

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Production de bioplastiques par les microalgues

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR
Marc-Antoine Cimon**

Juin 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Le présent travail n'aurait pu aboutir 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 mon cheminement universitaire, d'innombrables opportunités de me développer autant sur le plan humain qu'en tant que chercheur, en m'invitant à participer à des congrès internationaux et en me permettant de m'impliquer dans la communication scientifique auprès des adolescents de notre région. Je remercie également Nathalie Bourdeau, chercheuse à Innofibre, pour 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, m'ont apporté leur soutien et leur aide pour résoudre toutes problématiques rencontrées lors de ce projet, spécialement Tung Lai et Ha Pham. Pour leur assistance technique et leur compagnie au quotidien, je remercie également les étudiants diplômés Lauriane Thibault, Vicky Alain et Sabrina Grenier. Pour les nombreuses méthodes apprises et mon initiation au monde des microalgues, je remercie également l'équipe d'Innofibre : Annabelle St-Pierre, Maxime Bellemare, Kamal Kobaa et Josée Doucet.

Je remercie finalement les collaborateurs et organismes subventionnaires qui ont permis de rendre cette recherche possible : la Ville de Victoriaville, Sani Marc Inc., Mitacs ainsi que le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FRQNT).

AVANT-PROPOS

Ce mémoire fait l'objet du travail réalisé de janvier 2021 à décembre 2023 dans le cadre de la maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire. Il a été effectué sous la supervision du professeur Simon Barnabé 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 recherche. Le deuxième est l'article scientifique intitulé : Production de bioplastiques par les microalgues. 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.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
AVANT-PROPOS	2
TABLE DES MATIÈRES	3
LISTE DES FIGURES	5
Chapitre I	6
1.Introduction	6
1.1 Les microalgues : algues vertes et cyanobactéries	6
1.2 Les cocultures.....	9
1.3 La valorisation des microalgues	10
1.4 Les méthodes de cultures des microalgues.....	11
1.5 La valorisation des résidus agro-alimentaires	13
1.6 Les plastiques	14
1.7 Les biopolymères	15
1.8 Problématique.....	16
1.9 Projet dans lequel s'intègre cette étude	17
1.10 Objectifs de l'étude.....	20
Chapitre II	22
2. Production de bioplastiques par les microalgues : impact de la source de carbone	22
2.1 Résumé	22
2.2 Introduction	23
2.3	25
Matériels et Méthodes	25
2.3.1 Souches étudiées.....	25
2.3.2 Milieux de culture.....	25
2.3.3 Préparation de l'inoculum de coculture.....	26
2.3.4	26
Culture en fioles	26
2.3.5 Culture en photobioréacteur	27
2.4 Analyses	27
2.4.1 Biomasse sèche produite	27
2.4.2 Extraction des PHA et gravimétrie.....	28

2.4.3 Détection des polyhydroxyalkanoates par microscopie de fluorescence et optimisation	28
2.4.4 Dosage des polyhydroxyalkanoates (PHA).....	29
2.5 Résultats	29
2.5.1 Potentiel de la coculture pour la production algale	29
2.5.2.....	30
Stabilité de la coculture en photobioréacteur	30
2.5.3 Potentiel des différents substrats pour la production algale	32
2.5.4 Potentiel des différents substrats pour la production de bioplastiques.....	33
2.6 Caractérisation des PHAs.....	35
2.6.1 Optimisation de la méthode de microscopie de fluorescence.....	35
2.6.2 Analyses des PHA par GC-MS	35
2.7 Discussion	37
2.7.1 Le potentiel de croissance de la coculture	38
2.7.2 Le potentiel de croissance de différents substrats.....	38
2.7.3 Le potentiel de production de PHA de différents substrats	39
2.7.4 Le potentiel des substrats agro-alimentaires.....	40
2.8 Conclusions	41
2.9 Remerciements	41
2.10 Références	42
2.11 Annexe.....	44
Chapitre III.....	50
Discussion.....	50
3.1 Retour sur la problématique et les résultats.....	50
3.2 Limites et perspectives	54
3.3 Conclusions	58
Références	59

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Diversité morphologique des microalgues	8
Figure 2: Schéma du processus de valorisation des résidus agro-alimentaires par les microalgues (Kumar, 2022)	13
Figure 3: Répartition des différents types de plastique dans le monde en 2015	14
Figure 4: Les trois voies métaboliques principales des PHA	16
Figure 5: Vue microscopique du consortium Vertech.....	17
Figure 6: Schéma du projet Vertech I.....	18
Figure 7: Microscopie des deux consortiums avec une dominance des microalgues et une dominance des cyanobactéries.	19
Figure 8: Production de biomasse de <i>C. vulgaris</i> en culture pure vs la coculture <i>C. vulgaris</i> et cyanobactéries	30
Figure 9: Suivi du pH d'une coculture de <i>C. vulgaris</i> et cyanobactéries en PBR	31
Figure 10: Suivi de l'oxygène dissous d'une coculture de <i>C.vulgaris</i> et cyanobactéries en PBR..	32
Figure 11: Biomasse produite en fonction du traitement.....	33
Figure 12: Teneur en PHA de la biomasse en fonction de la source de carbone.	34
Figure 13: Image de fluorescence d'un échantillon algale aux paramètres optimaux	35
Tableau 1 : Résumé de la quantification des PHA par GC-MS.....	36
Figure 14: Chromatogrammes des échantillons traités avec du BBM, de l'acétate, des résidus de canneberges, et du malate.....	37

Chapitre I

1.Introduction

1.1 Les microalgues : algues vertes et cyanobactéries

Le terme microalgues regroupe un ensemble extrêmement hétérogène d'espèces dont la caractéristique commune est la photosynthèse oxygénique (Andersen, 1992). Ce processus permet la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique par le biais d'un transfert d'électrons à partir de l'eau. Le regroupement d'espèces désignées comme microalgues est difficilement défini aux vues de la grande diversité dans les propriétés et les caractéristiques de ses espèces. Cependant, une définition conservatrice serait de les désignées comme des microorganismes, eucaryotes ou non, contenant des plastides. Ces plastides pouvant se spécialiser dans le stockage de certaines molécules comme l'amidon ou tout simplement servir à la photosynthèse comme les chloroplastes. En plus de leurs caractéristiques variées, les microalgues se retrouvent également dans une grande variété d'écosystèmes allant de l'eau douce à l'eau salée, mais également des glaciers aux sols plus arides. Cette diversité d'habitats représente bien l'aspect hétérogène des microalgues. Cette biodiversité s'explique entre autres par l'existence d'environ 150 000 espèces de microalgues différentes, certaines études moins conservatrices allant même jusqu'à 800 000 espèces (Kim, 2015; Nef, 2019). Parmi ces espèces, seulement une faible portion a été caractérisée et une portion encore plus faible parmi ces dernières a été étudiée pour des applications potentielles (Halder, 2019).

Les microalgues se caractérisent également par leurs besoins aisément comblés par la plupart des habitats. En effet, outre un environnement relativement humide et une source lumineuse, les nutriments essentiels aux microalgues sont une source de carbone, des macronutriments (de l'azote, du phosphore, ainsi que de faibles quantités de certains métaux comme le cuivre et le fer). Plusieurs espèces de microalgues sont capables d'utiliser le dioxyde de carbone, CO₂, en tant que source de carbone pour la photosynthèse ainsi que d'utiliser le carbone d'origine organique directement (ex. : glucose, acétate, etc.). Ces

espèces comme *Chlorella sp.* et *Chlamydomonas reinhardtii* sont dites mixotrophes, ce qui leur permet de limiter la baisse de croissance en l'absence de lumière (Abdel-Raouf, 2012). Cette flexibilité au niveau des sources de nutriments permet d'obtenir un rendement en termes de production de biomasse pouvant être de 30 à 100 fois supérieur aux plantes terrestres (de Maurais, 2015).

Outre leur capacité photosynthétique, les microalgues peuvent être séparées et classifiées selon plusieurs autres critères comme la morphologie, leur membrane et la pigmentation (Correa, 2017). Du fait de leur facilité d'isolation et de conservation, la plupart des microalgues étudiées appartiennent aux groupes des algues vertes ou des cyanobactéries. Dans le cadre de ce projet de recherche, ces deux groupes ont été mis de l'avant et seront donc considérés en priorité pour la suite de ce mémoire.

Les algues vertes sont un ensemble d'algues eucaryotes dont la pigmentation provient majoritairement de la chlorophylle a et la chlorophylle b. Elles possèdent des tailles et des morphologies variées pouvant aller de l'ordre du micromètre à plusieurs mètres de longueur (Figure 1.1). Il est estimé que le nombre d'espèces appartenant à la catégorie des algues vertes correspond à environ 13 000 espèces distinctes (Guiry, 2012). Afin d'optimiser la lisibilité du texte, les termes « microalgues » ou « algues », qui seront utilisés dans ce travail, seront considérés comme englobant les algues vertes et les cyanobactéries.

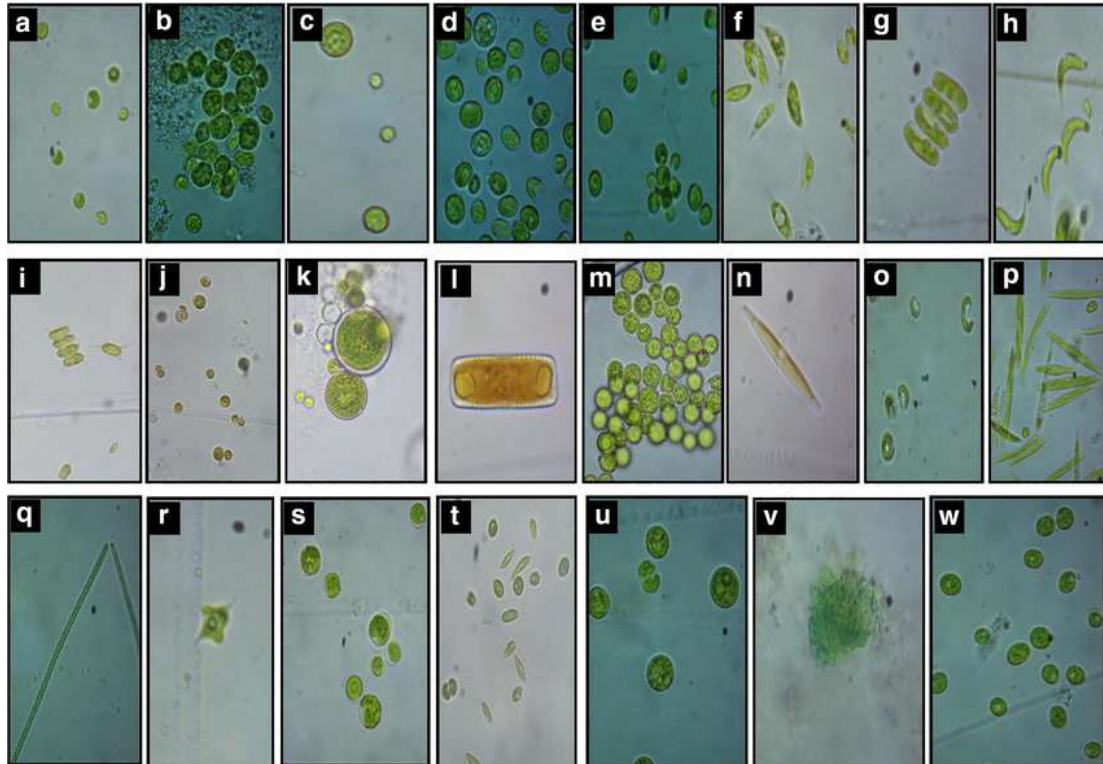


Figure 1: **Diversité morphologique des microalgues** : a–w représentent KACC 1–KACC 23. *Kalenjinia gelatinosa* KACC 1, *Scenedesmus rubescens* KACC 2, *Neodesmus pupukensis* KACC 3, *Coelastrella* sp. KACC 4, *Myrmecia incisa* KACC 5, *Scenedesmus acutus* KACC 6, *Desmodesmus dispar* KACC 7, *Monoraphidium contortum* KACC 8, *Scenedesmus acunae* KACC 9, *Nannochloris* sp. KACC 10, *Chlorococcum* sp. KACC 11, *Brachysira exilis* KACC 12, *Chlorococcum* sp. KACC 13, *Nitzschia paleacea* KACC 14, *Kirchneriella incurvata* KACC 15, *Ankistrodesmus* sp. KACC 16, *Oscillatoria* sp. KACC 17, *Tetraedron caudatum* KACC 18, *Graesiella* sp. KACC 19, *Scenedesmus* sp. KACC 20, *Chlorella neustonica* KACC 21, *Chlorella* sp. KACC 22, *Elliptochloris* sp. KACC 23 (Sureshkumar, 2020)

Les cyanobactéries, aussi connu sous le nom d'algues bleues, sont des organismes unicellulaires procaryotes pouvant vivre seules ou se regrouper sous formes de colonies. D'un point de vue phylogénétique, elles font partie du grand domaine des bactéries, mais elles sont souvent associées aux microalgues. En effet, leur écologie, leur morphologie, de même que leur production de chlorophylle a permet de les rapprocher du domaine végétal (Soni, 2017; Miller, 2017) (Figure 1.1). Leur pigmentation allant du bleu à l'orange permet souvent de les différencier des algues vertes. Plus précisément, leur production de deux pigments particuliers, la phycocyanine (bleu) et la phycoérythrine (rouge), vient moduler la teinte des cyanobactéries tout en camouflant la pigmentation de la chlorophylle a. Les applications potentielles des cyanobactéries sont demeurées méconnues jusqu'à récemment dû à leurs effets néfastes notoires sur certains écosystèmes. Leur capacité à proliférer de façon rapide dans les milieux aquatiques a souvent donner lieu à des

phénomènes d'eutrophisation dans les lacs et ce n'est qu'après plusieurs années d'études que certaines de leurs propriétés ont été étudiées dans un aspect biotechnologique (Kumar, 2019).

1.2 Les cocultures

Le terme coculture désigne les cultures dont le milieu regroupe plusieurs microorganismes différents. Ce type de culture permet d'examiner les interactions possibles entre les espèces et d'évaluer le potentiel que possèdent deux espèces ou plus de cohabiter (Carter, 2015). Cela permet aussi de détecter des synergies pouvant exister entre deux espèces. Par exemple, une espèce photosynthétique offrant des nutriments à une espèce hétérotrophe ou mixotrophe qui viendra par la suite l'alimenter en CO₂. De plus, la photosynthèse chez les microalgues produisant forcément de l'oxygène, sa concentration dans un milieu fermé comme un réacteur se trouve augmenté. La photosynthèse étant inhibée à des hauts taux d'oxygène, ce dernier devient donc un facteur limitant pour la croissance algale (Warburg, 1919). Afin de pallier cela, l'utilisation d'un organisme mixotrophe ou hétérotrophe comme les cyanobactéries ou les levures permet la régulation du niveau d'O₂ ce qui permet une croissance continue (Wang, 2015).

D'un autre côté, la mise en contact de deux espèces différentes induit un stress chez les microorganismes (Zhang, 2021). Ce stress de la culture offre de nombreuses applications potentielles. En effet, de nombreuses molécules d'intérêt sont produites comme réponse métabolique au stress comme les biopolymères ou les exopolysaccharides (EPS) (Garza-Rodriguez, 2022). De nombreuses cocultures se sont déjà montrées efficaces dans la production de différentes molécules comme la production d'EPS par une coculture de microalgues et de macromycètes (Angelis, 2012) ou encore la production de lipides par *Scenedesmus obliquus*/*Candida tropicalis* qui a montré une augmentation de rendement en comparaison aux cultures pures (Wang, 2015).

Dans cette étude, une attention particulière sera donc apportée aux interactions potentielles entre différentes espèces d'algues et cyanobactéries. Cela sera fait au niveau des synergies possibles ainsi qu'à celui du stress induit. Cette étude se focalisera principalement sur la croissance algale ainsi que la production de molécules d'intérêt.

1.3 La valorisation des microalgues

La grande diversité des microalgues au niveau de leurs habitats et leurs morphologies leur permet de produire une grande variété de molécules d'intérêt (ex. lipides, saccharides, protéines, polymères, etc.). Leur taux de croissance élevé permet également une production accrue de ces molécules comparativement aux végétaux supérieurs. Cette variété de molécules produites les rend intéressantes pour un large panel de secteurs industriels comme les emballages, l'alimentaire, le secteur pétrolier et la pharmaceutique (Padmaperuma, 2018; Shahid, 2020). Un autre avantage de la biomasse algale réside dans la possibilité de l'utiliser dans son ensemble sans prétraitement comme pour la production de biopolymères pour les emballages. Par exemple, une biomasse algale pourrait être incorporé directement dans un procédé de l'industrie papetière afin d'obtenir un produit possédant des propriétés différentes d'un carton ordinaire (Seo, 2010). La diversité métabolique des microalgues permet également d'induire la production de molécules à haute valeur ajoutée comme certaines phytohormones pour le domaine de l'agriculture biologique ou certains pigments comme la phycocyanine pour le domaine alimentaire (Langlois, 2021; Chen, 2013).

Lorsque soumis à certains stress précis, les microalgues ont la capacité d'accumuler un haut taux de lipides pouvant aller jusqu'à 40% (p/p). Ces lipides peuvent par la suite permettre la production de biocarburants comme le biodiesel, ce qui en fait une source potentielle d'énergie renouvelable (Kumar, 2022). La fermentation des sucres des algues permet également la production de bioéthanol pouvant servir dans les moteurs à essence. De plus, la liquéfaction hydrothermale des algues permet de produire une huile comparable au brut pétrolier, appelé le biobrut (Umit, 2023). Ces mêmes lipides présentent également

un certain intérêt dans le domaine alimentaire étant donné la haute teneur en oméga-3 (Bayu, 2021). Ainsi, pour leurs nombreux avantages énumérés ci-haut, les microalgues constituent une avenue intéressante dans la production industrielle de molécules d'intérêts.

1.4 Les méthodes de cultures des microalgues

Après les nombreuses études portant sur la production de co-produits à haute valeur ajoutée par les microalgues, plusieurs recherches se sont penchées sur l'optimisation des méthodes de culture. Ces méthodes se divisent en deux principaux volets pour la culture phototrophique ou mixotrophique: les bassins ouverts et les photobioréacteurs (PBR).

Les bassins ouverts, comme leur nom l'indique, sont des piscines de formes et de tailles variés dont le milieu de culture est directement en contact avec l'air ambiant. S'adaptant facilement aux besoins des producteurs, les bassins constituent une technologie simple d'accès pouvant se moduler afin d'optimiser la surface disponible. Par exemple, un vaste terrain permettra d'établir de longs bassins rectangulaires pour une production accrue. À l'inverse, un terrain comportant plusieurs bâtiments existants pourra se pourvoir de plusieurs bassins de format réduit répartis dans les espaces vacants. Un modèle de bassin ouvert intéressant est le modèle « raceway ». La forme ovale de celui-ci permet de produire un courant et une circulation du milieu de culture reproduisant les conditions de l'écosystème naturel d'un cours d'eau ce qui limite l'appauvrissement en oxygène dissous (Rayen, 2019). La technologie des bassins ouverts présente un autre avantage dans sa simplicité réduisant les coûts d'exploitation en comparaison des systèmes PBR. Leurs principaux désavantages résident dans le fait qu'il s'agisse d'un système ouvert, cela laissant place à la probabilité de contamination des cultures, la perte d'eau par évaporation ainsi qu'une plus faible productivité.

La technologie des photobioréacteurs vient pallier les risques de contamination grâce à son système fermé et ses nombreuses options de calibration des paramètres de culture. Les PBR

offrent un contrôle précis sur l'apport en oxygène, CO₂ et autres nutriments par l'usage des nombreuses sondes intégrées au design des différents modèles. De plus, cette technologie offre une diffusion plus uniforme de la lumière nécessaire à la croissance des microalgues. Le suivi de ces paramètres, en plus du contrôle et du suivi de la température, de l'agitation et du pH, permet d'obtenir les conditions optimales à la culture des différentes espèces de microalgues (Chen, 2011). Plusieurs modèles de PBR sont utilisés pour la culture de microalgues. Parmi ceux-ci, deux se distinguent particulièrement : les PBR tubulaires et les PBR à plaques (Figure 1.4). Les premiers constituent le modèle le plus répandu grâce à leur rendement en termes de pureté et de production de biomasse par unité de volume. En effet, le modèle tubulaire permet d'atteindre une forte densité cellulaire des microalgues dans le milieu, ce qui permet de réduire les traitements de la biomasse en aval, donc les coûts de production (Acien, 2012). Le second modèle, quant à lui, est constitué de deux plaques venant emprisonnés une mince couche de milieu de culture. Ce modèle apporte un avantage indéniable dans l'uniformisation de la distribution de la lumière à travers la culture et permet également d'optimiser l'espace disponible en montant les plaques de milieu de culture en séries parallèles (Benner, 2022).

Dans une optique d'optimisation des différents paramètres de culture, les photobioréacteurs représentent la technologie optimale. Le suivi et le contrôle des différents paramètres rend l'optimisation de ces derniers accessible. Les PBR permettent également de limiter les contaminations pouvant entraîner des pertes autant en termes de temps que financièrement. Pour toutes les raisons énoncées ci-haut, le modèle en système fermé de type PBR tubulaire sera privilégié dans cette étude.

1.5 La valorisation des résidus agro-alimentaires

Les résidus agro-alimentaires constituent une énorme biomasse inutilisée et disponible pour une valorisation. En effet, il est estimé que près d'un tiers de la production mondiale de nourriture est gaspillée (Gustavsson, 2011). Cette biomasse perdue possède un fort potentiel pour la croissance de microorganismes grâce à sa teneur en carbohydrates, protéines et lipides (Zeng, 2018). Celle-ci pourrait donc servir de source de nutriments pour la croissance algale et produire une biomasse ayant diverses avenues d'utilisation possibles comme devenir du biocarburant ou encore servir de base à la conception de biopolymères (Figure 2). Le principal enjeu concernant la production industrielle de microalgues est la rentabilité du procédé. Une des façons de régler celui-ci est de parvenir à sécuriser une quantité suffisante de substrat à faible coût. Ainsi, certaines études ont évalué la possibilité de faire croître les microalgues en se servant des résidus de l'industrie agro-alimentaire. Ces études ont montré la faisabilité d'un tel procédé en utilisant des résidus provenant de la production bovine, laitière ou de fruits et légumes (Zheng, 2022; Zhen, 2015; Zhuang, 2020).

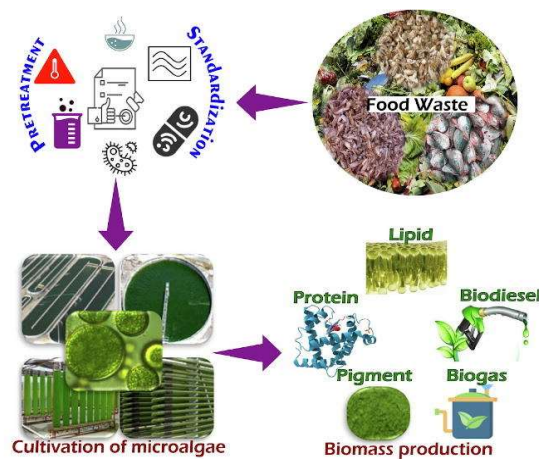


Figure 2: Schéma du processus de valorisation des résidus agro-alimentaires par les microalgues (Kumar, 2022)

Dans le cas nous concernant, les résidus agro-alimentaires provenant de l'industrie maraîchère ont été utilisés. Les motifs derrière le choix de ce résidu se trouvent dans la composition particulière des baies, dans ce cas-ci les canneberges, et donc de leurs résidus. En effet, les baies possèdent une forte teneur en acides organiques tels que les acides maliques, citriques, tartriques, succiniques, quiniques et oxaliques (Blackford, 2019). Ces

différents acides ont la possibilité d'être métabolisés par les microalgues dans certaines voies métaboliques d'intérêt, notamment celle des polyhydroxyalkanoates (PHA). Cette voie permet la production de molécules possédant des propriétés semblables à celle du plastique tout en conservant la biodégradabilité propre aux biopolymères.

1.6 Les plastiques

Les polymères d'origine fossile comme le plastique sont considérés comme un enjeu majeur au niveau environnemental dû à leur accumulation sous forme de déchets et leur temps de dégradation très long. En effet, selon le site des Nations-Unies, la production de déchets plastiques annuelle s'élève à 400 millions de tonnes, dont 36% provient d'emballages. Par ailleurs, la demi-vie des contenants plastiques est estimée à 58 ans, ce qui explique en partie leur accumulation constante

au cours des dernières décennies (Chamas, 2020). Plus concrètement, la famille des plastiques regroupent sept grandes familles : le polyéthylène téréphtalate (PET), le polyéthylène haute densité (PEHD), le polychlorure de vinyle (PVC), le polyéthylène basse densité (LDPE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS) et les autres ne pouvant être catégorisés parmi les 6 premières familles. Tel qu'illustré à la figure 3, leur répartition dans notre quotidien est relativement uniforme avec une légère prépondérance du polypropylène (Nguyen, 2018). Cette utilisation accrue du polypropylène s'explique par son utilisation dans la confection des emballages plastiques au même titre que polyéthylène à haute et basse densité.



Figure 3: Répartition des différents types de plastique dans le monde en 2015 (Nguyen, 2018)

1.7 Les biopolymères

Le terme biopolymère désigne les polymères synthétisés par les êtres vivants, les plus présents dans l'environnement étant la cellulose et le saccharide. Les rôles des polymères sont aussi nombreux que variés, allant de la signalisation cellulaire (saccharides) à la structure des cellules (polypeptides) (Kaplan, 1998). Plus récemment, le terme biopolymère a vu sa définition populaire modifiée pour s'associer à la propriété qu'ont certains de ceux-ci d'être biodégradable. Bien qu'inexacte au sens strict du terme, cette nouvelle définition a ouvert la porte à un nouveau monde de polymères spécialisé issus de la biomasse. Notamment, les bioplastiques ont attiré un intérêt grandissant dans le domaine des emballages comme potentielle réponse aux nouveaux enjeux éthiques et socio-économiques causés par l'usage de plastique d'origine fossile.

Les bioplastiques sont une famille de polyesters biosourcés s'accumulant dans les cellules de certains microorganismes comme stockage d'énergie. Leurs propriétés physico-chimiques sont semblables aux plastiques d'origine fossile au niveau de la résistance physique, chimique et leur faible poids (Luengo, 2003). La synthèse de ces bioplastiques par les cellules passent principalement par la β -oxydation de l'acetyl-CoA qui forme différents monomères qui seront par la suite condensés par l'action d'enzymes pour former le polymère (Figure 4). La famille de bioplastiques nous intéressant particulièrement dans le cas présent est celle des polyhydroxyalkanoates (PHA). Ceux-ci sont des polyesters biodégradables produit par certains microorganismes par un processus de fermentation. L'acetyl-CoA étant le principal précurseur de la voie de synthèse des PHA, il est normal d'également considérer les lipides, sucres et acides organiques comme étant également des précurseurs indirects de la production de PHA. En effet, le point final de la β -oxydation des lipides et de la dégradation des sucres et acides organiques est le cycle de Krebs dont le précurseur est également l'acétyl-CoA (Moussard, 2007).

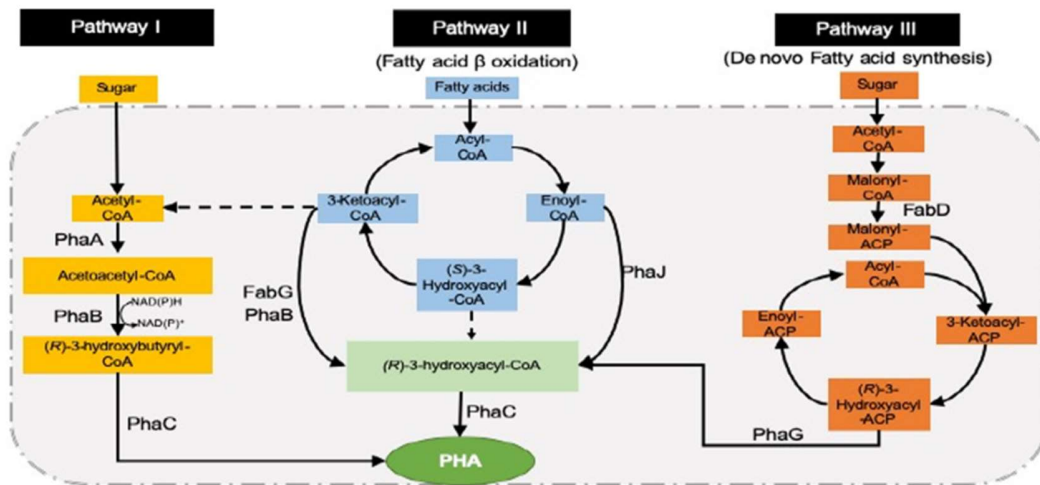


Figure 4: Les trois voies métaboliques principales des PHA (Khatami, 2020)

1.8 Problématique

La présente étude cherche à répondre à plusieurs enjeux de la société actuelle tel que la dépendance aux plastiques dans les emballages et la gestion des matières résiduelles agro-alimentaires. Le but de cette recherche est également de répondre à ces enjeux sans alourdir encore plus la complexité des chaînes d’approvisionnement des industries. Pour se faire, l’avenue de l’économie circulaire est privilégiée. Cependant, avec la notion d’économie circulaire vient également une notion de rentabilité.

La culture de microalgues à grande échelle implique également le besoin d’ajouter une grande quantité de nutriments ce qui s’avère souvent trop coûteux pour rentabiliser le procédé. De plus, afin d’accroître la teneur en polyhydroxyalkanoates dans la biomasse algale, il est nécessaire d’ajouter une source de carbone organique (Costa, 2019). Les PHA étant un polymère à base de carbone, il est logique qu’un apport en carbone supplémentaire soit requis afin d’en augmenter leur concentration. Par contre, ce type de substrat vient augmenter fortement les coûts de production déjà considérables. La clé de ce problème réside ainsi dans le choix du substrat afin de maximiser la production tout en minimisant les coûts.

Pour rappel, la problématique principale visée par ce projet est le coût de production non-concurrentiel des PHA. Afin de rendre ces biopolymères attractifs pour le marché, plusieurs études se sont penchées sur la possibilité d'utiliser diverses eaux usées contenant des sources de carbone organique comme des acides organiques (Mastropetros, 2022; Bagatella, 2022).

1.9 Projet dans lequel s'intègre cette étude

Les souches utilisées lors de ce projet ont été isolées à partir d'un consortium, le consortium *Vertech* (Figure 5). Ce consortium est issu d'un site de traitement et de gestion des eaux usées situé à Victoriaville. Il était alors constitué principalement de *Chlorella vulgaris* et de bactéries (Bélangier-Lépine, 2020).



Figure 5: Vue microscopique du consortium *Vertech* (Thibault, 2021)

Ce consortium a été utilisé dans le cadre du projet *Vertech I*, projet lancé en 2014 par la Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie (CRIEB) de l'UQTR, la Ville de Victoriaville et la compagnie Sani Marc. Ce projet porte sur la culture intensive du consortium de microalgues *Vertech* dans les eaux usées d'entreprise du parc industriel Fidèle-Édouard de Victoriaville afin de produire des molécules à valeur ajoutée (Figure 6). La finalité du projet était d'intégrer ses molécules d'intérêts aux produits de Sani Marc (Tangahu, 2020). Il peut s'avérer intéressant de remplacer certaines molécules de synthèse par des molécules biosourcés. Les deux avantages majeurs sont de réduire l'impact environnemental lié à la production de molécule de synthèse ainsi que d'augmenter la biodégradabilité du produit final (Krishna, 2019).



Figure 6: Schéma du projet Vertech I

Des expériences antérieures à cette présente étude, menées à l'UQTR par Bélanger-Lépine et al, ont démontré la possibilité de réduire la charge en métaux et nutriments des eaux usées en utilisant le consortium *Vertech* tout en produisant une biomasse algale riche en lipides, principalement en acides gras. Cette biomasse produite peut désormais constituer un intrant pour la production de biocarburants (Bélanger-Lépine, 2020). Cette preuve de procédé d'économie circulaire a constitué le premier volet du projet *Vertech*.

Le second volet du projet Vertech a vu le jour en 2018 après que l'équipe du CRIEB ait constaté une évolution dans la population du consortium. Celui-ci s'est séparé en 2 consortiums distincts, l'un dominé par les microalgues, l'autre par la cyanobactérie (Figure 7). Le premier volet se penchant plus sur le potentiel des microalgues au niveau de la production de biocarburants, le second se penche donc sur la possibilité de production de biomatériaux, notamment les bioplastiques. Ce nouveau volet a été rendu possible par la découverte de la cyanobactérie dominante du consortium et sa production de polyhydroxyalcanoates dans le cadre d'un projet de recherche de l'équipe de la Chaire de recherche municipale pour les villes durables (Tung, 2021). Une biomasse riche en PHA pourrait, en effet, être intégrée dans le thermoformage de produits d'emballage afin d'offrir une meilleure biodégradabilité aux emballages et contenants.

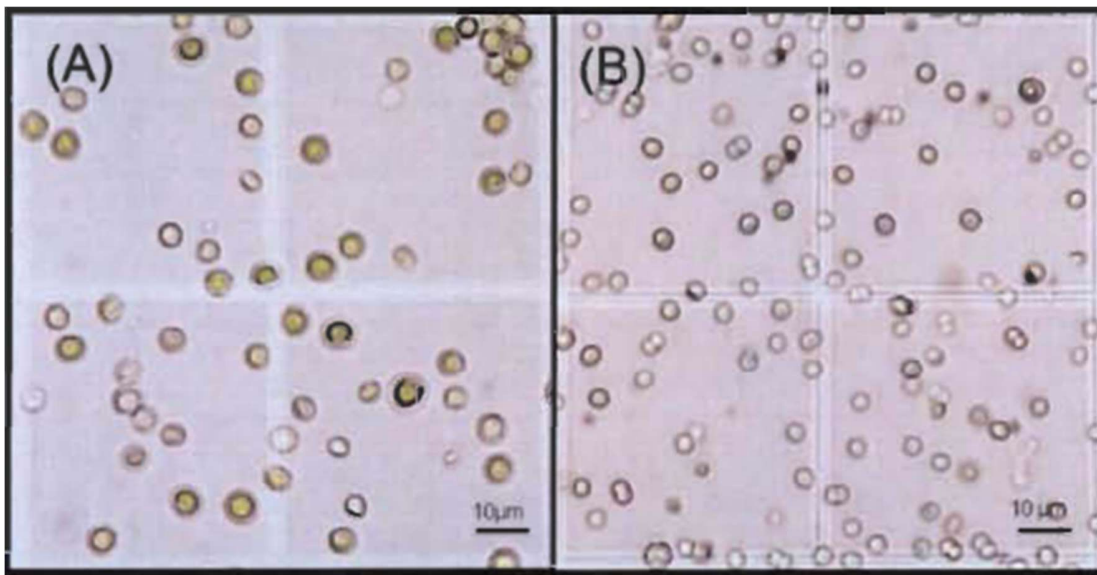


Figure 7: Microscopie des deux consortiums avec une dominance des microalgues (A) et une dominance des cyanobactéries (B).

1.10 Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est d'optimiser la production de biomasse algale d'une coculture de microalgues (*Chlorella vulgaris*) et de cyanobactéries dans un contexte d'économie circulaire pour son incorporation dans des produits thermoformés. Pour cela, la teneur en polyhydroxyalkanoates devra être optimisée et le potentiel de la coculture à produire en utilisant des résidus agro-alimentaires devra être évalué.

Les objectifs spécifiques du projet sont :

1. Établir une coculture optimale en fioles et en PBR à partir des souches isolées du consortium Vertech.
2. Déterminer le potentiel de différentes sources de carbone pour la production d'une biomasse algale riche en PHA.
3. Optimiser les paramètres de culture en PBR (agitation, aération, pH, etc.) afin de les adapter à la coculture.
4. Adapter une méthode de microscopie de fluorescence pour la détection rapide des PHA à la coculture.
5. Analyser la biomasse obtenue au niveau de sa teneur en PHA (gravimétrie et GC-MS).

Pour chaque objectif, une comparaison a été établie avec une condition contrôle sans traitement afin de déterminer l'impact de la modification des différents paramètres étudiés.

Pour répondre à l'objectif concernant les différentes sources de carbone organique, la coculture a été utilisée pour différentes cultures en fioles avec un volume de travail d'un litre. Pour les objectifs concernant la culture en photobioréacteur, la coculture a été entretenue en mode continu pour une période de 151 jours dans un PBR de Infors HT de 3,5L avec un volume de travail de 2,1L. Le suivi des cultures a été fait de façon régulière par la mesure de la biomasse sèche ainsi que par microscopie afin de détecter la présence

de contaminants. La teneur en PHA des différentes cultures a été tout d'abord constaté de manière qualitative par microscopie de fluorescence, puis de manière quantitative par gravimétrie. Les PHA ont ensuite été identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

Chapitre II

2. Production de bioplastiques par les microalgues : impact de la source de carbone

Le contenu de ce chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique qui sera prochainement soumis au journal *Algal Research* pour publication.

2.1 Résumé

Les polyhydroxyalkanoates (PHA) sont des biopolymères produits par de nombreux microorganismes et constituent une alternative prometteuse aux plastiques d'origine fossile. Les microalgues représentent une option intéressante dans cet optique. Afin d'optimiser la production de PHA par les microalgues, une série d'essais de culture utilisant comme substrat les précurseurs majeurs de la synthèse des PHA (acétate, malate, acide quinique, etc.) a été effectuée. Afin de réduire davantage les coûts de production, l'utilisation de résidus agro-alimentaires contenant les précurseurs a également été testée. Des analyses par gravimétrie et GC-MS ont par la suite permis de déterminer le meilleur rendement possible. Par ailleurs, une méthode de détection des PHA par microscopie de fluorescence a également pu être adaptée aux microalgues. À la suite de ces analyses, l'acétate a permis la meilleure production de PHA chez les substrats commerciaux avec $30,76\%(p/p) \pm 3,26\%(p/p)$. Cependant, les résidus agro-alimentaires ont permis d'obtenir le meilleur rendement avec une teneur de $32,05\%(p/p) \pm 0,87\%(p/p)$. Ces résultats ont permis de déterminer le substrat optimal pour la production de PHA, soit l'acétate. Cette étude aura permis d'obtenir une hausse de 2% de la teneur en PHA en utilisant les résidus plutôt que l'acétate commerciale, tout en réduisant les coûts de production. Ils ont également permis de déterminer une alternative aux substrats commerciaux en revalorisant des résidus agro-alimentaires. Cette étude se veut donc être une preuve de procédé dans le domaine de la production de biopolymères à faible coût.

Mots-clés : *Chlorella vulgaris*, polyhydroxyalkanoates, traitement des eaux usées, biopolymères, optimisation de procédé

2.2 Introduction

L'essor industriel de notre société a permis un usage sans cesse croissant de la matière plastique pour de nombreux biens de notre quotidien. Ce plastique provenant majoritairement du pétrole, il constitue une ressource limitée dont la disponibilité et le prix deviendront des enjeux importants dans un avenir proche. À ces enjeux s'ajoute l'accumulation des plastiques sous formes de déchets puisqu'ils ne sont pas biodégradables. Dans le but de pallier au besoin croissant d'alternatives au plastique d'origine fossile, diverses options basées sur des polymères biodégradables sont envisagées (Madison, 1999; Garcia, 1999; Nanda, 2022).

Les polyhydroxyalkanoates (PHA) sont un polymère biodégradable dont les propriétés comparables au polyéthylène en font une alternative intéressante aux plastiques fossiles. Les PHA sont synthétisés comme unité de stockage par de nombreux microorganismes ce qui rend envisageable leur culture et production à plus grande échelle (Tokiwa, 2004).

Parmi les microorganismes produisant des PHA, les microalgues se démarquent par leur capacité photosynthétique et leurs besoins en nutriments réduits en comparaison aux bactéries (Costa, 2018). Les microalgues parviennent à accumuler des PHA à l'aide du CO₂ atmosphérique. La souche *Chlorella vulgaris* a démontré un fort potentiel de production de PHA combiné à une capacité de phytoremédiation permettant d'envisager l'usage d'eaux usées comme substrat (Rocha, 2020).

La phytoremédiation par les microalgues possède un grand potentiel dans le traitement des eaux usées. En effet, les microalgues ont la capacité d'assimiler la charge organique

présente dans celles-ci afin de croître. Leur capacité à extraire et utiliser le CO₂ présente également un intérêt certain dans le traitement des eaux usées. Dans un contexte de production de molécules d'intérêt, la phytoremédiation sous-entend l'utilisation d'eaux usées comme substrat afin d'augmenter la production de PHA à faible coût. Cela a pour avantage d'offrir un substrat abordable en grande quantité pour la culture tout en répondant à la problématique du traitement des eaux usées (Wollmann, 2019).

À des fins de production à grande échelle, plusieurs enjeux sont à prendre en compte, notamment le rendement et le coût de production. Le premier dépend des conditions opérationnelles de la culture et des substrats utilisées, tandis que le second relève plutôt de la capacité du cultivateur à sécuriser un substrat à la fois de bonne qualité et abordable. De nombreuses études se sont déjà penchées sur le mode de culture optimal pour la production de PHA (Afreen, 2021). Parmi celles-ci, la culture en déficit d'azote en présence de substrat contenant du carbone organique semble stimuler au mieux le métabolisme de synthèse des PHA. Ce métabolisme étant connu dans sa majorité, ses précurseurs sont naturellement envisagés lors du choix de source de carbone, notamment le glucose, l'acétate et le malate (Afreen, 2021). Afin de répondre convenablement au second enjeu tout en assurant le rendement de la culture, le substrat choisi doit donc comporter une source de carbone faisant préférentiellement partie des précurseurs des PHA. Dans ce but, la phytoremédiation devient alors une solution puisqu'elle permet d'obtenir un substrat contenant des précurseurs, notamment chez les eaux usées agro-alimentaires riches en acides organiques, à faible coût. L'élimination des eaux usées étant souvent considéré comme un problème par les producteurs agricoles, un partenariat permettant de résoudre les enjeux des deux parties (producteurs agricoles et producteurs de bioplastiques) peut être envisagé.

À la vue des récents développements dans le domaine des bioplastiques, la présente étude s'est penchée sur l'optimisation de la production des PHA par les microalgues dans un système de photobioréacteur. La problématique se trouvant au niveau du coût en substrat, l'utilisation d'eaux usées devrait permettre une hausse du rendement en réduisant les coûts liés à la production. L'utilisation d'une eau usée provenant de l'industrie agro-alimentaire

(eau en provenance d'un producteur de fruits) contenant des acides organiques permettrait ainsi de prouver le potentiel de production de PHA dans un milieu compétitif ainsi que le potentiel de phytoremédiation des microalgues. Ainsi, cette étude portera sur l'effet de différentes sources de carbone sur la production de biomasse et sa teneur en PHA. En parallèle, la stabilité de la coculture dans un système de photobioréacteur pourra être évaluée. Une méthode de détection rapide des bioplastiques accumulés grâce à la microscopie de fluorescence sera également développée afin de faciliter la décision concernant le moment de la récolte de la biomasse. Afin d'atteindre ces trois objectifs, des cultures de microalgues en fioles ainsi qu'en photobioréacteur seront effectuées avec comme substrat l'acétate, le malate ainsi que des résidus agro-alimentaires. Cela permettra d'évaluer le potentiel des résidus de récolte. Des échantillons réguliers de biomasse seront analysés par microscopie de fluorescence avec une variation de différents paramètres afin d'optimiser la méthode et de l'adapter aux souches algales utilisées. Par la suite, la biomasse algale récoltée sera analysée par GC-MS afin de déterminer la teneur en PHA et le milieu sera analysé par HPLC pour évaluer la teneur en acides organiques restants.

2.3 Matériels et Méthodes

2.3.1 Souches étudiées

La coculture utilisée dans le cadre de cette étude est composée de la microalgue *Chlorella vulgaris* SMC-2M ainsi que d'une cyanobactérie de la famille des *Leptolyngbya* précédemment isolée du consortium VERTECH (Serrano-Blanco, 2023).

2.3.2 Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé dans la présente étude est le Bold Basal Medium (BBM) tel que décrit par l'Université du Texas (UTEX, 2019) (Annexe 1). Il s'agit d'un milieu de culture classique pour la culture de microalgues contenant les minéraux minimaux pour leur

croissance. Les résidus agricoles proviennent des rejets de la récolte des canneberges ayant été réduits en poudre, puis stérilisés.

2.3.3 Préparation de l'inoculum de coculture

Une culture de 500mL de chacune des deux espèces, *C. vulgaris* SMC-2M et la cyanobactérie d'espèce *Leptolyngbya* tel qu'identifié par Sergio Serrano Blanco, dans un milieu BBM ont été préparés et ont pu croître durant sept jours avec une photopériode de 12h. Une biomasse située entre 0,3g/L et 0,5 g/L a été considéré comme le minimum acceptable comme inoculum. La coculture a été formée en combinant 125mL de chacune des cultures précédentes ainsi que 250mL de milieu BBM frais, pour un volume final de 500mL. Cette coculture a par la suite été repiquée à un intervalle de 14 jours et a servi de base aux essais subséquents.

2.3.4 Culture en fioles

La production de microalgues a été effectuée en dupliqua en fioles de 2L contenant 1L de milieu BBM stérile. L'impact de différents acides organiques a été évalué par l'ajout de ces derniers à une concentration de 1g/L. Les différents acides testés sont l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide malique et l'acide quinique. L'impact des résidus de canneberges a été évalué au même titre que les acides organiques par l'ajout de 1g/L de résidus stérilisé à une culture en milieu BBM. Conformément à la littérature, l'ajout a été effectué suite à l'épuisement des nutriments du milieu BBM, soit après 7 jours de culture (Costa, 2018; Basak, 2011). La culture a ensuite été poursuivi pour une durée de 7 jours. La biomasse produite a ensuite été récoltée par centrifugation à 5000g pendant 5min, puis conservée à -20°C jusqu'aux analyses.

2.3.5 Culture en photobioréacteur

Pour la culture des microalgues, un photobioréacteur Luxfors (PBR) (Infors, Royaume-Uni) d'un volume de 3L a été utilisé tel que décrit par Cinq-Mars et al. (Cinq-Mars, M; 2022). L'alimentation du PBR a été assurée par une pompe péristaltique de modèle BT100-3J par Longer Pump. Les ajouts en milieu BBM frais étant fait à intervalles fixes, le débit de la pompe a été fixé à 30mL/min jusqu'à l'ajout d'un volume total de 500mL. L'alimentation en lumière a été effectuée par un système lumineux composé de néons à une intensité lumineuse de 84 μmol de photon/m²/s. La culture a été maintenue à une température de 23°C. La culture en photobioréacteur a été réalisée dans un volume de 2,5L sous les mêmes conditions expérimentales que la culture en fioles. Précédant la culture, une période d'adaptation variant de 3 à 4 jours a permis de stabiliser la concentration en biomasse du PBR afin d'assurer la reproductibilité du procédé. La biomasse récoltée a ensuite subi le même traitement que celle récoltée en fioles.

2.4 Analyses

2.4.1 Biomasse sèche produite

La biomasse a été récupérée par filtration sur filtre en fibre de verre (934-AH de Whatman) pré-pesé. Les filtres ont ensuite été séchés 24h à 40°C à l'étuve pour atteindre un poids constant, puis pesés de nouveau.

2.4.2 Extraction des PHA et gravimétrie

Les cellules ont été récoltées par centrifugation 10 000 x g pendant 10 min à 4°C et le culot a été récupéré et lyophilisé. Les cellules séchées ont été conservées à -20°C pour analyses futures. Chaque échantillon contenant 100 mg de cellules lyophilisées, 2 ml de chloroforme et 2 ml de méthanol acidifié (3% V/V H₂SO₄) a été digéré pendant 4 heures à 100°C. 1 ml d'eau distillée a été ajouté à chaque échantillon. L'échantillon a été décanté pendant 1 heure jusqu'à ce qu'une séparation de phase soit atteinte. La phase organique a été récupérée et 0,5 g de sulfate de sodium granulaire a été ajouté pour sécher les échantillons. Ils ont ensuite été filtrés sur filtre seringue en nylon 0,45 et le solvant a été évaporé sous hotte chimique pendant 48 heures. Le poids séché des échantillons a été noté pour calculer la concentration de PHA et les échantillons ont été stockés à -20°C pour l'analyse GC-MS.

2.4.3 Détection des polyhydroxyalkanoates par microscopie de fluorescence et optimisation

Les échantillons de culture sont prélevés à différents temps de la culture, puis traités selon le protocole développé par Elain et al (2015). Concrètement, les étapes du protocole consistent en l'ajout d'un agent de coloration, le Rouge de Nile, suivi d'une période d'incubation et d'une exposition à la fluorescence à 543nm permettant d'observer les molécules de PHA s'étant liées au colorant. La détection a été effectuée sur un microscope Axioscope A1 de Zeiss par le logiciel Zen de Zeiss Microscopy. La phase d'optimisation a consisté en la variation des différents paramètres du protocole (densité optique, concentration en colorant Rouge de Nile, la température d'incubation et le temps d'exposition à la fluorescence).

2.4.4 Dosage des polyhydroxyalkanoates (PHA)

L'analyse des polyhydroxyalkanoates (PHA) dans les cellules comprend trois étapes : la préparation de la biomasse séchée, l'extraction des PHA et la quantification au GC-MS. La méthode d'extraction consiste en une hydrolyse, puis une conversion des 3-hydroxyalkanoates en méthyl-ester en utilisant du méthanol acidifié en présence de solvants organiques. L'analyse au GC-MS est effectuée afin d'identifier et quantifier la composition des PHA en comparant les spectres de masse à la base de données NIST avec l'utilisation de standards externes. L'analyse GC-MS utilise un appareil Agilent 7820A équipé d'une colonne DB-WAX (polaire, 30m x 250 μ m x 0,25 μ m) couplé à un spectromètre de masse Agilent 5977E. 1 μ L d'échantillon est injecté en mode «splitless» avec une température augmentant de 10°C/min de 40°C à 250°C. L'intervalle de m/z est de 40-850 m/z.

2.5 Résultats

Afin d'optimiser la production de bioplastiques par les microalgues, deux facteurs principaux ont été évalués; la quantité de biomasse produite et sa teneur en polyhydroxyalkanoates (PHA). Ces facteurs indiquent la pertinence du procédé en termes d'efficacité de production biomasse et de qualité de cette même biomasse.

2.5.1 Potentiel de la coculture pour la production algale

Tout d'abord, la présence de synergies potentielles entre la microalgue et la cyanobactérie a été évalué au niveau de la production de biomasse. Des fioles de 1L avec un volume de travail de 500mL en milieu BBM ont été inoculé avec 10% (V/V) de préculture de culture pure ou coculture, puis maintenu en agitation à 150RPM durant 14 jours. À noter que la

Chlorella vulgaris provient dans les deux cas du même inoculum en part égale. De plus, la cyanobactérie possède une biomasse négligeable en comparaison avec la microalgue, soit moins de 1% de cette dernière. Ainsi, tel qu'illustré à la Figure 1, pour un même volume de travail, la production de biomasse a vu une augmentation de 80% en termes de rendement passant d'une productivité de 0.0127g/L/jr à 0.0229g/L/jr. Ce résultat se montre très révélateur de l'intérêt de la coculture dans la production algale et permet donc de poursuivre cette étude en se focalisant sur la coculture établie entre *C. vulgaris* et la cyanobactérie.

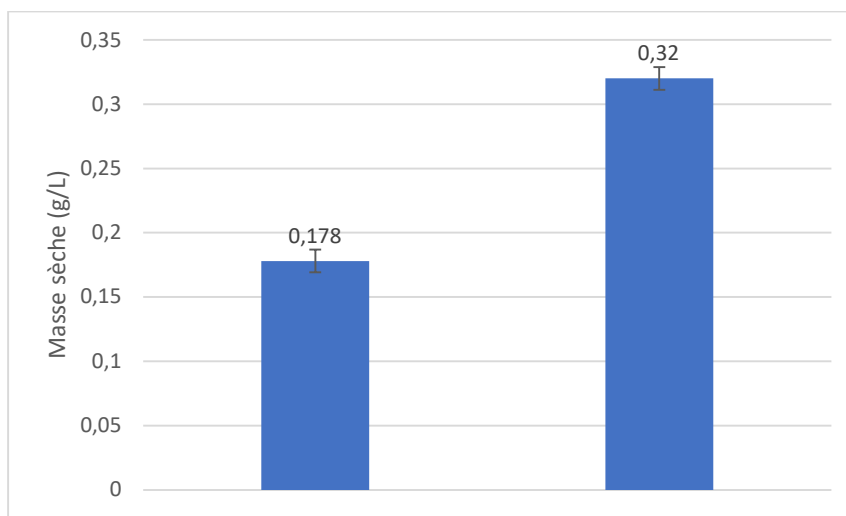


Figure 8: Production de biomasse de *C. vulgaris* en culture pure (gauche) vs la coculture *C. vulgaris* et cyanobactéries (droite).

2.5.2 Stabilité de la coculture en photobioréacteur

La stabilité de la coculture en photobioréacteur a été évaluée en effectuant le suivi sur une culture sur une durée de 5 mois avec ajout de milieu frais et soutirage de biomasse algale aux 14 jours. Les facteurs utilisés pour déterminer la stabilité sont principalement le pH et l'oxygène dissous. Le premier est un indicateur de la croissance algale, car l'accumulation de biomasse implique un déséquilibre au niveau du CO₂ qui augmente le pH. L'oxygène dissous indique quant à lui la production d'oxygène par photosynthèse ainsi que la

consommation d'oxygène par le métabolisme des microalgues. Une augmentation de ce dernier indique une présence majoritaire des *Chlorella*, puisque le métabolisme des cyanobactéries ne suffit plus à maintenir le niveau d'oxygène à un seuil bas. Ainsi, tel qu'illustré dans la Figure 2, la coculture a montré une augmentation graduelle de pH allant de 6,63 à T0 jusqu'à 9,13 à T151 au moment de l'arrêt. Les ajouts de milieu BBM frais ont permis de stabiliser sur une plus longue période le pH grâce à son pH plus bas (d'environ 6,7) et son tampon phosphate. Pour ce qui est de l'oxygène dissous, la Figure 3 permet d'observer la transition dans la composition de la culture vers une culture majoritaire de *Chlorella*. Encore une fois, il est possible de constater l'effet stabilisateur des ajouts périodiques de nutriments sur l'augmentation de l'oxygène dissous jusqu'au jour 151 durant lequel la saturation en O₂ a été atteinte et a mené à une chute drastique de la population du PBR.

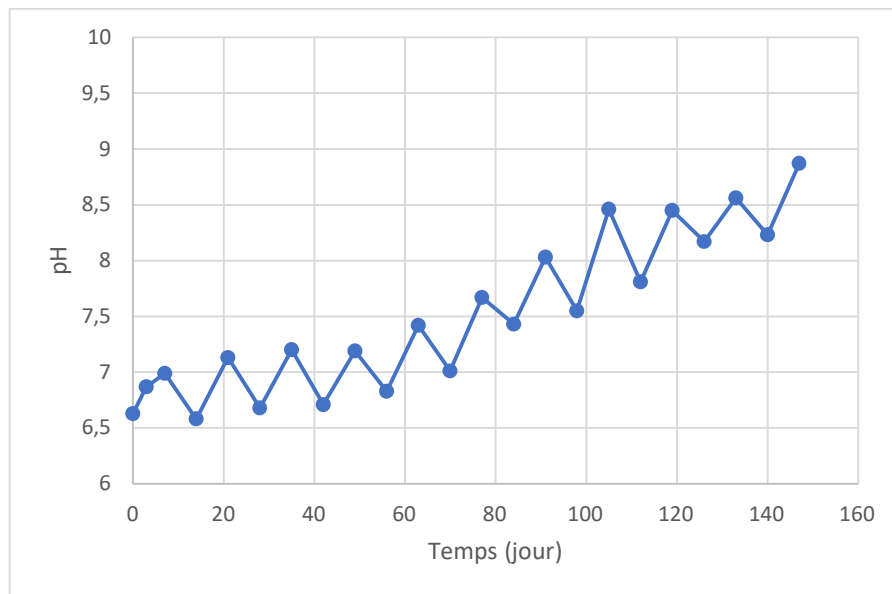


Figure 9: Suivi du pH d'une coculture de *C. vulgaris* et cyanobactéries durant cinq mois en PBR : Les mesures ayant été prises à temps fixes, on note une tendance d'augmentation du pH qui est plus saccadée dû à l'ajout de milieu frais à intervalles réguliers.

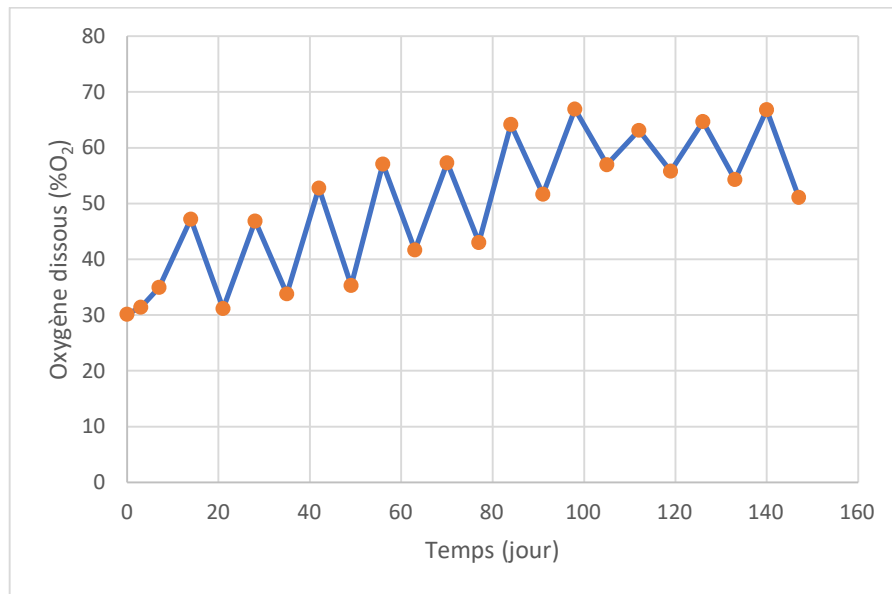


Figure 10: Suivi de l'oxygène dissous d'une coculture de *C. vulgaris* et cyanobactéries durant cinq mois en PBR.

2.5.3 Potentiel des différents substrats pour la production algale

En ce qui concerne la production de biomasse, les différents substrats utilisés ont permis de déterminer le potentiel des résidus agro-alimentaires en les comparant aux substrats commerciaux comme le malate et l'acétate. Une production semblable entre ceux-ci révèle le potentiel des résidus pour la production algale. Les différents traitements utilisés sur la biomasse et leur production respective sont rapportés dans la Figure 4. Le traitement à l'acide quinique (1g/L) a offert le meilleur rendement avec une production de $1,0131 \text{ g/L} \pm 0.002 \text{ g/L}$. Le traitement au citrate a été le moins productif à $0.4975 \text{ g/L} \pm 0.003 \text{ g/L}$. Il est également intéressant de relever la production de biomasse du traitement comportant des résidus qui a produit 0.9700 g/L . L'acide quinique se révèle surprenant puisqu'il s'agit d'un acide phénolique n'intervenant pas dans le métabolisme des PHA. Cela soulève donc la possibilité que l'acide quinique agisse comme promoteur de croissance chez les algues. L'acide quinique étant un facteur de stress en tant qu'acide phénolique, la croissance devrait s'en trouver amoindrie. Une précipitation de certains métabolites à pH élevé a été envisagée pour expliquer l'augmentation de la biomasse produite. Cependant, le lavage de

la biomasse au moment de la récolte devrait exclure cette possibilité. De plus, les résultats tendant à indiquer le contraire, il est possible que ce substrat puisse pousser la croissance algale tout en maintenant les conditions de stress nécessaires à l'accumulation de PHA. L'acide quinique étant la principale composante des résidus de canneberges utilisés, ces derniers constituent donc un substitut de choix aux substrats commerciaux. En effet, les coûts liés à l'acquisition de substrat constituent le principal frein à la production à grande échelle de molécules d'intérêts. Ainsi, acquérir des résidus à faible coût pouvant agir comme substrat alternatif pour la production de microalgues représente une possibilité à fort potentiel dans un contexte d'économie circulaire. Les résidus permettront de produire de la biomasse algale à forte teneur en PHA ayant ainsi de meilleures propriétés. Cette biomasse pourra ensuite être utilisée pour produire des emballages et contenants biodégradables pour les industries ayant généré les résidus.

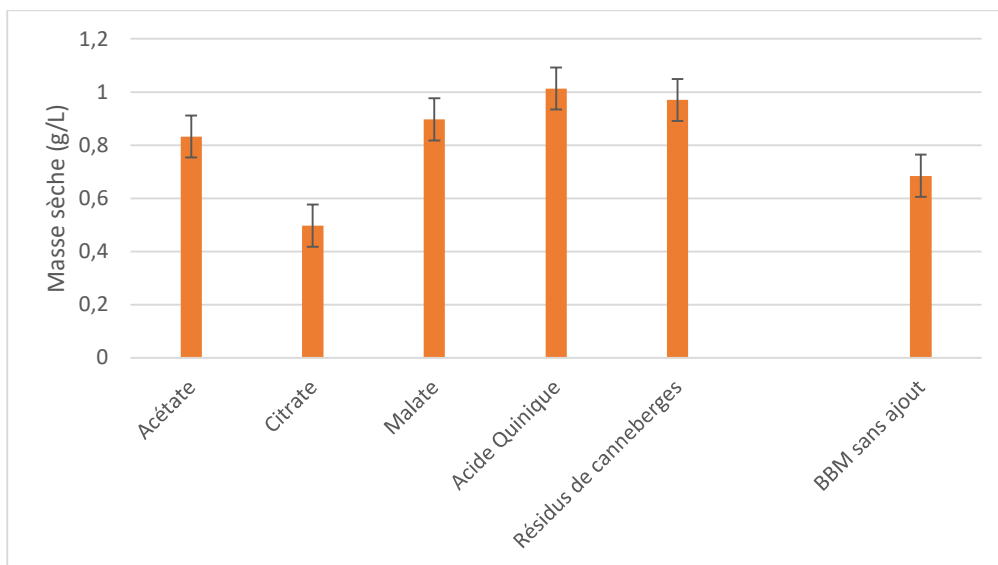


Figure 11: Biomasse produite en fonction du traitement.

2.5.4 Potentiel des différents substrats pour la production de bioplastiques

Après avoir déterminé le meilleur traitement au niveau de la quantité de biomasse, la qualité de celle-ci a été évaluée. Dans le cas nous concernant, la qualité se détermine par

sa teneur en bioplastiques (PHA). Les différents substrats utilisés ont permis de déterminer le potentiel des résidus agro-alimentaires pour la production de bioplastiques en les comparant aux substrats commerciaux comme le malate et l'acétate. La comparaison de leur teneur en PHA permet d'obtenir un aperçu de la capacité des résidus à égaler la production des substrats commerciaux. La concentration de PHA contenue par la biomasse après chacun des traitements est rapportée dans la Figure 5. La teneur la plus élevée a été celle du traitement comportant des résidus agro-alimentaires (résidus de canneberges) avec 31.38% (p/p) avec un écart de 1,31%(p/p). Pour ce qui est du traitement ayant offert des résultats moins efficaces, le citrate a produit une une quantité de biomasse n'ayant que 24,36%(p/p)±1.30%(p/p), ce qui demeure très près de la valeur contrôle (23.04%(p/p)±2.16%(p/p)). Ainsi, les microalgues démontrent une capacité de transformation des résidus agro-alimentaires équivalente à celle démontrée avec les substrats commerciaux.

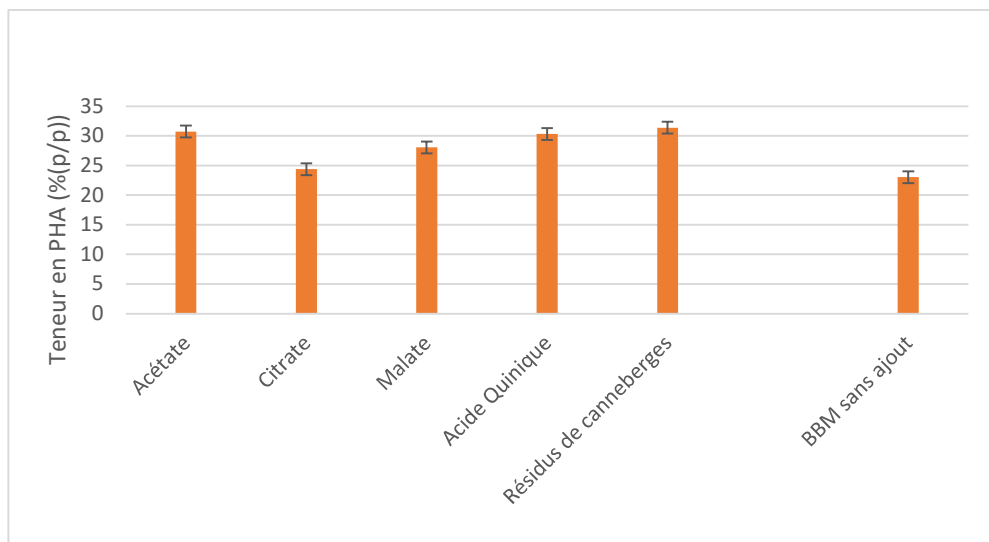


Figure 12: Teneur en PHA de la biomasse en fonction de la source de carbone.

2.6 Caractérisation des PHAs

2.6.1 Optimisation de la méthode de microscopie de fluorescence

L'optimisation des différents paramètres a permis de déterminer les valeurs optimales afin d'obtenir l'image la plus claire et définie possible pour les souches utilisées. Pour ce qui est des paramètres optimaux, il s'agit donc d'une photo prise à une densité optique de 0,4, avec une concentration en Rouge de Nile de 1 :10, avec une incubation à température ambiante et un temps d'exposition de 800ms (Figure 6). Afin d'alléger cette section, les images de fluorescence des paramètres non-optimaux se retrouvent dans l'Annexe.

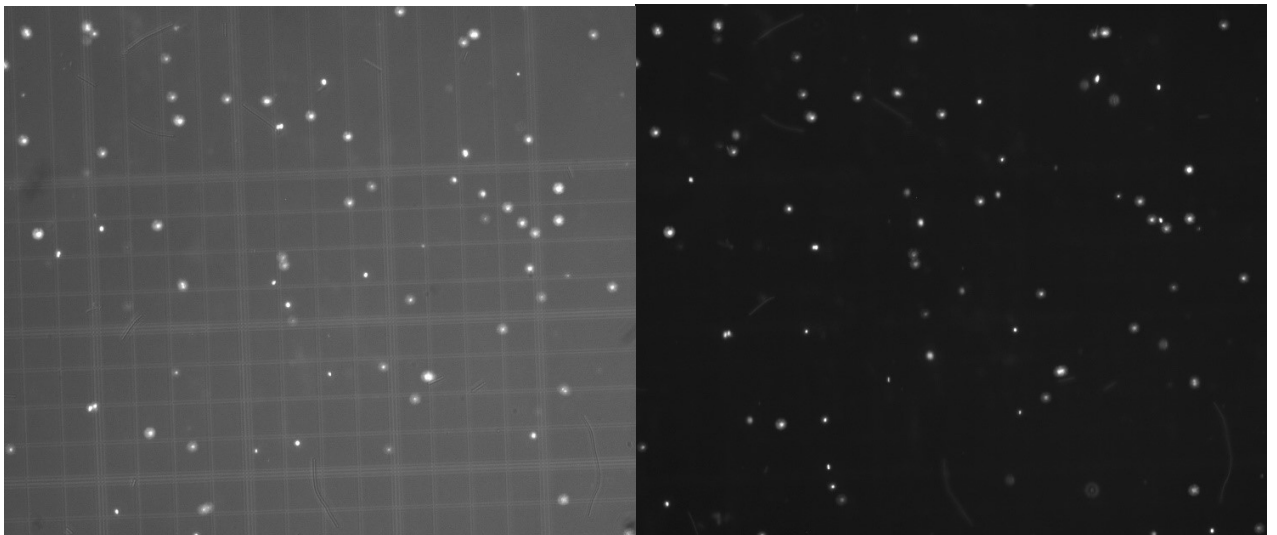


Figure 13: Image de fluorescence d'un échantillon algale aux paramètres optimaux avec (à gauche) un éclairage hybride et (à droite) un éclairage de fluorescence uniquement.

2.6.2 Analyses des PHA par GC-MS

Les chromatogrammes de gaz des composés d'intérêt de PHA (polyhydroxybutyrate (PHB) et polyhydroxyvalérate (PHV)) des extraits de biomasse microalgale du contrôle (culture en BBM) et ceux des traitements sont présentés dans la figure 15. Selon les

chromatogrammes de gaz des standards, le temps de rétention du PHB est de 9,6 min et celui de PHV est 10,7 min. On constate que les pics de PHB et PHV sont présentés dans les chromatogrammes de tous les extraits de biomasses. La quantification de PHB et PHV par rapport au PHA total des extraits de biomasses microalgales est présentée dans le Tableau 1. La teneur maximale en PHB a été obtenue grâce aux résidus avec 16%, suivi de l'acétate à 9%. Pour les PHV, l'acétate a permis d'obtenir une teneur de 52%, suivi des résidus à 44%. Ces résultats viennent donc confirmer la capacité des microalgues à utiliser ces sources de carbone, plus particulièrement les résidus, pour stocker de l'énergie sous forme de molécules d'intérêt, les PHA. Afin d'alléger cette section, les données supplémentaires hormis le spectre GC-MS seront présentés en Annexe.

Tableau 1 : Résumé de la quantification des PHA par GC-MS

Échantillons	Biomasse produite (g/L)	Concentration en PHA gravimétrie (%p/p)	Ratio PHV/PHA (%)	Ratio PHB/PHA (%)
Contrôle	0.6851	23	99	1
Acétate	0.8325	31	52	9
Résidus	0.9700	31	44	16
Malate	0.8971	27	58	2

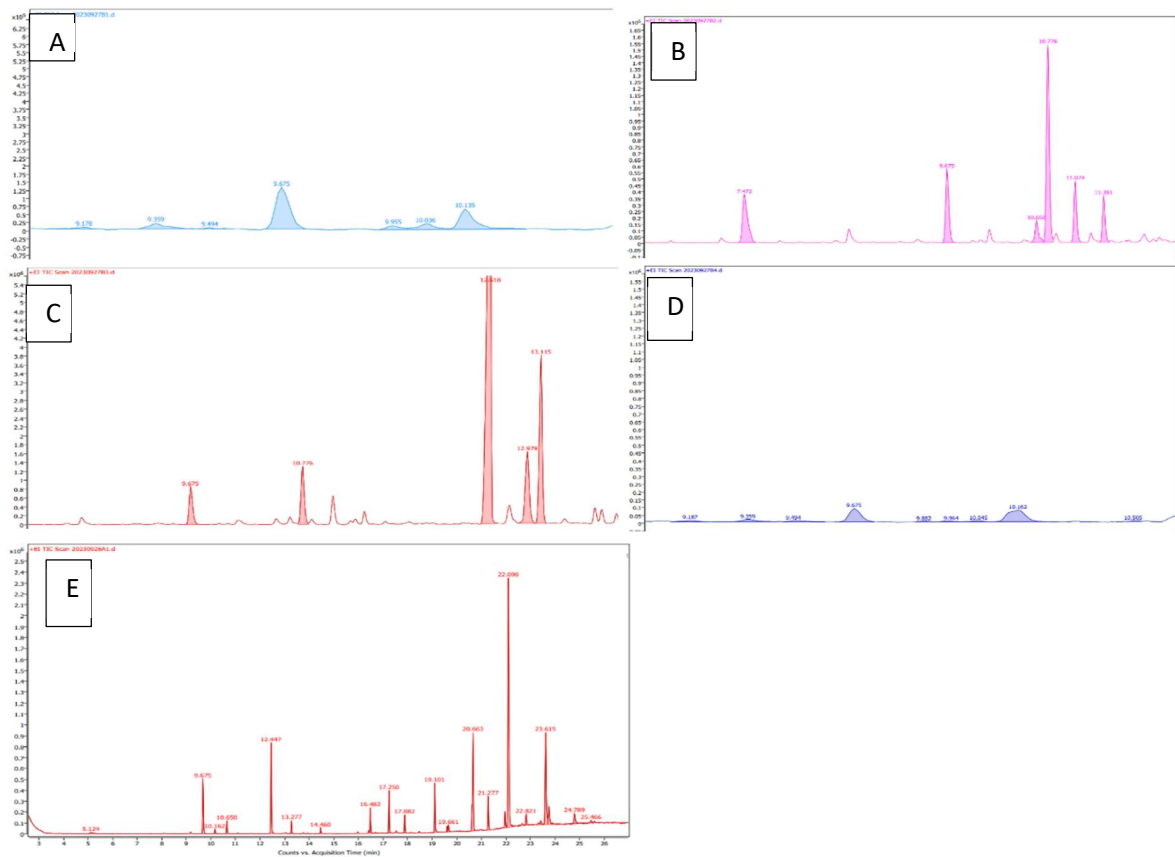


Figure 14: Chromatogrammes des échantillons traités avec du BBM (A), de l'acétate (B), des résidus de canneberges (C), du malate (D) et le standard de PHB/PHV (E).

2.7 Discussion

L'objectif de cette étude se divise en trois points principaux : augmenter la production en biomasse algale, augmenter la production en PHA et déterminer le potentiel des résidus agricoles en lien avec les deux premiers objectifs cités. Pour atteindre ces buts, des cultures de microalgues en présence de différents substrats ont été effectuées. Ces substrats sont divisés en substrats commerciaux (acétate, citrate, malate et acide quinique) et agro-alimentaire (résidus solides).

2.7.1 Le potentiel de croissance de la coculture

L'établissement d'une coculture durable entre la microalgue *Chlorella vulgaris* et la cyanobactérie a été un succès au niveau de la production de biomasse ainsi qu'au niveau de la stabilité du consortium ainsi formé. En effet, l'augmentation du rendement en biomasse de près de 80% par la coculture comparativement à la culture pure indique une forte synergie entre les deux espèces lorsque introduites dans le même système fermé (fioles ou PBR). Par ailleurs, la mise en culture prolongée sous un modèle de culture semi-continue (alimentation en nutriments et retrait de biomasse ponctuels) a permis d'évaluer la capacité des deux espèces à maintenir un équilibre dans un système fermé sur une période prolongée. La culture effectuée en PBR sur une période de 5 mois a permis de montrer la stabilité de celle-ci tout en permettant l'optimisation des paramètres de pH et d'aération. Cette coculture présente donc de nombreux avantages pour la production industrielle de molécules d'intérêts. Dans le cadre de la production de biomatériaux, la biomasse algale peut être utilisée entièrement, ce qui permet de réduire le coût des procédés de traitement. La qualité des biomatériaux dépendra donc directement de la qualité de la biomasse et sa teneur en PHA sans nécessiter d'extraction.

2.7.2 Le potentiel de croissance sur différents substrats

Les microalgues ont montré une hausse de production de la biomasse sous l'ensemble des traitements excepté le malate. Ce dernier a même montré une baisse de 28% comparativement à la condition contrôle. Cela peut potentiellement s'expliquer par le fait que le malate possède deux points isoélectriques distincts, dont le second se situe à 3,46, ce qui est fortement éloigné du pH idéal de la culture entre 6,5 et 8,5 pour les microalgues utilisés. Il est donc possible que le malate ne se retrouve pas sous une forme utilisable par les microalgues dans la culture. D'un autre côté, l'acide quinique est le substrat ayant l'impact le plus positif sur la croissance avec une hausse de 47% lorsque comparé à la condition contrôle. Cela constitue une avenue prometteuse pour de plus amples recherches,

car l'acide quinique est un des acides organiques les plus présents chez de nombreux fruits et autres produits agro-alimentaires dont les résidus peuvent potentiellement être récupérés. Du côté de la production de biomasse, l'acide quinique a démontré un potentiel intéressant comme promoteur de croissance chez *C. vulgaris*. De plus amples analyses pourraient permettre d'obtenir d'autres données encourageant l'usage de résidus agro-alimentaires comme substrat à faible coût.

2.7.3 Le potentiel de production de PHA de différents substrats

En ce qui concerne la production de bioplastiques, il est important de rappeler que les microalgues utilisent les PHA et les lipides comme unité de stockage d'énergie. Elles n'en accumulent donc qu'en conditions propices au stockage. Lors de cette étude, l'ensemble des substrats ont montré un potentiel d'accumulation des PHA. Les PHA accumulés ont été identifiés sous deux formes principales : le polyhydroxybutyrate (PHB) et le polyhydroxyvalérate (PHV). Il s'agit de deux copolymères intéressants pour leur propriétés biodégradables et compostables tout en offrant des propriétés barrières équivalentes aux plastiques tels que le polyéthylène et le polypropylène qui sont utilisés pour la majorité des emballages et contenants. La teneur de ces deux polymères combinés s'élève à 61% des PHA totaux pour l'acétate et 60% pour les résidus. Ce résultat vient confirmer la capacité de cette coculture à utiliser efficacement les résidus de canneberges comme substrat. Concernant les substrats utilisés pour leur production, le malate n'a pas démontré autant de potentiel que d'autres substrats, malgré le fait que le malate soit un précurseur dans la synthèse des PHA. Concernant le citrate, il constitue également un précurseur des PHA, cependant, de nombreuses souches de microalgues ne possèdent pas les transporteurs nécessaires à son utilisation. Cela peut potentiellement expliquer la faible accumulation de PHA obtenue. À l'opposé en termes de rendement, nous retrouvons l'acétate, un précurseur utilisé à maintes reprises dans la production de PHA (Bagatella, S, 2022; Troschl, C., 2017), ainsi que l'acide quinique et les deux substrats agro-alimentaires contenant également de l'acide quinique qui ont tous montré une augmentation de la teneur en PHA d'au moins 7% par rapport au contrôle. Si l'acétate n'a plus rien à prouver, l'acide quinique semble plutôt

être un invité inattendu sur le podium. En effet, elle n'apparaît aucunement comme un précurseur de PHA et sa structure possède même un cycle aromatique allant plutôt à l'encontre de la nature linéaire des polymères d'esters tels que les PHA. Une éventualité envisagée concernant l'acide quinique est que celle-ci agit comme facteur de stress puisqu'il s'agit d'un acide phénolique et que les microalgues accumulent les PHA comme stockage énergétique en période de stress. Ce résultat est d'autant plus intéressant que l'utilisation de résidus contenant de l'acide quinique a également permis d'obtenir une plus grande quantité de biomasse qui se trouve donc à avoir de meilleures propriétés grâce à sa teneur plus élevée en PHA. Cette étude ouvre donc la voie à de plus amples recherches sur les voies de synthèse des PHA et le fonctionnement des différentes enzymes de ces voies.

2.7.4 Le potentiel des substrats agro-alimentaires

Les microalgues sont parvenues à produire du bioplastique (PHA) en utilisant les divers substrats testés. La croissance ainsi que la production de PHA ont été particulièrement prometteuses en utilisant des substrats agro-alimentaires, surpassant même les substrats commerciaux. Ces résultats indiquent la possibilité de traiter les résidus agro-alimentaires, considérés comme des déchets, en utilisant des microalgues. Les principaux polluants des résidus sont des phosphates, ces derniers constituent une source de nutriments pour les microalgues qui peuvent donc assainir les résidus (Wollmann, F., 2019). Cela constitue un avantage non-négligeable au niveau de la production à grande échelle. En effet, le principal enjeu lors de la mise à l'échelle industrielle est de parvenir à sécuriser un intrant en quantité suffisante afin d'assurer le maintien de la production. Cet objectif est facilement atteint avec les microalgues de cette étude, car elles ont la possibilité d'utiliser des déchets d'autres industries. Cela implique donc qu'il y a un fort potentiel d'économie circulaire avec les industries agro-alimentaires afin de les débarrasser de leurs rejets tout en les revalorisant par la production de bioplastiques. Bien entendu, ces résultats ont également des failles évidentes qui devront faire l'objet de futures études. Les principales failles sont : la variation dans le contenu des résidus dans le temps et selon le lieu ainsi que la capacité des microalgues à maintenir leur dominance dans des milieux qui ne seront pas

nécessairement aussi stables comme les étangs aérés. Le premier obstacle peut être résolu par l'étude des microalgues dans différents lieux et différentes saisons afin d'établir une stratégie de production au cas par cas. Le second obstacle peut être réglé également par une phase d'adaptation dans des conditions favorisant les microalgues, puis une transition vers le milieu réel.

2.8 Conclusions

Ainsi, lors de ces essais, une coculture microalgues/cyanobactéries a pu être établie avec une synergie aisément détectable. Cette étude a également permis de montrer le fort potentiel des cocultures de microalgues pour la production de molécules d'intérêts comme les biopolymères. De plus, cet article a permis de mettre en lumière l'enjeu de la stabilité d'une telle coculture dans des systèmes complexes comme les photobioréacteurs tout en apportant des pistes de solutions potentielles. Cette étude se veut également une preuve de procédé avant-gardiste dans la production de bioplastiques dans un contexte d'économie circulaire. En effet, les résultats de cette étude démontrent la capacité des microalgues à utiliser efficacement des rejets agro-alimentaires afin de les revaloriser sous la forme de PHA.

2.9 Remerciements

Remerciements particuliers au réseau Veritech City, à la Ville de Victoriaville ainsi qu'à Innofibre pour leur soutien dans le cadre de cette étude.

2.10 Références

Afreen Rukhsar, Tyagi Shivani, Singh Gajendra Pratap, Singh Mamtesh, Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 2021,10.3389/fbioe.2021.624885

Bagatella, S.; Ciapponi, R.; Ficara, E.; Frison, N.; Turri, S. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates from Wastewater via Mixed Microbial Cultures and Microalgae. *Sustainability* **2022**, *14*, 3704. <https://doi.org/10.3390/su14063704>

Basak, B., Ince, O., Artan, N., Yagci, N., & Ince, B. K. (2011). Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34, 1007-1016.

Bélanger-Lépine, F., Tremblay, A., Huot, Y., Barnabé, S., 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), doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.099>

César Javier López Rocha, Estefanía Álvarez-Castillo, Mirna Rosa Estrada Yáñez, Carlos Bengoechea, Antonio Guerrero, María Teresa Orta Ledesma, Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater, *Journal of Environmental Management*, Volume 263, 2020, 110353, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110353>.

Cinq-Mars, M., Bourdeau, N., Marchand, P., Desgagné-Penix, I., & Barnabé, S. (2022). Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization. *Algal Research*, 62, 102628

Costa, S. S., Miranda, A. L., Andrade, B. B., de Jesus Assis, D., Souza, C. O., de Morais, M. G., ... & Druzian, J. I. (2018). Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *International journal of biological macromolecules*, 116, 552-562.

Elain, A., Le Fellic, M., Corre, Y.-M., Le Grand, A., Le Tilly, V., Audic, J.-L., & Bruzard, S. (2015). Rapid and qualitative fluorescence-based method for the assessment of PHA production in marine bacteria during batch culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(10), 1555-1563.

García B, Olivera ER, Minambres B, Fernandez-Valverde M, Canedo LM, Prieto MA, García JL, Martínez M, Luengo JM: Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. *J Biol Chem* 1999, 274:29228-29241

Madison LL, Huisman GW: Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999, 63:21-53

Nanda, S., Patra, B.R., Patel, R. et al. Innovations in applications and prospects of bioplastics and biopolymers: a review. *Environ Chem Lett* 20, 379–395 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01334-4>

Samantha Serra Costa, Andréa Lobo Miranda, Denilson de Jesus Assis, Carolina Oliveira Souza, Michele Greque de Morais, Jorge Alberto Vieira Costa, Janice Izabel Druzian, Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition, *Algal Research*, Volume 33, 2018, Pages 231-238, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.016>.

Sergio Serrano-Blanco; , Lauriane Thibault, Thi-Thanh-Ha Pham, Thanh-Tung Lai, Adam Harvey, Sharon Velasquez-Orta and Simon Barnabé. Isolation, identification and characterization of a biofilm-forming cyanobacteria for wastewater treatment and novel materials production. *Algal biomass, biofuels and bioproducts (AlgalBBB)*, June 12-14 2023, Hawaii

Tokiwa, Y., Calabria, B.P. Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters* 26, 1181–1189 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5>

Troschl, C.; Meixner, K.; Drosig, B. Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering* 2017, 4, 26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020026>

Wollmann, F, Dietze, S, Ackermann, J-U, et al. Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Eng Life Sci.* 2019; 19: 860– 871. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>,

Wollmann, F, Dietze, S, Ackermann, J-U, et al. Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Eng Life Sci.* 2019; 19: 860– 871. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>

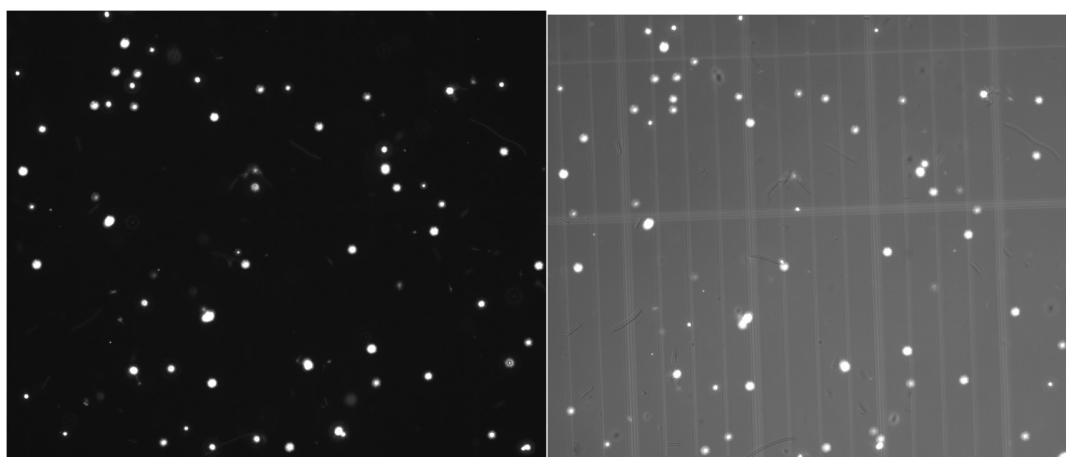
2.11 Annexe

Milieu de culture

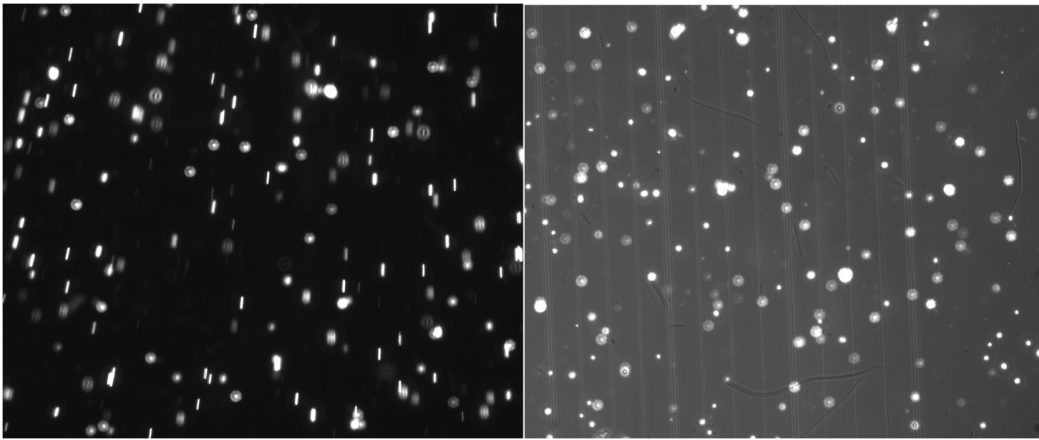
Chemicals/ Compounds	Concentration in stock solution ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	Amount in culture medium ($\text{ml} \cdot \text{l}^{-1}$)
NaNO_3	25.00	10.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.50	10.0
NaCl	2.50	10.0
K_2HPO_4	7.50	10.0
KH_2PO_4	17.50	10.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50	10.0
Trace element		1.0
a) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.82	-
b) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.44	-
c) MoO_3	0.71	-
d) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57	-
e) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.94	-
H_3BO_3	11.40	1.0
EDTA-KOH solution		1.0
a) EDTA Na_2	50.00	-
b) KOH	31.00	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98	
Conc. H_2SO_4	$1.0 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$	1.0

Microscopie de fluorescence

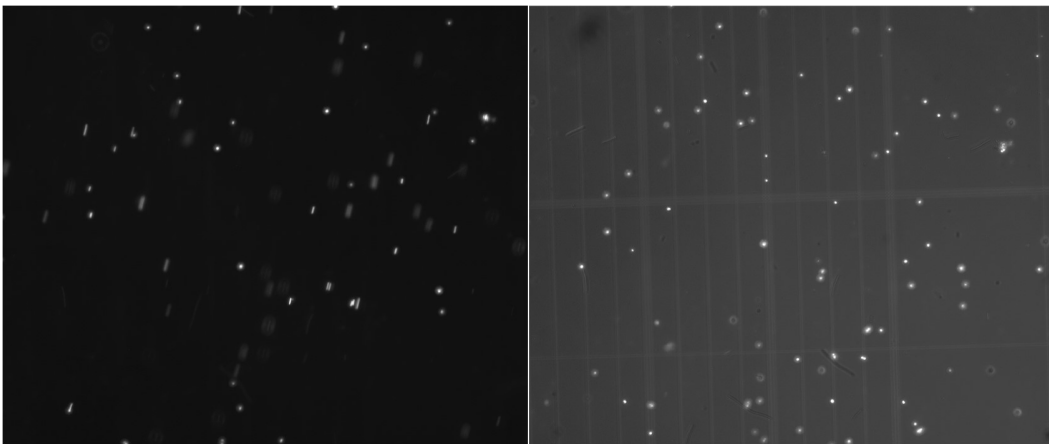
Densité optique 0.2



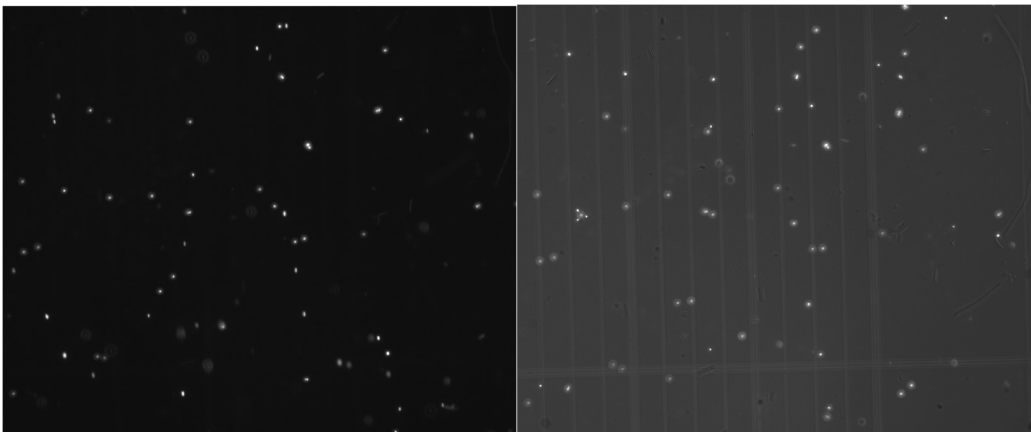
Densité Optique 0.6



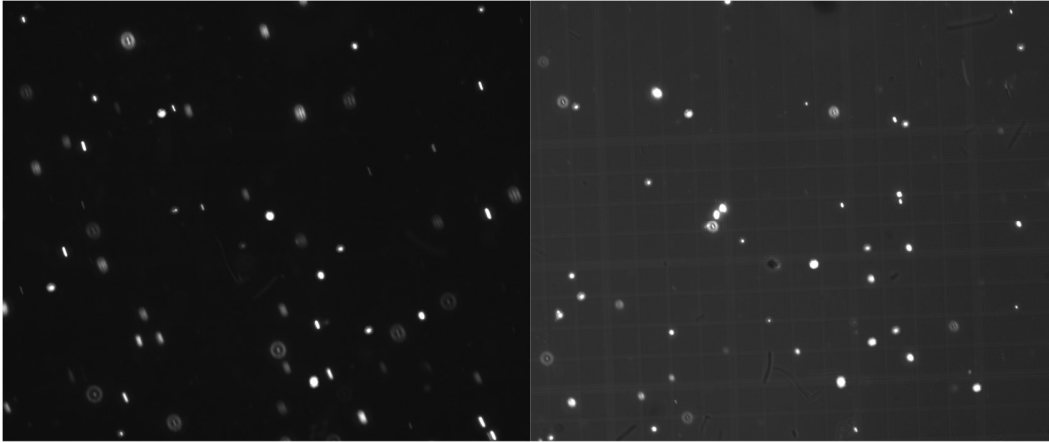
Concentration en Rouge de Nile 1:50



Concentration en Rouge de Nile 1:100



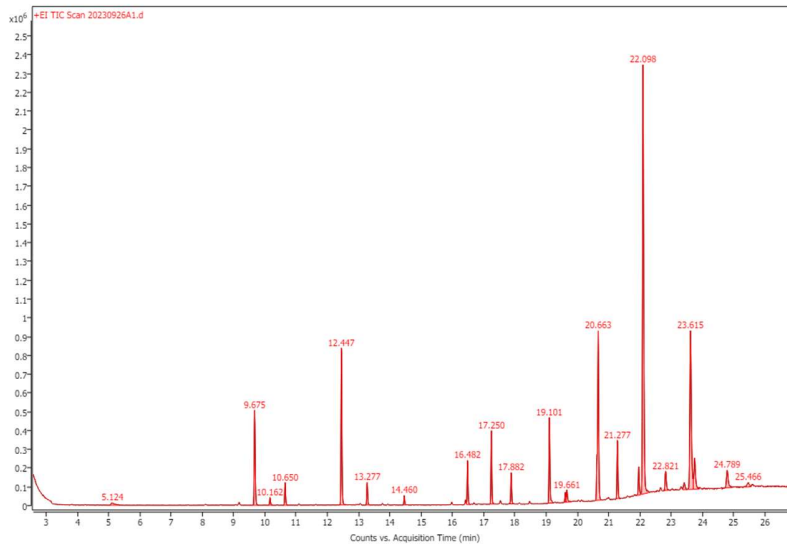
Température d'incubation 37°C



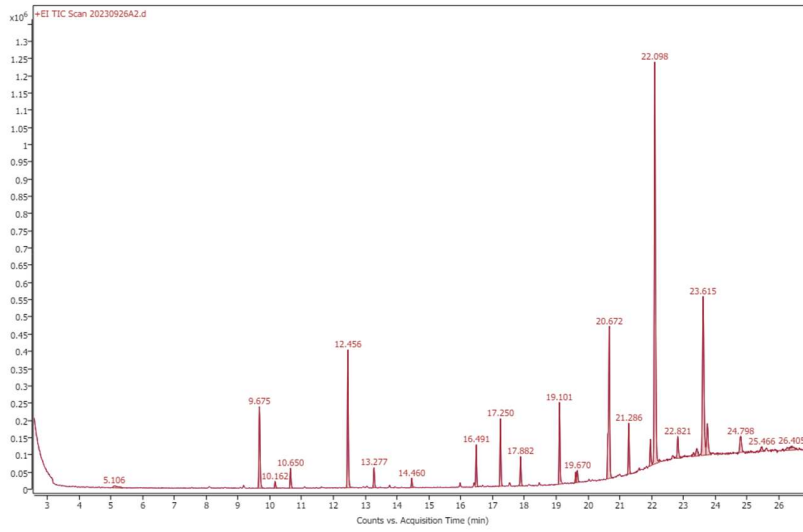
Spectre GC-MS/Identification des composés

Spectres GC-MS des standards PHB/PHV

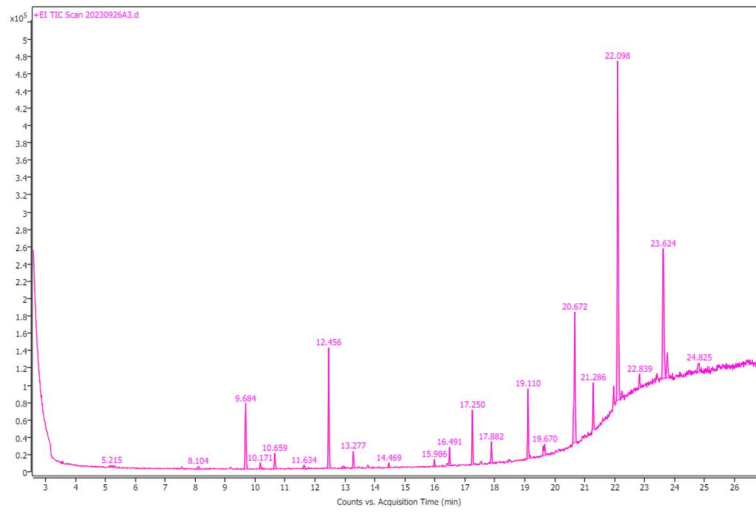
Concentration en standard : 12 500ppm



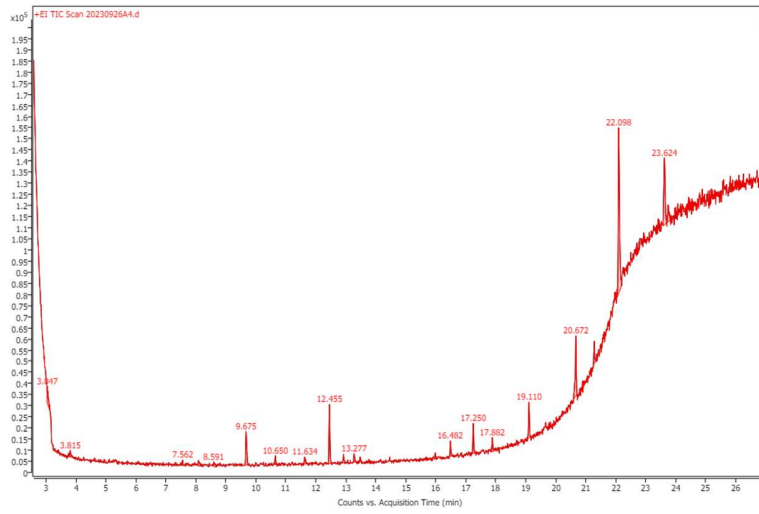
Concentration en standard : 6250ppm



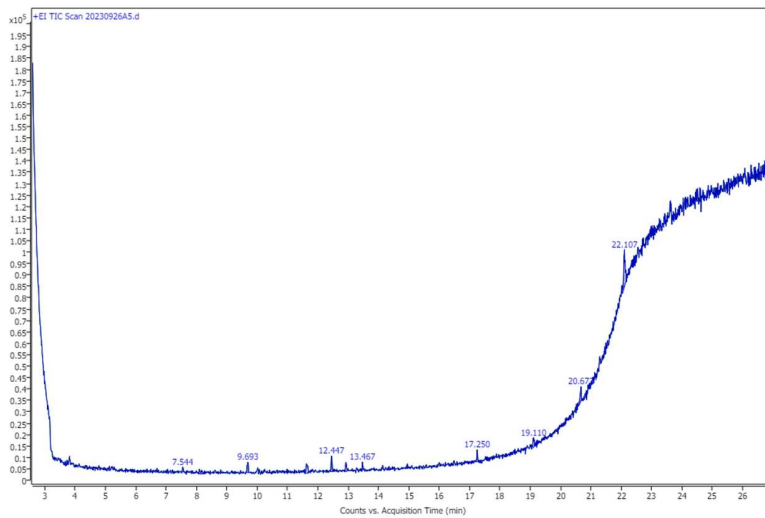
Concentration en standard : 3125ppm



Concentration en standard : 312.5ppm



Concentration en standard : 156.25ppm



Identification des composés

PHB

1	Best	ID Source	Name	Formula	Species	m/z	Score
2	VRAI	LibSearch	Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester, (S)-	C5H10O3			91,33

PHV

Best	ID Source	Name	Formula	Species	m/z	Diff (ppm)	CAS	Score	Score (Lib)	Score (DB)	Score (MFG)	Lib/DB
Yes	LibSearch	Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester	C6H10O3				624-45-3	96.13	96.13			NIST11.L

Chapitre III

3. Discussion

3.1 Retour sur la problématique et les résultats

Les microalgues constituent une solution prometteuse à plusieurs enjeux environnementaux de notre société actuelle. Leur capacité à transformer des résidus et émissions d'autres industries en nouveaux produits à valeur ajoutée, notamment les bioplastiques, en font des candidates idéales pour pourvoir au besoin croissant en emballages de l'industrie du transport de biens. Pourvoir à la demande grandissante en biomatériaux comporte cependant de nombreux défis. Pour être considéré comme une solution dans un milieu compétitif comme celui-ci, il faut non seulement être en mesure de prouver la viabilité d'un procédé, mais également sa rentabilité. C'est ici que l'utilisation des microalgues prend tout son sens, l'utilisation des résidus inutilisés de l'industrie agro-alimentaire permet, dans un premier temps, de régler un souci de gestion des matières résiduelles chez les producteurs, mais également de réduire fortement les coûts liés à la production des biomatériaux, et donc des emballages. Ainsi décrit, ce processus semble parfaitement adapté et prêt à la production. Cependant, l'optimisation des paramètres opérationnelles demeurent un frein majeur au développement de ce procédé.

Par ailleurs, l'utilisation de consortium ou de coculture dans la production de molécules d'intérêts demeure une méthode peu explorée. Les cocultures apportent comme principaux avantages une plus grande résistance aux contaminants extérieurs ainsi qu'une synergie rehaussant la production de biomasse. De plus, la morphologie et l'agencement inter-cellules de certaines espèces viennent fournir un avantage supplémentaire au moment de la récolte. En effet, la récolte de biomasse étant un processus long et parfois coûteux avec l'ajout d'agent de floculation (Gulab, 2018), les amalgames formés par des cyanobactéries filamenteuses facilitent grandement le processus. Malheureusement, peu d'études sur le comportement des cocultures dans un contexte de production se penchent sur des cocultures impliquant des cyanobactéries, leur préférant des cocultures

microalgues/bactéries (Tong, 2023). La présente étude aura donc permis d'apporter une lumière nouvelle sur un point important des cocultures. La coculture étudiée, *Chlorella vulgaris*/*Leptolyngbya*, a montré une synergie indéniable dans la production de biomasse, celle-ci dépassant la production de biomasse des cultures pures combinés. Ainsi, la coculture possède un avantage plus qu'additif au niveau du rendement en biomasse.

Ainsi, cette même coculture a été cultivé en milieu standard dans un volume de travail d'un litre en fioles agitées. Après sept jours de croissance, ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de la coculture, diverses sources de carbone organique ont été ajoutées aux cultures afin de déterminer celle offrant le meilleur rendement en termes de biomasse produite et de polyhydroxyalkanoates produits. Les traitements testés sont : l'acétate, le citrate, le malate, l'acide quinique et les résidus de canneberges. Au bout de 14 jours, la biomasse a été récoltée par centrifugation, puis lyophilisée pour analyses ultérieures. Cette méthode avait pour but de répondre aux objectifs 1 et 2 du présent projet, soit : établir une coculture optimale en fioles et en PBR à partir des souches isolées du consortium Vertech et déterminer le potentiel de différentes sources de carbone pour la production d'une biomasse algale riche en PHA.

Tout d'abord, l'acétate et le malate ont permis d'obtenir des rendements parmi les plus élevés en PHA, cela s'explique par leurs présences directes dans la voie métabolique de synthèse des PHA en tant que précurseurs principaux (Prieto, 2016). Cependant, Le citrate, un autre précurseur, n'a pas affiché le rendement escompté (24.36% (p/p)). Cela s'explique possiblement par l'absence de certains transporteurs du citrate chez les microalgues, les cellules n'aurait alors pas eu accès au substrat pour la synthèse. Pour ce qui est de l'acide quinique, il s'agit d'un acide phénolique n'entrant pas directement dans les voies métaboliques de synthèse des PHA connues. Son rendement inattendu peut s'expliquer de deux façons selon notre compréhension du processus. Premièrement, il est possible que l'acide quinique agisse en tant que facteur de stress. En effet, la production de PHA s'amorce chez les microalgues comme stockage de l'énergie en période de stress, ce stress étant traditionnellement un déficit en azote dans le milieu dans la littérature. La seconde

possibilité se base sur le fait que la recherche sur les PHA n'a pas encore permis d'élucider l'entière des voies de synthèse possibles et certains mécanismes demeurent encore méconnus. L'acide quinique peut donc potentiellement constituer un précurseur à l'une de ces voies. Concernant les résidus de canneberges, celui-ci est riche en acides organiques comme l'acide malique et l'acide quinique qui constitue deux sources de carbones ayant montré une capacité de production de PHA indéniable au cours de cette étude. Son rendement (31,38% (p/p)) s'explique donc par sa teneur en carbone organique élevée. Ce rendement permet donc d'établir la preuve de la possibilité d'utiliser les résidus de culture maraîchères dans la culture de microalgues ainsi que dans la production de molécules à haute valeur ajoutée comme les PHA. Cette étude se veut donc être une première dans la valorisation des résidus de récolte agricole dans le domaine des microalgues.

En parallèle, une coculture composée de la microalgue *Chlorella vulgaris* et de la cyanobactérie isolée du consortium Vertech de l'espèce *Leptolyngbya* a été étudiée. La coculture a été cultivée pendant 151 jours en photobioréacteur en milieu standard en mode continu avec ajout de milieu de culture frais et soutirage de biomasse à des intervalles de 14 jours. La période de culture de 151 jours s'est terminée par l'arrêt du PBR et la récolte de la biomasse pour analyses ultérieures. Cette méthode avait pour but de répondre au troisième objectif du présent projet, soit l'optimisation des différents paramètres de culture en PBR (agitation, aération, pH et intensité lumineuse). Cet objectif a donc pu être atteint par le suivi des différents paramètres durant la culture ainsi que leur ajustement au cours de la période de cinq mois qu'a duré l'expérience. Cette étude a permis de soulever de nombreux points concernant le maintien d'une coculture en semi-continu. Tout d'abord, un effet synergique supplémentaire entre la microalgue et la cyanobactérie a été soulevé par cette étude. En effet, la cyanobactérie a semblé avoir de la difficulté à être cultivée seule sans support dans le milieu, préférant croître sur chaque paroi disponible. Cependant, avec l'ajout de la microalgue, des amalgames microalgue/cyanobactérie ont été visibles au microscope, soulevant l'hypothèse que ces amas ont permis d'offrir un support pour la croissance à la cyanobactérie. Outre cela, l'augmentation inéluctable du pH dans une culture de *Chlorella vulgaris* a pu être contrée par les ajouts de nutriments, le milieu BBM

ayant un pH légèrement acide, permettant ainsi de réguler le milieu de culture durant la croissance. Cette étude a également permis de constater l'absence d'une dominance nette entre les deux espèces dans la coculture sur du moyen à long terme. En effet, la légère surreprésentation de la microalgue comparativement à la cyanobactérie s'est maintenue sur la période de 5 mois sans modifications notables au niveau de la population du photobioréacteur.

Les analyses sur la biomasse visaient quant à eux à répondre au quatrième et cinquième objectif soit l'optimisation d'un protocole de détection des PHA par microscopie de fluorescence et la détermination de la teneur en PHA de la biomasse ainsi que le profil des différents PHA produits. Pour se faire, une évaluation des différents paramètres nécessaires a été effectuée et ceux-ci ont par la suite été comparés afin d'obtenir l'image la plus claire et distincte possible des cellules contenant les PHA. Les paramètres étudiés comprenaient : le temps d'exposition, le temps d'incubation des échantillons, la température d'incubation, la concentration en agent de coloration et la concentration de la coculture. Ainsi, l'optimisation du protocole de détection des PHA a permis d'obtenir des images avec une définition satisfaisante des cellules contenant des PHA. La méthode se voulant qualitative plutôt que quantitative et souhaitant permettre une évaluation rapide et visuelle de la présence des PHA ainsi que de la proportion des cellules contenant des PHA, une méthode classique ainsi qu'une méthode hybride ont été évaluées. La méthode classique permet d'obtenir une image claire et fait clairement ressortir les cellules en surbrillance contenant les PHA. La méthode hybride, quant à elle, vient faire intervenir la lumière visible afin de partiellement éclairer la lame de microscope. Cette méthode permet de voir les cellules n'étant pas illuminés par la fluorescence tout en permettant de voir les cellules ayant réagi à celle-ci. En combinant ces deux méthodes, il est donc possible d'évaluer un pourcentage approximatif des cellules contenant des PHA en plus de simplement détecter leur présence. Cela constitue un avantage indéniable lorsque vient le moment de décider de la récolte de la biomasse ou de la poursuite de la culture. Ce protocole se veut donc être une méthode pouvant indiquer beaucoup plus rapidement qu'une analyse gravimétrique la présence des PHA.

La teneur en PHA a, quant à elle, été mesurée par gravimétrie grâce à une extraction par solvants. Cette extraction constitue un point-clé des analyses, car elle permet d'obtenir les échantillons nécessaires pour l'ensemble des analyses subséquentes, soit la gravimétrie et la chromatographie en phase gazeuse. Les étapes du protocole ont donc dû être contrôlé et adapté à la souche afin d'assurer une extraction des PHA présents. Une étape de lyophilisation de la biomasse a donc été utilisé avant l'extraction afin d'éviter la présence d'eau dans les futures analyses. Puis, les échantillons ont subi l'extraction parallèlement à des standards de PHA afin de confirmer la réussite de l'extraction. Suite à ces étapes, les analyses ont pu être effectuées. Pour ce qui est du profil des PHA, la caractérisation des différents PHA présents dans la biomasse a été effectuée par GC-MS. Cela a permis d'identifier le type de PHA produit par la coculture en comparant les spectres obtenus avec ceux de standards de PHA ayant subi le même traitement d'extraction. La méthode utilisée, le GC-MS, offre des identifications possibles pour chaque pic de détection apparaissant sur le chromatogramme. Ces pics pouvant représenter différentes molécules possibles, l'identification proposée ici ne représente qu'une identification probable tenant compte de la similarité avec le standard ainsi que de la littérature concernant la biomasse algale. Avec ces faits à l'esprit, les échantillons sont composés d'esters de longueur différentes suggérant la présence de PHA, plus spécifiquement le polyhydroxybutyrate (PHB) avec un score de 93,59. Le PHB est un polymère d'ester comportant un groupement méthyle en position trois. Outre les polymères d'esters allant d'un à quatre carbonés, une forte teneur en longue chaînes carbonés est visible dans le chromatogramme. Cela s'explique par la présence dans les échantillons de débris de la paroi cellulaire des microalgues ayant été extrait avec les PHA.

3.2 Limites et perspectives

Il est important de noter que, comme dans toute recherche scientifique, la présente étude comporte des limites théoriques et méthodologiques. Afin de souligner et structurer celles-

ci, les limites seront relevées selon chacun des objectifs. Cette étape d'auto-critique est considérée comme importante afin d'aiguiller les futurs travaux sur le sujet.

Tout d'abord, les limites concernant l'établissement d'une coculture débutent par le fait que l'ensemble des essais a porté sur une coculture précise provenant du consortium Vertech. Ainsi, d'autres cocultures d'espèces différentes peuvent potentiellement offrir des résultats et rendements différents. Un impact notamment sur la dominance d'une espèce sur l'autre est envisageable dans la coculture.

Les limites concernant le second objectif sur l'impact de la source de carbone sur la biomasse sont nombreuses. La première limite concerne le nombre limité de source de carbone testée. Certaines sources de carbone ayant un potentiel comme précurseurs, notamment certains acides organiques, n'ont pas été testées et pourraient faire l'objet de futurs travaux. Ces substrats ont été mis à l'écart pour la présente étude par manque de ressources en termes de temps et de main-d'œuvre, cette étude se concentrant sur un axe de recherche autour des substrats contenus dans les résidus agro-alimentaires. Outre cela, les conditions de culture lors des essais ne permettent pas d'obtenir un suivi de l'utilisation des nutriments de manière certaine. En effet, l'ajout de la source de carbone se faisait après sept jours, soit la fin de la phase exponentielle de la culture. Cela étant fait dans le but de provoquer l'état de stress nécessaire à la production de polyhydroxyalkanoates par le manque de nutriments, dans ce cas-ci l'azote, un suivi du niveau des nutriments serait à envisager. Cependant, aucun suivi de ce type n'a été effectué et par souci d'efficacité, un suivi des phases de croissance de la coculture a été considéré comme un indice suffisant de l'absence de nutriments.

Concernant les limitations sur le volet de culture en photobioréacteur, la reproductibilité demeure un enjeu-clé à garder en tête. En effet, les paramètres utilisés lors de la culture en continu sont adaptés à ce mélange précis de souche, soit notre coculture. Il ne peut être affirmé hors de tout doutes qu'une coculture utilisant des souches différentes, bien que

conservant le même principe de cohabitation microalgue/cyanobactérie, offrira des rendements similaires ou qu'elle se comportera de manière identique. Par ailleurs, la culture en PBR tel que décrite dans cette étude se veut être une démarche exploratoire sur le comportement de cette coculture lors d'une culture à long terme. Ainsi, les variations de pH induite par la croissance et l'ajout de nutriments ne devraient pas être considérer comme une méthode utilisable pour une culture industrielle, cette dernière nécessitant un contrôle des paramètres beaucoup plus strict pour assurer la qualité du produit final. Cette étude apporte cependant son lot de réponses. Tout d'abord, la coculture peut subir de nombreuses altérations de son pH ou son niveau d'oxygène dissous sans voir sa composition en termes d'espèces changer. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour la culture en bassin ouvert, car les paramètres y sont plus difficilement contrôlables.

Concernant l'optimisation du protocole de détection des polyhydroxyalcanoates par microscopie de fluorescence, les limitations proviennent de plusieurs aspects différents : les réactifs utilisés, l'espèce étudiée ainsi que l'utilisateur du protocole. Tout d'abord, le réactif permettant la fluorescence dans cette méthode est le colorant Rouge de Nile. Ce dernier vient établir une liaison avec les PHA des cellules permettant ainsi de percevoir un signal lorsque soumis à la fluorescence. Il vient cependant également se lier avec une certaine affinité aux lipides présents. Une culture produisant beaucoup de lipides ou une espèce ayant tendance à en accumuler parallèlement aux PHA verrait donc ses résultats et le contenu de ses photos être faussés par l'usage de ce colorant. Les cyanobactéries utilisées lors de cette étude ne produisant pas ou en quantité négligeable des lipides, cette méthode demeure cependant adaptée au cadre de cette étude. Cela nous amène donc au second point à prendre en compte pour l'usage de ce protocole, l'espèce étudiée. Tel qu'énoncé précédemment, les espèces produisant des lipides peuvent venir fausser les résultats. Outre cela, certaines espèces peuvent potentiellement posséder une paroi ne permettant pas la diffusion du colorant. Une fluorescence de la paroi des cellules serait donc un signe de la nécessité d'évaluer ce protocole avec l'espèce précise et de possiblement l'adapter. Concernant les limites liées à l'utilisateur, il ne s'agit pas ici de jeter la pierre à l'expérimentateur, mais plutôt de relever les étapes critiques pouvant amener des soucis de

reproductibilité. Tout d'abord, le réactif utilisé étant fortement photosensible, il est très important de conserver le mélange des cellules contenant le Rouge de Nile à l'abri de la lumière jusqu'au moment de le soumettre à la fluorescence. L'étape offrant donc une grande variabilité dans la reproductibilité des essais est la vitesse et la précision d'exécution lors du transfert du mélange entre le tube opaque et la lame du microscope de fluorescence. Une variation lors de cette étape a une forte incidence sur la qualité de l'image obtenue par la suite. Par ailleurs, les micro-ajustements inévitables au niveau de l'intensité de fluorescence et le positionnement de la lame afin d'ajuster la clarté de l'image sont également une étape-clé nécessitant une rapidité d'exécution. En effet, la durée de la fluorescence du Rouge de Nile étant limitée, il est nécessaire d'effectuer les ajustements de manière efficace et cela fait entrer en ligne de compte l'expérience et la dextérité de l'expérimentateur avec l'appareil. Malgré ses nombreuses limitations, cette méthode offre un moyen simple, rapide et efficace de déterminer la présence de PHA dans les échantillons sans recourir à une extraction fastidieuse des molécules du polymère. Cette méthode comprend également un moyen de déterminer approximativement le pourcentage des cellules contenant des PHA. Il pourrait donc s'agir d'un indicateur rapide dans le milieu industriel permettant de déterminer le moment de l'arrêt d'une fermentation dans un contexte de production en culture de molécules d'intérêts. Avec le développement du domaine de la bio-informatique, il est également envisageable de coupler cette méthode avec un logiciel de traitement d'image. Cela aurait comme principal avantage de permettre de déterminer le pourcentage précis de l'image étant illuminé et donc le pourcentage de cellules contenant des PHA.

Les limitations concernant les analyses de la biomasse se situent principalement sur deux volets : la validité des étapes préparatoires et la justesse des méthodes de caractérisation. La validité au niveau de l'extraction des PHA par des solvants organiques dépend des solvants utilisés et de leur affinité pour la molécule d'intérêt. Une extraction par solvant possède un niveau de spécificité limité à des catégories de molécules. Par exemple, il est possible d'extraire les lipides des cellules, mais il n'est pas possible de les séparer spécifiquement par extraction. Le degré d'affinité des molécules pour le solvant influe

également sur la qualité de l'extraction. Il est possible que l'extraction ne s'effectue que partiellement, ce qui apporterait un biais lors des calculs subséquents. Concernant les méthodes de caractérisation, il existe une limite importante à la méthode utilisée, soit le GC-MS. En effet, il n'y a aucune certitude au niveau de l'identification des molécules composants l'échantillon, il n'y a que des identifications potentielles de la composition de l'échantillon selon les pics du chromatogramme. De plus, chaque pic de détection du chromatogramme peut correspondre à différentes molécules selon un degré de concordance plus ou moins grand. Il revient donc à l'esprit critique de l'expérimentateur de déterminer la composition de l'échantillon selon sa provenance et la littérature. Il est donc important de préciser que la méthode n'est pas infaillible et ne fait que proposer une identification probable des molécules, surtout lorsque la littérature concernant les échantillons est limitée.

3.3 Conclusions

Ce travail se veut être une preuve de procédé sur le potentiel des cocultures microalgues/cyanobactéries dans la production de bioplastiques dans un contexte d'économie circulaire. La présente étude a permis d'évaluer les synergies existantes entre les souches de microalgues et cyanobactéries utilisées et de montrer une augmentation de la biomasse produite par la coculture comparativement aux cultures pures. De plus, la présente étude a permis de déterminer le potentiel de différentes sources de carbone d'agir à titre de substrat pour la production de PHA. Ainsi, l'acétate a prouvé son efficacité en tant que précurseur tel que confirmé par la littérature. Cependant, l'acide quinique s'est révélé être un substrat prometteur avec une efficacité semblable à l'acétate. L'intérêt pour ce substrat provient de sa présence en grande quantité dans les résidus agro-alimentaires notamment les résidus provenant de récoltes maraîchères. Ces résidus ont offert une production en termes de biomasse algale produite et de PHA produits égale à l'acétate tout en constituant une solution économique aux additifs commerciaux. Malgré ces résultats encourageants pour le domaine de la bioéconomie, de plus amples études sont à envisager concernant la culture à grande échelle de cocultures et consortiums avant de parvenir à une commercialisation des bioplastiques d'origine algale.

Références

Ali Chamas, Hyunjin Moon, Jiajia Zheng, Yang Qiu, Tarnuma Tabassum, Jun Hee Jang, Mahdi Abu-Omar, Susannah L. Scott, and Sangwon Suh, Degradation Rates of Plastics in the Environment, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2020 8 (9), 3494-3511
DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b06635

Andersen R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*, 1(4), 267–292.

Angelis, S., Novak, A.C., Sydney, E.B. et al. Co-Culture of Microalgae, Cyanobacteria, and Macromycetes for Exopolysaccharides Production: Process Preliminary Optimization and Partial Characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 1092–1106 (2012).
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9642-7>

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) 1013-102

B.V. Tangahu, P.A. Hutabarat, T.F. Aabidah, The ability test of Microalgae consortia *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* in removing cadmium (II)

Bagatella S, Ciapponi R, Ficara E, Frison N, Turri S. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates from Wastewater via Mixed Microbial Cultures and Microalgae. *Sustainability*. 2022; 14(6):3704. <https://doi.org/10.3390/su14063704>

Bayu Afnovandra Perdana, Zulkarnain Chaidir, Arif Juliari Kusnanda, Abdi Dharma, Indra Junaidi Zakaria, Syafrizayanti, Asep Bayu, Masteria Yunovilsa Putra, Omega-3 fatty acids of microalgae as a food supplement: A review of exogenous factors for production enhancement, *Algal Research*, Volume 60, 2021, 102542, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102542>.

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

Benner, P., Meier, L., Pfeffer, A. et al. Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and scalability. *Bioprocess Biosyst Eng* 45, 791–813 (2022).
<https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1>

Blackford, Marie & fuchs, julie & Rienth, Markus & Dienes-Nagy, Agnes & Cléroux, Marilyn & spring, jean-laurent & Bourdin, Gilles & Lorenzini, Fabrice. (2019). Evolution des acides dans les baies et dans les moûts au cours des derniers millésimes. 51. 290-299.

- Chen, C.-Y., et al., Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, 2013. 145: p. 307-312.
- Chun-Yen Chen, Kuei-Ling Yeh, Rifka Aisyah, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang, Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 1, 2011, Pages 71-81, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
- Correa, L, et al. Deep learning for microalgae classification. in 2017 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA). 2017. IEEE.
- Costa, S. S., Miranda, A. L., de Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099
- de Morais, M.G., et al., Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*, 2015. 2015.
- F.G. Acién, J.M. Fernández, J.J. Magán, E. Molina, Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it, *Biotechnology Advances*, Volume 30, Issue 6, 2012, Pages 1344-1353, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>.
- Garza-Rodríguez Z. B., Jesús Hernández-Pérez, Arlette Santacruz, Daniel A. Jacobo-Velázquez, Jorge Benavides, Prospective on the application of abiotic stresses to enhance the industrial production of exopolysaccharides from microalgae, *Current Research in Biotechnology*, Volume 4, 2022, Pages 439-444, ISSN 2590-2628, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.09.007>.
- Gulab Singh, S.K. Patidar, Microalgae harvesting techniques: A review, *Journal of Environmental Management*, Volume 217, 2018, Pages 499-508, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
- Gustavsson, Jenny & Cederberg, Christel & Sonesson, Ulf. (2011). *Global Food Losses and Food Waste*. Save Food at Interpack Düsseldorf, Germany.
- Halder, P. and A. Azad, Recent trends and challenges of algal biofuel conversion technologies, in *Advanced Biofuels*. 2019, Elsevier. p. 167-179.
- Hongli Zheng, Fengru Ge, Kunyan Song, Zixiang Yang, Jinneng Li, Feng Yan, Xiaodan Wu, Qi Zhang, Yuhuan Liu, Roger Ruan, Docosahexaenoic acid production of the marine microalga *Isochrysis galbana* cultivated on renewable substrates from food processing waste under CO₂ enrichment, *Science of The Total Environment*, Volume 848, 2022, 157654, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157654>.
- Jay Kumar, Divya Singh, Madhu B. Tyagi, Ashok Kumar, Chapter 16 - Cyanobacteria: Applications in Biotechnology, Editor(s): A.K. Mishra, D.N. Tiwari, A.N. Rai,

Cyanobacteria, Academic Press, 2019, Pages 327-346, ISBN 9780128146675, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7>.

Kaplan, D.L. (1998). Introduction to Biopolymers from Renewable Resources. In: Kaplan, D.L. (eds) Biopolymers from Renewable Resources. Macromolecular Systems — Materials Approach. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8_1

Kim, S.-K., Handbook of marine microalgae: biotechnology advances. 2015: Academic Press.

Lakhan Kumar, Raksha Anand, Maulin P Shah, Navneeta Bharadvaja, Microalgae biodiesel: A sustainable source of energy, unit operations, technological challenges, and solutions, Journal of Hazardous Materials Advances, Volume 8, 2022, 100145, ISSN 2772-4166, <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100145>.

Langlois, V. et al., identification et quantification des phytohormones dans les macroalgues de l'est du Canada. UQAR, 2021

Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. Current Opinion in Microbiology, 6(3), 251–260. doi:10.1016/s1369-5274(03)00040-7

Matt Carter, Jennifer Shieh, in Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition), 2015

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

Moussard, C.M., 2007, Biochimie structurale et métabolique (3e édition, Volume 1), DeBoeck

N. Abdel-Raouf, A AI-Homaidan, I. Ibraheem, Microalgae and wastewater treatment, Saudi journal of biological sciences, 19 (2012) 257-275.

Nef, C., Métabolisme et interactions bactériennes en lien avec la vitamine B12 chez la microalgue haptophyte *Tisochrysis lutea*, 2019, Université de Nantes

Nguyen, H., The quest for high glass transition temperature bioplastics 2018, Journal of Materials Chemistry, DOI: 10.1039/c8ta00377g

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

Prieto, A., Escapa, I. F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., ... & Revelles, O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. Environmental microbiology, 18(2), 341-357.

- Rayen F, Behnam T, Dominique P. Optimization of a raceway pond system for wastewater treatment: a review. *Crit Rev Biotechnol.* 2019 May;39(3):422-435. doi: 10.1080/07388551.2019.1571007
- 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.
- Savvas Giannis Mastropetros, Konstantinos Pispas, Dimitris Zagklis, Sameh S. Ali, Michael Kornaros, Biopolymers production from microalgae and cyanobacteria cultivated in wastewater: Recent advances, *Biotechnology Advances*, Volume 60, 2022, 107999, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107999>.
- Tong C.Y., Kohsuke Honda, C.J.C. Derek, A review on microalgal-bacterial co-culture: The multifaceted role of beneficial bacteria towards enhancement of microalgal metabolite production, *Environmental Research*, Volume 228, 2023, 115872, ISSN 0013-9351, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115872>.
- Yung-Bum Seo, Youn-Woo Lee, Chun-Han Lee, Hack-Chul You, Red algae and their use in papermaking, *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 7, 2010, Pages 2549-2553, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.088>.
- 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
- Soni, RA., K. Sudhakar, and R Rana, *Spirulina- From growth to nutritional product: A review.* *Trends in Food Science & Technology*, 2017
- Sureshkumar, Pandian & Thomas, Jibu & Kumar, Suresh. (2020). Exploring the distinctiveness of biomass and biomolecules from limnic microalgae of unexplored waters of Noyyal River, Western Ghats, for exploitation. *Environmental Science and Pollution Research.* 27. 10.1007/s11356-020-08921-y.
- Tung, L.T., Pham, H.T., Bourdeau, N., Barnabé, S. (2021). Nestlé-UQTR project I: Feasibility study of microalgae production in Nestlé wastewaters and microalgae-PHA bacteria coculture. Final technical report NESTLE01, 4 pages.
- Ümit Ağbulut, Ranjna Sirohi, Eric Lichtfouse, Wei-Hsin Chen, Christophe Len, Pau Loke Show, Anh Tuan Le, Xuan Phuong Nguyen, Anh Tuan Hoang, Microalgae bio-oil production by pyrolysis and hydrothermal liquefaction: Mechanism and characteristics, *Bioresource Technology*, Volume 376, 2023, 128860, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128860>.
- Wang, R., Tian, Y., Xue, S., Zhang, D., Zhang, Q., Wu, X., Kong, D. and Cong, W. (2016), Enhanced microalgal biomass and lipid production via co-culture of *Scenedesmus obliquus* and *Candida tropicalis* in an autotrophic system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 91: 1387-1396. <https://doi.org/10.1002/jctb.4735>

Wang, S., & Zeng, Y. (2018). Ammonia emission mitigation in food waste composting: A review. *Bioresource Technology*, 248, 13–19. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.050

Warburg O. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biochemische Zeitschrift*. 1919;100:308–322

Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., & Xu, K. (2016). Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. *Chemical Engineering Journal*, 299, 332-341.

Chaofan Zhang, Shih-Hsin Ho, Anran Li, Liang Fu, Dandan Zhou, Co-culture of *Chlorella* and *Scenedesmus* could enhance total lipid production under bacteria quorum sensing molecule stress, *Journal of Water Process Engineering*, Volume 39, 2021, 101739, ISSN 2214-7144, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101739>.

Zhuang, L. L., Li, M., & Ngo, H. H. (2020). Non-suspended microalgae cultivation for wastewater refinery and biomass production. *Bioresource technology*, 308, 123320.