

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CARACTÉRISATION MICROBIENNE DE DEUX CONSORTIUMS DE
MICROALGUES-BACTÉRIES CULTIVÉS EN EAUX USÉES INDUSTRIELLES
ET RECHERCHE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
MARGUERITE CINQ-MARS

NOVEMBRE 2021

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Le présent travail n'aurait pu voir le jour sans l'aide, le soutien et la collaboration de nombreux partenaires. Je remercie d'abord mon directeur de recherche, le professeur Simon Barnabé. Il m'a offert, tout au long de mes études universitaires, d'innombrables opportunités de m'améliorer, tant sur le plan professionnel que personnel, en m'invitant à participer à des congrès internationaux ou encore en m'encourageant à m'impliquer dans le domaine de la vulgarisation scientifique. Je remercie également ma codirectrice, la professeure Isabel Desgagné-Penix, pour son accueil bienveillant au sein de son équipe de recherche. Les membres passionnés de son équipe, ainsi que celle du professeur Hugo Germain, m'en ont appris énormément sur la biologie moléculaire. Je remercie aussi grandement Nathalie Bourdeau, chercheuse à Innofibre, pour son écoute, ses conseils et son apport majeur dans le développement du projet.

Je tiens à remercier aussi toute l'équipe du professeur Simon Barnabé qui, quotidiennement, était là pour me soutenir et discuter de mes problématiques pour trouver des solutions, spécialement Michelle Boivin et Kevin Lajoie. Pour leur assistance technique et les beaux moments partagés, merci également aux auxiliaires de laboratoire et stagiaires Laurianne Thibault, Éric Sinclair Mouna Fomo, Véronique Roy-Blais et Benjamin Dupuy-Galet. Merci également à Frédérique Bélanger-Lépine, Elsy Seminor et Alexandre Tremblay, pour mon initiation au monde des microalgues et leurs nombreux conseils. J'aimerais ensuite remercier l'équipe d'Innofibre pour leur soutien technique et leur aide dans l'analyse des résultats, spécialement Annabelle St-Pierre, Stéphanie Blais, Valérie Cloutier, Josée Doucet et Kamal Kobaa.

Bien sûr, ma maîtrise n'aurait pas été possible sans le support, l'encouragement et l'aide de ma famille et de mes amis. Je remercie particulièrement mon conjoint Alexandre, ma mère Isabelle, ma sœur Justine et mon amie Véronique.

Je remercie finalement les collaborateurs et organismes subventionnaires qui ont permis de rendre cette recherche possible : la ville de Victoriaville, Sani Marc Inc., Laboratoire Abbott-Canlac Group, et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FRQNT).

AVANT-PROPOS

Ce mémoire fait l'objet du travail réalisé de mai 2018 à mai 2021 dans le cadre de la maîtrise en sciences de l'environnement. Il a été effectué sous la supervision des professeurs Simon Barnabé et Isabel Desgagné-Penix, dans le Département de chimie, biochimie et physique à l'Université du Québec à Trois-Rivières. Ce mémoire comporte trois principaux chapitres. Le premier présente l'introduction, la problématique et les objectifs de la recherche. Le deuxième est l'article scientifique en anglais intitulé : « Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization ». Cet article a été soumis au journal scientifique *Algal Research* en octobre 2021. Le troisième et dernier chapitre est une discussion qui se compose de trois sections, soit un retour sur la problématique et les résultats, les limites et perspectives de l'étude et une conclusion.

RÉSUMÉ

L'utilisation de consortiums de microalgues-bactéries, couplée à la valorisation de la biomasse, semble prometteuse pour un traitement des eaux usées économique et respectueux de l'environnement. Cependant, un problème important associé aux consortiums de microalgues cultivées en eaux usées est de prédire comment les différentes espèces évolueront ensemble et comment cela affectera la composition et la productivité des différentes cultures.

Par conséquent, la présente étude vise d'abord à examiner et à comparer les communautés microbiennes associées à un consortium d'algues vertes par rapport à celles d'un consortium de cyanobactéries, qui étaient tous deux des évolutions du même consortium natif de microalgues-bactéries. L'étude vise aussi à comparer leur efficacité de traitement des eaux usées et les métabolites d'intérêt produits. Les cultures des deux consortiums ont été conduites en mode semi-continu dans des photobioréacteurs de 2 L pendant 51 jours en milieu standard avec ou sans apport d'eaux usées. De nombreuses études ont montré que les consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries sont tous deux de bons candidats pour le traitement des eaux usées, de sorte qu'une élimination similaire des nutriments était attendue dans les deux cas. Il est également connu que les algues vertes et les cyanobactéries produisent toutes deux des composés aux activités biologiques intéressantes, mais il était attendu que leurs différences biologiques aient une incidence sur les composés produits, donc sur les perspectives de valorisation.

L'analyse des OTU (unités taxonomiques opérationnelles) des communautés microbiennes a révélé que les Trebouxiophyceae et Gomphosphaeriaceae sont les organismes les plus abondants des consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries respectivement; et que les deux consortiums partageaient respectivement 28 % et 15 % des OTU procaryotes et eucaryotes identifiés. Bien que les cultures enrichies en eaux usées n'atteignent pas les rendements obtenus avec un milieu standard, une croissance significative a été observée avec une efficacité d'élimination des nutriments allant jusqu'à 91 % et 63 % pour l'azote total et le carbone total respectivement. La biomasse algale ainsi que les surnageants des deux consortiums ont été analysés par UPLC-QTOF-MS et GC-MS. Des composés bioactifs d'intérêt tels que l'acide lécanorique (antimicrobien, antioxydant et anticancéreux) et des lipides à haute valeur ajoutée ont été identifiés. De plus, les acides gras polyinsaturés étaient les acides gras les plus abondants dans les échantillons analysés (51 % à 66 %).

Les résultats suggèrent que même si un consortium initial a évolué en deux consortiums différents, les deux peuvent se développer en présence d'eaux usées. De plus, les deux ont pu éliminer une grande partie de l'azote et du carbone tout en produisant des composés intéressants, ce qui ouvre la voie à un processus de traitement des eaux usées potentiellement économiquement viable.

Mots-clés : Microalgues, consortium d'algues-bactéries, métagénomique, molécules d'intérêt, eaux usées industrielles, retrait de nutriments, acide gras.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS.....	iv
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les microalgues : algues vertes et cyanobactéries	1
1.2 La valorisation des microalgues	3
1.3 Les techniques de culture des microalgues.....	5
1.4 Le traitement des eaux usées par les microalgues	7
1.5 Les consortiums de microalgues.....	9
1.6 Problématique.....	11
1.6.1 L'instabilité des consortiums de microalgues.....	11
1.6.2 Projet dans lequel s'intègre l'étude.....	12
1.7 Objectifs de l'étude.....	15
 CHAPITRE II	
CHARACTERIZATION OF TWO MICROALGAE CONSORTIA GROWN IN INDUSTRIAL WASTEWATER FOR BIOMASS VALORIZATION.....	17
2.1 Contributions des auteurs	17
2.2 Résumé de l'article	18
2.3 Article scientifique en anglais : Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization.....	19
2.3.1 Introduction.....	19
2.3.2 Materials and methods.....	22
2.3.3 Results.....	28
2.3.4 Discussion.....	36

2.3.5	Conclusions.....	45
2.3.6	Acknowledgments	45
2.3.7	Conflict of interest	46
2.3.8	References.....	46
2.3.9	Supplementary data.....	54
CHAPITRE III		
	DISCUSSION	66
3.1	Retour sur la problématique et les résultats.....	66
3.2	Limites et perspectives	71
3.3	Conclusions	76
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Addition of wastewater and nutrients in the wastewater condition cultures	24
2.2 Prokaryote and eukaryote taxa identified in the green algae and the cyanobacteria consortia at the end of the culture and their relative abundance in each sample as a percentage of the total OTUs	30
2.3 Compounds with biological activities identified in the biomass extract and supernatant of green algae and cyanobacteria's consortia with wastewater addition following UPLC-QTOF-MS analysis (> 0.5% area).....	41
2.4 Most interesting fatty acids and their relative abundance in the green algae and cyanobacteria consortia in wastewater condition.....	44
S1 All prokaryote taxa identified in the two consortia at the end of the culture and their relative abundance in each sample as a percentage of the total taxa .	54
S2 Characterization of compounds of interest identified from chloroform/methanol extract of green algae consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis.....	59
S3 Characterization of compounds of interest identified in supernatant of green algae consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis	61
S4 Characterization of compounds of interest identified from chloroform/methanol extract of cyanobacteria consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis.....	62
S5 Characterization of compounds of interest identified in supernatant of cyanobacteria consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis	64
S6 The proportion of all fatty acids identified in the oil extracted at the end of the culture of the green algae and cyanobacteria consortia, in control and wastewater condition	65

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Diversité parmi les cyanobactéries et les algues vertes	3
1.2 Différentes voies de valorisation de la biomasse algale, modifiée de Khan et al. (2018)	4
1.3 Principales méthodes de culture à grande échelle des microalgues : en bassins ouverts (A) et en photobioréacteurs tubulaires (B)	6
1.4 Interactions entre les microalgues, les bactéries et les levures	11
1.5 Consortium <i>Vertech</i> à l'échelle macro et microscopique (450X).....	13
1.6 Projet <i>Vertech</i> I : Intégration d'une culture de microalgues à Victoriaville pour l'obtention de produits biosourcés à usage local	13
1.7 Microscopie optique du consortium d'algues vertes (A) et de cyanobactéries (B) (450 X).....	14
1.8 Résumé graphique des objectifs du projet présentés dans ce mémoire	16
2.1 Optical microscopy of the green algae (A) and cyanobacteria (B) consortia (450 X).....	22
2.2 Growth of the green algae (A) and cyanobacteria (B) consortia measured by OD _{750nm}	32
2.3 Nutrient removal by the green algae and the cyanobacteria consortia (↓ = % removal, ↑ = % increase)	34
2.4 Proportion of fatty acids (representing ≥ 5% of fatty acids total weight in at least one condition) in the oil extracted at the end of the culture of the green algae and cyanobacteria consortia, in control and wastewater condition	36
S1 Growth of green algae (A) and cyanobacteria (B) measured by microscope count	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique/Deoxyribonucleic acid
ANOVA	Analyse de la variance (<i>analysis of variance</i>)
BBM	Milieu Bold Basal (<i>Bold's basal medium</i>)
CO ₂	Dioxyde de carbone
CRIEB	Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie
CRIQ	Centre de recherche industrielle du Québec
C _{tot}	Carbone total
GC-MS	Chromatographie gazeuse (<i>Gas chromatography</i>) couplée à un spectromètre de masse (<i>Mass spectrometry</i>)
HIV-1	Virus de l'immunodéficience humaine (<i>Human immunodeficiency virus 1</i>)
HTL	Liquéfaction hydrothermale (<i>Hydrothermal liquefaction</i>)
IBIS	Institut de biologie intégrative et des systèmes
IRDA	Institut de recherche et de développement en agroenvironnement
MUFA	Acide gras monoinsaturé (<i>Monounsaturated fatty acid</i>)
m/z	Ratio masse sur charge
N _{tot}	Azote total
O ₂	Dioxygène
OD	Densité optique (<i>Optical density</i>)
OTU	Unité taxonomique opérationnelle (<i>Operation Taxonomic Unit</i>)
PBR	Photobioréacteur
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PO ₄	Phosphate
p	Poids

PUFA	Acide gras polyinsaturé (<i>Polyunsaturated fatty acid</i>)
QTOF-MS	Spectromètre de masse (<i>Mass spectrometry</i>) de configuration quadripôle/temps de vol (<i>Quadrupole time of flight analyzers</i>)
rRNA	Acide ribonucléique ribosomique
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
SFA	Acide gras saturé (<i>Saturated fatty acids</i>)
UPLC	Chromatographie liquide ultra-performance (<i>Ultra-performance liquid chromatography</i>)
ω -3/ ω -6	Oméga-3/ oméga-6

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
cell	Cellule
g	Gramme
L	Litre
mg	Milligramme
ml	Millilitre
min	Minute
nm	Nanomètre
rpm	Rotation par minute
s	Seconde
µm	Micromètre

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les microalgues : algues vertes et cyanobactéries

Les microalgues constituent un groupe polyphylétique diversifié composé d'organismes unicellulaires photosynthétiques, c'est-à-dire qui convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique par le processus de la photosynthèse. Elles sont retrouvées dans une grande variété d'habitats, incluant les eaux douces et salées, les sols, mais aussi des habitats extrêmes comme les montagnes enneigées ou même les déserts. Leur distribution est donc quasi omniprésente dans la biosphère [1]. De cela découle une biodiversité immense. Il est en effet estimé qu'entre 200 000 et 800 000 espèces différentes de microalgues existent [1]. De toutes ces espèces, seulement environ 50 000 ont été identifiées, dont 30 000 qui ont déjà été étudiées pour des applications potentielles [2].

La grande diversité d'habitats des microalgues dépend de leur croissance peu exigeante. Mis à part un milieu aqueux, les principales exigences des microalgues sont de l'énergie lumineuse, une source de carbone (généralement du dioxyde de carbone (CO_2)), des macronutriments (principalement de l'azote (N) et du phosphore (P)), certains métaux en faibles quantités (ex. cuivre, fer, manganèse) et une température adéquate. Plusieurs microalgues, comme l'algue verte *Chlorella* sp. ou la cyanobactérie *Spirulina* (*Arthrospira plantensis*), peuvent effectuer la photosynthèse avec du carbone inorganique (CO_2) en plus d'être capables d'assimiler du carbone organique directement (ex. glucose, glycérol et acétate). Ce mode trophique se nomme la mixotrophie, et cela permet notamment de limiter la perte de biomasse en l'absence de lumière [3]. Lorsque les conditions de croissance optimales sont remplies, les microalgues peuvent avoir un taux de croissance très élevé, qui peut produire des rendements de biomasse de 30 à 100 fois supérieurs à ceux des plantes terrestres [4].

Les microalgues sont classées en plus d'une dizaine de groupes, principalement selon des critères morphologiques comme la pigmentation ou encore l'arrangement des membranes [5]. La majorité des espèces décrites à ce jour font partie du groupe des algues vertes et des cyanobactéries [1]. Ces deux groupes ont été étudiés dans le cadre de ce projet de recherche; une attention particulière leur sera donc accordée.

Les cyanobactéries, couramment appelées algues bleues, sont des organismes unicellulaires procaryotes, pouvant vivre seuls ou en colonies. Elles sont un embranchement du grand domaine des bactéries, mais elles sont parfois incluses dans le groupe des microalgues. En effet, elles partagent une apparence et une écologie semblables à celles-ci et contiennent de la chlorophylle a, comme les plantes supérieures [6]. Malgré leur appellation d'algues «bleues», elles peuvent en fait adopter des couleurs allant du bleu à l'orange, notamment dues à leurs pigments bleus (phycocyanines) et rouges (phycoérythrine) qui masquent la chlorophylle a. Les cyanobactéries forment un groupe très diversifié qui inclurait entre 2000 et 8000 espèces différentes [7] (Figure 1.1). Les cyanobactéries sont souvent connues pour leurs effets néfastes sur les écosystèmes aquatiques et la santé humaine, car celles-ci peuvent proliférer rapidement dans les lacs et créer des efflorescences (*algal bloom*) qui entraînent l'eutrophisation des plans d'eau. Certaines espèces produisent même des cyanotoxines [7]. Les cyanobactéries ont toutefois attiré l'attention des chercheurs ces dernières années en raison de leurs multiples applications potentielles en biotechnologie [8].

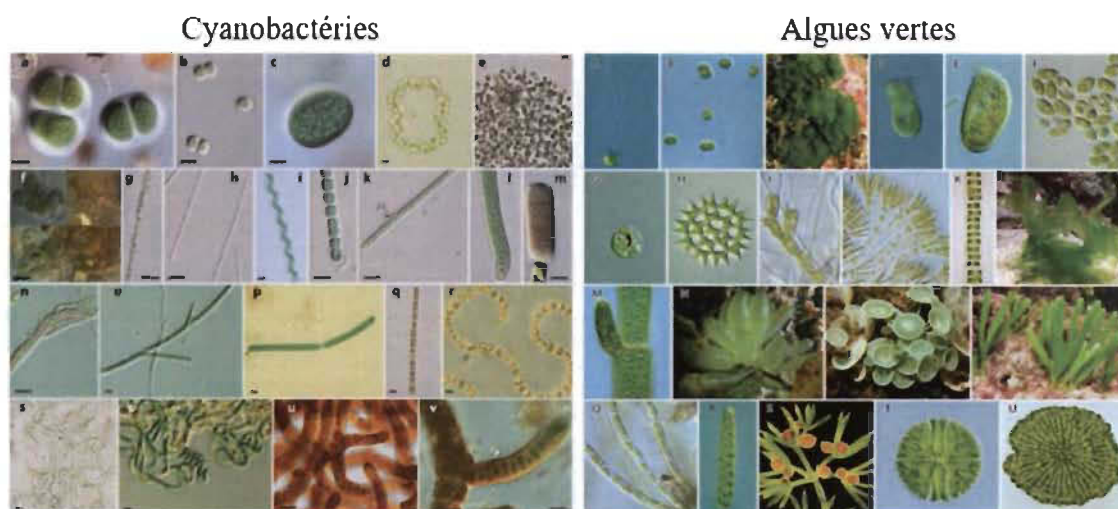


Figure 1.1 Illustration de la diversité morphologique des cyanobactéries [9] et des algues vertes [10].

Les ordres suivants de cyanobactéries sont illustrés : Chroococcales (a-e), Pleurocapsales (f), Oscillatoriales (g-p), Nostocales (q-t), Stigonematales (u,v). Les ordres suivants d'algues vertes sont illustrés : Pyramimonadales (A), Nephroselmidales (B), Palmophyllales (C), Chlorodendrophyceae (D), Chlorellales (E, F), Chlamydomonadales (G), Sphaeropleales (H), Oedogoniales (I), Chaetophorales (J), Ulotrichales (K), Ulvales (L), Cladophorales (M, N), Dasycladales (O), Bryopsidales (P), Klebsormidiales (Q), genre : Spirotaenia (R), Charales (S), Desmidiiales (T), Coleochaetales (U).

Les algues vertes, quant à elles, sont un ensemble d'algues eucaryotes dont les pigments photosynthétiques principaux sont les chlorophylles a et b. Elles regroupent des organismes variés dont les tailles peuvent aller de quelques micromètres à plus d'un mètre et dont les aspects peuvent être très divers (Figure 1.1). Il est estimé qu'environ 8000 espèces de Chlorophyta, embranchement qui inclut la majorité des algues vertes, existent [11]. Un secteur de biotechnologie est aussi bien développé autour des algues vertes. Les termes « microalgues » ou « algues », qui seront utilisés dans ce travail, englobent les algues vertes et les cyanobactéries.

1.2 La valorisation des microalgues

La grande diversité des microalgues et leur taux de croissance élevé leur confèrent la possibilité de produire une grande quantité et diversité de composés d'intérêt

(ex. lipides, polysaccharides, pigments, minéraux, vitamines et enzymes). Ces composés peuvent être utilisés dans des industries variées, tels que les cosmétiques, les compléments alimentaires, les biocarburants, les produits pharmaceutiques ou encore l'alimentation animale [12, 13]. La biomasse algale peut être utilisée entière sans traitement (ex. pour l'alimentation) ou elle peut être transformée, pour en augmenter sa valeur (Figure 1.2).

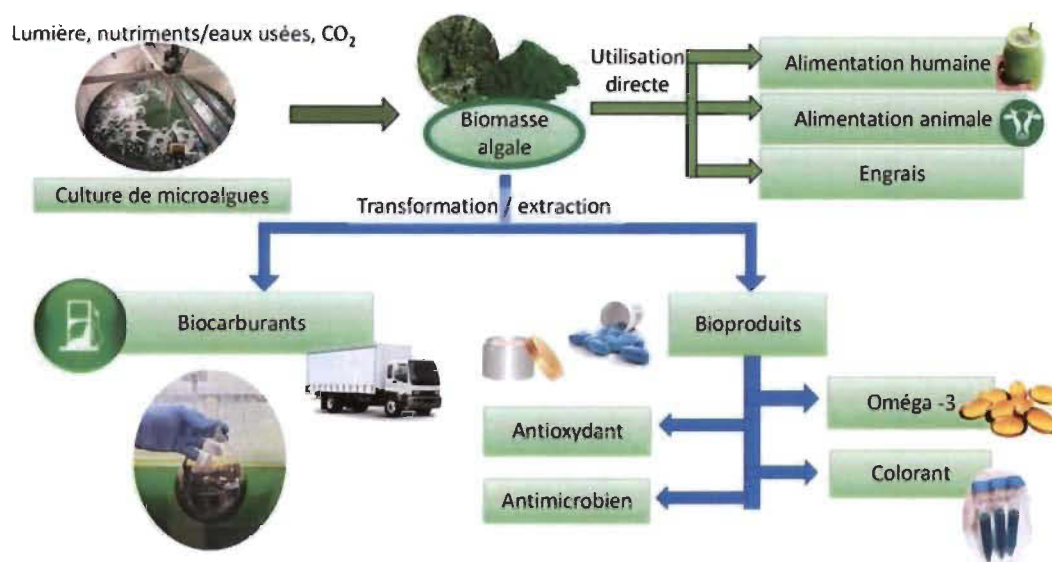


Figure 1.2 Différentes voies de valorisation de la biomasse algale, modifiée de Khan et al. (2018) [14].

Des extractions peuvent en effet être réalisées sur la biomasse algale afin d'aller chercher certains composés d'intérêt à l'intérieur de celle-ci. Par exemple, certains pigments algaux, comme l'astaxanthine, produits par une algue verte, sont intégrés dans les produits nutraceutiques pour leurs propriétés antioxydantes [14]. Un autre pigment, la phycocyanine, produit par une cyanobactérie, est très commercialisé dans le domaine alimentaire en tant que colorant, ou encore dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques, pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices [15].

Les microalgues sont aussi très prisées en raison de leur haut taux de lipides. En effet, la biomasse de microalgues contient jusqu'à 40 % (p/p) de lipides, dont une grande partie d'acides gras polyinsaturés, comme les oméga-3, qui ont de nombreux effets

thérapeutiques reconnus [1, 14]. Plusieurs compagnies (ex. Sapphire Energy Inc., Cellana Inc., Corbion et Algenol Biotech LLC) explorent d'ailleurs la possibilité de convertir la biomasse de microalgues en suppléments alimentaires [16].

Aussi, plusieurs autres composés extraits des algues (ex. muscoride A, tubercidin, tanikolide) sont reconnus pour avoir des propriétés bioactives intéressantes comme antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires ou encore anticancérigènes [8, 17].

Enfin, en raison de leur capacité à accumuler une grande quantité de lipides et d'amidons, les microalgues sont considérées comme une source potentielle d'énergie renouvelable. En effet, du biodiesel peut être produit à partir de l'huile extraite et transestérifiée des algues. Aussi, du bioéthanol peut être produit grâce à la fermentation des sucres extraits des algues et peut être utilisé dans les moteurs à essence. Enfin, une liquéfaction hydrothermale (HTL) de la biomasse d'algues, un procédé de conversion thermochimique, permet de convertir la biomasse humide entière en une huile qui peut s'apparenter à un brut pétrolier [2].

Un avantage à exploiter les composés d'intérêt des microalgues provient du fait qu'elles possèdent une plasticité métabolique importante, c'est-à-dire que la production de certains composés d'intérêt peut facilement être déclenchée par différentes formes de stress appliquées [4, 18]. Par exemple, une carence en azote est un stress qui peut mener à une plus grande production de lipides. En bref, les microalgues représentent une occasion unique de découvrir de nouveaux composés et de produire des métabolites connus à des coûts inférieurs [18].

1.3 Les techniques de culture des microalgues

Vu les innombrables possibilités de valorisation de la biomasse algale, plusieurs chercheurs et entreprises s'intéressent donc à la culture intensive de microalgues. Afin de produire une grande quantité de biomasse algale, différentes techniques de culture et de récolte ont été développées. Actuellement, deux technologies principales sont utilisées

pour cultiver les microalgues en mode phototrophique ou mixotrophique : les bassins ouverts et les photobioréacteurs (PBR) (Figure 1.3). Les bassins ouverts ont l'avantage de nécessiter une technologie moins complexe et moins coûteuse par rapport aux PBR. Les PBR peuvent cependant fournir des conditions de croissance plus appropriées. Ils permettent en effet un meilleur contrôle de l'apport en CO_2 , une dispersion de la lumière plus efficace et le maintien d'une température, d'un pH et d'une aération optimaux. De plus, ces cultures fermées offrent un risque de contamination plus faible. Il peut donc en résulter une productivité en biomasse plus élevée [19, 20].



Figure 1.3 Principales méthodes de culture à grande échelle des microalgues : en bassins ouverts (A) et en photobioréacteurs tubulaires (B) [6].

Afin d'optimiser la croissance des microalgues, divers paramètres doivent être contrôlés selon l'espèce cultivée, comme la concentration en nutriments, l'injection de CO_2 , l'intensité et la fréquence lumineuse, l'agitation, la température et le pH du milieu. Afin d'augmenter les rendements de biomasse, les cultures peuvent aussi être réalisées en mode semi-continu. Ce mode de culture signifie qu'un certain volume de culture d'algues est récolté lorsque la culture d'algue a atteint une certaine concentration cellulaire, puis une quantité égale de milieux de culture est ajoutée pour continuer la culture. Ce mode permet de maintenir la culture d'algues en mode exponentielle de croissance, car la teneur en nutriments dans le liquide est maintenue constante et les microalgues sont diluées, ce qui augmente la transmittance de la lumière [21]. Ce mode de culture a donc été priorisé dans le cadre de ce projet de recherche.

La valorisation des microalgues est très prometteuse, cependant, des recherches à long terme sont nécessaires afin de développer des systèmes de production rentables [17].

En effet, les coûts élevés reliés à la culture (nutriments, système de culture) et aux traitements en aval de la biomasse (déshydratation, extraction) ne permettent souvent pas des procédés économiquement viables [17]. Afin que les microalgues deviennent une source économique et verte importante de composés d'intérêts, il est essentiel de poursuivre l'optimisation des systèmes de cultures [4] et d'explorer les concepts de valorisation de coproduits de valeur.

1.4 Le traitement des eaux usées par les microalgues

La biomasse d'algues peut être valorisée de différentes façons. Cependant, un défi majeur pour la plupart des processus de valorisation est le coût de production élevé. Une façon innovante de diminuer le coût de production est d'intégrer la culture de microalgues au traitement des eaux usées. Les eaux usées sont des eaux contenant des polluants physiques, chimiques ou biologiques, de nature à contaminer les milieux dans lesquels elles sont déversées. Les principaux types sont les eaux usées municipales, agricoles et industrielles [22]. Généralement, elles sont composées de protéines, de glucides, de lipides, d'urée, d'ammoniaque, de produits chimiques organiques synthétiques et de composés inorganiques (ex. azote, phosphore). Les microalgues nécessitent certains de ces éléments pour assurer leur croissance. Les eaux usées peuvent alors devenir un milieu de croissance pour les microalgues ou servir d'enrichissement à un milieu pauvre en certains nutriments [23].

En se développant dans les eaux usées, les microalgues peuvent recycler l'azote, le phosphore, le carbone organique, les métaux lourds (cadmium, chrome, zinc, etc.) ou encore séquestrer des toxines chimiques organiques (hydrocarbures, biocides et tensioactifs) [22, 24]. Ce processus fait d'une pierre deux coups; les algues traitent les eaux usées en y retirant les polluants, et la biomasse algale produite, qui n'a nécessité que peu voire aucun engrais chimique, peut être valorisée [22, 24-26].

Depuis les débuts de la phycoremédiation, c'est-à-dire le traitement des eaux usées par les algues, dans les années 1950, plusieurs études ont prouvé la capacité des

microalgues à croître dans des eaux usées municipales, agricoles et industrielles, tout en y retirant les polluants [22]. Par exemple, Ji et al. 2018 ont montré l'efficacité du traitement des eaux usées par un consortium de microalgues-bactéries composé principalement de l'algue verte *Chlorella vulgaris* (classe Trebouxiophyceae). Après 10 jours, 80 % du phosphore total dissous et 89 % de l'azote total dissous ont été retirés par le consortium d'algues vertes [27]. Aussi, Kabariya et Ramani (2018) ont montré l'efficacité de deux espèces de cyanobactéries à retirer les nutriments d'eaux usées industrielles laitières en 18 jours, avec des taux de retrait de 82 % et 94 % pour l'azote et le phosphore respectivement [28].

Aussi, comme mentionné dans la section 1.2, les conditions de culture sont des facteurs importants qui influencent le métabolisme des microalgues. En ce sens, les eaux usées permettent d'induire un stress d'où pourrait résulter une plus grande proportion de molécules d'intérêt [4].

En plus de permettre de diminuer les coûts de production de biomasse algale, la culture des microalgues en eaux usées est une avenue intéressante pour contrer une problématique mondiale actuelle : l'augmentation du volume mondial d'eaux usées à traiter. Il est essentiel de développer de nouvelles façons de traiter les eaux usées. En effet, les traitements avancés conventionnels des eaux usées, telles que la précipitation chimique, l'ozonation et l'osmose inverse, sont souvent trop complexes ou coûteux pour les régions pauvres. Ces régions se voient donc obligées de rejeter les eaux polluées dans les plans d'eau naturels. Cela contamine les plans d'eau et peut causer éventuellement des problèmes de santé ou l'eutrophisation des lacs [29, 30]. La phycorémédiation pourrait être une solution économique et écologique à ce problème.

Malgré ces avantages, plusieurs défis pratiques et économiques entravent encore la mise en œuvre de la phycorémédiation et devraient être relevés pour que celle-ci atteigne une application industrielle. Un défi majeur concerne l'énergie consommée dans le processus de culture, qui le rend trop coûteux [31]. Cela démontre l'importance de coupler

le traitement des eaux usées à la valorisation de la biomasse, afin de rendre rentable le processus.

Cependant, un aspect important à considérer dans l'optique où des eaux usées sont utilisées comme milieu de culture pour les microalgues est la possible contamination de la biomasse par les polluants des eaux. En effet, l'applicabilité alimentaire et pharmaceutique exige une évaluation rigoureuse de la qualité et de la sécurité des produits [32]. Moheimani et al. (2018) ont évalué la charge pathogène, la valeur nutritionnelle et la digestibilité in vitro de microalgues cultivées dans des effluents de porcherie [32]. Les auteurs ont montré qu'un consortium de microalgues vertes cultivé en eaux usées pouvait être utilisé comme matière première pour l'alimentation des porcs, car la charge en pathogènes de la biomasse se situait dans les limites réglementaires. Les auteurs ont toutefois indiqué que d'autres études in vivo sont nécessaires pour mieux comprendre les effets alimentaires [32]. Des recherches supplémentaires doivent être menées pour combiner la culture de microalgues en eaux usées et la production de bioproduits à haute valeur ajoutée comme les oméga-3 [16]. Sinon, une biomasse impropre à ces industries devrait être utilisée pour des produits qui nécessitent une évaluation sanitaire moins rigoureuse, comme des biocarburants, des bioplastiques, des engrais ou des emballages verts non alimentaires.

1.5 Les consortiums de microalgues

Ce sont généralement des monocultures de microalgues qui sont utilisées pour la production à échelle commerciale de biomasse algale. Cependant, il est difficile, voire impossible, de maintenir des cultures axéniques de microalgues dans des conditions environnementales changeantes, en particulier lors de l'utilisation d'eaux usées [13]. Par conséquent, la plupart des chercheurs se concentrent maintenant sur les consortiums à base de microalgues. En effet, en combinant aux microalgues différents microorganismes, comme des bactéries et des levures, le traitement des eaux devient plus efficace puisque chaque groupe de microorganismes a des capacités métaboliques différentes, telles la mixotrophie, la liaison spécifique à certains métaux ou l'affinité pour

différentes sources d'azote [12, 33]. Cela procure aussi l'avantage d'une plus grande résistance aux organismes nuisibles et aux variations environnementales, limitant ainsi le risque de perte de cultures [34, 35]. Par ailleurs, la présence de bactéries accentue l'agrégation des cellules algales, ce qui facilite la récolte de biomasse [36], une des étapes les plus coûteuses de la production de microalgues [37].

Divers consortiums peuvent être utilisés parce que les microalgues peuvent vivre en symbiose avec de nombreux organismes différents, comme d'autres microalgues, des bactéries ou des champignons (Figure 1.4). Les algues vertes et les cyanobactéries sont toutefois communément associées à des bactéries [38]. En effet, une relation symbiotique peut être établie entre les microalgues et les bactéries, principalement parce que les microalgues dépendent de sources exogènes de vitamines (B_{12} , B_7), qui sont synthétisées par de nombreuses bactéries [12, 26]. Aussi, les microalgues fournissent de l' O_2 nécessaire aux bactéries et les bactéries libèrent du CO_2 qui favorise la photosynthèse des algues [33, 39]. De plus, la plupart des bactéries excrètent des enzymes, comme l'amylase, la lipase et la protéase, qui décomposent les composants complexes des eaux usées en substances organiques simples facilement assimilables par les microalgues [39]. Par conséquent, l'utilisation d'un consortium composé principalement de microalgues pour l'épuration des eaux usées augmente l'efficacité de retrait des nutriments et permet une production de biomasse microbienne plus élevée par rapport aux cultures pures [12, 36].

Par contre, il est important de considérer que certaines interactions entre les microorganismes peuvent aussi être nuisibles, comme la production de métabolites inhibiteurs (algicide et bactéricide) par les bactéries et les algues [40].

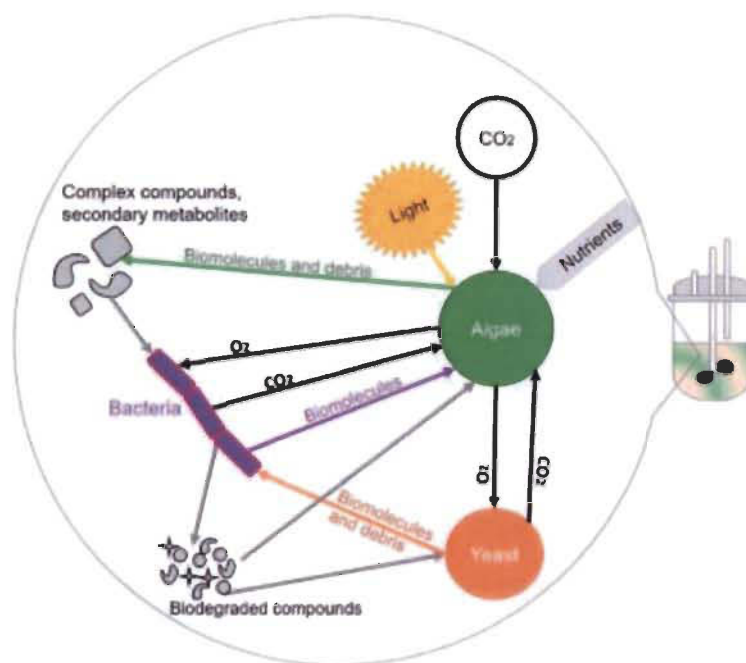


Figure 1.4 Représentation des interactions entre les algues, les levures et les bactéries d'un consortium.

Les microalgues absorbent le CO_2 et produisent de l' O_2 (via la photosynthèse). L' O_2 est consommé par les bactéries aérobies et les levures, qui fournissent du CO_2 (via la respiration), qui sera consommé par les algues. Les sécrétions cellulaires et leur dégradation libèrent des biomolécules (ex. vitamines, protéines) dans le milieu de culture. Les bactéries décomposent ces molécules en composés plus simples qui pourront être consommés par les membres du consortium [12].

1.6 Problématique

1.6.1 L'instabilité des consortiums de microalgues

Les consortiums de microalgues semblent prometteurs; cependant, pour obtenir des cultures d'algues industrielles réussies et réitérables, ceux-ci doivent être mieux compris [41]. Leur écologie est en effet complexe, en particulier dans les conditions non aseptiques et changeantes des systèmes de traitement des eaux usées. Ces conditions rendent difficile de prédire comment les différentes espèces du consortium se développeront ensemble [42] et comment cela affectera l'abondance relative de chacune [12]. Il est pourtant important d'être capable de prédire quels organismes formeront le consortium. Paddock et al. (2020) ont en effet montré que la communauté microbienne associée aux microalgues peut avoir

un impact sur le traitement des eaux usées et la production de biomasse [43]. De plus, une culture non aseptique peut inclure des organismes indésirables (par exemple, des bactéries, des champignons, des protozoaires ou d'autres algues) qui limitent la croissance des algues en faisant concurrence pour les nutriments, en libérant des substances algicides ou en prédatant les algues.

Pour éviter que ces ravageurs ne prennent le contrôle des algues et pour comprendre comment l'abondance relative des espèces change au fil du temps, il est essentiel de surveiller régulièrement la diversité microbienne des consortiums [44]. Le séquençage métagénomique à haut débit est un outil précis qui permet d'y parvenir en fournissant des informations et des données sur l'identité des microorganismes présents dans les cultures et leur abondance relative [44].

Dans notre laboratoire, deux consortiums apparentés (l'un dominé par les algues vertes et l'autre par les cyanobactéries) ont évolué à partir du même consortium natif de microalgues-bactéries à force de les repiquer en conditions non stériles. Ce changement d'espèces pourrait également se produire dans les installations de traitement des eaux usées, et peu d'études ont abordé l'effet des modifications d'un consortium dans le traitement des eaux usées et la valorisation de la biomasse [41, 43].

1.6.2 Projet dans lequel s'intègre l'étude

Les consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries utilisés dans le cadre de cette recherche proviennent tous les deux d'un même consortium, le consortium *Vertech*, illustré à la figure 1.5. Celui-ci est un consortium naturel échantillonné sur un site de gestion d'eaux usées à Victoriaville. Il était constitué au moment de son échantillonnage principalement de la microalgue *Chlorella* sp. et de bactéries [45].



Figure 1.5 Consortium *Vertech* à l'échelle macro et microscopique (450X).

Ce consortium est issu du projet *Vertech* I. Ce projet a été lancé en 2014 par la Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie (CRIEB) de l'UQTR, la ville de Victoriaville et l'industrie Sani Marc. Ce projet porte sur la culture intensive du consortium de microalgues *Vertech* dans les eaux usées d'entreprises du parc industriel de Victoriaville, afin de produire des molécules à valeur ajoutée (Figure 1.6). Ces molécules issues des algues pourraient être intégrées aux produits nettoyants de l'industrie Sani Marc [35]. Il est en effet intéressant d'intégrer des molécules biosourcées aux produits commerciaux plutôt que des molécules de synthèse, car les processus pour produire ces molécules ont souvent un moins grand impact environnemental, et les produits seront biodégradés plus facilement [46].



Figure 1.6 Projet *Vertech* I : Intégration d'une culture de microalgues à Victoriaville pour l'obtention de produits biosourcés à usage local.

Des expériences menées à l'UQTR par l'étudiante au doctorat Frédérique Bélanger Lépine ont démontré que le consortium *Vertech* pouvait réduire la charge en nutriments et métaux des eaux usées du parc industriel de Victoriaville, et produire une biomasse riche en acides gras qui pourrait être utilisée localement [45, 47]. Ceci a constitué le premier volet du projet *Vertech*.

Un deuxième volet au projet *Vertech* a débuté en 2018. En effet, l'équipe de la CRIEB a noté qu'avec le temps, deux profils différents ont ressorti du consortium *Vertech* : un qui semble avoir conservé les algues vertes en plus forte proportion, et un autre, où une cyanobactérie semble avoir pris le dessus (Figure 1.7).

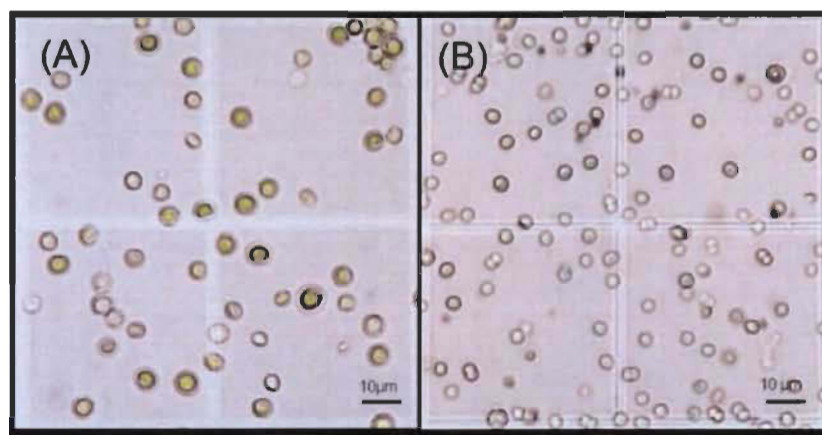


Figure 1.7 Microscopie optique du consortium d'algues vertes (A) et de cyanobactéries (B) (450 X).

Ce deuxième volet vise donc à étudier ces deux consortiums au niveau 1) des espèces qui les constituent, 2) de leur capacité à retirer les nutriments des eaux usées du parc industriel de Victoriaville et 3) de leur production de molécules d'intérêt (ex. antimicrobiens, acide gras). Certains de ces métabolites pourraient entrer directement dans la formulation de produits de nettoyage de Sani Marc ou être utilisés comme intermédiaires de synthèse chimique pour fabriquer des composants biosourcés remplaçant des composés synthétiques issus de sources non renouvelables.

1.7 Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est de comparer la composition microbienne, le potentiel de traitement des eaux usées et la valorisation de la biomasse d'un consortium composé principalement d'algues vertes à ceux d'un consortium composé principalement de cyanobactéries, qui sont tous deux des évolutions du même consortium de microalgues-bactéries.

Les objectifs spécifiques, illustrés à la Figure 1.8, sont :

- 1) Identifier les différentes espèces présentes dans chaque consortium par métagénomique.
- 2) Mesurer la croissance des microalgues en eaux usées.
- 3) Mesurer l'élimination de l'azote total (N_{tot}) et du carbone total (C_{tot}) des eaux usées.
- 4) Identifier les composés d'intérêt produits par les consortiums et leur profil d'acides gras.

Pour chaque objectif, une comparaison a été faite entre les deux consortiums, mais aussi entre deux conditions : avec ajout d'eaux usées et sans eau usée (contrôle).

Pour répondre à ces objectifs, les deux consortiums ont été cultivés en mode semi-continu en photobioréacteurs pendant 51 jours dans un milieu standard avec ou sans ajouts d'eaux usées. Les différentes espèces présentes dans les consortiums ont été identifiées par métagénomique. La croissance des consortiums a été mesurée par la densité optique et le décompte des cellules d'algues. Le retrait des polluants des eaux usées a été estimé avec le % d'élimination du N_{tot} , du C_{tot} et du phosphate (PO_4), mesuré par analyse élémentaire CHNS et chromatographie ionique. Enfin, les composés d'intérêt et le profil d'acides gras produits par les deux consortiums ont été identifiés par chromatographie liquide ultra-performante-spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire

(UPLC-QTOF-MS) et par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS).

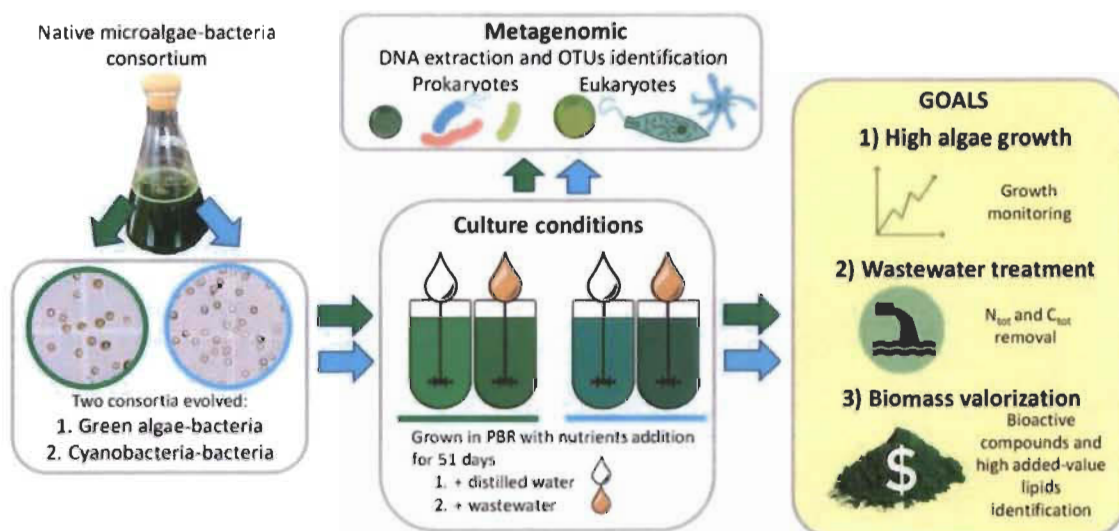


Figure 1.8 Résumé graphique des objectifs du projet présentés dans ce mémoire.

CHAPITRE II

CHARACTERIZATION OF TWO MICROALGAE CONSORTIA GROWN IN INDUSTRIAL WASTEWATER FOR BIOMASS VALORIZATION

Le contenu de ce chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique en anglais, qui a été soumis à la revue *Algal Research* en octobre 2021. Une première version de l'article avait été soumise à *Algal Research* en mai 2021. La version ci-dessous tient donc en compte les commentaires des examinateurs.

2.1 Contributions des auteurs

La majorité des manipulations et des analyses ayant permis d'obtenir les résultats présentés dans cet article ont été réalisées par l'étudiante Marguerite Cinq-Mars. Trois analyses ont toutefois dû être effectuées dans des laboratoires externes : 1) l'analyse UPLC-QTOF-MS, réalisée au Centre de recherche industrielle du Québec (CRIQ) par Pascal Dubé, 2) l'analyse métagénomique, au laboratoire d'écologie microbienne de l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) par Thomas Jeanne et 3) l'extraction de lipides et l'analyse GC-MS du profil d'acides gras, chez Innofibre par Annabelle Bourassa et Valérie Cloutier. Toutefois, l'interprétation de ces analyses a été réalisée par Marguerite Cinq-Mars. L'élaboration et la planification de ce projet de recherche, incluant la recherche bibliographique, l'établissement de la problématique et des objectifs, l'élaboration de la démarche méthodologique, ainsi que la supervision de l'étudiante, ont été supportées par Simon Barnabé (directeur de maîtrise, UQTR), Isabel Desgagné-Penix (codirectrice de maîtrise, UQTR) et Nathalie Bourdeau (chercheuse associée, Innofibre). La rédaction de ce manuscrit a également été complétée par Marguerite Cinq-Mars. Les corrections finales de cette publication ont été apportées par Nathalie Bourdeau, Simon Barnabé et Isabel Desgagné-Penix. Une révision de l'article a également été effectuée par Patrick Marchand (directeur Innovation et développement chez Sani Marc, partenaire du projet).

2.2 Résumé de l'article

The use of microalgae-bacteria consortium coupled with biomass valorization is promising for environmentally friendly and economical wastewater treatment. However, a significant challenge associated with microalgae consortia grown in wastewater is predicting how different species will grow together and how this will affect both, the composition and the productivity of different batches. Therefore, this study aimed to examine microbiome associated with a green alga consortium versus a cyanobacteria consortium, both evolved from the same initial consortium, to compare their wastewater treatment efficiency as well as the metabolites of interest produced. Cultures of both consortia were conducted in a semi-continuous mode in 2 L photobioreactors for 51 days with standard culture medium with or without wastewater. Analysis of individual OTUs (operational taxonomic units) from the microbial community revealed that 1) Trebouxiophyceae and Gomphosphaeriaceae are the most abundant organisms in the green algae and cyanobacteria consortia respectively; and 2) both consortia shared 28% and 15% of identified prokaryotes and eukaryotes OTUs, respectively. Although the cultures enriched with wastewater do not achieve the yields obtained with a standard medium, significant growth was observed with a nutrient removal efficiency up to 91% and 63% for total nitrogen and total carbon respectively. The algal biomass as well as the supernatants from the two consortia were analyzed by UPLC-QTOF-MS and GC-MS. Results showed valuable bioactive compounds such as lecanoric acid (antimicrobial, antioxidant and anticancer) and high added-value lipids. Also, polyunsaturated fatty acids were the most abundant fatty acids in our samples (51% to 66%). Results suggest that even though an initial native consortium evolved into two different consortia, both can grow in presence of wastewater. Moreover, both were able to remove a high part of nitrogen and carbon while producing interesting compounds, which paves the way for a potential economically viable wastewater treatment process.

Keywords

Microalgae-bacteria consortia, metagenomics, wastewater treatment, metabolites of interest, nutrient removal

2.3 Article scientifique en anglais : Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization

Cinq-Mars Marguerite^a, Bourdeau Nathalie^b, Marchand Patrick^c,
Desgagné-Penix Isabel^a & Barnabé Simon^{a*}

^a Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada, ^b Innofibre, Trois-Rivières, QC, Canada, ^c Groupe Sani Marc Inc, Victoriaville, QC.

* Corresponding author. Address: 3351 Boulevard des Forges, Trois-Rivières, QC, Canada, G8Z 4M3 (local 3152 CIPP). E-mail: simon.barnabe@uqtr.ca. Phone: 1-819-376-5011 ext. 4531.

2.3.1 Introduction

Wastewater treatment is one of the main environmental challenges of the 21st century, as the demographic and industrial explosion of the last years has led to a significant increase in the volume to be treated and the related costs [1]. Wastewater treatment using microalgae coupled with biomass valorization offers a sustainable, efficient, and vastly available avenue for the advanced treatment of wastewater [4]. Microalgae can indeed recycle a variety of compounds from wastewater, such as nitrogen (in nitrate, nitrite or ammonia form) and phosphorus (in phosphate form), with high removal efficiencies, ranging from 60-99% for total nitrogen and 54-95% for total phosphorus [10]. These compounds are considered pollutants in wastewater but are essential nutrients for algae. Although microalgae are mainly autotrophic, some microalgae are mixotrophic, meaning that they can also recycle organic carbon from wastewaters [10]. Therefore microalgae culture can help in the advanced treatment of agricultural, industrial or domestic wastewater, that are usually rich in nitrate, phosphate and organic carbon [10].

An advantage of using microalgae lies in their ability to produce a wide range of high-value metabolites such as polyunsaturated fatty acids (PUFA), polysaccharides,

pigments, essential minerals, vitamins, enzymes and bioactive peptides, which can be used in various industries (*e.g.* cosmetics, biofertilizers, medicine, biofuels, and food) [4, 12]. In this context, several companies are exploring the possibility of converting microalgae biomass into food oil or omega-3 (ω -3) fatty acids [13]. Moreover wastewater is a practical resource to produce algal biomass since it is a low-cost but rich in nutriment growth medium. Furthermore, microalgae cultures could be integrated within existing infrastructure of wastewater treatment [4].

However, it is challenging to maintain axenic cultures of microalgae under field conditions, especially when using wastewater [4]. Hence, most researchers focused on microalgae-based consortia, which are more efficient for wastewater remediation. Indeed, each group of microorganisms (*e.g.*, microalgae and bacteria) brings different metabolic capacities, such as mixotrophy or affinity for different nitrogen sources [10, 12]. Although microalgae can live in symbiosis with several different organisms (*e.g.*, other microalgae, bacteria, and fungi), microalgae-bacteria consortia remain the most studied [12]. Indeed a symbiotic relationship has been established between microalgae and bacteria: 1) microalgae rely on exogenous sources of vitamins which are synthesized by many bacteria; 2) microalgae provide O₂ for bacteria; 3) bacteria release CO₂ that sustains algal photosynthesis; 4) bacteria excrete enzymes able to break down complex components into simple organic substances easily assimilated by microalgae [12]. Therefore, the use of algae-bacteria consortium can increase the biomass and desired products [5, 12].

Although the use of microalgae-based consortia is promising, a better understanding for consistent and successful industrial algae cultivation is vital [16]. Consortium's ecology is complex, especially in non-aseptic and changing conditions found in wastewater treatment systems. Paddock et al. (2020) showed that the microbial community associated with the microalgae can impact the wastewater treatment and biomass production [17]. Moreover, non-aseptic culture may include undesirable organisms (*e.g.*, bacteria, fungi, protozoa, or undesirable algae) that restrict algal growth by competing for nutrients, releasing anti-algal substances or grazing algae. To avoid these pests gaining control over algae and understand how the relative abundance of species

changes over time, it is essential to monitor consortia's microbial diversity [18]. High throughput metagenomic sequencing is a precise tool that can achieve this by delivering information and data on microorganisms' identity present in consortia and their relative abundance [18].

Previous studies have addressed the effect of bacteria microbiome changes in wastewater treatment with a microalgae strain [16, 17]. However, no study to our knowledge has investigated the effect of the dominant algal strain shift. Previous work from our laboratory has investigated a microalgae based consortium dominated by *Chlorella* sp. for wastewater treatment and biomass valorization [19]. It turns out that this initial native consortium has evolved over subculturing in non-sterile conditions into two related consortia (dominated by green algae or cyanobacteria respectively) Thus, a change in the dominant microalgal strain has occurred and the impact of such change in a wastewater treatment system can disrupt its stability, efficiency and the quality of the biomass produced.

To assess the impacts of this kind of potential event, this study aims to compare the microbial composition, the growth, the efficiency in wastewater treatment, and the biomass composition of a green algae-based and a cyanobacteria-based consortium, which both evolved from the same initial consortium. Although green algae and cyanobacteria are both photosynthetic organisms, good candidates for wastewater treatment [20], and produce compounds with biological activities [21], they are different regarding many aspects, starting with their domain, respectively eukaryote and prokaryote and their cellular composition.

Both consortia were grown in the same conditions, and the influence of wastewater was studied. Nature of species present in consortia and growth rates were achieved using metagenomics sequencing, optical density (OD) and algae cell count. The removal of pollutants from the wastewater was estimated with total nitrogen (N_{tot}), total carbon (C_{tot}) and phosphate (PO_4) removal. Finally, compounds of interest and fatty acid profile produced by both consortia were identified using ultra-performance liquid

chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

2.3.2 Materials and methods

2.3.2.1 Origin and description of algae-based consortia

A native microalgae-bacteria consortium composed mainly of the green algae *Chlorella* sp. was isolated from a dairy industry's wastewater management site in Victoriaville's industrial park (Canada). The consortium was studied by Bélanger-Lépine *et al.* in the context of reducing the nutrient and metal load of industrial wastewater and producing valuable biomass [35, 45]. This consortium was maintained in Bold's Basal standard medium (BBM) [56] and mechanically shaken (orbital shaker) at 110 rpm at 24 °C under 12 hours lighting cycle at a light intensity of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. All samples were subcultured in fresh BBM weekly [35]. However, over sub-culturing in non-sterile conditions, microscope observations suggest a change in the dominant algae in some flasks, arising two different profiles: one composed mainly of green microalgae (diameter 6 μm) and the other of cyanobacteria (diameter 3 μm) (Figure 2.1). Therefore, these two consortia, labelled "Green algae consortium" and "Cyanobacteria consortium", were studied in the present work.

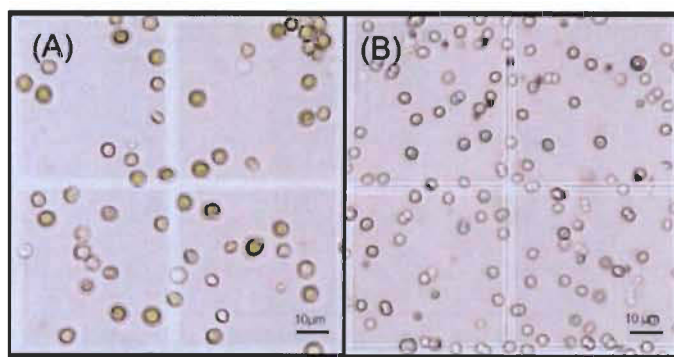


Figure 2.1 Optical microscopy of the green algae (A) and cyanobacteria (B) consortia (450 X).

2.3.2.2 Wastewater origin

In this study, the green algae and cyanobacteria consortia were acclimatized to a mixture of wastewater rich in nitrogen and organic carbon [45] from four industries in Victoriaville's industrial park, with the following proportions: 45% from a lactulose producer, 41% from a dairy product industry, 10% from a cleaning product industry and 4% from landfill leachate (v/v). The chemical composition of these wastewater is not presented in this paper for confidentiality reasons. These proportions were established in previous studies based on algae's optimal growth and the volumes available at the industrial park [35]. Wastewater was stored at -20 °C to avoid any modification and thawed at 4 °C three days before use.

2.3.2.3 Experimental culture conditions

Consortia were grown in Luxfors photobioreactors (PBR) (Infors HT, United Kingdom) with a working volume of 2 L. The culture was stirred by a radial flow agitator at 300 rpm and kept at a constant temperature of 24 °C, under a 12-hour lighting cycle at $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [35], with air bubbling at $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. The inoculum was diluted to obtain an initial concentration of $1.13 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Consortia were first cultivated in a batch mode in BBM for six days in the PBR, which corresponded to the end of the exponential growth phase in previous tests. Cultures were then carried out in a semi-continuous mode for 45 days to allow microalgae acclimatization to the wastewater: 10% of wastewater was added every three days, with 10% removal from the medium before addition.

Supplements of BBM nutrients were added every nine days over a period of 36 days to prevent the lack of assimilable essential nutrients and thus achieve high growth, as suggested by Osundeko *et al.* [52]. This experimental condition was labelled "wastewater condition". Details of the wastewater and nutrients addition are presented in Table 2.1. Another experimental condition labelled "control condition" was carried out for both green algae and cyanobacteria consortia, with the same experimental conditions and

nutrients additions as the wastewater condition (as shown in Table 2.1), but with sterile demineralized water instead of wastewater. This condition was executed to assess the effect of wastewater on microalgae consortia.

Table 2.1. Addition of wastewater and nutrients in the wastewater condition cultures.

Time (days)	Withdraw (mL)	Wastewater addition (mL)	Concentrated (83x) BBM nutrient addition (mL)	Wastewater in media at the sampling time (%)
0	-	-	-	0
3	-	-	-	0
6	200	200	-	0
9	224	200	24	10
12	200	200	-	19
15	200	200	-	28
18	224	200	24	37
21	200	200	-	46
24	200	200	-	55
27	224	200	24	64
30	200	200	-	72
33	200	200	-	81
36	224	200	24	90
39	200	200	-	99
42	200	200	-	100
45	200	200	-	100
48	200	200	-	100
51	2000	-	-	100

The duration of 51 days was chosen to allow the media to reach 100% wastewater (achieve at day 42), and then have 10 days without BBM nutrient addition to see if the consortium was acclimatized to the wastewater and can grow in it.

2.3.2.4 Analysis

Metagenomic identification

To understand the composition of both consortia, a high-throughput Illumina sequencing of metagenomic DNA was performed at the Microbial Ecology Laboratory of the Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) (Quebec, Canada) on biomass harvested at the end of the culture for both green algae and cyanobacteria consortia in wastewater and control conditions.

Briefly, genomic DNAs of wet biomass were extracted using the FastDNA Spin kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). The quality and quantity of the DNAs were determined by spectrophotometry with the absorbance measurements at 260 nm and 280 nm and the A260/A280 ratio.

Amplification of the V4 regions of the prokaryotic 16S rRNA and of the eukaryotic 18S rRNA were carried out using the primer sequences of specific regions described in literature through a dual-indexed PCR approach specially designed for analysis with the high-throughput sequencing platform Illumina MiSeq. The amplicon libraries were sequenced in paired-end format with a reading of 300 bases, *i.e.*, 2×300 base pairs on each side of the DNA strand on Illumina MiSeq at the genomic analysis platform of the Institute for Integrative Biology and Systems (IBIS) of Laval University (Quebec, CA).

The bioinformatics processing of the sequences was carried out on the IRDA LEM bioinformatics platform and involved different processing strategies (Qiime2) [57] and R (R Core Team project 2014)), including quality validation steps, baselines, as well as measures to compare microbial diversity. The reference databases Greengenes 13.8 [58], SILVA [59], and UNITE version 8 [60] were used to analyze the diversity of microorganisms.

Consortia's growth monitoring

To estimate both consortia's growth over time, OD was measured every three days for 51 days, with a Carry 50 spectrophotometer (Varian, United States). The measurement was carried out at 750 nm, a wavelength that allows all microorganisms to be taken into account while avoiding any interference due to pigment absorption bands (between 350 and 700 nm) [61]. Before the measurement, the culture and its supernatant (used as a blank) were diluted 10 times in demineralized water. OD data were normalized to consider the 10% removal and adding of wastewater/demineralized water that causes a 10% dilution, to show growth. All readings were performed in triplicate.

A cell count of microalgae was also conducted every three days. It was carried out with a Neubauer counting chamber under the Axio Scope A1 phase-contrast microscope (Zeiss, Germany) according to the method described by Guillard and Sieracki [62].

Wastewater analysis and nutrient removal by the consortia

To measure both consortia's nutrient removal efficiency, N_{tot} , C_{tot} and PO_4 concentrations were analyzed 1) in supernatants harvested after centrifugation (4000 g, 5 min) at the end of cultures ($t = 51d$); 2) in the wastewater mix and 3) in the BBM. Samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis to avoid any modification. N_{tot} and C_{tot} concentrations were measured with the CHNS vario MACRO cube elemental analyzer (Elementar, Germany). PO_4 concentrations were carried out with the Dionex ICS-3000 ion chromatography system (Thermo Fisher Scientific, United States). The removal efficiency (%) of each nutrient was calculated according to the equation:

$$\text{Withdrawal efficiency (\%)} = \frac{(\text{total amount added}) - (\text{final amount})}{\text{total amount added}} \times 100,$$

where the *total amount added* corresponds to the sum of the mass of each nutrient's addition (from wastewater or BBM) considering the 10% withdrawal every three days, and the *final amount* corresponds to the mass of the nutrient present in the medium at day 51. The reduction of the nutrients in the wastewater condition was calculated by

considering the addition of nutrients of both wastewater and BBM; while just BBM was considered in the control condition.

Metabolites of interest produced by the consortia

In order to valorize the microalgae used for wastewater treatment, it is necessary to identify the compounds of interest contained in its biomass. To do so, UPLC-QTOF-MS analyses were carried out on biomass extract and culture supernatant of both consortia by the Quebec Industrial Research Center (CRIQ), using the methodology described in St-Pierre *et al.* (2018) [63]. The wastewater mix and the BBM (filtered 0.22 μm) were used as blank.

Biomass extracts were prepared as follows. Cultures from the last day (control and wastewater condition of green algae and cyanobacteria consortia) were dried under vacuum with a Savant Speedvac Systems, model SS21 (Thermo Savant, Waltham, USA). Fifty mg of dry biomass were mixed with 3 ml of methanol: chloroform (2: 1 v/v), then heat in a water bath at 65 °C for 24 hours. Samples were filtered (0.45 μm) and rinsed twice with methanol. Dry extracts were obtained after evaporation of the solvents under a stream of nitrogen. To identify molecules excreted by the consortia, supernatants of culture on the last day (control and wastewater condition of green algae and cyanobacteria consortia) were harvested after centrifugation (4000 g, 5 min), then filtered (0.22 μm).

Fatty acids profile

In order to study fatty acids profile in the microalgae biomass, a first transesterification step with methanol was performed on the previous extract, according to the method of Li *et al.* (2013) [64]. Then GC-MS analyses were achieved using the protocol described in Bourdeau *et al.* (2018) [65]. The fatty acid data were expressed as the mass percent of total fatty acid identified.

2.3.4 Results

2.3.4.1 Metagenomic identification

To further investigate the nature of the green algae and cyanobacteria consortia, the microbiota of both consortia at the end of culture in control and wastewater conditions was profiled using high-throughput Illumina sequencing of metagenomic samples.

Prokaryote population comparison

A total of 63 and 41 prokaryotic microorganisms were identified in the green algae consortium for control and wastewater conditions respectively; while 36 and 38 for the cyanobacteria consortium for control and wastewater conditions respectively (Table S1). The 20 most abundant prokaryotic operational taxonomic units (OTUs) are reported in Table 2.2

The prokaryotic OTU with the highest relative abundance in the green algae consortium was a microalga in the phylum Chlorophyta (surprisingly identified as cyanobacteria even if it is a eukaryote); and a cyanobacterium of the Gomphosphaeriaceae family for the cyanobacteria consortium (Table 2.2).

Both consortia contained a high diversity of bacteria from the phylum Proteobacteria (mostly the class alphaproteobacteria), followed by the phylum Bacteroidetes. Besides, green algae and cyanobacteria consortia shared 28% of identified prokaryotes in at least one condition. For example, the order Rhizobiales was present in both consortia but had a higher relative abundance and was more diverse in the green algae consortium (Table 2.2). The remaining 72% OTUs represent species specific to each consortium, *e.g.* Rhizobiaceae family and *Hydrogenophaga* genus for the green algae consortium, *Inquilinus* and *Flavobacterium* genus for the cyanobacteria consortium.

The analysis of samples cultivated in the presence of wastewater also showed the influence of the latter on the nature and relative abundance of the species present.

Thus, the Cytophagales order is mainly present in wastewater conditions (9-12%) but almost absent in control conditions (0-0.05%). Also, one OTU of proteobacteria presents a specificity for both wastewater conditions, while five OTUs appear to be specific to control conditions only.

Eukaryote population comparison

Seven and three eukaryotic microorganisms were identified in the green algae consortium for control and wastewater conditions respectively, while four and six were identified for the cyanobacteria consortium. Green algae and cyanobacteria consortia shared 15% of identified eukaryotes in at least one condition.

The analysis of the different samples showed that both consortia have the same majority eukaryotic specie, which is a green alga of the Trebouxiophyceae class (phylum Chlorophyta). This green alga is present up to 100 and 86% in the green algae and cyanobacteria consortia respectively (see Table 2.2).

As shown in Table 2.2, other eukaryote phyla could also be identified, including OcropHYta (only in cyanobacteria consortium's control), Ciliophora (32% in cyanobacteria wastewater condition), Amoebozoa (13% of Echinamoebida in cyanobacteria wastewater condition) or fungi (3% of *Sarocladium* sp. in the green algae control condition). It was also observed that the addition of wastewater with the green algae consortium had a significant impact on eukaryotic species, with only three representatives identified (two algae and one amoebozoa, Table 2.2)

Table 2.2. Prokaryote and eukaryote taxa identified in the green algae and the cyanobacteria consortia at the end of the culture and their relative abundance in each sample as a percentage of the total OTUs. Twenty most abundant prokaryotes OTUs are list.

Taxa						OTUs relative abundance (%)			
Phylum	Class	Order	Family	Genus		G c ^a	G w ^a	C c ^a	C w ^a
PROKARYOTES	Cyanobacteria	Cyanophyceae	Chroococcales	Gomphosphaeriaceae	-	2.71	0	69.97	58.51
	Chlorophyta ^b	-	-	-	-	17.96	32.18	0.80	0.17
			Rhizobiaceae	-	-	17.06	7.12	0	0
			Beijerinckiaceae	-	-	1.20	3.85	14.12	1.55
		Rhizobiales		<i>Salinarimonas</i>		4.04	6.71	1.61	0.16
			Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>		2.62	0.76	0	0.06
			-	-	-	1.90	1.11	0	0.04
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Blastomonas</i>		6.39	2.45	0	0.06
		Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Erythromicrobium</i>		1.52	0.99	1.51	4.73
			Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>		0.25	7.49	0	0.08
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Roseococcus</i>		1.33	1.39	3.83	0.54
			Rhodospirillaceae	<i>Inquilinus</i>		0	0	0.21	4.82
		Rickettsiales	-	-	-	3.49	0.15	0.02	0
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga</i>	3.95	1.14	0	0
		Cytophagia	Cytophagales	-	-	0.05	12.80	0	9.26
	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	0	0	3.31	7.86
		Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	-	-	5.27	4.99	0.03	0.80
	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	-	11.12	6.63	0.12	0.51
	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	-	-	-	4.14	1.40	0	0.03
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	-	2.55	0	0.55	0
TOTALS						87.55	91.13	96.07	89.20

						OTUs relative abundance (%)			
Taxa									
Phylum	Class	Order	Family	Genus		G c ^a	G w ^a	C c ^a	C w ^a
EUKARYOTES	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	-	-	-	95.82	99.90	86.48	55.17
	-	-	-	-	-	0	0.02	0	0
	Ochrophyta	-	-	-	-	0	0	11.73	0
	-	-	-	-	-	0	0	0	31.63
	Ciliophora	-	-	-	-	0	0	0	0
	-	Colpodida	-	<i>Bromeliothrix</i>	-	0.58	0	0	0
	-	Tubulinea	Arcellinida	Echinamoebida	-	0	0	1.77	12.99
	Amoebozoa	-	Gracilipodida	-	<i>Flamella</i>	0.12	0.08	0	0
	-	Discosea	Centramoebida	-	<i>Acanthamoeba</i>	0	0	0	0.02
	Choanozoa	Cristidiscoidea	Nucleariida	Nucleariidae	<i>Nuclearia</i>	0	0	0	0.10
	-	-	-	-	<i>Sarocladium</i>	3.26	0	0	0
	-	-	-	-	-	0.03	0	0.02	0
	Fungi	-	-	Herpotrichiellaceae	-	0.18	0	0	0
	-	-	-	-	-	0	0	0	0.04
	Unassigned	-	-	-	-	0.02			0.05
TOTALS						100	100	100	100

^a "G" = green algae consortium, "C" = cyanobacteria consortium, "c" = control condition, "w" = wastewater condition. ^b Chlorophyta is a eukaryotic phylum but was present in the prokaryote database.

2.3.4.2 Consortium's growth

To monitor the consortium's growth, OD at 750 nm of the culture was measured every three days. Results showed that the growth pattern is similar in both consortia (Figure 2.2); control conditions for both consortia had higher OD than the wastewater condition from day 9 to the end of the culture (OD 1.2 and 1.7 times higher at the end of the culture for green algae and cyanobacteria consortia respectively).

The growth slowed down in the wastewater condition in the cyanobacteria consortium beginning on day 36, while in the green algae consortium, there was a continuous growth except around day 30.

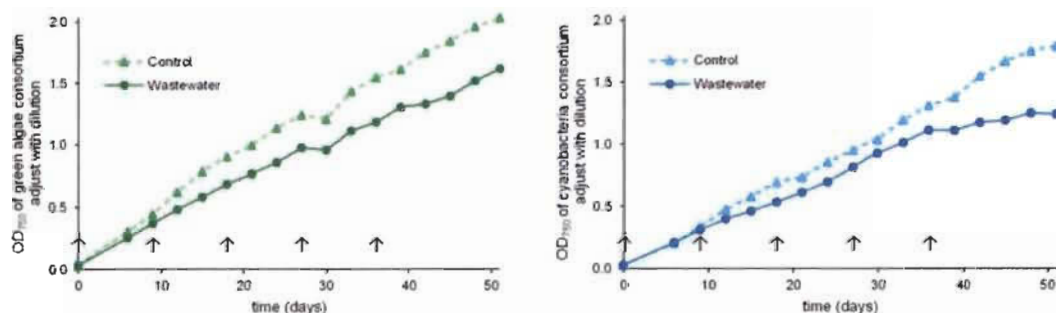


Figure 2.2 Growth of the green algae (A) and cyanobacteria (B) consortia measured by OD_{750nm}. Points show the average of 3 measures and error bars represent the standard deviation from the mean. Arrows represent BBM nutrient addition. OD was normalized with the dilution rate (10% every three days) to show proper growth.

The microalgae cell count and microscopic observation were also conducted to assess consortia growth better. The algae growth pattern measured by microscopic algae cell count (Figure S1) was similar to the OD one: the algae growth was higher in the control condition (2.3 more cells in the control than in the wastewater condition in both consortium at the end of the culture). Although the total number of algae cells appeared higher in the cyanobacteria consortium all along the growth time than in the green algae consortium (0.9×10^8 vs. 2.0×10^8 cell·ml⁻¹ at the end of culture for green algae and cyanobacteria respectively), microscopic observation showed that cells were smaller (Figure 2.1). Microscope observation every three days also suggests that the main algae

in each consortium stayed dominant all along the culture. The wastewater allowed the growth of microalgae but not at the same level as the control.

2.3.4.3 Nutrient removal

To evaluate the wastewater treatment efficiency by both consortia, the nutrient composition (N_{tot} , C_{tot} , and PO_4) of the wastewater and BBM were firstly measured. Then the nutrients from the additions of wastewater and BBM were summed, while considering the periodic removal, and compared with the nutrients present in the supernatants at the end of the culture (Figure 2.3).

An analysis of the composition of the wastewater mixtures and BBM alone was carried out, and results obtained showed a higher nitrogen (216 vs. 53 $mg \cdot L^{-1}$ of N_{tot}) and carbon (519 vs. 51 $mg \cdot L^{-1}$ of C_{tot}) content in the wastewater compared to BBM, but a much lower phosphorus content (3 vs. 163 $mg \cdot L^{-1}$ of PO_4). With the help of these data, the contribution in nutrients of wastewater could be inferred, namely 77% of N_{tot} , 90% of C_{tot} and 1% of PO_4 . Although we could not say whether a nutrient removed came from wastewater or BBM, we were nevertheless able to hypothesize that if the nutrient consumption was greater than BBM intake alone, then the surplus consumed came from wastewater.

Both consortia in wastewater conditions significantly reduced the N_{tot} concentration (-81% and -91%) and C_{tot} (-63% and -56%) in the wastewater condition for the green algae and cyanobacteria consortium respectively. For PO_4 , which came from BBM at 99%, its removal was higher in the wastewater condition than in the control for both consortia (54% vs. 25% and 73% vs. 43% for the green algae and the cyanobacteria consortia respectively).

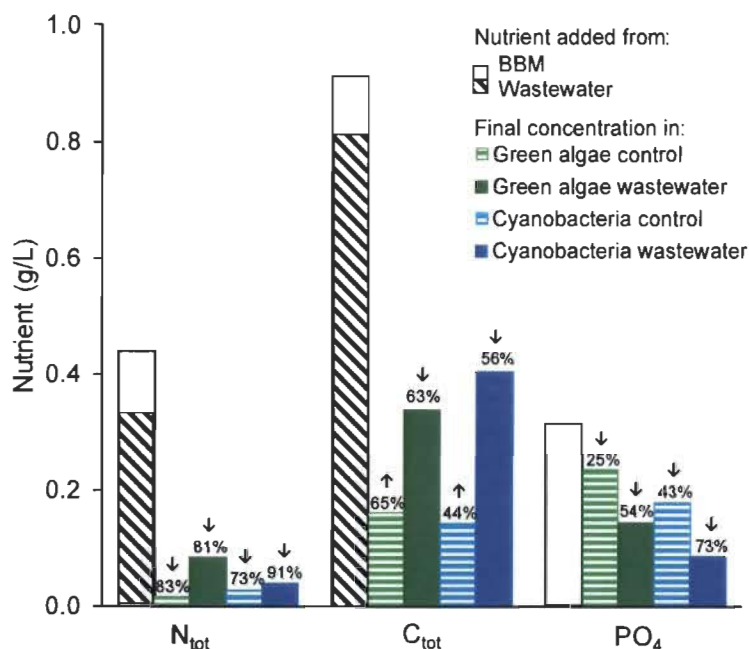


Figure 2.3 Nutrient removal by the green algae and the cyanobacteria consortia (↓ = % removal, ↑ = % increase). Nutrient concentration was measured on supernatants at the end of the culture. Nutrients from wastewater and BBM were summed up in the wastewater condition.

2.3.4.4 Metabolites of interest

To identify compounds of interest produced by both consortia, UPLC-QTOF-MS analyses using positive and negative ionization modes were performed on biomass extract and culture supernatant at the end of culture with wastewater addition.

In the biomass extracts of green algae consortium, polyphenols were the most diversified group followed by fatty acids (Table S2). In the supernatant, carbohydrates were the most diversified group, followed by polyphenols, carboxylic acids and amino acids (Table S3).

Conversely, fatty acids were the most diversified group in the cyanobacteria consortium biomass extracts, followed by alkaloids, polyphenols, and amines (Table S4). In the supernatant, polyphenols, lactones, amino acids, sphingolipids, amino alcohols and fatty acyls were present (Table S5).

2.3.4.5 Fatty acids profile

The fatty acid profiles of both consortia in the control and wastewater conditions were analyzed to show the effect of taxonomic change and wastewater addition to the composition and proportion of fatty acids. The two consortia generally presented the same fatty acids: carbon chains varying mostly from C16 to C18, and less than 10% were long chains (C20 and more). The proportions of fatty acids representing $\geq 5\%$ of fatty acids total weight are presented in Figure 2.4.

In terms of compounds, the most abundant fatty acids found in the green algae consortium were palmitic (C16:0), linoleic (C18:2n6c) and α -linolenic acids (C18:3n3); and for the cyanobacteria consortium C16:0, γ -linolenic acids (C18:3n6) and C18:2n6c (Figure 2.4). Although the same large families were found in each consortium, the relative proportions differ greatly for some of them (Figure 2.4). Indeed, the results obtained showed that the green algae consortium was 5 times richer in cis-10-heptadecenoic acid (C17:1), and 3 to 10 times richer in C18:3n3 compared to the cyanobacteria consortium. Conversely, the latter had 1.5 and 12 to 25 times higher relative contents of C16:0 and C18:3n6 respectively.

Results also showed that there was an increase in the relative abundance of certain fatty acids in the wastewater condition compared to the control (*e.g.* C17:1, C18:2n6t, C18:2n6c for the green algae consortium and C18:3n6 for the cyanobacteria consortium). Consequently, the relative abundance of certain fatty acid decreased in the wastewater condition, like C18:3n3 that was approximately four times higher in the control of the cyanobacteria consortium.

Overall, polyunsaturated fatty acids (PUFA) were the most abundant (51 to 66%), followed by saturated fatty acids (SFA) (24 to 44%) and mono-unsaturated fatty acids (MUFA) (6% to 9%) (Table S6).

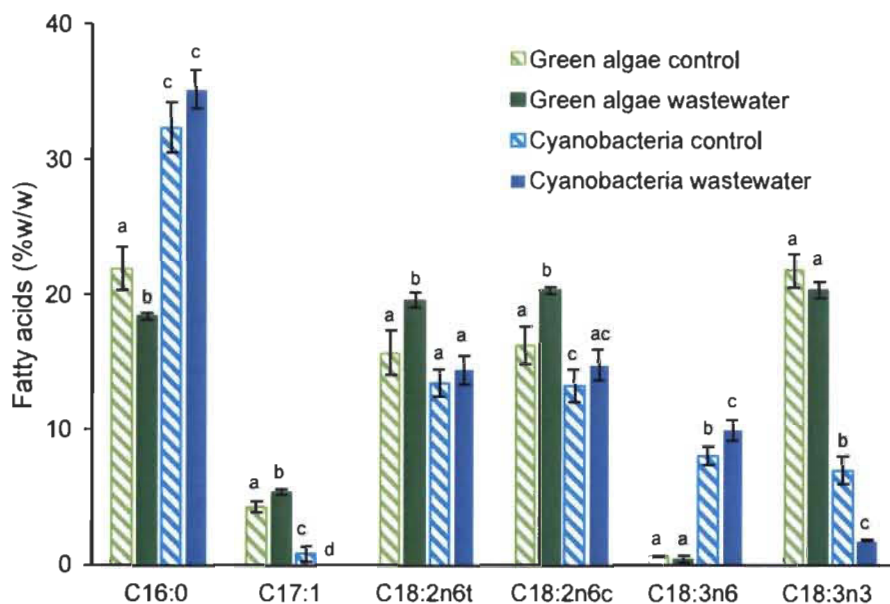


Figure 2.4 Proportion of fatty acids (representing $\geq 5\%$ of fatty acids total weight in at least one condition) in the oil extracted at the end of the culture of the green algae and cyanobacteria consortia, in control and wastewater condition. Each bar represents the average of four replicates, and error bars represent the standard deviation. The columns identified with different letters (a–d) are significantly different using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a pairwise mean comparison Tukey's test where differences were detected ($n = 4$, $p < 0.05$).

2.3.5 Discussion

This study aimed to compare the microbial composition, the potential in wastewater treatment, and the biomass valorization of both a green algae-based and a cyanobacteria-based consortia, which were both evolution of the same native microalgae-based consortium. To characterize the changes between two related microalgae consortia is new and relevant if we want to use them as a potential industrial wastewater treatment. Wastewater being variable media, it is expected that changes can occur in consortia microbiota composition between batches, and thus fluctuations in the chemical composition of each batch. Therefore, further research is needed in this area [42].

2.3.5.1 Metagenomic identification

We have studied the evolution of two related microalgae consortia via metagenomic analysis to understand how and where they separated and to better understand the differences in the final biomass compositions. As expected, both consortia seemed to be composed mainly of microalgae, from the Trebouxiphyceae class for the green algae consortium and the Gomphosphaeriaceae family for the cyanobacteria consortium.

Trebouxiphyceae family, highly found in the green algae consortium, includes the genus *Chlorella*, identified in a previous study as the main organism of this native consortium [45]. Therefore the green algae consortium was probably more resembling the native consortium initially sampled, and the cyanobacteria consortium evolved otherwise. Gomphosphaeriaceae cyanobacteria were present in a low relative abundance in the green algae control (2%), suggesting that this specie was there initially in the original native consortium and took over the green algae in some flask over time. It is possible that this change occurs around the time aeration was added to the cultures, so we suppose that the cyanobacteria were advantaged compared to the green algae in these conditions. Although, this hypothesis is plausible, further investigations on the evolution of native consortium are needed to assess the cause of such differentiation. Indeed, the green algae Trebouxiphyceae were still present in the cyanobacteria consortium, but in a smaller proportion than in the green algae consortium. Results therefore suggest that the green algae consortium was composed almost exclusively of green algae, and the cyanobacteria consortium was a mix of cyanobacteria and green algae. Microscopic observations also suggested that both algae species coexist, but the cyanobacteria were more abundant (Figure 2.1). It was shown in the study of Tangahu et al. (2019) that green algae and cyanobacteria can be cultured together as a consortium to help remove pollutants from wastewater [66]. This suggests that both species may be useful together in a wastewater treatment perspective. Bacteria, fungi, and ciliate were also identified via metagenomic, as suggested in the past study of this consortium [45].

The most abundant and diverse phyla of bacteria found in both consortia (Proteobacteria and Bacteroidetes) were consistent with microalgae consortia literature [43, 67, 68].

Also, some identified prokaryotes are known to be good candidates for wastewater treatment. For example, Beijerinckiaceae family (found in both consortia) is known to fix nitrogen; while the bacteria *Sphingomonas* sp., (7.5% in green algae, Table 2.2) are known to metabolize a wide variety of carbon sources and use the contaminants as nutrients. We can also mention Pirellulaceae bacteria (up to 11% in green algae consortia, Table 2.2) and the phylum Bacteroidetes (present in both consortia, Table 2.2), which are ammonia-oxidizing bacteria conducting nitrification and specialists in the degradation of high-molecular-weight organic matter respectively [67]. No algae pathogens described in the literature were thus found in the bacteria we identified, which is consistent with the growth profiles obtained (Figure S1).

The use of wastewater induced a significant change in the composition of the consortia compared to the control conditions. For example, bacteria of the order Cytophagales (phylum Bacteroidetes), barely detectable under control conditions, were present at 9 to 12% in samples containing wastewater. We find the same trend with Ciliophora (ciliates) and amoebzoa, present respectively at 32% and 13% in the cyanobacteria consortium, against only 2% in control conditions. Fewer biological contaminants were detected in the green algae consortium (Ciliophora and Amoebozoa under 1%). These preliminary results suggest that the cyanobacteria consortium look more sensitive to contamination from harmful microorganisms. Indeed, its composition is rich in potential pathogens (Amoebozoa) or in organisms known to feed on algae (ciliates); which can reduce the growth of microalgae of interest and thus reduce the economic potential of extractable metabolites [78,79,80].

Metagenomic analysis suggests significant changes in eukaryotic and prokaryotic organisms' composition between green algae and cyanobacteria consortia (only 28% and 15% of shared OTUs for prokaryotes and eukaryotes respectively). Differences between

the control and the wastewater conditions were also highlighted. Future studies on synthetic consortia would be of interest to understand the impact of bacteria orders or families on the consortia on growth.

2.3.5.2 Consortium's growth

Growth of consortia was estimated with OD and algae count to determine if the green algae and the cyanobacteria could grow in a media enriched with wastewater with high productivity. Results showed a slowed down of growth in both consortia in wastewater conditions compared to the control condition. It was expected to achieve higher growth with wastewater addition than the control because wastewater contains more nutrients. Surprisingly, the control had a higher cell concentration. There are many reasons for this observation. Firstly, nutrients present in the wastewater are possibly not easily assimilable, taken up or metabolized by microalgae thus bacteria could have been advantaged over algae. Bacteria growth was not monitored to assess this but should be considered in future experiments. Another possibility is that the carbon source in the wastewater was consumed by bacteria instead of algae. A third reason could be the presence of antimicrobial compounds in the wastewater mixture because of the portion coming from a cleaning products industry, which could have hindered the growth of algae [36]. Even though the media in wastewater condition was more nutritious than the controls, both consortia grew less. But the aim of the study is not only the growth of microalgae, but also the treatment of wastewater, which will be at the expense of growth in our case (see section 4.3).

2.3.5.3 Nutrient removal

N_{tot} and C_{tot} removal efficiency were measured to determine the consortium's potential to treat the wastewater. High N_{tot} removal, similar to those found in the literature (80-92%), was observed; with 81% and 91% for the green algae and the cyanobacteria consortium respectively [70-72]. More than half of the C_{tot} was removed (63% and 56% for the green algae and cyanobacteria consortia respectively).

Results indicate that the wastewater had a very low phosphate content ($2.47 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), an essential nutrient for algae. That could explain why algae from the consortium could not grow in wastewater without BBM addition ($163 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of PO_4) in preliminary work. New phosphate-rich wastewater like human and animal waste, detergents, and food and beverage residues [73] should be added to the wastewater mix to make it more profitable for algae growth.

However, the measurement of PO_4 concentration at the end of cultures showed that its removal was higher in the wastewater condition than in the control: 54% vs. 25% and 73% vs. 43% for the green algae and cyanobacteria consortia, respectively (Figure 2.3). This higher removal is probably due to the wastewater addition, enriching the media in nitrogen, allowing higher phosphorus consumption. Algae's growth is indeed inhibited when either nitrogen or phosphate supply is limited [39]. For example, Wu and al. (2014) showed that the optimum nitrogen: phosphorus ratio was 16:1 for *Chlorella* sp. [74].

2.3.5.4 Metabolites of interest

In a biomass valorization perspective, it is important to find high-value compounds produced in high abundance by the microalgae consortia. The UPLC-QTOF-MS characterization performed in this study was useful to identify and compare the valuable compounds produce by both microalgae consortia in wastewater. Future experiments could then target and quantify the most interesting one found in this study.

Our result showed that both biomass and supernatant contained specialized metabolites (*e.g.* polyphenols, alkaloids, terpenes and steroids) with interesting biological activities, including antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidants (Table 2.3), suggesting that both parts could be valorized. These properties are commonly described from algae extract [4].

Table 2.3. Compounds with biological activities identified in the biomass extract and supernatant of green algae and cyanobacteria's consortia with wastewater addition following UPLC-QTOF-MS analysis (> 0.5% area).

		Mass (m/z)	Mass error ^a (m/z)	Proposed compound ^b	Compound class	Properties ^c	Ref.
Green algae consortium	Biomass	317.054657	0.0120	Lecanoric acid	Polyphenol	anti-diabetic, anticancer, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic	[75-78]
		377.092926	0.0091	Resistomycin	Polyphenol	antifungal	[79, 80]
		377.121124	0.0245	Riboflavin	Flavin	anti-migraine, anticancer, antioxidant	[81, 82]
		609.324158	0.0200	BQ-123	Peptide	antioxidant	[83, 84]
	Supernatant	271.0569	0.0043	Butein	Polyphenol	antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory, anticancer	[85-87]
		285.069122	0.0287	Kaempferol	Polyphenol	cardioprotective, neuroprotective, anti-inflammatory, anti-diabetic, antioxidant, antimicrobial,	[88-90]
Cyanobacteria consortium	Biomass	317.0818	0.0151	Lecanoric acid	Polyphenol	anti-diabetic, anticancer, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic	[75-78]
		234.1164	0.0124	(S)-Tetrahydro-protoberberine	Alkaloid	therapeutic activity, antimalarial, cytotoxic	[91, 92]
		349.1553	0.0244	Nitidine	Alkaloid	antimalarial, anticancer	[93, 94]
		481.205627	0.0351	Paeoniflorin	Terpene	anti-inflammatory, immunoregulation	[95-97]
	Supernatant	633.0865	0.0132	Corilagin	Polyphenol	antitumor, anti-inflammatory, antioxidant	[98-100]
		285.102478	0.0257	Phyllodulcin	Polyphenol	therapeutic alternative sweetener, anti-obesity, anti-diabetic, anti-allergic	[101-103]
		278.208984	0.0388	Crucigasterin 277	Amino alcohol	antimicrobial, cytotoxic	[104, 105]

^a Mass error represents the difference between theoretical mass of the proposed compound and the exact mass (m/z) measured, ^b Proposed compounds were based on a match of exact mass results with database in the MZMine 2.0 library using the UPLC-QTOF-MS method. These compounds had a % area above 0.5% and were not found in the wastewater or the BBM. % area of these compounds is indicated in supplementary data (Table S2-S5) ^c these biological proprieties were described in at least two recent papers (2012-2021).

Although certain classes of molecules are found in both consortia (fatty acids, polyphenols, terpenes, amino acids, lactone, carboxylic acid), analysis shows that their representatives are unique to each consortium. For example, butein, an antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory and anticancer polyphenol, was identified only in the green algae consortium, and phyllodulcin, an alternative therapeutic sweetener, anti-obesity, anti-diabetic and anti-allergic polyphenol, was identified only in the cyanobacteria consortium (Table 2.3). Only one metabolite of interest, the polyphenol lecanoric acid (anti-diabetic, anticancer, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic) was identified in both consortia. It is interesting to note that for most of the compounds of interest identified, there is no artificial synthesis route, which makes the valorization of algal biomass economically interesting. Unfortunately, these results also suggest that the two consortia cannot be apprehended and valued in the same way. In order to produce a molecule that can be used locally, for example by industries that provide wastewater for growth, the stability of the consortium should be maintained to ensure that the molecule of interest is consistently produced.

An innovative aspect of this work is that most compounds identified were not listed as microalgae metabolites in past studies. Many identified compounds are in fact known metabolites produced by various plants. For example, butein and kaempferol, identified in the supernatant of green algae consortium, are respectively a known polyphenol isolated from the bark of *Rhus verniciflua* [87] and a natural flavonol found in a variety of fruits and vegetable [88]. Paeoniflorin, identified in the cyanobacteria consortium biomass, is a major constituent of herbal medicine derived from *Paeonia* sp [96]. Corilagin and phyllodulcin, identified in the cyanobacteria consortium supernatant, are a major active component of many ethnopharmacological plants [99] and a polyphenol found in the plant *Hydrangea macrophylla* [102], respectively. Producing plant metabolites with algae is attractive for commercial exploitation for many reasons, including that microalgae have greater ability to fix CO₂ and then convert it into biomass and potentially into products of interest. In addition, they have fewer requirements for arable land and freshwater [106].

Besides, results suggest that not only algae produce valuable metabolites but the bacteria and fungi from the consortium also. For example, resistomycin, identified in the green algae consortium, is a bacterial metabolite with antifungal activity [79]. Alternariol, identified in the supernatant of both consortia, is a mycotoxin of various *Alternaria* (Ascomycota) fungi [107]. Lecanoric acid, identified in both consortia, is a known polyphenol present in lichen species (association of fungi and algae), that could come from our algae or fungi [75]. It also needs to be considered that the compounds detected could come from microbial degradation of wastewaters.

Altogether, these results give insight into the diversity of interesting compounds produced by two related algae consortia. To consider the detected compounds in a valorization process, a comparison with standard reagents, purification and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analysis would be required.

2.3.5.5 Fatty acid profiles

Beside UPLC-QTOF-MS analysis, fatty acids methyl (FAMES) profile has been determined by GC-MS. Fatty acids are one of the major constituents of microalgal biomass, typically making up between 5 and 50% of the cell dry weight [108]. Depending on their profile, those lipids can be used as nutraceuticals (ω -3 fatty acids), food commodities, chemicals or biofuels [108].

The most interesting fatty acids for valorization (relative abundance $\geq 10\%$ with interesting commercial applications) are presented in Table 2.4.

Table 2.4. Most interesting fatty acids and their relative abundance in the green algae and cyanobacteria consortia in wastewater condition.

				Relative abundance (%w/w FAMES)	
Fatty acid		Class	Applications	Green algae	Cyanobacteria
C16:0	Palmitic	SFA	Cosmetics, pharmacology	18	35
C18:2n6t	Linolelaidic	PUFA	Functional foods (ω-6)	20	14
C18:2n6c	Linoleic	PUFA	Functional foods (ω-6)	20	15
C18 :3n3	α-Linolenic	PUFA	Functional foods (ω-3)	20	2
C18:3n6	γ-Linolenic	PUFA	Functional foods (ω-6)	1	10

The most abundant class of fatty acids identified in the biomass was PUFA for both consortia, which are the highest added-value lipid components [16]. Among these PUFA, linolelaidic (ω -6) and linoleic (ω -6) acids were found in similar proportion in both consortia, while α -linolenic (ω -3) and γ -linolenic (ω -6) acids were mainly found in the green algae and cyanobacteria consortia respectively (Table 2.4).

These ω -3 and -6 are valuable for functional food and animal feed and [109]. This high PUFA content also suggests that both consortia's lipids can be transformed through esterification process in biodiesel with good cold flow properties (useful in cold climate countries), but with low oxidative stability [110].

The only SFA found in high abundance, mostly in the cyanobacteria consortium, is palmitic acid, which is widely used in the cosmetics industry and has been indicated as a specific inhibitor of HIV-1 [111].

Analysis of the fatty acid profile first reveal that the green algae consortium seems to be richer in unsaturated fatty acids than cyanobacteria consortium (Table S6). A difference between the green algae and the cyanobacteria profile was expected because fatty acid composition of microalgae differed depending on the taxa [112, 113]. Also, relative abundances of fatty acid vary from the control and the wastewater condition. These changes can be due to the different amounts of nitrogen found in both conditions. It is indeed known that a lower N concentration, like found in the control conditions

(Figure 2.3), enhanced the production of some fatty acids and can, therefore, change their relative abundance [110].

The fatty acid profile suggests that both consortia could be valorized similarly, like cosmetics, pharmaceuticals and food oils (Table 2.4). However, green algae consortia seem like a better source for functional food because of the variety of ω -3 and -6, and the cyanobacteria consortia a better source for cosmetics and pharmacology because of the highest relative abundance of palmitic acid [16].

However, food and pharmaceutical applicability demands a rigorous evaluation of product quality and safety [32]. Thus more research needs to be done to demonstrate safety of the production of high-added-value bioproducts as ω -3 by combining microalgae cultivation in wastewater and [16].

2.3.6 Conclusions

Two microalgae consortium were studied for a wastewater remediation perspective. The microbial composition, growth and nutrient removal were examined. Regardless of their different taxonomic status, both consortia responded to the wastewater addition in a similar manner, by having significant growth and a high N_{tot} and C_{tot} removal from wastewater. For a valorization perspective, a study of compounds of interest produced by the consortia was carried out. Several molecules of interest were identified, including lecanoric acid, known for its antioxidant and antimicrobial properties and ω -3 and -6 fatty acids, which could be used as functional foods. Future work would be needed to quantify these metabolites of interest.

2.3.7 Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Olivier Rezazgui, and Michelle Boivin for revising the manuscript and the staff at Innofibre (Quebec, CA) for their technical support. This work was funded by the city of Victoriaville, Sani-Marc Inc. and Abbott Laboratories

– Canlac Group, MITACS (IT04228), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (EGP 462695-14), the Consortium de recherche et d'innovation en bioprocédés industriels (CRIBIQ) (2013-017-PR-C10) and the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (file number: 259861).

2.3.8 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

2.3.9 References

- [1] Z. Rasouli, B. Valverde-Pérez, M. D'Este, D. De Francisci, I. Angelidaki, Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs, *Biochemical Engineering Journal*, 134 (2018) 129-135.
- [2] A. Lavrinovičs, T. Juhna, Review on challenges and limitations for algae-based wastewater treatment, *Construction Science*, 20 (2017) 17-25.
- [3] N. Abdel-Raouf, A. Al-Homaidan, I. Ibraheem, Microalgae and wastewater treatment, *Saudi journal of biological sciences*, 19 (2012) 257-275.
- [4] A. Shahid, S. Malik, H. Zhu, J. Xu, M.Z. Nawaz, S. Nawaz, M.A. Alam, M.A. Mehmood, Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review, *Science of the Total Environment*, 704 (2020) 135303.
- [5] B.B. Makut, D. Das, G. Goswami, Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: A sustainable approach, *Algal research*, 37 (2019) 228-239.
- [6] R.L. Stephenson, J.B. Blackburn Jr, *The industrial wastewater systems handbook*, CRC Press 2018.
- [7] A.F.M. Udaiyappan, H.A. Hasan, M.S. Takriff, S.R.S. Abdullah, A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment, *Journal of Water Process Engineering*, 20 (2017) 8-21.
- [8] D. De Francisci, Y. Su, A. Iital, I. Angelidaki, Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment, *Environmental technology*, 39 (2018) 581-592.

- [9] O. Osundeko, P. Ansolia, S.K. Gupta, P. Bag, A.K. Bajhaiya, Promises and challenges of growing microalgae in wastewater, *Water Conservation, Recycling and Reuse: Issues and Challenges*, Springer2019, pp. 29-53.
- [10] A. Babaei, M.R. Mehrnia, J. Shayegan, M.H. Sarrafzadeh, E. Amini, Evaluation of Nutrient Removal and Biomass Production Through Mixotrophic, Heterotrophic, and Photoautotrophic Cultivation of *Chlorella* in Nitrate and Ammonium Wastewater, *International Journal of Environmental Research*, 12 (2018) 167-178.
- [11] A.L. Goncalves, J.C. Pires, M. Simões, A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment, *Algal Research*, 24 (2017) 403-415.
- [12] D. García, E. Posadas, S. Blanco, G. Acién, P. García-Encina, S. Bolado, R. Muñoz, Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors, *Bioresource technology*, 248 (2018) 120-126.
- [13] L. Zhu, Z. Wang, Q. Shu, J. Takala, E. Hiltunen, P. Feng, Z. Yuan, Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment, *Water research*, 47 (2013) 4294-4302.
- [14] G. Padmaperuma, R.V. Kapoore, D.J. Gilmour, S. Vaidyanathan, Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing, *Critical reviews in biotechnology*, 38 (2018) 690-703.
- [15] G. Ferreira, L.R. Pinto, R. Maciel Filho, L. Fregolente, A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 109 (2019) 448-466.
- [16] Y. Torres-Tiji, F.J. Fields, S.P. Mayfield, Microalgae as a future food source, *Biotechnology advances*, 41 (2020) 107536.
- [17] S.R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu, Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential, *Biotechnology advances*, 29 (2011) 896-907.
- [18] S.P. Fulbright, A. Robbins-Pianka, D. Berg-Lyons, R. Knight, K.F. Reardon, S.T. Chisholm, Bacterial community changes in an industrial algae production system, *Algal research*, 31 (2018) 147-156.
- [19] M.B. Paddock, J.D. Fernández-Bayo, J.S. VanderGheynst, The effect of the microalgae-bacteria microbiome on wastewater treatment and biomass production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (2020) 893-905.
- [20] C. Sambles, K. Moore, T.M. Lux, K. Jones, G.R. Littlejohn, J.D. Gouveia, S.J. Aves, D.J. Studholme, R. Lee, J. Love, Metagenomic analysis of the complex microbial consortium associated with cultures of the oil-rich alga *Botryococcus braunii*, *MicrobiologyOpen*, 6 (2017) e00482.

- [21] F. Bélanger-Lépine, M. Lemire-Lamothe, A. Tremblay, S. Rondeau, P. Marchand, Y. Huot, S. Barnabé, Cultivation of an Algae-Bacteria Consortium in a Mixture of Industrial Wastewater to Obtain Valuable Products for Local Use, *Industrial Biotechnology*, 16 (2020) 33-42.
- [22] I.A. Perera, S. Abinandan, S.R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, R. Naidu, M. Megharaj, Advances in the technologies for studying consortia of bacteria and cyanobacteria/microalgae in wastewaters, *Critical reviews in biotechnology*, 39 (2019) 709-731.
- [23] X. Ji, M. Jiang, J. Zhang, X. Jiang, Z. Zheng, The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater, *Bioresource technology*, 247 (2018) 44-50.
- [24] F. Bélanger-Lépine, A. Tremblay, Y. Huot, S. Barnabé, Cultivation of an algae-bacteria consortium in wastewater from an industrial park: Effect of environmental stress and nutrient deficiency on lipid production, *Bioresource technology*, 267 (2018) 657-665.
- [25] H.W. Bischoff, H.C. Bold, *BBM-Medium (Bold's Basal Medium + soil extract + vitamins)*, Fraunhofer, (2005).
- [26] E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, *QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science*, *PeerJ Preprints*, 2018.
- [27] T.Z. DeSantis, P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E.L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, G.L. Andersen, Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB, *Applied and environmental microbiology*, 72 (2006) 5069-5072.
- [28] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glöckner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic acids research*, 41 (2012) D590-D596.
- [29] U. Kõljalg, R.H. Nilsson, K. Abarenkov, L. Tedersoo, A.F. Taylor, M. Bahram, S.T. Bates, T.D. Bruns, J. Bengtsson-Palme, T.M. Callaghan, Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi, *Molecular ecology*, 22 (2013) 5271-5277.
- [30] M.J. Griffiths, C. Garcin, R.P. van Hille, S.T. Harrison, Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density, *Journal of microbiological methods*, 85 (2011) 119-123.
- [31] R.A. Andersen, *Algal culturing techniques*, Elsevier 2005.

- [32] A. St-Pierre, D. Blondeau, A. Lajeunesse, J. Bley, N. Bourdeau, I. Desgagné-Penix, Phytochemical Screening of Quaking Aspen (*Populus tremuloides*) Extracts by UPLC-QTOF-MS and Evaluation of their Antimicrobial Activity, *molecules*, (2018).
- [33] Z. Li, F. Jiang, Y. Li, X. Zhang, T. Tan, Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae *Chlorella* spp. by three-phase partitioning, *Bioresource technology*, 149 (2013) 286-291.
- [34] N. Bourdeau, F. Bélanger-Lépine, K. Adjallé, N. Dubois-Caléro, R. Dosnon-Olette, G. Samson, S. Barnabé, Mixotrophic Cultivation of an Algae-Bacteria Consortium in Aluminium Smelter Wastewaters (Quebec, Canada): High Nitrogen Concentration Increases Overall Lipid Production, *Industrial Biotechnology*, 13 (2017) 260-269.
- [35] B.V. Tangahu, P.A. Hutabarat, T.F. Aabidah, The ability test of Microalgae consortia *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* in removing cadmium (II).
- [36] I. Krohn-Molt, B. Wemheuer, M. Alawi, A. Poehlein, S. Güllert, C. Schmeisser, A. Pommerening-Röser, A. Grundhoff, R. Daniel, D. Hanelt, Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (2013) 6196-6206.
- [37] K.D. Sniffen, J.R. Price, C.M. Sales, M.S. Olson, Influence of scale on biomass growth and nutrient removal in an algal–bacterial leachate treatment system, *Environmental Science & Technology*, 51 (2017) 13344-13352.
- [38] G. Jing, Z. Zhou, J. Zhuo, Quantitative structure–activity relationship (QSAR) study of toxicity of quaternary ammonium compounds on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*, *Chemosphere*, 86 (2012) 76-82.
- [39] D. Hernández, B. Riaño, M. Coca, M. Solana, A. Bertucco, M. Garcia-Gonzalez, Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications, *Chemical Engineering Journal*, 285 (2016) 449-458.
- [40] B.-H. Kim, Z. Kang, R. Ramanan, J.-E. Choi, D.-H. Cho, H.-M. Oh, H.-S. Kim, Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24 (2014) 1123-1132.
- [41] E. Posadas, A. Muñoz, M.C. García-González, R. Muñoz, P.A. García-Encina, A case study of a pilot high rate algal pond for the treatment of fish farm and domestic wastewaters, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90 (2015) 1094-1101.
- [42] R. Kumar, P. Pal, Assessing the feasibility of N and P recovery by struvite precipitation from nutrient-rich wastewater: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (2015) 17453-17464.

- [43] S. Abinandan, S.R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, M. Megharaj, Nutrient removal and biomass production: advances in microalgal biotechnology for wastewater treatment, *Critical reviews in biotechnology*, 38 (2018) 1244-1260.
- [44] J.S. Wu, R.B. Jia, B. Li, C.C. Liu, Study on the correlation of N, P nutrients and chlorella growth, *Applied Mechanics and Materials*, Trans Tech Publ, 2014, pp. 1183-1186.
- [45] M.G. de Moraes, B.d.S. Vaz, E.G. de Moraes, J.A.V. Costa, Biologically active metabolites synthesized by microalgae, *BioMed research international*, 2015 (2015).
- [46] B. Rama Krishna, S. Ramakrishna, S. Rajendra, K. Madhusudana, U.V. Mallavadhani, Synthesis of some novel orsellinates and lecanoric acid related depsides as α -glucosidase inhibitors, *Journal of Asian natural products research*, 21 (2019) 1013-1027.
- [47] S. Ristić, B. Ranković, M. Kosanić, T. Stanojković, S. Stamenković, P. Vasiljević, I. Manojlović, N. Manojlović, Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens, *Journal of food science and technology*, 53 (2016) 2804-2816.
- [48] V.B. Tatipamula, G.S. Vedula, B.B. Rathod, P.R. Shetty, A. Sastry, Study of phytochemical analysis, total flavonoid and phenolic content, antimicrobial properties and chemical constituents of two manglicolous lichens extracts, *Inventi Rapid: Planta Activa*, 2018 (2018) 1-6.
- [49] B.N. Jha, M. Shrestha, D.P. Pandey, T. Bhattarai, H.D. Bhattarai, B. Paudel, Investigation of antioxidant, antimicrobial and toxicity activities of lichens from high altitude regions of Nepal, *BMC complementary and alternative medicine*, 17 (2017) 282.
- [50] S. Carlson, U. Tanouye, S. Omarsdottir, B.T. Murphy, Phylum-specific regulation of resistomycin production in a *Streptomyces* sp. via microbial coculture, *Journal of natural products*, 78 (2015) 381-387.
- [51] Y.-l. Zhang, S. Li, D.-h. Jiang, L.-c. Kong, P.-h. Zhang, J.-d. Xu, Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (2013) 1521-1524.
- [52] K. Thakur, S.K. Tomar, A.K. Singh, S. Mandal, S. Arora, Riboflavin and health: A review of recent human research, *Critical reviews in food science and nutrition*, 57 (2017) 3650-3660.
- [53] A. Saedisomeolia, M. Ashoori, Riboflavin in human health: a review of current evidences, *Advances in food and nutrition research*, Elsevier 2018, pp. 57-81.

- [54] H. Aslan, H. Kesici, Z.I. Karaca, B. Özyurt, U. Tas, F. Ekici, H. Erdoğan, F. Gevrek, S. Cayli, Beneficial effects of melatonin and BQ-123 on the rat testis damage caused by cigarette smoke, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45 (2015) 11-17.
- [55] A. Kowalczyk, A. Jeleń, M. Żebrowska, E. Balcerczak, A. Gorąca, BQ123 stimulates skeletal muscle antioxidant defense via Nrf2 activation in LPS-treated rats, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016 (2016).
- [56] Z. Song, M.K. Shanmugam, H. Yu, G. Sethi, Butein and its role in chronic diseases, *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, Springer 2016, pp. 419-433.
- [57] I.-L. Hsin, S.-C. Wang, J.-R. Li, T.-C. Ciou, C.-H. Wu, H.-M. Wu, J.-L. Ko, Immunomodulatory proteins FIP-gts and chloroquine induce caspase-independent cell death via autophagy for resensitizing cisplatin-resistant urothelial cancer cells, *Phytomedicine*, 23 (2016) 1566-1573.
- [58] R.G.P.T. Jayasooriya, I.M.N. Molagoda, C. Park, J.-W. Jeong, Y.H. Choi, D.-O. Moon, M.-O. Kim, G.-Y. Kim, Molecular chemotherapeutic potential of butein: A concise review, *Food and Chemical Toxicology*, 112 (2018) 1-10.
- [59] M. Imran, B. Salehi, J. Sharifi-Rad, T. Aslam Gondal, F. Saeed, A. Imran, M. Shahbaz, P.V. Tsouh Fokou, M. Umair Arshad, H. Khan, Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential, *Molecules*, 24 (2019) 2277.
- [60] K.P. Devi, D.S. Malar, S.F. Nabavi, A. Sureda, J. Xiao, S.M. Nabavi, M. Daglia, Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine, *Pharmacological Research*, 99 (2015) 1-10.
- [61] J. Ren, Y. Lu, Y. Qian, B. Chen, T. Wu, G. Ji, Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18 (2019) 2759-2776.
- [62] M.O. Nesbit, A.G. Phillips, Tetrahydroprotoberberines: A Novel Source of Pharmacotherapies for Substance Use Disorders?, *Trends in Pharmacological Sciences*, 41 (2020) 147-161.
- [63] D.R. Callejon, T.B. Riul, L.G. Feitosa, T. Guaratini, D.B. Silva, A. Adhikari, R.L. Shrestha, L.M. Marques, M.D. Baruffi, J.L. Lopes, Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids, *Molecules*, 19 (2014) 5692-5703.
- [64] J. Bouquet, M. Rivaud, S. Chevalley, E. Deharo, V. Jullian, A. Valentin, Biological activities of nitidine, a potential anti-malarial lead compound, *Malaria journal*, 11 (2012) 67.

- [65] K. Ihrmark, I. Bödeker, K. Cruz-Martinez, H. Friberg, A. Kubartova, J. Schenck, Y. Strid, J. Stenlid, M. Brandström-Durling, K.E. Clemmensen, New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities, *FEMS microbiology ecology*, 82 (2012) 666-677.
- [66] N.-Y. Tang, C.-H. Liu, C.-T. Hsieh, C.-L. Hsieh, The anti-inflammatory effect of paeoniflorin on cerebral infarction induced by ischemia-reperfusion injury in Sprague-Dawley rats, *The American journal of Chinese medicine*, 38 (2010) 51-64.
- [67] H. Li, Y. Jiao, M. Xie, Paeoniflorin ameliorates atherosclerosis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B activation, *Inflammation*, 40 (2017) 2042-2051.
- [68] J. Zhang, W. Dou, E. Zhang, A. Sun, L. Ding, X. Wei, G. Chou, S. Mani, Z. Wang, Paeoniflorin abrogates DSS-induced colitis via a TLR4-dependent pathway, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and liver physiology*, 306 (2014) G27-G36.
- [69] B. Luan, H. Zhao, R.C. Bast, Z. Lu, Y. Yu, Corilagin could help to overcome PARP inhibitor resistance by inhibiting ERK signaling pathways, *AACR*, 2019.
- [70] X. Li, Y. Deng, Z. Zheng, W. Huang, L. Chen, Q. Tong, Y. Ming, Corilagin, a promising medicinal herbal agent, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99 (2018) 43-50.
- [71] Y. Tong, G. Zhang, Y. Li, J. Xu, J. Yuan, B. Zhang, T. Hu, G. Song, Corilagin inhibits breast cancer growth via reactive oxygen species-dependent apoptosis and autophagy, *Journal of cellular and molecular medicine*, 22 (2018) 3795-3807.
- [72] E. Kim, J.-H. Shin, P.R. Seok, M.-S. Kim, S.-H. Yoo, Y. Kim, Phyllodulcin, a natural functional sweetener, improves diabetic metabolic changes by regulating hepatic lipogenesis, inflammation, oxidative stress, fibrosis, and gluconeogenesis in db/db mice, *Journal of Functional Foods*, 42 (2018) 1-11.
- [73] E. Kim, S.-M. Lim, M.-S. Kim, S.-H. Yoo, Y. Kim, Phyllodulcin, a natural sweetener, regulates obesity-related metabolic changes and fat browning-related genes of subcutaneous white adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice, *Nutrients*, 9 (2017) 1049.
- [74] E. Kim, S.-H. Yoo, Y. Kim, Phyllodulcin as a sugar complement exerts anti-diabetic effects in db/db mouse, *The FASEB journal*, 30 (2016) 692.611-692.611.
- [75] M.M. Heravi, T.B. Lashaki, B. Fattahi, V. Zadsirjan, Application of asymmetric Sharpless aminohydroxylation in total synthesis of natural products and some synthetic complex bio-active molecules, *RSC advances*, 8 (2018) 6634-6659.

- [76] S. Flock, S. Antonsen, H. Gallantree-Smith, A.M. Langseter, L. Skattebøl, Y. Stenstrøm, The first synthesis of Crucigasterin 277—a polyunsaturated C-18 amino alcohol from the Mediterranean tunicate *Pseudomonas crucigaster*, *Tetrahedron*, 72 (2016) 4518-4522.
- [77] H. Sun, W. Zhao, X. Mao, Y. Li, T. Wu, F. Chen, High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion, *Biotechnology for biofuels*, 11 (2018) 1-23.
- [78] A. Solhaug, G.S. Eriksen, J.A. Holme, Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin alternariol: A review, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119 (2016) 533-539.
- [79] G. Breuer, W.A. Evers, J.H. de Vree, D.M. Kleinegris, D.E. Martens, R.H. Wijffels, P.P. Lamers, Analysis of fatty acid content and composition in microalgae, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (2013) e50628.
- [80] N. Sharma, G. Fleurent, F. Awwad, M. Cheng, F. Meddeb-Mouelhi, S.M. Budge, H. Germain, I. Desgagné-Penix, Red light variation an effective alternative to regulate biomass and lipid profiles in *Phaeodactylum tricornutum*, *Applied Sciences*, 10 (2020) 2531.
- [81] S. Deshmukh, R. Kumar, K. Bala, Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions, *Fuel Processing Technology*, 191 (2019) 232-247.
- [82] C.D. Calixto, J.K. da Silva Santana, E.B. de Lira, P.G.P. Sassi, R. Rosenhaim, C.F. da Costa Sassi, M.M. da Conceição, R. Sassi, Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues, *Bioresource technology*, 221 (2016) 438-446.
- [83] J. Pratoomyot, P. Srivilas, T. Noiraksar, Fatty acids composition of 10 microalgal species, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 27 (2005) 1179-1187.
- [84] N. Sushchik, G. Kalacheva, N. Zhila, M. Gladyshev, T. Volova, A temperature dependence of the intra-and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (2003) 374-380.
- [85] N.R. Moheimani, A. Vadiveloo, J.M. Ayre, J.R. Pluske, Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent, *Algal research*, 35 (2018) 362-369.

2.3.10 Supplementary data

Table S1. All prokaryote taxa identified in the two consortia at the end of the culture and their relative abundance in each sample as a percentage of the total taxa.

Taxa					OTUs relative abundance (%)			
Phylum	Class	Order	Family	Genus	G c ^a	G w ^a	C c ^a	C w ^a
Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	-	-	0.16	0.00	0.20	0.00
			C111	-	0.00	0.00	0.02	0.00
			-	-	2.55	0.00	0.55	0.00
	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	0.33	0.00	0.00	0.00
			-	<i>Microbacterium aurum</i>	1.67	0.00	0.00	0.00
			Micrococcaceae	<i>Nesterenkonia</i>	0.10	0.00	0.00	0.00
	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia</i>	0.03	0.00	0.03	0.00
			Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>	0.01	0.00	0.00	0.00
Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	-	-	0.05	12.80	0.00	9.26
			-	-	0.00	0.00	0.00	0.30
			Cyclobacteriaceae	<i>Larkinella</i>	0.01	1.98	0.00	0.00
				<i>Leadbetterella</i>	0.00	0.00	0.00	2.36
				<i>Rhodocytophaga</i>	0.01	0.00	0.00	0.00
				<i>Runella</i>	0.00	0.00	0.00	0.92
				<i>Spirosoma</i>	0.01	0.17	0.00	0.00
				-	0.00	0.00	0.28	0.38
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	0.00	0.00	3.31	7.86
			[Weeksellaceae]	<i>Chryseobacterium</i>	0.08	0.38	0.00	0.01
	SMIA07	-	-	-	0.00	0.00	0.02	0.00
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	-	-	5.27	4.99	0.03	0.80
			Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>	0.08	0.57	0.00	0.00
Chloroflexi	Chloroflexi	Chloroflexales	Chloroflexaceae	<i>Chloronemas</i>	0.00	0.00	0.11	0.00
			Oscillochloridaceae;	<i>Oscillochloris</i>	0.01	0.00	0.29	0.00
Cyanobacteria	Chloroplast	Chlorophyta	-	-	17.96	32.18	0.80	0.17

Taxa					OTUs relative abundance (%)			
Phylum	Class	Order	Family	Genus	G c ^a	G w ^a	C c ^a	C w ^a
	Oscillatoriothycideae	Chroococcales	Gomphosphaeriaceae	-	2.71	0.00	69.97	58.51
			Xenococcaceae;	<i>Synechococcus elongatus</i>	0.00	0.00	0.00	0.01
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae;	<i>Bacillus</i>	0.00	0.00	0.03	0.00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	-	-	-	4.14	1.40	0.00	0.03
OD1	-	-	-	-	0.00	0.00	0.00	0.01
	Phycisphaerae	Phycisphaerales	-	-	0.00	0.00	0.00	0.08
		Gemmatales	Gemmataceae;	<i>Gemmata</i>	0.00	0.08	0.00	0.00
Planctomycetes	Planctomycetia		Isosphaeraceae	-	0.63	0.00	0.00	0.00
		Pirellulales	Pirellulaceae	-	11.12	6.63	0.12	0.51
				<i>planctomycetes MS3071</i>	0.00	0.00	1.06	1.99
		-	-	-	0.07	0.00	0.00	0.00
				<i>Brevundimonas</i>	0.40	0.05	0.00	0.00
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas diminuta</i>	0.10	0.00	0.00	0.00
				<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.09	0.08	0.00	0.00
				<i>Phenylobacterium</i>	1.38	0.00	0.48	0.00
			-	-	1.90	1.11	0.00	0.04
			-	-	0.00	0.07	0.00	0.00
			Aurantimonadaceae	-	0.07	0.08	0.00	0.00
				-	1.20	3.85	14.12	1.55
Proteobacteria	Alphaproteobacteria		Beijerinckiaceae	<i>Camelimonas lactis</i>	0.00	0.08	0.00	0.00
				<i>Salinarimonas rosea</i>	4.04	6.71	1.61	0.16
				-	0.00	0.00	0.00	0.05
		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia</i>	2.62	0.76	0.00	0.06
				<i>Parvibaculum</i>	0.31	0.35	0.00	0.00
				-	0.26	0.27	0.00	0.00
			Methylobacteriaceae	-	0.05	0.00	0.00	0.01
				<i>Methylobacterium</i>	0.09	0.11	0.00	0.00
				-	1.29	0.23	0.00	1.08
			Phyllobacteriaceae	<i>Aminobacters</i>	0.07	0.00	0.00	0.00
				<i>Chelativoranss</i>	0.48	0.08	0.00	0.00

Phylum	Class	Taxa			OTUs relative abundance (%)			
		Order	Family	Genus	G c ^a	G w ^a	C c ^a	C w ^a
				<i>Mesorhizobiums</i>	0.11	0.00	0.00	0.00
				-	17.06	7.12	0.00	0.00
			Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	0.25	0.00	0.00	0.00
				<i>Kaistia</i>	0.03	0.00	0.00	0.00
				<i>Shinellas granuli</i>	0.03	0.00	0.00	0.00
			Xanthobacteraceae:	<i>Ancylobacter</i>	0.54	0.00	0.00	0.00
				-	0.89	0.00	0.41	1.03
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	0.00	0.00	0.05	0.00
				<i>Paracoccuss marcusii</i>	0.18	0.00	0.00	0.00
				<i>Rubrimonass cliftonensis</i>	0.00	0.00	0.00	0.02
				-	0.00	0.00	0.01	0.10
				-	0.00	0.00	0.02	0.00
			Acetobacteraceae	<i>Roseococcus</i>	1.33	1.39	3.83	0.54
		Rhodospirillales		<i>Roseomonas</i>	0.29	0.00	0.00	0.00
				<i>Roseomonass frigidaquae</i>	0.63	1.00	0.06	0.28
				<i>Roseomonass lacus</i>	0.00	0.00	0.03	0.00
			Rhodospirillaceae	<i>Inquilinus</i>	0.00	0.00	0.21	4.82
				<i>Reyranellas massiliensis</i>	0.24	0.06	0.00	0.00
			-	-	0.13	0.21	0.11	0.13
		Rickettsiales	mitochondria	-	3.49	0.15	0.02	0.00
			Erythrobacteraceae	-	0.00	0.00	0.39	0.11
				<i>Erythromicrobium</i>	1.52	0.99	1.51	4.73
				-	0.04	0.00	0.00	0.00
				<i>Blastomonas</i>	6.39	2.45	0.00	0.06
				<i>Novosphingobium</i>	0.55	0.00	0.00	0.00
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sandaracinobacters sibiricus</i>	0.00	0.00	0.01	0.00
				<i>Sphingobium</i>	0.00	0.42	0.00	0.00
				<i>Sphingobium</i>	0.11	0.00	0.00	0.00
				<i>Sphingomonas</i>	0.25	7.49	0.00	0.08
				<i>Sphingomonas</i>	0.00	0.42	0.00	0.00

Taxa					OTUs relative abundance (%)			
Phylum	Class	Order	Family	Genus	G c ^a	G w ^a	C c ^a	C w ^a
				<i>Sphingopyxis</i>	0.12	0.00	0.00	0.00
				<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	0.30	0.00	0.00	0.00
		-	-	-	0.00	0.00	0.00	0.03
			Alcaligenaceae	-	0.01	0.00	0.00	0.00
				-	0.20	0.86	0.00	0.00
		Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>	0.00	0.22	0.00	0.00
				<i>Hydrogenophaga</i>	3.95	1.14	0.00	0.00
				<i>Variovorax</i>	0.00	1.05	0.00	0.00
			Oxalobacteraceae	<i>Ralstonia</i>	0.00	0.00	0.02	0.00
	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	<i>Methylophilas mobilis</i>	0.00	0.00	0.02	0.00
			Xanthomonadaceae	<i>Aquimonas</i>	0.00	0.00	0.13	0.54
	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales		<i>Stenotrophomonas geniculata</i>	0.02	0.02	0.00	0.00
TM6	SJA-4	-	-	-	0.00	0.02	0.00	0.01
WPS-2	-	-	-	-	0.00	0.00	0.14	1.34
[Thermi]	Deinococci	Deinococcales	Trueperaceae	<i>B-42</i>	0.00	0.00	0.01	0.00

^a "G" = green algae consortium, "C" = cyanobacteria consortium, "c" = control condition, "w" = wastewater condition. ^b Chlorophyta is a eukaryotic phylum but was present in the prokaryote database.

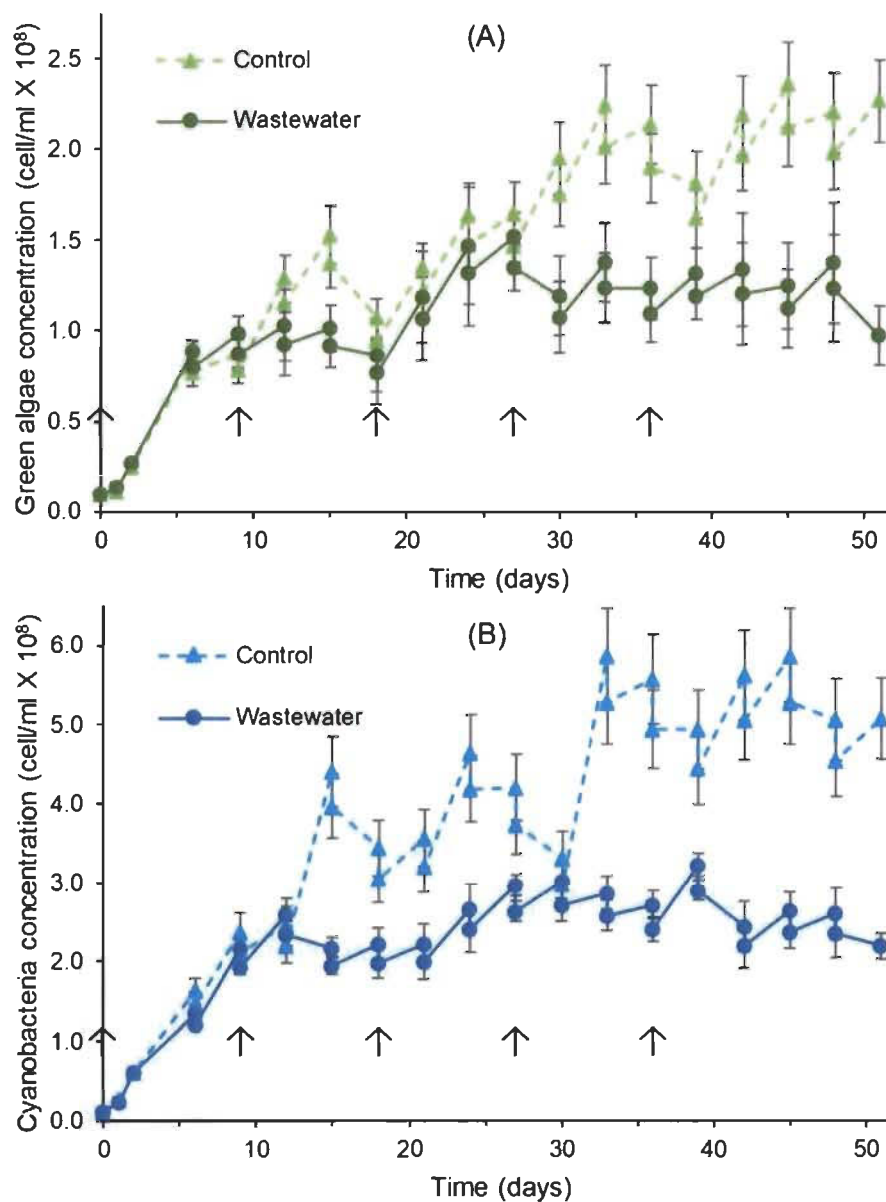


Figure S1 Growth of green algae (A) and cyanobacteria (B) measured by microscope count. Two concentration values are illustrated at each time value, representing before and after the culture withdrawal of 10%, which was carried out at each sampling. Points show the average of 10 counts and error bars represent the standard deviation from the mean. Arrows represent moments when nutrients were added.

Table S2. Characterization of compounds of interest identified from chloroform/methanol extract of green algae consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis.

Compound Class	Proposed Compound ^a	% Area ^b	RT ^c (min)	Exact Mass (<i>m/z</i>)	
				[M+H] ⁺ ^d	[M-H] ⁻ ^d
Fatty acids	Hexadecanoic acid	36.4	28.1578/ 26.3508/ 26.9137		255.2238616 94335/ 255.2315826 41601/255.2 31582641601
	Stearolic acid	2.2	26.7257		279.2329102
	Hydnocarpic acid	2.1	24.4342		251.1945038
	Crepenynate	2.0	25.1750		277.2177124
	Dibutyl adipate	1.6	13.2988		257.1343079
	Dihomo-gamma-linolenate	0.5	8.16	307.2750	
Polyphenols	Lecanoric acid	5.2	1.2155		317.054657
	Resistomycin	2.2	24.2867/ 29.0117	377.07415771 4843/377.0929 2602539	
	(-)-Vestitone	0.7	7.86	287.1340	
	Kievitone	0.8	23.7833/ 24.622	357.18133544 9218/357.1813 35449218	
Carbohydrates	D-Erythritol 4-phosphate	3.8	0.9587		201.0208588
	sn-Glycero-3-phosphocholine	0.7	12.3998		257.1343079
	Salicin 6-phosphate	3.6	26.59	367.1252	
Terpenes	Kanokoside D	5	26.5877/ 21.7372		623.2756958/ 623.2516479
	Arbusculin A	1.5	22.7843		249.1765747
Nucleotides	P1,P2-Bis(5'-adenosyl) triphosphate	1.3	20.9667		755.055481
	1-(5'-Phosphoribosyl)-5-formamido-4-imidazolecarboxamide	0.8	21.751/2 6.5947/2 1.751	367.097442626 953/367.051086 425781/367.051 086425781	
Amino acids	NG,NG-Dimethyl-L-arginine	7.8	12.6173		201.1065063
Peptides	BQ 123	1.8	23.7725		609.3241577

Compound Class	Proposed Compound ^a	% Area ^b	RT ^c (min)	Exact Mass (<i>m/z</i>)	
				[M+H] ⁺ ^d	[M-H] ⁻ ^d
Fatty alcohols	1-Hexadecanol	0.7	25.7185		241.208847
	Mycobilin a	5.5	23.7823		609.2645264
	20-COOH-Leukotriene B4	1.4	26.5947/ 21.7313	367.162322998 046/367.162322 998046	
	2,5-Diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)pyrimidin-4(3H)-one	0.9	24.0502/ 27.9862/ 27.4537	354.115539550 781/354.106445 3125/354.11553 9550781	
	Riboflavin	1.1	29.0215/ 24.2963	377.121124267 578/377.111724 853515	
Others	6-Phospho-2-dehydro-D-gluconate 1-(5-Phosphoribosyl)-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole	7.6	1.3045		273.0335999
		3.6	3.0332		408.0706482
	Dibromoacetonitrile	3.6	1.3045		195.8035278

^aProposed compounds were based on a match of exact mass results with base data in the MZMine 2.0 library using the UPLC-QTOF-MS method. Some compounds were discarded from the list because they did not abide by the following selection criteria: (1) % area above 0.5%; (2) compounds whose exact structure was identified by the library (compounds with a crude formula only were discarded); (3) compounds that were not also identified in the wastewater or the BBM UPLC-QTOF-MS analysis. ^b% area was calculated for each ionization mode analysis; ^cRT; Retention time; ^d [M + H]⁺: exact mass from positive ionization mode analysis. [M - H]⁻: exact mass from negative ionization mode analysis.

Table S3. Characterization of compounds of interest identified in supernatant of green algae consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis.

Compound Class	Proposed Compound ^a	% Area ^b	RT ^c (min)	Exact Mass (m/z)	
				[M+H] ⁺ ^d	[M-H] ⁻ ^d
Carbohydrates	L-Fucose 1-phosphate	4.9	6.12517		243.020 9961
	D-Erythrose 4-phosphate	4.7	10.1757		199.035 4462
	2-Dehydro-3-deoxy-6-phospho-D-galactonate	3.8	7.864		257.041 3513
	dUDP	3.2	1.08633		387.010 0708
Carboxylic acids	Phosphoenol-4-deoxy-3-tetrolonate	16.5	1.29383		197.002 2278
	Caffeic acid 3-glucoside	8.8	1.501		341.043 0908
Polyphenols	Butein	7.0	8.9498 3/9.63233		271.056 9152832 03/271.0 4898071 289
					285.069 1223
Amino acids	Cystine	8.2	1.511		239.014 8163
Lactones	Alternariol	3.7	7.34033		257.033 5999
Others	3-(2-Carboxyethenyl)-cis,cis-muconate	5.0	1.4715		211.018 5547
	Dimethyl selenide	23.6	1.0958 3/35.2427	110.9778594 9707/110.977 85949707	
	Dodecane	2.9	15.983	171.2431641	
	p-Xylene	2.3	1.06617	107.1281967	
	S-Succinylglutathione	1.9	9.4515	408.1096191	
	Phenylpyruvate	1.8	7.62717	165.0822449	

^a Proposed compounds were based on a match of exact mass results with base data in the MZMine 2.0 library using the UPLC-QTOF-MS method. Some compounds were discarded from the list because they did not abide by the following selection criteria: (1) compounds whose exact structure was identified by the library (compounds with a crude formula only were discarded); (2) compounds that were not also identified in the wastewater or the BBM UPLC-QTOF-MS analysis. ^b % area was calculated for each ionization mode analysis; ^c RT; Retention time; ^d [M + H]⁺: exact mass from positive ionization mode analysis. [M - H]⁻: exact mass from negative ionization mode analysis.

Table S4. Characterization of compounds of interest identified from chloroform/methanol extract of cyanobacteria consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis.

Compound Class	Proposed Compound ^a	% Area ^b	RT ^c (min)	Exact Mass (<i>m/z</i>)	
				[M+H] ⁺ ^d	[M-H] ⁻ ^d
Alkaloids	Nitidine	6.81	8.61	349.1553	234.1164
	(S)-Tetrahydroprotoberberine	5.16	2.82		
	Veprisinium	1.76	5.72	335.1417	
	Penaresidin A	1.00	19.26	330.3409	
Fatty acids	Allopumiliotoxin 267A	0.79	25.28	268.2688	
	Linoleamide	4.00	24.72	280.2624	
	Palmitoleamide	3.90	23.85	254.2489	
	2-Hydroxyhexadecanoylcarnitine	2.43	20.64	416.3009	
	5,8-heptadecadiynoic acid	1.40	24.74	263.2370	
Polyphenols	Lecanoric acid	33.43	1.82		317.0818
	4beta-Hydroxyobovatachromene	1.13	25.46	371.0957	
			/27.90	/371.1050	
	(+)-Myristinin A	0.86	30.49	549.2784	
	Medicagol	0.81	25.47	297.0787	
Terpenes	Gibberellin A1	1.29	8.63	349.2004	
	7,8,7',8'-Tetrahydroastaxanthin	1.10	27.55	593.3290	
		1.30	4.15	481.2056	
	Paeoniflorin		/1.29	/481.2109	
Amino acid	N6-Acetyl-L-lysine	0.89	1.06	189.1340	
	Proline	1.30	2.32	116.0660	
			/1.29	/116.0712	
Amines	N-butyl arachidonoyl amine	8.46	20.62	360.3633	
		2.00	19.00		
	N-ethyl arachidonoyl amine		/18.61	332.3311	
			/35.07	/332.3222	
	2-Naphthylamine	1.77	2.34	144.0650	
			/3.90		
Steroids	N-propyl-16,16-dimethyl-5Z,8Z,11Z,14Z-docosatetraenoyl amine	0.97	21.22	402.4113	
	Pinnasterol	1.13	15.90	447.3416	
	6-Deoxytyphasterol	0.77	14.65	435.3484	
Carboxylic acids	Lunularic acid	16.73	1.82/2.81		257.0569/ 257.0646
	N-Methyl-4-aminobenzoate	1.51	1.28 /1.75	152.0527	
Fatty Acyls	O-arachidonoylcarnitine	11.14	20.65/20.67 & 17.65	448.3245/ 448.3655	446.3501
	Behenyl palmitoleate	1.69	26.63	563.5549	
	9,12-octadecadienal	1.30	26.62	265.2582	

Compound Class	Proposed Compound ^a	% Area ^b	RT ^c (min)	Exact Mass (<i>m/z</i>)	
				[M+H] ^{+d}	[M-H] ^{-d}
	2E,4E,8E,10E-Dodecatetraenedioic acid	0.87	22.62 /15.07	223.0616	
Sphingolipids	Prosafrinine	0.80	28.67 /28.20	284.2941 /284.2981	

^aProposed compounds were based on a match of exact mass results with base data in the MZMine 2.0 library using the UPLC-QTOF-MS method. Some compounds were discarded from the list because they did not abide by the following selection criteria: (1) % area above 0.5 %; (2) compounds whose exact structure was identified by the library (compounds with a crude formula only were discarded); (3) compounds that were not also identified in the wastewater or the BBM UPLC-QTOF-MS analysis. ^b% area was calculated for each ionization mode analysis; ^cRT; Retention time; ^d[M + H]⁺: exact mass from positive ionization mode analysis. [M – H][–]: exact mass from negative ionization mode analysis.

Table S5. Characterization of compounds of interest identified in supernatant of cyanobacteria consortium wastewater condition following UPLC-QTOF-MS analysis.

Compound Class	Proposed Compound ^a	% Area ^b	RT ^c (min)	Exact Mass (<i>m/z</i>)	
				[M+H] ⁺ ^d	[M-H] ⁻ ^d
Polyphenols	Corilagin	3.56	1.88		633.0865
	Phyllodulcin	3.07	9.55		285.1025
Lactones	Alternariol	2.48	7.34		257.0725
	Alternariol monomethyl ether	2.48	8.38		271.0892
Amino acid	4-O-Dimethylallyl-L-tyrosine	21.90	6.17	250.1767	
	L-Homocysteic acid	4.82	1.01	184.0455	
Sphingolipids	Hydroxypyruvate	20.02	1.13	104.9917	
	7,8-epoxy-17S-HDHA	4.51	16.08	359.1795	
Amino alcohols	Crucigasterin 277	18.61	8.20	278.2090	
	Obscuraminol A	2.60	8.91	278.2090	
Fatty Acyls	2-aminomuconic acid	5.92			
	semialdehyde		1.01	142.0340	
	N-oleoyl glycine	4.97	9.47	340.2538	
Others	Sinapate	2.12	1.88		223.0408
	Lunularic acid	1.61	7.71		257.0725
	Axisothiocyanate 3	5.39	7.18	264.1955	
	PA(P-16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	3.68	9.46	679.5092	

^a Proposed compounds were based on a match of exact mass results with base data in the MZMine 2.0 library using the UPLC-QTOF-MS method. Some compounds were discarded from the list because they did not abide by the following selection criteria: (1) compounds whose exact structure was identified by the library (compounds with a crude formula only were discarded); (2) compounds that were not also identified in the wastewater or the BBM UPLC-QTOF-MS analysis. ^b % area was calculated for each ionization mode analysis; ^c RT; Retention time; ^d [M + H]⁺: exact mass from positive ionization mode analysis. [M - H]⁻: exact mass from negative ionization mode analysis.

Table S6. The proportion of all fatty acids identified in the oil extracted at the end of the culture of the green algae and cyanobacteria consortia, in control and wastewater condition.

Fatty acid		Class	Relative abundance (%w/w)			
			Gc ^a	Gw ^a	Cc	Cw
C16:0	Palmitic	SFA ^b	21.9	18.4	32.4	35.2
C17:0	Heptadecanoic	SFA	0.3	0.2	0.2	0.3
C18:0	Stearic	SFA	0.7	0.2	0.0	0.1
C20:0	Arachidic	SFA	0.4	0.4	0.7	0.6
C21:0	Henicosanoic	SFA	0.8	0.6	1.4	1.1
C23:0	Tricosanoic	SFA	1.8	0.6	1.5	1.7
C24:0	Lignoceric	SFA	4.6	3.9	2.0	4.9
Total SFA			30.4	24.3	38.2	43.7
C16:1	Palmitoleic	MUFA ^c	0.3	0.9	2.4	2.2
C17:1	cis-10-Heptadecenoic	MUFA	4.2	5.3	0.8	0.0
C18:1n9c	Oleic	MUFA	2.8	0.0	0.0	0.0
C20:1n9	cis-11-Eicosenoic	MUFA	0.6	0.5	1.1	0.6
C22:1n9	Erucic	MUFA	0.7	0.9	0.6	1.6
C24:1n9	Nervonic	MUFA	0.4	1.3	0.9	1.2
Total MUFA			9.2	8.9	5.9	5.5
C18:2n6t	Linolelaidic	PUFA ^d	15.7	19.6	13.4	14.4
C18:2n6c	Linoleic	PUFA	16.2	20.3	13.3	14.8
C18:3n6	γ -Linolenic	PUFA	0.7	0.4	8.0	10.0
C18:3n3	α -Linolenic	PUFA	21.8	20.3	7.0	1.8
C20:2	cis-11,14-Eicosadienoic	PUFA	0.9	1.0	2.1	1.6
C20:3n6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic	PUFA	0.3	0.4	2.0	1.6
C20:4n6	Arachidonic	PUFA	0.5	0.3	1.9	1.5
C20:3n3	cis-11,14,17-Eicosatrienoic	PUFA	1.5	1.2	2.6	1.5
C20:5n3	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic	PUFA	1.4	1.2	1.3	1.1
C22:2	cis-13,16-Docosadienoic	PUFA	0.9	1.2	3.4	2.6
Total PUFA			59.9	65.9	54.9	50.7

^a "G" = green algae consortium, "C" = cyanobacteria consortium, "c" = control condition, "w" = wastewater condition, ^b SFA = Saturated fatty acid, ^c Monounsaturated fatty acid, ^d PUFA = polyunsaturated fatty acid.

CHAPITRE III

DISCUSSION

3.1 Retour sur la problématique et les résultats

Les consortiums de microalgues-bactéries sont une solution prometteuse à différents problèmes environnementaux, notamment en raison de leur capacité à retirer des polluants des eaux usées et de la possibilité de les transformer en une multitude de bioproduits comme des biocarburants ou des antimicrobiens [12]. La culture de consortiums de microalgues en eaux usées comporte cependant certains défis. En effet, la composition microbienne des consortiums n'est pas toujours stable, surtout dans des conditions variables, qu'on retrouve typiquement dans les eaux usées. Les espèces dominantes d'un consortium pourraient ainsi être remplacées par d'autres, mieux adaptées aux nouvelles conditions. Celles-ci n'auront toutefois pas nécessairement la même efficacité de retrait de polluants, et la biomasse générée pourrait avoir une composition chimique différente que celle ciblée pour l'obtention de bioproduits [12, 42].

Ce problème est préoccupant pour le développement des technologies utilisant les consortiums. Pourtant, peu d'études documentent les conséquences sur le traitement des eaux usées et la valorisation de la biomasse d'un consortium qui se modifie avec le temps et les conditions environnantes. La présente étude s'est donc penchée sur cette problématique, en s'intéressant à savoir si, malgré un changement de l'espèce principale d'un consortium, le retrait des nutriments des eaux usées sera aussi efficace et si les molécules d'intérêt produites seront similaires.

Ainsi, deux consortiums de microalgues-bactéries, un composé principalement d'algues vertes et un de cyanobactéries, qui avaient tous deux évolués d'un même consortium, ont été étudié. Les consortiums ont été cultivés pendant 51 jours en milieu standard en mode semi-continu, avec ajout progressif d'eaux usées ou d'eau déminéralisée

(contrôle). La durée de 51 jours a été choisie pour permettre au milieu de culture d'atteindre 100 % d'eaux usées (atteint au jour 42), puis d'avoir 10 jours sans ajout de nutriments BBM pour voir si le consortium s'est acclimaté aux eaux usées et peut s'y développer. À la fin des cultures, plusieurs analyses ont été effectuées sur la biomasse algale et son surnageant afin de répondre aux quatre grands objectifs de l'étude, soient : 1) d'identifier les différentes espèces présentes dans les deux consortiums, 2) de mesurer la croissance des microalgues en eaux usées, 3) de mesurer l'élimination de l'azote et du carbone des eaux usées puis 4) d'étudier la valorisation possible de la biomasse par l'identification des composés d'intérêt et des acides gras produits.

Afin de répondre au premier objectif, l'identification des différents microorganismes composant les deux consortiums a été réalisée par métagénomique à l'IRDA). La préparation des échantillons et l'analyse des résultats ont été réalisées à l'UQTR. L'analyse des OTU (unités taxonomiques opérationnelles) de la communauté microbienne a révélé que la classe des Trebouxiophyceae et la famille des Gomphosphaeriaceae sont les organismes les plus abondants dans les consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries respectivement. L'identification des microalgues indique aussi que le consortium d'algues vertes était composé presque exclusivement d'algues vertes Trebouxiophyceae tandis que le consortium de cyanobactéries était un mélange de cyanobactéries Gomphosphaeriaceae et d'algues vertes Trebouxiophyceae (Tableau 2.2). Ces résultats suggèrent que cette espèce de cyanobactérie était présente initialement dans le consortium *Vertech* d'origine et qu'elle a pris le dessus des algues vertes dans certaines cultures mères au fil du temps, ce qui a engendré le « consortium de cyanobactéries ». Il est possible que ce changement se soit produit au moment où de l'aération a été ajoutée aux cultures mères pour en augmenter leur productivité. Bien que cette hypothèse soit plausible, des expériences supplémentaires sur l'évolution du consortium sont nécessaires pour évaluer la cause d'une telle différenciation. Ce résultat suggère toutefois l'importance de surveiller fréquemment la diversité microbienne des cultures d'algues afin d'anticiper des différenciations de la sorte.

Aussi, une grande diversité de bactéries a été identifiée dans les deux consortiums, dont plusieurs qui sont connues pour être de bonnes candidates pour le traitement des eaux usées. Ce résultat est encourageant dans la perspective d'utiliser ces consortiums pour le traitement des eaux usées, car comme mentionné dans l'introduction, ces bactéries pourraient permettre de traiter les eaux usées en assimilant ou dégradant certaines substances dont les algues seules n'auraient pas la capacité, et donc augmenter l'efficacité de traitement des eaux usées. De plus, aucune bactérie pathogène pour les algues ni pour les humains n'a été retrouvée dans les bactéries identifiées, selon la littérature. Cela est souhaitable dans un consortium sain puisqu'il doit être constitué d'organismes symbiotiques. L'absence de pathogène humain est aussi nécessaire si une mise à l'échelle était réalisée des consortiums, pour des raisons de santé et sécurité du personnel et des produits obtenus à partir du consortium. Toutefois, une faible diversité d'eucaryotes a été identifiée, principalement des ciliés, des amibes et des champignons. Ces organismes, qui peuvent être reconnus comme nuisibles pour les microalgues, devraient être surveillés régulièrement pour s'assurer qu'ils ne prennent pas le dessus des cultures. En comparant les deux consortiums, les résultats de métagénomique suggèrent que le consortium de cyanobactéries semble plus sensible à la contamination par des micro-organismes nocifs que celui d'algues vertes, vu sa composition plus riche en pathogènes potentiels (Amoebozoa) ou en organismes connus pour se nourrir d'algues (ciliés) (Tableau 2.2). Ces contaminants peuvent réduire la croissance des microalgues d'intérêt et ainsi réduire le potentiel économique des métabolites extractibles [78,79,80]. Le consortium d'algues vertes semble donc représenter un plus grand potentiel au niveau de la composition du consortium, car moins d'organismes indésirables y ont été identifiés (moins de 1 % de Ciliophora et Amoebozoa, Tableau 2.2). En outre, les deux consortiums partageaient seulement 28 % des OTU procaryotes et 15 % des OTU eucaryotes identifiées. Ces résultats démontrent que, bien que les deux consortiums aient divergé à partir d'un même consortium initial (le consortium *Vertech*), les deux nouvelles versions sont assez différentes au niveau de leur diversité taxonomique.

En ce qui concerne le second objectif, la croissance du consortium a été mesurée par densité optique à 750 nm par spectrophotométrie. Pour les deux consortiums, la croissance

a été plus élevée en milieu standard sans eaux usées (Figure 2.2). Une croissance plus élevée dans la condition avec eaux usées était anticipée, puisque plus de nutriments sont retrouvés dans le milieu de culture dans cette condition (nutriments du BBM + nutriments des eaux usées, notamment riche en nitrate et carbone organique). Plusieurs hypothèses peuvent toutefois expliquer cette croissance plus faible en eaux usées (décrites à la section 2.3.5 *nutrient removal*), comme la présence potentielle d'antimicrobiens dans les eaux usées de l'industrie de produits nettoyants Sani Marc (ex. ammoniums quaternaires), qui nuiraient à la croissance algale. Dans l'objectif d'augmenter le rendement de croissance des consortiums, des expériences en lien avec les hypothèses soulevées devraient être réalisées, comme par exemple retirer la fraction de Sani Marc du mélange d'eaux usées. Malgré qu'elle soit plus faible que celle du contrôle, une croissance élevée a tout de même été mesurée avec l'ajout d'eaux usées pour les deux consortiums (Figure 2.2). Afin d'avoir une idée plus précise de la croissance des microalgues (puisque une augmentation de la densité optique pourrait indiquer une croissance de bactéries ou autres microorganismes), des décomptes cellulaires au microscope ont aussi été effectués. Les résultats indiquent que le nombre de cellules algales a augmenté entre 10 et 20 fois par rapport à la concentration initiale, et ce, tout au long du cycle de culture en mode semi-continu et en présence d'eaux usées. La croissance des consortiums a continué même après l'arrêt d'ajout des nutriments BBM pendant les 10 derniers jours. Ces résultats sont encourageants, car ils démontrent qu'il est possible de faire croître les consortiums en présence de ces eaux usées. En résumé, les mesures de croissance des consortiums ont démontré qu'indépendamment de leur statut taxonomique différent, les deux consortiums ont répondu à l'ajout d'eaux usées d'une façon similaire, en ayant une croissance algale significative. Toutefois, le consortium d'algues vertes semble avoir un plus grand potentiel de croissance en eaux usées, et donc un meilleur potentiel d'obtention de biomasse, puisque sa croissance a été constante tout au long de la culture, contrairement à celui de cyanobactérie où un ralentissement de croissance a été mesuré en fin de culture (Figure 2.2).

Pour répondre au troisième objectif, les milieux de culture des deux consortiums ont d'abord été récoltés par centrifugation en fin de culture, puis ont été analysés pour

connaître la concentration résiduelle de N_{tot} et de C_{tot} . Ces deux composantes, qui sont des nutriments pour les algues, peuvent causer des impacts néfastes sur l'environnement s'ils se retrouvent en concentration trop élevée dans les cours d'eau. Ils doivent donc être retirés des eaux usées avant de les rejeter dans l'environnement. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un analyseur élémentaire CHNS par des techniciens d'Innofibre. La préparation des échantillons et l'analyse ont été réalisées quant à elles à l'UQTR. Les rendements d'élimination des nutriments ont été de 81 % et 91 % pour le N_{tot} et de 63 % et 56 % pour le C_{tot} pour les consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries, respectivement, dans la condition avec eaux usées. Comme il avait été énoncé dans l'hypothèse de départ, les consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries ont donc réussi à retirer la majorité de ces polluants de façon similaire. Cela suggère que la diversité de chaque consortium n'affecte pas leur potentiel épuratoire.

En ce qui a trait au dernier objectif, un criblage des molécules produites par les consortiums a été réalisé par chromatographie liquide ultra-performance couplée à un spectromètre de masse de configuration quadripôle / temps de vol (UPLC-QTOF-MS) au Centre de recherche industrielle du Québec (CRIQ). Pour effectuer ces analyses, des extractions ont été effectuées sur les échantillons de biomasse d'algues à l'aide de solvants organiques afin d'isoler des groupes de molécules. Le surnageant du milieu de culture récolté en fin d'expérience a aussi été analysé puisque des molécules d'intérêt produites par les algues peuvent avoir été excrétées dans le milieu durant leur croissance. La préparation des extraits a été réalisée à l'UQTR et chez Innofibre, et l'analyse des résultats a été réalisée à l'UQTR. Des composés bioactifs d'intérêt ont été identifiés dans l'extrait chloroforme / méthanol de la biomasse et dans le surnageant pour les deux consortiums cultivés en eaux usées. Par exemple, l'acide lécanorique, reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses, a été identifié dans l'extrait de biomasse des consortiums d'algues vertes et de cyanobactéries. Bien que certaines classes de molécules se retrouvent dans les deux consortiums, l'analyse montre que la grande majorité des molécules sont propres à chaque consortium. Ce résultat était attendu, car bien que les algues vertes et les cyanobactéries soient toutes deux des organismes photosynthétiques, elles diffèrent sur de nombreux aspects, notamment leur

domaine (eucaryote vs procaryote). De plus, les molécules produites peuvent provenir des autres organismes (ex. bactéries, champignons), et la majorité de ceux-ci diffèrent d'un consortium à l'autre.

Aussi, afin de cibler la meilleure perspective de valorisation des lipides de la biomasse produite, l'analyse du profil d'acides gras a été réalisée chez Innofibre par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). L'analyse GC-MS des huiles extraites des deux consortiums a révélé que les acides gras polyinsaturés, qui sont des lipides à haute valeur ajoutée, étaient les acides gras les plus abondants (45 % à 63 %). L'acide gras α -linolénique (C18 :3n3) (20 % et 2 % d'abondance relative (% p/p) pour le consortium d'algues vertes et de cyanobactérie respectivement, Tableau 2.4), un oméga-3, pourrait être valorisé sous forme de compléments alimentaires. Sinon, l'acide palmitique (C16 :0), qui était présent en forte abondance relative dans les deux consortiums (18 % et 35 % d'abondance relative (% p/p) pour le consortium d'algues vertes et de cyanobactéries respectivement, Tableau 2.4) est souvent utilisé dans l'industrie des cosmétiques [111]. L'analyse du profil des acides gras révèle que le consortium d'algues vertes est plus riche en acides gras insaturés que le consortium de cyanobactéries. Le profil des acides gras suggère que le consortium d'algues vertes semble être une meilleure source d'aliments fonctionnels en raison de la variété d'oméga-3 et -6, et les consortiums de cyanobactéries une meilleure source pour les cosmétiques et les produits pharmaceutiques en raison de l'abondance relative plus élevée d'acide palmitique [15]. Ces résultats suggèrent que les deux consortiums ne peuvent pas être appréhendés et valorisés de la même manière. Si une molécule d'intérêt est ciblée, la stabilité du consortium doit donc être maintenue pour garantir que celle-ci soit produite de manière constante.

3.2 Limites et perspectives

Il est important de noter que, comme toute recherche scientifique, la présente étude porte des limites théoriques et méthodologiques. Afin de garder un regard critique sur les

résultats et d'orienter les prochains travaux, celles-ci sont décrites, en fonction des différents objectifs.

D'abord, des limites doivent être considérées concernant le premier objectif, soit l'identification des organismes des consortiums de microalgues par séquençage Illumina à haut débit. Cette méthode de haute précision permet l'identification des OTU (unités taxonomiques opérationnelles), c'est-à-dire des microorganismes présents dans les deux consortiums. Elle a été effectuée dans le but de mieux connaître ceux-ci et de pouvoir observer les différences entre les deux consortiums, et entre les conditions *contrôle* et *eaux usées*. Toutefois, l'identification des OTU n'est pas toujours précise. Par exemple, certaines OTU ont été assignées jusqu'à l'espèce (ex. *Microbacterium aurum*), mais dans d'autres cas, l'OTU a seulement pu être assignée à la famille, l'ordre, ou même le domaine (ex. *unassigned eukaryote*). Cela est dû au fait que l'analyse est limitée aux organismes des bases de données utilisées (Greengenes 13.8 [58], SILVA [59], and UNITE version 8 [60]) ou encore à un manque de spécification du système d'amplification. Cela nous empêche d'approfondir les recherches sur certaines OTU intéressantes, comme le contaminant Ciliophora, présent en abondance dans la condition eaux usées du consortium de cyanobactérie (32 %), mais dont on ne connaît que le domaine. Aussi, il aurait été intéressant, à des fins de valorisation de la biomasse, de connaître avec plus de précision les espèces d'algues vertes et de cyanobactéries composant les deux consortiums, mais seulement la classe et la famille ont été identifiées pour chacun d'entre eux respectivement.

Une autre limite du séquençage réalisé est que les résultats sont présentés sous la forme d'une abondance relative pour chaque OTU détectée (%ARNr/ARNr total) pour les organismes procaryotes (bactéries et cyanobactéries) et eucaryotes (algues vertes, ciliés, champignons, etc.) séparément. Cette méthode n'est donc pas quantitative [114]. Cela nous empêche de comparer les quantités absolues des microorganismes, comme les bactéries, d'un consortium ou d'une condition à l'autre. Par exemple, si deux fois plus de bactéries étaient présentes dans la condition avec ajout d'eaux usées, mais avec les mêmes proportions que le contrôle, cette différence n'aurait pas été détectée dans la présente

étude. Avoir une idée des quantités absolues des microorganismes autres que les microalgues aiderait à mieux comprendre comment ils se comportent selon les conditions et donnerait un indice sur la stabilité des consortiums. Afin de répondre à ce défi, des décomptes de bactéries et de champignons ont été réalisés tout au long de la culture par étalement sur gélose tryptone soya (TSA) et Sabouraud. Malheureusement, une variation dans le milieu de culture utilisé est survenue et n'a pas permis une interprétation juste de ces résultats. Cette méthode aurait été une façon simple et rapide d'estimer l'évolution bactérienne et fongique des cultures. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'avec cette méthode, ce ne sont pas tous les bactéries et champignons qui peuvent croître sur des milieux solides (gélose d'agar). Sinon, puisque les organismes principaux des consortiums sont maintenant connus, les plus intéressants pourraient être quantifiés par des réactions en chaîne par polymérase quantitative relative (relative qPCR) avec des amorces spécifiques aux espèces ciblées.

Ensuite, une limite du troisième objectif est qu'il n'était pas possible d'affirmer quelle proportion des nutriments retirés provenait des eaux usées et quelle provenait du milieu BBM. Par exemple, si 60 % de l'azote total a été retiré, est-ce que cet azote était principalement celui des eaux usées ou celui du BBM? L'hypothèse suivante avait été émise : si la consommation du nutriment était supérieure à l'apport de BBM seul, alors le surplus consommé provenait des eaux usées. Maintenant que nous connaissons la composition en nutriments des eaux usées, il serait préférable dans les prochains travaux de simplement compléter ces eaux avec les nutriments essentiels manquant, au lieu d'ajouter le milieu BBM complet. Par exemple, il faudrait nécessairement compléter le milieu en phosphate, puisque les eaux usées utilisées en contiennent très peu (2.5 mg/L), mais pas en nitrate, puisque les eaux usées en sont riches (770 mg/L).

De plus, le fait que les eaux usées aient été congelées peut avoir un impact sur la disponibilité de certains nutriments et pourrait avoir, du même coup, éliminé certains microorganismes natifs de celles-ci. Il serait intéressant de tester une culture avec des eaux fraîchement échantillonnées par rapport à des eaux usées qui ont été congelées. Aussi, dans le contexte de ce projet, on mentionne la capacité des microalgues à traiter les

eaux usées, mais dans cette recherche on étudie seulement le retrait de deux polluants/nutriments, soit l'azote et le carbone total. Il serait donc intéressant, dans de futurs travaux, de caractériser davantage de composés règlementés par le ministère de l'Environnement du Canada dans les eaux usées avant et après la croissance des algues, comme les matières exerçant une demande biochimique en oxygène de la partie carbonée (carbone organique), les matières en suspension, l'ammoniac non ionisé, la concentration en métaux de trace, etc. Obtenir ces données serait fort utile dans une perspective d'incorporer les microalgues aux traitements des eaux usées industrielles.

Enfin, d'importantes limites concernent le quatrième objectif, soit l'identification des molécules d'intérêt produites par les consortiums. D'abord, la méthode utilisée, l'UPLC-QTOF-MS, ne permet pas d'identifier les composés avec une certitude absolue, mais plutôt d'obtenir une identification potentielle. En effet, il arrive parfois que plusieurs concordances de molécules soient possibles par pic de détection du chromatogramme. C'est à la personne qui analyse les résultats de choisir quelle molécule semble la plus appropriée en fonction de l'erreur sur la masse et en fonction d'une recherche dans la littérature, pour voir si ces molécules ont déjà été identifiées dans des extraits de microalgues. Il existe toutefois peu d'informations sur les molécules produites par les algues et le choix peut être difficile. Cette technique d'identification n'est donc pas infaillible, c'est pour cela qu'il est indiqué « proposed compounds » dans le tableau des molécules identifiées.

Aussi, les molécules identifiées se limitent à celles qui se retrouvent dans les bases de données liées au logiciel MZMine 2.0, soit la base de données du CRIQ composée essentiellement de métabolites végétaux ainsi que les bases de données publiques Chempider, Kegg Compounds Database et LipidMaps Database. Bien que ces bases de données possèdent un nombre très élevé de métabolites, plusieurs composés détectés dans nos extraits n'ont pas été identifiés et seules leurs formules brutes ont été rapportées. Il est donc possible que certaines molécules intéressantes présentes dans nos extraits n'aient pas été rapportées dans les bases de données utilisées.

Aussi, les résultats obtenus par l'analyse UPLC-QTOF-MS ne permettent pas de quantifier la concentration des molécules dans les extraits. En effet, on peut avoir une idée grossière de l'abondance relative des différents composés présents grâce aux valeurs d'aire sous la courbe déterminée pour l'ensemble des composés détectés en fonction du degré d'ionisation de la molécule concernée. Et malgré cela, cette comparaison peut seulement s'effectuer pour des molécules d'une même classe présentant une structure similaire. Afin de confirmer la présence des molécules d'intérêt proposées et de pouvoir les quantifier, il faudrait utiliser des standards de ces molécules et réaliser des courbes d'étalonnage.

Enfin, un point important à considérer concernant la valorisation de la biomasse des consortiums est que les résultats de cette recherche suggèrent que les composés d'intérêt identifiés sont plutôt d'ordre pharmaceutique et médical. Cela est assez problématique si la biomasse est cultivée dans des eaux usées, car il existe de nombreuses réglementations sanitaires pour les produits de ce type d'industries, et en cultivant des microalgues en eaux usées, il peut rester des composés toxiques dans ou sur la biomasse [16, 32]. Il serait donc important de développer une voie de valorisation qui permet d'utiliser une biomasse générée dans un milieu potentiellement contaminé et variable. Dans cette optique, la possibilité de convertir les acides gras algaux en biodiesel, une source d'énergie alternative durable [43], a aussi été envisagée. Nos consortiums produisent des acides gras avec des longueurs de chaîne allant principalement de C16 à C18 et avec une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (45 % à 63 %), ce qui convient au biodiesel avec de bonnes propriétés d'écoulement à froid, mais une faible stabilité à l'oxydation [110]. Cependant, les deux consortiums contiennent de l'acide linoléique (C18: 2n6c) entre 13 % et 20 % d'abondance relative, ce qui est supérieur à la limite imposée par la norme européenne (maximum 12 %) [110]. De plus, pour produire des biocarburants conformes aux normes européennes et américaines, une grande proportion d'acides gras saturés et mono-insaturés et une petite quantité d'acides gras polyinsaturés sont nécessaires, ce qui n'est pas satisfait dans les deux consortiums [65]. Sinon, les biocarburants obtenus par HTL seraient une bonne alternative. En effet, ce processus ne nécessite pas d'avoir un profil d'acide gras

particulier, contrairement au biodiesel obtenu à partir de l'huile extraite et transestérifiée des algues.

Aussi, une avenue intéressante qui a commencé à être explorée dans nos laboratoires et dans l'usine pilote d'Innofibre est de créer des emballages thermoformés à partir d'algues et de pâte cellulosique. Cette méthode permet de transformer la biomasse algale en emballages biodégradables qui remplaceraient des emballages en plastique ou en autres matières obtenues à partir de ressources non renouvelables. De futurs travaux se pencheront d'ailleurs sur cette voie de valorisation dans le cadre du projet *Vertech II*.

3.3 Conclusions

Ce travail donne un aperçu sur la façon dont le processus de traitement des eaux usées et la valorisation de la biomasse algale pourraient être affectés par des changements dans la composition microbienne d'un consortium de microalgues-bactéries. Notre étude suggère qu'il est possible qu'en dépit de changements microbiens importants, deux consortiums différents constitués principalement d'algues vertes et de cyanobactéries respectivement puissent maintenir leur dominance en microalgues, et puissent éliminer certains polluants comme l'azote et le carbone d'eaux usées industrielles. Enfin, il a été montré que malgré les différences en termes de composition biochimique de la biomasse récoltée des deux consortiums, différentes applications peuvent encore être ciblées dans une perspective de valorisation, comme les oméga-3 ou encore des molécules aux propriétés bioactives. En dépit de changements microbiens importants, deux consortiums différents constitués principalement d'algues vertes et de cyanobactéries maintiennent leur fort potentiel de valorisation. Des travaux futurs seraient nécessaires pour quantifier ces métabolites d'intérêt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kim, S.-K., *Handbook of marine microalgae: biotechnology advances*. 2015: Academic Press.
2. Halder, P. and A. Azad, *Recent trends and challenges of algal biofuel conversion technologies*, in *Advanced Biofuels*. 2019, Elsevier. p. 167-179.
3. Safi, C., et al., *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: a review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014. **35**: p. 265-278.
4. de Morais, M.G., et al., *Biologically active metabolites synthesized by microalgae*. BioMed research international, 2015. **2015**.
5. Correa, I., et al. *Deep learning for microalgae classification*. in *2017 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA)*. 2017. IEEE.
6. Soni, R.A., K. Sudhakar, and R. Rana, *Spirulina—From growth to nutritional product: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2017.
7. Miller, A. and C. Russell, *Food crops irrigated with cyanobacteria-contaminated water: an emerging public health issue in Canada*. Environmental Health Review, 2017. **60**(3): p. 58-63.
8. Abed, R.M., S. Dobretsov, and K. Sudesh, *Applications of cyanobacteria in biotechnology*. Journal of applied microbiology, 2009. **106**(1): p. 1-12.
9. Dvořák, P., et al., *Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification*. Biodiversity and Conservation, 2015. **24**(4): p. 739-757.
10. Leliaert, F., et al., *Phylogeny and molecular evolution of the green algae*. Critical reviews in plant sciences, 2012. **31**(1): p. 1-46.
11. Guiry, M.D., *How many species of algae are there?* Journal of phycology, 2012. **48**(5): p. 1057-1063.
12. Padmaperuma, G., et al., *Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing*. Critical reviews in biotechnology, 2018. **38**(5): p. 690-703.

13. Shahid, A., et al., *Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review*. Science of the Total Environment, 2020. **704**: p. 135303.
14. Khan, M.I., J.H. Shin, and J.D. Kim, *The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products*. Microbial cell factories, 2018. **17**(1): p. 1-21.
15. Chen, C.-Y., et al., *Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phyococyanin production and CO₂ fixation with Spirulina platensis*. Bioresource technology, 2013. **145**: p. 307-312.
16. Ferreira, G., et al., *A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2019. **109**: p. 448-466.
17. Rahman, K.M., *Food and high value products from microalgae: market opportunities and challenges*, in *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. 2020, Springer. p. 3-27.
18. Amaro, H.M., A.C. Guedes, and F.X. Malcata, *Antimicrobial activities of microalgae: an invited review*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 2011. **3**: p. 1272-1284.
19. Liu, H., et al., *Optimizing light distribution and controlling biomass concentration by continuously pre-harvesting Spirulina platensis for improving the microalgae production*. Bioresource technology, 2018. **252**: p. 14-19.
20. Michels, M.H., et al., *Effects of shear stress on the microalgae Chaetoceros muelleri*. Bioprocess and biosystems engineering, 2010. **33**(8): p. 921-927.
21. Khoo, C.G., M.K. Lam, and K.T. Lee, *Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae Chlorella vulgaris in bubble column photobioreactor (BC-PBR): hydrodynamics and gas-liquid mass transfer study*. Algal research, 2016. **15**: p. 65-76.
22. Pittman, J.K., A.P. Dean, and O. Osundeko, *The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources*. Bioresource technology, 2011. **102**(1): p. 17-25.
23. Rawat, I., et al., *Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production*. Applied energy, 2011. **88**(10): p. 3411-3424.
24. Odjadjare, E.C., T. Mutanda, and A.O. Olaniran, *Potential biotechnological application of microalgae: a critical review*. Critical reviews in biotechnology, 2017. **37**(1): p. 37-52.

25. Lavrinovičs, A. and T. Juhna, *Review on challenges and limitations for algae-based wastewater treatment*. Construction Science, 2017. **20**(1): p. 17-25.
26. Liu, H., et al., *Isolation of a bacterial strain, Acinetobacter sp. from centrate wastewater and study of its cooperation with algae in nutrients removal*. Bioresource technology, 2017. **235**: p. 59-69.
27. Ji, X., et al., *The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater*. Bioresource technology, 2018. **247**: p. 44-50.
28. Kabariya, J.H. and V.M. Ramani, *Dairy wastewater treatment by cyanobacteria for removal of nutrients with extraction of high value compounds from biomass*. Int J Curr Microbiol App Sci, 2018. **7**: p. 1527-1538.
29. Abdel-Raouf, N., A. Al-Homaidan, and I. Ibraheem, *Microalgae and wastewater treatment*. Saudi journal of biological sciences, 2012. **19**(3): p. 257-275.
30. Edokpayi, J.N., J.O. Odiyo, and O.S. Durowoju, *Impact of wastewater on surface water quality in developing countries: a case study of South Africa*. Water Quality; INTECH: Vienna, Austria, 2017: p. 401-416.
31. Mohsenpour, S.F., et al., *Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review*. Science of The Total Environment, 2020: p. 142168.
32. Moheimani, N.R., et al., *Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent*. Algal research, 2018. **35**: p. 362-369.
33. Goncalves, A.L., J.C. Pires, and M. Simões, *A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment*. Algal Research, 2017. **24**: p. 403-415.
34. Subashchandrabose, S.R., et al., *Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential*. Biotechnology advances, 2011. **29**(6): p. 896-907.
35. Bélanger-Lépine, F., et al., *Cultivation of an algae-bacteria consortium in wastewater from an industrial park: Effect of environmental stress and nutrient deficiency on lipid production*. Bioresource technology, 2018. **267**: p. 657-665.
36. Makut, B.B., D. Das, and G. Goswami, *Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: A sustainable approach*. Algal research, 2019. **37**: p. 228-239.
37. Barros, A.I., et al., *Harvesting techniques applied to microalgae: a review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015. **41**: p. 1489-1500.

38. Perera, I.A., et al., *Advances in the technologies for studying consortia of bacteria and cyanobacteria/microalgae in wastewaters*. Critical reviews in biotechnology, 2019. **39**(5): p. 709-731.
39. Abinandan, S., et al., *Nutrient removal and biomass production: advances in microalgal biotechnology for wastewater treatment*. Critical reviews in biotechnology, 2018. **38**(8): p. 1244-1260.
40. Muñoz, R. and B. Guieysse, *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. Water Research, 2006. **40**(15): p. 2799-2815.
41. Fulbright, S.P., et al., *Bacterial community changes in an industrial algae production system*. Algal research, 2018. **31**: p. 147-156.
42. Torres-Tiji, Y., F.J. Fields, and S.P. Mayfield, *Microalgae as a future food source*. Biotechnology advances, 2020. **41**: p. 107536.
43. Paddock, M.B., J.D. Fernández-Bayo, and J.S. VanderGheynst, *The effect of the microalgae-bacteria microbiome on wastewater treatment and biomass production*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. **104**(2): p. 893-905.
44. Sambles, C., et al., *Metagenomic analysis of the complex microbial consortium associated with cultures of the oil-rich alga Botryococcus braunii*. MicrobiologyOpen, 2017. **6**(4): p. e00482.
45. Bélanger-Lépine, F., et al., *Cultivation of an Algae-Bacteria Consortium in a Mixture of Industrial Wastewater to Obtain Valuable Products for Local Use*. Industrial Biotechnology, 2020. **16**(1): p. 33-42.
46. Elshouny, W.A.E.-F., et al., *Antimicrobial activity of Spirulina platensis against aquatic bacterial isolates*. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2017. **6**(5): p. 1203.
47. Bélanger-Lépine, F., *Culture d'un consortium d'algues-bactéries dans des eaux usées industrielles pour l'obtention de produits biosourcés utilisables par les entreprises locales*, in *Sciences de l'environnement*. 2019, Université du Québec à Montréal. p. 159.
48. Rasouli, Z., et al., *Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs*. Biochemical Engineering Journal, 2018. **134**: p. 129-135.
49. Stephenson, R.L. and J.B. Blackburn Jr, *The industrial wastewater systems handbook*. 2018: CRC Press.
50. Udaiyappan, A.F.M., et al., *A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment*. Journal of Water Process Engineering, 2017. **20**: p. 8-21.

51. De Francisci, D., et al., *Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment*. Environmental technology, 2018. **39**(5): p. 581-592.
52. Osundeko, O., et al., *Promises and challenges of growing microalgae in wastewater*, in *Water Conservation, Recycling and Reuse: Issues and Challenges*. 2019, Springer. p. 29-53.
53. Babaei, A., et al., *Evaluation of Nutrient Removal and Biomass Production Through Mixotrophic, Heterotrophic, and Photoautotrophic Cultivation of Chlorella in Nitrate and Ammonium Wastewater*. International Journal of Environmental Research, 2018. **12**(2): p. 167-178.
54. García, D., et al., *Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggy wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors*. Bioresource technology, 2018. **248**: p. 120-126.
55. Zhu, L., et al., *Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggy wastewater treatment*. Water research, 2013. **47**(13): p. 4294-4302.
56. Bischoff, H.W. and H.C. Bold, *BBM-Medium (Bold's Basal Medium + soil extract + vitamins)*. Fraunhofer, 2005.
57. Bolyen, E., et al., *QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science*. 2018, PeerJ Preprints.
58. DeSantis, T.Z., et al., *Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(7): p. 5069-5072.
59. Quast, C., et al., *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. Nucleic acids research, 2012. **41**(D1): p. D590-D596.
60. Kõljalg, U., et al., *Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi*. Molecular ecology, 2013. **22**(21): p. 5271-5277.
61. Griffiths, M.J., et al., *Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density*. Journal of microbiological methods, 2011. **85**(2): p. 119-123.
62. Andersen, R.A., *Algal culturing techniques*. 2005: Elsevier.
63. St-Pierre, A., et al., *Phytochemical Screening of Quaking Aspen (Populus tremuloides) Extracts by UPLC-QTOF-MS and Evaluation of their Antimicrobial Activity*. molecules, 2018.

64. Li, Z., et al., *Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae Chlorella spp. by three-phase partitioning*. Bioresource technology, 2013. **149**: p. 286-291.
65. Bourdeau, N., et al., *Mixotrophic Cultivation of an Algae-Bacteria Consortium in Aluminium Smelter Wastewaters (Quebec, Canada): High Nitrogen Concentration Increases Overall Lipid Production*. Industrial Biotechnology, 2017. **13**(5): p. 260-269.
66. Tangahu, B.V., P.A. Hutabarat, and T.F. Aabidah, *The ability test of Microalgae consortia Chlorella vulgaris and Spirulina platensis in removing cadmium (II)*.
67. Krohn-Molt, I., et al., *Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors*. Appl. Environ. Microbiol., 2013. **79**(20): p. 6196-6206.
68. Sniffen, K.D., et al., *Influence of scale on biomass growth and nutrient removal in an algal-bacterial leachate treatment system*. Environmental Science & Technology, 2017. **51**(22): p. 13344-13352.
69. Jing, G., Z. Zhou, and J. Zhuo, *Quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of toxicity of quaternary ammonium compounds on Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus quadricauda*. Chemosphere, 2012. **86**(1): p. 76-82.
70. Hernández, D., et al., *Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications*. Chemical Engineering Journal, 2016. **285**: p. 449-458.
71. Kim, B.-H., et al., *Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater*. J. Microbiol. Biotechnol., 2014. **24**(8): p. 1123-1132.
72. Posadas, E., et al., *A case study of a pilot high rate algal pond for the treatment of fish farm and domestic wastewaters*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2015. **90**(6): p. 1094-1101.
73. Kumar, R. and P. Pal, *Assessing the feasibility of N and P recovery by struvite precipitation from nutrient-rich wastewater: a review*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(22): p. 17453-17464.
74. Wu, J.S., et al. *Study on the correlation of N, P nutrients and chlorella growth*. in *Applied Mechanics and Materials*. 2014. Trans Tech Publ.
75. Rama Krishna, B., et al., *Synthesis of some novel orsellinates and lecanoric acid related depsides as α -glucosidase inhibitors*. Journal of Asian natural products research, 2019. **21**(10): p. 1013-1027.

76. Ristić, S., et al., *Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of Melanelia subaurifera and Melanelia fuliginosa lichens*. Journal of food science and technology, 2016. **53**(6): p. 2804-2816.
77. Tatipamula, V.B., et al., *Study of phytochemical analysis, total flavonoid and phenolic content, antimicrobial properties and chemical constituents of two manglicolous lichens extracts*. Inventi Rapid: Planta Activa, 2018. **2018**(2): p. 1-6.
78. Jha, B.N., et al., *Investigation of antioxidant, antimicrobial and toxicity activities of lichens from high altitude regions of Nepal*. BMC complementary and alternative medicine, 2017. **17**(1): p. 282.
79. Carlson, S., et al., *Phylum-specific regulation of resistomycin production in a Streptomyces sp. via microbial coculture*. Journal of natural products, 2015. **78**(3): p. 381-387.
80. Zhang, Y.-l., et al., *Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated Streptomyces canus BYB02*. Journal of agricultural and food chemistry, 2013. **61**(7): p. 1521-1524.
81. Thakur, K., et al., *Riboflavin and health: A review of recent human research*. Critical reviews in food science and nutrition, 2017. **57**(17): p. 3650-3660.
82. Saedisomeolia, A. and M. Ashoori, *Riboflavin in human health: a review of current evidences*, in *Advances in food and nutrition research*. 2018, Elsevier. p. 57-81.
83. ASLAN, H., et al., *Beneficial effects of melatonin and BQ-123 on the rat testis damage caused by cigarette smoke*. Turkish Journal of Medical Sciences, 2015. **45**(1): p. 11-17.
84. Kowalczyk, A., et al., *BQ123 stimulates skeletal muscle antioxidant defense via Nrf2 activation in LPS-treated rats*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016.
85. Song, Z., et al., *Butein and its role in chronic diseases*, in *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*. 2016, Springer. p. 419-433.
86. Hsin, I.-L., et al., *Immunomodulatory proteins FIP-gts and chloroquine induce caspase-independent cell death via autophagy for resensitizing cisplatin-resistant urothelial cancer cells*. Phytomedicine, 2016. **23**(13): p. 1566-1573.
87. Jayasooriya, R.G.P.T., et al., *Molecular chemotherapeutic potential of butein: A concise review*. Food and Chemical Toxicology, 2018. **112**: p. 1-10.
88. Imran, M., et al., *Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential*. Molecules, 2019. **24**(12): p. 2277.

89. Devi, K.P., et al., *Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine*. Pharmacological Research, 2015. **99**: p. 1-10.
90. Ren, J., et al., *Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2019. **18**(4): p. 2759-2776.
91. Nesbit, M.O. and A.G. Phillips, *Tetrahydroprotoberberines: A Novel Source of Pharmacotherapies for Substance Use Disorders?* Trends in Pharmacological Sciences, 2020. **41**(3): p. 147-161.
92. Callejon, D.R., et al., *Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids*. Molecules, 2014. **19**(5): p. 5692-5703.
93. Bouquet, J., et al., *Biological activities of nitidine, a potential anti-malarial lead compound*. Malaria journal, 2012. **11**(1): p. 67.
94. Ihrmark, K., et al., *New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities*. FEMS microbiology ecology, 2012. **82**(3): p. 666-677.
95. Tang, N.-Y., et al., *The anti-inflammatory effect of paeoniflorin on cerebral infarction induced by ischemia-reperfusion injury in Sprague-Dawley rats*. The American journal of Chinese medicine, 2010. **38**(01): p. 51-64.
96. Li, H., Y. Jiao, and M. Xie, *Paeoniflorin ameliorates atherosclerosis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B activation*. Inflammation, 2017. **40**(6): p. 2042-2051.
97. Zhang, J., et al., *Paeoniflorin abrogates DSS-induced colitis via a TLR4-dependent pathway*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and liver physiology, 2014. **306**(1): p. G27-G36.
98. Luan, B., et al., *Corilagin could help to overcome PARP inhibitor resistance by inhibiting ERK signaling pathways*. 2019, AACR.
99. Li, X., et al., *Corilagin, a promising medicinal herbal agent*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018. **99**: p. 43-50.
100. Tong, Y., et al., *Corilagin inhibits breast cancer growth via reactive oxygen species-dependent apoptosis and autophagy*. Journal of cellular and molecular medicine, 2018. **22**(8): p. 3795-3807.
101. Kim, E., et al., *Phyllodulcin, a natural functional sweetener, improves diabetic metabolic changes by regulating hepatic lipogenesis, inflammation, oxidative stress, fibrosis, and gluconeogenesis in db/db mice*. Journal of Functional Foods, 2018. **42**: p. 1-11.

102. Kim, E., et al., *Phyllodulcin, a natural sweetener, regulates obesity-related metabolic changes and fat browning-related genes of subcutaneous white adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice*. *Nutrients*, 2017. **9**(10): p. 1049.
103. Kim, E., S.-H. Yoo, and Y. Kim, *Phyllodulcin as a sugar complement exerts anti-diabetic effects in db/db mouse*. *The FASEB journal*, 2016. **30**(1_supplement): p. 692.11-692.11.
104. Heravi, M.M., et al., *Application of asymmetric Sharpless aminohydroxylation in total synthesis of natural products and some synthetic complex bio-active molecules*. *RSC advances*, 2018. **8**(12): p. 6634-6659.
105. Flock, S., et al., *The first synthesis of Crucigasterin 277—a polyunsaturated C-18 amino alcohol from the Mediterranean tunicate Pseudomonas crucigaster*. *Tetrahedron*, 2016. **72**(30): p. 4518-4522.
106. Sun, H., et al., *High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion*. *Biotechnology for biofuels*, 2018. **11**(1): p. 1-23.
107. Solhaug, A., G.S. Eriksen, and J.A. Holme, *Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin alternariol: A review*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2016. **119**(6): p. 533-539.
108. Breuer, G., et al., *Analysis of fatty acid content and composition in microalgae*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2013(80): p. e50628.
109. Sharma, N., et al., *Red light variation an effective alternative to regulate biomass and lipid profiles in Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Sciences*, 2020. **10**(7): p. 2531.
110. Deshmukh, S., R. Kumar, and K. Bala, *Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions*. *Fuel Processing Technology*, 2019. **191**: p. 232-247.
111. Calixto, C.D., et al., *Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues*. *Bioresource technology*, 2016. **221**: p. 438-446.
112. Pratoomyot, J., P. Srivilas, and T. Noiraksar, *Fatty acids composition of 10 microalgal species*. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 2005. **27**(6): p. 1179-1187.
113. Sushchik, N., et al., *A temperature dependence of the intra-and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2003. **50**(3): p. 374-380.
114. Bragg, L. and G.W. Tyson, *Metagenomics using next-generation sequencing*, in *Environmental microbiology*. 2014, Springer. p. 183-201.