- 210.
- Bayané, A., & Guiot, S. R. (2010). Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(1), 43–62.
- Béchet, Q., Muñoz, R., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Outdoor cultivation of temperature-tolerant *Chlorella sorokiniana* in a column photobioreactor under low power-input. *Biotechnology and bioengineering*, 110(1), 118–126.
- Becker ,E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25,207-210.

- Becker, E.W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture. Oxford: Blackwell Publishing. p. 312-351.
- Becker, E. W. (1994). Microalgae Biotechnology and microbiology. Cambridge Press University.
- Becker, E. W. (1988). Micro-algae for human and animal consumption. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ, editors. Microalgal technology. Cambridge University Press; p. 222-256.
- Beijerinck, M. W. (1904). Das Assimilationsprodukt der Kohlensäure in den Chromatophoren der Diatomeen. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais*, 1, 28–32.
- Ben Amotz, A. (2008). Large scale open ponds. (<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/benamotz.pdf>).
- Benemann, J. R., Weissman, J. C., Koopman, B. L., & Oswald, W. J. (1977). Energy production by microbial photosynthesis. *Nature*, 268(5615), 19–23.
- Benemann, J., Woertz, I., & Lundquist, T. (2012). Life Cycle Assessment for Microalgae Oil Production. *Disruptive Science and Technology*, 1(2), 68–78.
- Berger, S., & Couturier, C. (2008). La méthanisation en milieu rural. In R. Moletta (Ed.), *La méthanisation* (pp. 235–250). Editions TEC & DOC.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in microbiology*, 154(3), 157–64.
- Bernet, N., & Buffiere, P. (2008). Caractérisation de la mise en oeuvre de la méthanisation. In R. Moletta (Ed.), *La méthanisation* (pp. 87–113). Editions TEC & DOC.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10), 3425–3431.
- Club Biogaz (2011). *Etat des lieux de la filière méthanisation en France*.
- Bjornsson, W. J., Nicol, R. W., Dickinson, K. E., & McGinn, P. J. (2013). Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. *Journal of Applied Phycology*. doi10.1007/s10811-012-9968-0
- Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., & Wijffels, R. H. (2012). Scenario Analysis of Nutrient Removal from Municipal Wastewater by Microalgal Biofilms. *Water*, 4(2), 460–473.

- Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P., Cecchi, F., (2005). Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochemistry* 40, 1453-1460.
- Bonmati ,A., Flotats, X., Mateu ,L., Campos ,E. (2001) Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Water Science Technology* 44(4),,109-116.
- Borisova, Y. V., & Nogina, T. M. (2000). Bacteria of the Genus *Rhodococcus* Accompanying Green Algae in Nature and under Conditions of Laboratory Cultivation. *Hydrobiological Journal*, 36(4).
- Borowitzka, M. A., (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 313–321.
- Bougrier, C., Albasi, C., Delgenes, J.P., Carrere, H., (2006). Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilization and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering Process*. 45 (8), 711–718.
- Bougrier, C., Carrere, H., Delgenes, J.P., (2005). Solubilization of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical. Engineering Journal*. 106 (2), 163–169.
- Braun , R., Huber ,P., Meyrath ,J., (1981). Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnology Letters* 3,159-164.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151,315-331.
- Bulgakov, N. G., & Levich, A. P. (1999). The nitrogen : Phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure : Nutrient ratios. *Archiv für Hydrobiologie*, 146(1), 3–22.
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., & Kovar, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 31–46.
- Burczyk, J., Dworzanski ,J.P., (1988). Comparison of sporopollenin-like algal resistant biopolymer from cell wall of *Botryococcus*, *Scenedesmus* and *Lycopodium clavatum* by GC-pyrolysis. *Phytochemistry* 27(7), 2151-2153.

- Burlew, J. S. (1953). *Agal culture from Laboratory to pilot plant.* (J. S. Burlew, Ed.). Washington: Carnegie Institution of Washington.
- Cadore, P. J., & Bernard, O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis, *202(3)*, 201–211.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360–369.
- Calvin, M. (1961). The path of carbon in photosynthesis.
- Carlsson ,A.S., Van Bilein ,J.B., Möller ,R., Clayton ,D., Bowles ,D. (2007). *Outputs from EPOBIO Project: micro-and macroalgae utility for industrial application.* York,UK:CPL Press.
- Caron, D.A., (1994). Inorganic nutrients, bacteria, and the microbial loop. *Microb Ecol* *28*, 295-298.
- Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D. J., Delgenès, J. P., Steyer, J. P., & Ferrer, I. (2010). Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: a review. *Journal of hazardous materials*, *183(1-3)*, 1–15.
- Carver, S. M., Hulatt, C. J., Thomas, D. N., & Tuovinen, O. H. (2011). Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H₂ production. *Biodegradation*, *22(4)*, 805–14.
- Chae SR, Hwang EJ, Shin HS. (2006). Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresource Technology* *97*,322-329.
- Chang ,D.W., Hsieh ,M.L., Chen Y.M., Lin ,T.F., Chang ,J.S., (2010). Kinetics of cell lysis for *Microcystis aeruginosa* and *Nitzschia palea* in the exposure to b-cyclocitral. *Journal of Hazard Material* *185*, 1214-1220.
- Chen ,P.H., Oswald ,W.J., (1998). Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environment International* *24(8)*:889-897.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* *99*,4044-4064.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S., (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology* *102*, 71-81.

- Chen, P. H., (1987). Factors influencing methane fermentation of microalgae. PhD thesis, University of California, Berkeley, CA, USA.
- Chiaramonti, D., Prussi, M., Casini, D., Tredici, M. R., Rodolfi, L., Bassi, N., Zittelli, G. C., *et al.* (2012). Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. *Applied Energy*, 102, 101-111.
- Chin, W.-C., Orellana, M.V., Verdugo, P., (1998). Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 391, 568-572.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Das, K.C., (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*. 10, 518-532.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294–306.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology*, 26(3), 126–131.
- Chiu, S.-Y., Kao, C.-Y., Chen, C.-H., Kuan, T.-C., Ong, S.-C., Lin, C.-S., (2008). Reduction of CO₂ by high-density culture of *Chlorella* sp. in a semi-continuous photobioreactor. *Bioresource Technology* 99, 3389-3396.
- Cho, S.H., Ji, S.C., Hur, S.B., Bae, J., Park, I.S., Song, Y.C., (2007). Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fisheries Science* 73, 1050-1056.
- Christ ,O., Wilderer ,P.A., Angerhöfer ,R., Faulstich ,M. (2000). Mathematical modeling of the hydrolysis of anaerobic processes. *Water Science Technology* ,41(3),61-65.
- Chynoweth ,D.P., Isaacson ,R. (1987) *Anaerobic digestion of biomass*. Elsevier Applied Science Publishers LTD.
- Cirne ,D.G., Paloumet ,X., Björnsson ,L., Alves M.M., Mattiasson ,B. (2007). Anaerobic digestion of lipid-rich waste—effects of lipid concentration. *Renewable Energy* 32,965-975.
- Cole, J. J. (1982). Interactions Between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13(1), 291–314.
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R.-A., & Steyer, J.-P. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource technology*, 102(1), 207–214.

- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., del Borghi, M., (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering Process*. 48, 1146–1151.
- Converti, A., Oliveira, R.P.S., Torres, B.R., Lodi, A., Zilli, M., (2009). Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. *Bioresource Technology* 100 (23),5771-5776.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064), 90–3.
- Croft, M. T., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2006). Algae need their vitamins. *Eukaryotic cell*, 5(8), 1175–83. doi:10.1128/EC.00097-06
- Crutzen, P.J., Mosier, A.R., Smith, K.A., Winiwarter, W., (2008). N2O release from agrobiocfuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics* 8, 389-395.
- Day, J. G., Slocombe, S. P., & Stanley, M. S. (2012). Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. *Bioresource technology*, 109, 245–51.
- de Schampelaire ,L., Verstraete ,W., (2009). Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system. *Biotechnol Bioeng* 103(2),296-304.
- de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource technology*, 101(6), 1611–1627.
- Delbes, C., Moletta, R., Godon, J.J., (2001). Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *Fems Microbiology Ecology* 35, 19-26.
- Derenne ,S., Largeau ,C., Berkloff ,C., Rousseau ,B., Wilhelm ,C., Hatcher ,P.G. (1992). Non-hydrolysable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochemistry* 31:1923-1929.
- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., & Posewitz, M. C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 19(3), 235–240.
- Donk, E. Van, & Liirling, M. (1997). Altered cell wall morphology in nutrient-deficient impact on grazers phytoplankton and its. *Limnology and oceanography*, 42(2), 357–364.

- Doucha, J., Straka, F., Livansky, K., (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorellasp.*) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 17, 403-412.
- Droop, M. R. (1983). 25 years of algal growth kinetics. *Botanica marina* 26,99-112.
- Droop, M. R. (2007). Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of Plankton Research*, 29(2), 107–113.
- Dumas, C., Perez, S., Paul, E., Lefebvre, X., (2010). Combined thermophilic aerobic process and conventional anaerobic digestion: effect of sludge biodegradation and methane production. *Bioresource Technology* 101, 2629-2636.
- DuRand, M.D., Olson, R.J., 1998. Diel patterns in optical properties of the chlorophyte *Nannochloris* sp.: relating individual-cell to bulk measurements. *Limnology and Oceanography* 43, 1107-1118.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J., (2011). Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy* 88, 3454-3463.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J., (2010). Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production. *Applied Energy* 88, 3454–3463.
- Eisenberg ,D.M., Benemann ,J.R., Weissman ,J.C., Oswald ,W.J. (1981). Large-scale freshwater microalgae biomass production for fuel and fertilizer, final report. Golden, Colorado: Solar Energy Research Institute.
- Eland, L. E., Davenport, R., & Mota, C. R. (2012). Evaluation of DNA extraction methods for freshwater eukaryotic microalgae. *Water research*, 46(16), 5355–64.
- Eléments de contexte et règlement Française relatif à la valorisation des boues issues du traitement des boues activées. (2009).
- Elser ,J.J., Fagan W.F., Denno ,R.F., Dobberfuhr ,D.R., Folarin A., Huberty A., *et al.* (2000). Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* 408, 578-80.

- Emienour-Muzalina, M., Phang, S.-M., & Chu, W.-L. (2011). Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 953–963.
- Eppley, R.W., Coatsworth, J.L., Solorzano, L., (1969). Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 14, 194-205.
- Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (1997). *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science.
- Feng, X., Lei, H., Deng, J., Yu, Q., Li, H., (2009). Physical and chemical characteristics of waste activated sludge treated ultrasonically. *Chemical Engineering and Processing*. 48, 187–194.
- Ferrón, S., Ho, D. T., Johnson, Z. I., & Huntley, M. E. (2012). Air-water fluxes of N₂O and CH₄ during microalgae (*Staurosira* sp.) cultivation in an open raceway pond. *Environmental science & technology*, 46(19), 10842–8.
- Folmer, F., Jaspars, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews*, 9(4), 557–579. doi:10.1007/s11101-010-9200-2
- Foree, E.G., McCarty, M., (1970). Anaerobic decomposition of algae. *Env. Sci. Technol.* 4 (10),842-849.
- Fouilland, E., (2012). Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11, 1-4.
- Fouilland, E., Descolas-Gros, C., Courties, C., Collos, Y., Vaquer, A., Gasc, A., (2004). Productivity and growth of a natural population of the smallest free-living eukaryote under nitrogen deficiency and sufficiency. *Microbial Ecology* 48, 103-110.
- Fouilland, E., Mostajir, B., (2010). Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 419-429.
- Frigon, J.-C., Matteau-Lebrun, F., Hamani Abdou, R., McGinn, P. J., O’Leary, S. J. B., & Guiot, S. R. (2013). Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Applied Energy*, 108, 100–107
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teysier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4, 634-643.

- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407–418.
- Fukuda, R., Ogawa, H., Nagata, T., Koike, I., (1998). Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3352-3359.
- Garrote ,G., Dominguez ,H., Parajo, J.C. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst* 57(3):191-202.
- Geider, R.J., La Roche, J., (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37, 1-17.
- Gelin, F., Volkman, J.K., Largeau, C., Derenne, S., Damste Sinninghe, J.S., De Leeuw, J.W., (1999). Distribution of aliphatic, non-hydrolyzable biopolymers in marine microalgae org. *Geochemistry* 30, 147-159.
- Ghosh, S., Henry, M.P., Christopher, R.W., (1985). Hemicellulose conversion by anaerobic digestion. *Biomass* 6, 257-269.
- Gibson, J.H., Hon, H., Farnood, R., Droppo, I.G., Seto, P., (2009). Effects of ultrasound on suspended particles in municipal wastewater. *Water Research*. 43, 2251–2259.
- Golueke CG, Oswald WJ , Gotaas HB (1957). Anaerobic digestion of algae. *Applied Microbiology* 15, 47-55.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., 1959. Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Appl. Microbiol.* 7, 219-227.
- Gonzalez , C., Marciniak , J., Villaverde ,S., Leon ,C., Garcia P.A., Munoz R. (2008). Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science Technology* 58(1), 95-102.
- Gonzalez-Fernandez ,C., Molinuevo-Salces ,B., Garcia-Gonzalez ,M.C. (2011). Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. *Applied Energy* 88(10):3448-3453.
- Gonzalez-Fernandez ,C., Sialve ,B., Bernet ,N., Steyer ,J.P. (2012). Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology*, 110, 610-616.

- González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, MC., (2011b). Evaluation of anaerobic codigestion of microalgal biomass and swine manure via response surface methodology. *Applied Energy* 88, 3448–3453.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, JP., (2011a). Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel Part II: focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6(2), 205-218.
- Gonze, E., Pillot, S., Valette, E., Gonthier, Y., Bernis, A., (2003). Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor. *Chemical Engineering and Processing* 42, 965–975.
- Grima Molina, E., Belarbi, E.-H., Acién Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y., (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20 (7-8), 491-515.
- Grima, E. M. (2002). *Microalgae, Mass Culture Methods*. Encyclopedia of Bioprocess Technology. John Wiley & Sons, Inc.
- Grobbelaar JU. (2004) Algal nutrition. In Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Wiley-Blackwell; 2004.
- Grobbelaar, J. U. (2007). Algal Nutrition – Mineral Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 95–115). Blackwell Publishing Ltd.
- Grossart, H.P., Simon, M., (2007). Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* 47, 163-176.
- Halleux, H., Lassaux, S., Renzoni, R., Germain, A. (2008). Comparative life cycle assessment of two biofuels ethanol from sugar beet and rapeseed methyl ester. *International Journal of LCA* 13(3), 184-190.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure. inhibition by ammonia. *Water Research* 32(1):5-12.
- Harris, R.F., Adams, S.S. (1979). Determination of the carbon-bound electron composition of microbial cells and metabolites by dichromate oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 237-243.
- Harun, R., Danquah, M.K. (2010). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* 46(1), 304-309.

- Haug , R.T., Stuckey ,D.C., Gossett ,J.M., Mac Carty ,P.L. (1978). Effect of thermal pretreatment on digestibility and dewaterability of organic sludges. *Journal of Water Pollution Control* 50(1):73-85.
- Hegewald, E., Aldave, A., Schnepf, E., (1975). Investigations on the lakes of Peru and their phytoplankton. The algae of pond La Laguna, Huanuco, with special reference to *Scenedesmus intermedius* and *S. armatus*. *Archive Hydrobiology* 82, 207–215.
- Henley, W.J., Major, K.M., Hironaka, J.L., (2002). Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae. *Journal of Phycology* 38, 757-766.
- Heubeck ,S., Craggs ,R.J., Shilton ,A. (2007). Influence of CO₂ scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. *Water Science Technology* 55(11),193-200.
- Hoiczuk, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of bacteriology* 182(5), 1191–9.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 54(4), 621–39.
- Hulatt, C.J., Thomas, D.N., (2010). Dissolved organic matter (DOM) in microalgal photobioreactors: a potential loss in solar energy conversion ? *Bioresource Technology* 101, 8690-8697.
- Hulatt, C.J., Thomas, D.N., (2011). Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. *Bioresource Technology* 102, 6687-6695.
- Huntley ME, Redalje DG., (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12:573-608.
- Illman ,A. , Scragg ,A., Shales ,S.,(2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27; 631-635.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shalles, S.W., (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 631- 635.
- James, T. Y., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M. J., Griffith, G. W., *et al.* (2007). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860–871.

- Janczyk ,P., Franke ,H., Souffrant ,W.B., (2007). Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science Technology* 132, 163-169.
- Jiang, J.-Q., Graham, N.J.D., Harward, C., (1993). Comparison of polyferric sulphate with other coagulants for the removal of algae and algae-derived organic matter. *Water Science Technology* 27, 221-230.
- Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., Guo, R., (2011). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied energy* 88, 3336-3341.
- Jirka, A.M., Carter, M.J., (1975). *Analytical Chemistry* 47 (8), 1397.
- Kadam, K. L. (2001). *Microalgae Production from Power Plant Flue Gas: Environmental Implications on a Life Cycle Basis*.
- Källqvist, T., & Svenson, A. (2003). Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. *Water Research*, 37(3), 477–484.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z., Aaronson, S. (1986). Algal Nutrition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 147–198). Boca Raton, FL., USA: CRC Press.
- Kazamia, E., Aldridge, D. C., & Smith, A. G. (2012). Synthetic ecology – A way forward for sustainable algal biofuel production? *Journal of Biotechnology*, 162(1), 163–169.
- Kepp ,U., Machenbach ,I., Weisz ,N., Solheim ,O.E, (2000). Enhanced stabilisation of sewage sludge through thermal hydrolysis — three years of experience with full scale plant. *Water Science Technology* 42(9), 89-96.
- Ketchum BH, Redfield AC. Some physical and chemical characteristics of algae growth in mass culture. *J Cell Physiol* 1949;33:281-99.
- Kim, M.-K., Jeune, K.-H., 2009. Use of FT-IR to identify enhanced biomass production and biochemical pool shifts in the marine microalgae, *Chlorella ovalis*, cultured in media composed of different ratios of deep seawater and fermented animal wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 1206-1212.
- Kita, K., Okada, S., Sekino, H., Imou, K., Yokoyama, S., Amano, T., (2010). Thermal pretreatment of wet microalgae harvest for efficient hydrocarbon recovery. *Applied. Energy* 87, 2420–2423.

- Komaki ,H., Yamashita ,M., Niwa ,Y., Tanaka ,Y., Kamiya ,N., Ando ,Y., *et al.* (1998). The effect of processing of *Chlorella vulgaris*: K-5 on in vitro and in vivo digestibility in rats. *Animal Feed Science Technology* 70, 363-366.
- Koster ,I.W., Lettinga ,G., (1988). Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes* 25,51-59.
- Koster, I.W., Lettinga, G., (1984). The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agricultural Wastes* 9, 205-216.
- Kugelman ,I.J., McCarty ,P.L. (1965). Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. I. Slug feed studies. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 37, 97-116.
- Labeckas ,G., Slavinskas ,S., (2009). Comparative performance of direct injection diesel engine operating on ethanol, petrol and rapeseed oil blends. *Energy Convers Manag* 50(3), 792-801.
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2009). Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*, 43(17), 6475–6481.
- Laureano-Perez ,L., Teymouri ,F., Alizadeh ,H., Dale ,B.E., (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl Biochem Biotech* 124(1-3):1081-1099.
- Leadbeater ,B.S.C., (2006). The ‘Droop equation’-Michael Droop and the legacy of the ‘cell-quota model’ of phytoplankton growth. *Protist* 157 (3), 345-358.
- Leboulanger, C., Quiblier, C., Dufour, P., (2006). Rapid assessment of multiple-limiting factors of phytoplankton biomass: bioassays, in vivo chlorophyll-a fluorescence, and factorial design. *Archiv Fur Hydrobiologie* 166, 433-451.
- Ledford, H. K., Niyogi, K. K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, cell and environment* 28(8), 1037–1045.
- Lee, J-Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101, 575–577.
- Lee, Y.-K. (2007). *Algal Nutrition – Heterotrophic Carbon Nutrition*. *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 116–124). Blackwell Publishing Ltd.
- Lefebvre ,O., Moletta ,R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Research* 40, 3671-82.

- Levine, R. B., Costanza-Robinson, M. S., & Spatafora, G. A. (2011). *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 40–49.
- Li ,Y., Horsman ,M., Wu ,N., Lan ,C.Q., Dubois-Calero ,N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Prog* 24(4), 815-820.
- Li ,Y.Y., Sasaki ,H., Yamashita ,K., Seki ,K., Kamigochi ,I., (2002). High-rate methane fermentation of lipid-rich food wastes by a high-solids co-digestion process. *Water Sci Technology* 45(12),143-150.
- Lin, L., Chan, G. Y. S., Jiang, B. L., & Lan, C. Y. (2007). Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste management (New York, N.Y.)*, 27(10), 1376–1382.
- Liu, W. K., Yang, Q.-C., & Du, L. (2009). Soilless cultivation for high-quality vegetables with biogas manure in China: Feasibility and benefit analysis. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 24(04), 300.
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., Bergman, R., (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42, 3-40.
- Macedo, M. F., Miller, A. Z., Dionísio, A., & Saiz-Jimenez, C. (2009). Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 11), 3476–3490.
- Maeda ,K., Owada ,M., Kimura ,N., Omata ,K., Karube ,I. (1995). CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management* 36, 717-720.
- Mandeno ,G., Craggs ,R., Tanner ,C., Suskias ,J., Webster-Brown ,J. (2005). Potential biogas scrubbing using a high rate pond. *Water Science Technology* 51(12),253-256.
- Marcato, C. E., Pinelli, E., Pouech, P., Winterton, P., & Guiresse, M. (2008). Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. *Bioresource technology*, 99(7), 2340–2348.
- Marcato, C.-E., Pinelli, E., Cecchi, M., Winterton, P., & Guiresse, M. (2009). Bioavailability of Cu and Zn in raw and anaerobically digested pig slurry. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(5),

- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R., Robert, R., Cadoret, J.P., (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture* 326-329, 115-116.
- Margesin, R., & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in microbiology*, 162(3), 346–61.
- Markou G., Angelidaki I., Georgakakis D., (2013). Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel*, 111, 872-879.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74, 3-16.
- Mata-Alvarez, J., Cecchi, F., Pavan, P., Llabres, P., (1990). The performances of digesters treating the organic fraction of municipal solid wastes differently sorted. *Biological Wastes* 33, 181-199.
- Masojidek, J., Klobizek, M., Torzillo; G. (2007). Photosynthesis in Microalgae. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture*. Oxford: Blackwell Publishing. p. 20- 39.
- Mc Carty, P.L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public Works* 95(9), 91-99.
- Metting, F.B., (1996). Biodiversity and application of microalgae. *J Ind Microbiol* 17, 477-489.
- McGinn, P. J., Dickinson, K. E., Park, K. C., Whitney, C. G., MacQuarrie, S. P., Black, F. J., Frigon, J.-C., *et al.* (2012). Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. *Algal Research*, 1(2), 155–165.
- McKendry (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology* 83(1); 37-46.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., (2009). StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9, 1359-1363.
- Michiki, H., (1995). Biological CO₂ fixation and utilization project. *Energy Conversion Management* 36, 701-705.

- Milledge, J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(1), 11.
- Milledge, J. J., & Heaven, S. (2012). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1–14.
- Molinuevo-Salces, B., García-González, M.C., González-Fernández, C., 2010. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresource Technology* 101, 5144–5149.
- Möller, K., & Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242–257.
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X., (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress*, 28(2), 299–311.
- Montusiewicz, A., Lebiocka, M., Rozej, A., Zacharska, E., & Pawłowski, L., (2010). Freezing/thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. *Bioresource technology*, 101(10), 3466–3473.
- Morse, G., Brett, S., Guy, J., & Lester, J., (1998). Review: Phosphorus removal and recovery technologies. *The Science of The Total Environment*, 212(1), 69–81.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., & Kebede-Westhead, E., (2008). Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource technology*, 99(17), 8137–8142.
- Muller-feuga, A., Moal, J., & Kaas, R., (2003). The aquaculture of microalgae. In L. A. McEvoy & J. G. Stottrup (Ed.), *Live feeds in marine aquaculture* (pp. 206–252). London, UK: Wiley-Blackwell.
- Munoz ,R. , Jacinto ,M., Guieysse ,B., Mattiasson ,B. (2005). Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 699-707.
- Murray, J., & King, D. (2012). Oil's tipping point has passed. *Nature*, 481, 433–435.
- Mussgnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51–56.

- Ogbonna, J. C., Yoshizawa, H., & Tanaka, H. (2000). Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 277–284.
- Okuda K. Structure and phylogeny of cell coverings. *J Plant Res* 2002;115:283-8.
- Olaizola ,M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20, 459-466.
- Olguín ,E.J. (2000). The cleaner production strategy applied to animal production. In: Olguín EJ, Sánchez G, Hernández E, editors. *Environmental biotechnology an cleaner bioprocesses*. London: Taylor and Francis. p. 227-243.
- Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology advances*, 30(5), 1031–1046.
- Omil ,F., Mendez ,R., Lema ,J.M. (1995) Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulfide and ammonia content. *Bioresource Technology* 1995;54:269-78.
- Orandi, S., Lewis, D. M., & Moheimani, N. R. (2012). Biofilm establishment and heavy metal removal capacity of an indigenous mining algal-microbial consortium in a photo-rotating biological contactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(9), 1321–31.
- Oswald ,W.J., Golueke ,C.G. (1960). Biological transformation of solar energy. *Advances in Applied Microbiology* 2, 223-62.
- Oswald, W.J., Gotaas, H.B., Ludwig, H.F., Lynch, V., (1953). Algae symbiosis in oxidation ponds: II. Growth characteristics of *Chlorella pyrenoidosa* cultured in sewage. *Sewage and Industrial Wastes* 25, 26-37.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011a). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1), 35–42.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011b). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water research*, 45(20), 6637–49.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011c). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35–42.

- Passos, F., García, J., & Ferrer, I. (2013). Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.114
- Pavlostathis ,S.G., Giraldo-Gomez ,E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* 21:411-490.
- Penard, E. (1922). *Etude sur les infusoires d'eau douce*. Genève: Georg. et Cie.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11–36.
- Phang ,S.M., Miah ,M.S., Yeoh ,B.G., Hashim ,M.A. (2000). Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology* 12(3), 395-400.
- Pulz, O., & Sheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors : Design and performance with respect to light energy input. *Advances in biochemical engineering, biotechnology* 59, 123–152.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology* 57, 287–293.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), 635–48.
- Qiang H. (2004). Environmental effects on cell composition. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Wiley-Blackwell; 2004. p. 83-93.
- Quigley, M.S., Santschi, P.H., Guo, L., Honeyman, B.D., (2001). Sorption irreversibility and coagulation behavior of ²³⁴Th with marine organic matter. *Marine Chemistry* 76, 27-45.
- Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P., (2011). Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 102 (1), 200–206.
- Rasi ,S., Veijanen ,A., Rintala ,J. (2007). Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy* 32,1375-1380.
- Redfield, A. (1934). On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton, 177 – 192.
- Reijnders, L. (2006). Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. *Energy Policy*, 34(7), 863–876.

- Ribalet ,F., Berges ,J.A., Ianora ,A., Casotti ,R. (2007). Growth inhibition of cultured marine phytoplankton by toxic algal-derived polyunsaturated aldehydes. *Aquatic Toxicology* 85(3), 219-227.
- Richards, R. G., & Mullins, B. J. (2013). Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecological Modelling* 249, 59–67.
- Rinzema ,A., van Lier ,J., Lettinga ,G. (1988). Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 10, 24-32.
- RITTIMO. (2011). Qualité agronomique et sanitaire des digestats.
- Rivasseau, C., Farhi, E., Atteia, A., Couté, A., Gromova, M., De Gouvion Saint Cyr, D., Boisson, A.-M., *et al.* (2013). An extremely radioresistant green eukaryote for radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry. *Energy & Environmental Science*, 6(4), 1230.
- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C., Henriques, M.H.F., (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* 20, 237-242.
- Rodolfi ,L., Chini Zittelli ,G., Bassi ,N., Padovani ,G., Biondi ,N., Bonini ,G., *et al.* (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102(1),100-112.
- Safonova, E., Kvitko, K. V., Iankevitch, M. I., Surgko, L. F., Afti, I. A., & Reisser, W. (2004). Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia. *Chemical engineering & technology*, 27(8), 347–353.
- Samson ,R., LeDuy ,A. (1982). Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnology Bioengineering* 24, 1919-1924.
- Samson ,R., LeDuy ,A. (1986). Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algae biomass. *Biotechnology Bioengineering* 28,1014-1023.
- Samson ,R., LeDuy ,A. (1983b). Improved performance of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass by addition of carbon-rich wastes. *Biotechnology Letters* 5,677-682.
- Samson R, LeDuy A. (1983a). Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnology Letters* 5: 671-676.
- Samson, R., Leduy, A., (1982). Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnology Bioengineering* 24, 1919-1924.

- Samson, R., LeDuy, A., 1983. Improved performance of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass by addition of carbon-rich wastes. *Biotechnology Letters* (10), 677-682.
- Sanchez ,E.P., Travieso ;L. (1993). Anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* for energy production. *Resources, Conservation and Recycling* 9, 127-132.
- Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S., & Tréguer, P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*, 53(1-2), 25–42.
- Sato, M., Murata, Y., Mizusawa, M., Iwahashi, H., Oka, S., (2004). A simple and rapid dual-fluorescence viability assay for microalgae. *Microbiol. Cult. Coll.* 20 (2), 53–59.
- Schwede, S., Kowalczyk, A., Gerber, M., & Span, R. (2011). Influence of Different Cell Disruption Techniques on Mono Digestion of Algal Biomass, 41–47.
- Sharma, N. K., Rai, A. K., Singh, S., & Brown, R. M. (2007). Airborne algae: their present status and relevance 1. *Journal of Phycology*, 43(4), 615–627.
- Show, K-Y., Mao, T., Lee, D-J., 2007. Optimization of sludge disruption by sonication. *Water Research*. 41, 4741–4747.
- Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409–416.
- Speece , R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Nashville: Archae press.
- Spoehr HA, & Milner HW. (1949). The chemical composition of *Chlorella* : effect of environmental conditions. *Plant Physiology* 24, 120–149.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2), 87–96.
- Staub, R., (1961). Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an *Oscillatoria rubescens*. D. C.-Schweiz. Z. *Hydrologia* 23, 82–198.
- Strik D, Domnanovich AM, Holubar P. (2006). A pH-based control of ammonia in biogas during anaerobic digestion of artificial pig manure and maize silage. *Process Biochemistry* 41, 1235-1238.

- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnology advances*, 29(6), 896–907.
- Sumper, M., & Kruger, N. (2004). Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2059. doi:10.1039/b401028k
- Symons, G.E., Buswell, A.M., (1933). The methane fermentation of carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society* 55, 2028-2036.
- Takeda, H., (1996). Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry* 42, 673–675.
- Tang, B., Yu, L., Huang, S., Luo, J., & Zhuo, Y. (2010). Energy efficiency of pre-treating excess sewage sludge with microwave irradiation. *Bioresource technology*, 101(14), 5092–7.
- Tang, X., He, L.Y., Tao, X.Q., Dang, Z., Guo, C.L., Lu, G.N., Yi, X.Y., (2010). Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil. *Journal of Hazardous Materials* 181, 1158-1162.
- Tiehm, A., Nickel, K., Zellhorn, M., Neis, U., (2001). Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*. 35 (8), 2003–2009.
- Travieso, L., Sanchez, E.P., Benitez, F., Conde, J.L., (1993). *Arthrospira* sp. intensive cultures for food and biogas purification. *Biotechnology Letters* 15, 1091-1094.
- Troussellier, M., Bonnefont, J.-L., Courties, C., Derrien, A., Dupray, E., Gauthier, M., Gourmelon, M., *et al.* (1998). Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanologica Acta*, 21(6), 965–981.
- Tsao, G.T., (1987). In: Chynoweth DP, Isaacson R, editors. Pre-/posttreatment. *Anaerobic digestion of biomass*. Elsevier Applied Science.
- Türker, M., & Celen, I. (2007). Removal of ammonia as struvite from anaerobic digester effluents and recycling of magnesium and phosphate. *Bioresource technology*, 98(8), 1529–34.
- Uziel, M. (1978). Solar energy fixation and conversion with algal bacterial systems. PhD thesis. University of California, Berkeley, CA, USA.
- Valo, A., Carrère, H., & Delgenès, J. P. (2004). Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(11), 1197–1203.

- Valo, A., Carrere, H., Delgenes, J.P., (2004). Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79 (11), 1197-1203.
- Van Den Hende, S., Vervaeren, H., & Boon, N. (2012). Flue gas compounds and microalgae: (Bio)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnology advances* 30(6), 1405-1424.
- Van Velsen, A.F.M., (1979). Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia- nitrogen concentrations. *Water Research*. 13, 995-999.
- Vandamme, D., Foubert, I., & Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in biotechnology*, 31(4), 233–239.
- Vandenbroucke, M., & Largeau, C. (2007). Kerogen origin, evolution and structure. *Organic Geochemistry*, 38(5), 719–833. doi:10.1016/j.orggeochem.2007.01.001
- Venkatesan, R., Kumaraguru Vasagram, K.P., Balasubramanian, T., (2006). Culture of marine microalgae in shrimp farm discharge water: a sustainable approach to reduce the cost production and recovery of nutrients. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 1, 262-269.
- Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In R. A. (Ed.), *Handbook of microalgal mass culture* (pp. 117–145). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Walker, D. A. (2009). Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 509–517.
- Wang, J., and Evangelou, V.P., (1995). Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole, in *Handbook of Plant and Crop Physiology*, ed by Pessaraki M. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA, pp. 695–717..
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology* 79(5); 707-18.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., & Ruan, R. R. (2010). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource technology* 101(8), 2623–2628.
- Wang, T., Yabar, H., & Higano, Y. (2013). Perspective assessment of algae-based biofuel production using recycled nutrient sources: The case of Japan. *Bioresource technology* 128, 688–96.

- Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 232(10), 1266–74.
- Widjaja, A., Chien, C.-C., & Ju, Y.-H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13–20.
- Wilkie, A. (2002). Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresource Technology*, 84(1), 81–91.
- Wilkie, A. C., Edmundson, S. J., & Duncan, J. G. (2011). Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development*, 15(4), 365–371.
- Williams, P.B., Laurens, L.M., (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science* 3, 554-590.
- Witt, U., Koske, P.H., Kuhlmann, D., Lenz, J., Nellen, W., (1981). Production of *Nannochloris spec.* (Chlorophyceae) in large-scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. *Aquaculture* 23, 171-181.
- Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., & Nelson, Y. (2009). Algae Grown on Dairy and Municipal Wastewater for Simultaneous Nutrient Removal and Lipid Production for Biofuel Feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 135(11), 1115–1122.
- Wu, J. F., & Pond, W. G. (1981). Amino acid composition and microbial contamination of *Spirulina maxima*, a blue-green alga, grown on the effluent of different fermented animal wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 27-27(1), 151–159.
- Wu, J.-T., Chiang, Y.-R., Huang, W.-Y., & Jane, W.-N. (2006). Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 80(4), 338–345.
- Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499–507.
- Yahi, H., Elmaleh, S., Coma, J., (1994). Algal flocculation - sedimentation by pH increase in a continuous reactor. *Water Science Technology*. 30, 259-267.

- Yen, H.W., Brune, D.E., (2007). Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology* 98, 130-134.
- Yan, Y., Feng, L., Zhang, C., Zhu, H., Zhou, Q., (2010). Effect of ultrasonic specific energy on waste activated sludge solubilization and enzyme activity. *African Journal of Biotechnology* 9 (12), 1776–1782.
- Yang, Y., Xu, J., Vail, D., & Weathers, P. (2011). *Ettlia oleoabundans* growth and oil production on agricultural anaerobic waste effluents. *Bioresource technology*, 102(8), 5076–82.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X. (2010). Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (18), 9618–9623.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Luo, S. (2011). Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (5), 3465–3470.
- Yen, H.W., Brune, D.E. (2007). Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98, 130-134.
- Zhu, X.-G., Long, S. P., & Ort, D. R. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Current opinion in Biotechnology*, 19(2), 153–9.



MICROALGAE CULTIVATION AND ANAEROBIC DIGESTION : ORGANIC MATTER AND ENERGY TREATMENT AND RECOVERY AS PART OF ENVIRONMENTAL BIOREFINERY

In recent years, there has been an explosion of interest in the use of microalgae as a source of bioenergy. Mass cultivation of microalgae for bioenergy production promises several advantages compared to first and second generation biofuels. However, similar difficulties in terms of nutrient requirements and an unfavourable energy balance are faced. As a consequence, achieving the sustainable levels of microalgal culture required to implement this strategy in the longer term appears problematic. The work presented in this thesis focuses on anaerobic digestion; a solution which allows both recycling of nutrients and supply of energy to the production and downstream processes. In particular, the studies presented here have been directed towards the integration of microalgal culture and methanisation, at both the laboratory and pilot scale. The guiding principle used is conversion of biomass and provision of nutrients to the culture. We first identified the constraints and potential strategies associated with the aerobic biodegradability of microalgae. Next, we demonstrated that the energetic potential of cells is limited by their quality as well as their level of resistance to biological degradation. We have shown that it is possible to optimise the conversion step, increasing energy yields and nutrient mineralisation via a strategy of thermal pretreatment. The use of a natural microalgae-bacteria ecosystem which uses a synthetic digestate as culture media, revealed a key role for bacterial flora interacting with microalgae. These results were further tested in a pilot-level production system specifically designed to address these questions. The evidence suggests that the characteristics of the culture pond determine both the hydrodynamic behaviour of the culture and the physical and ecological behaviour of the phytoplanktonic population. A study of the dynamics of the microbial, eukaryotic and prokaryotic communities suggests the presence of a resilient and complex ecosystem, which is influenced by variations in its environment. The results of this work provide opportunities for management and optimisation of processes integrating microalgae cultivation and methanisation beyond bioenergy production, for example liquid wastes treatment and production of high-value byproducts.

DEFENDED ON 15TH JULY 2013 AT :



WITH THE FINANCIAL SUPPORT OF :



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Unité de recherche (UR0050) - Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

102, avenue des Etangs
F-11100 Narbonne
France

Tél. : + 33 4 68 42 51 51
Courriel: lbe-contact@supagro.inra.fr
www.montpellier.inra.fr/narbonne

