UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'AMIDON D'UN CONSORTIUM INDIGÈNE DE MICROALGUES ET BACTÉRIES : INFLUENCE DES PARAMÈTRES PHOTOSYNTHÉTIQUES ET DE LA LIMITATION EN NUTRIMENT

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA

MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

LAURIANE THIBAULT

JUIN 2026

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.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Direction de recherche :

Simon Barnabé	
Prénom et nom	directeur de recherche

Nathalie Bourdeau	
Prénom et nom	codirectrice de recherche

Jury d'évaluation

Simon Barnabé	Directeur de recherche
Prénom et nom	Fonction du membre de jury

Fatima Awwad	Examinatrice interne
Prénom et nom	Fonction du membre de jury

Mélanie Trudel	Examinatrice externe
Prénom et nom	Fonction du membre de jury

REMERCIEMENTS

D’abord, ce projet n’aurait pas été possible sans l’appui financier de la municipalité de Victoriaville (Chaire de recherche municipale pour les villes durables) et MITACS (IT31600).

Je souhaite ensuite remercier mes merveilleux collègues de laboratoire pour leur soutien moral, leurs précieux conseils et la belle ambiance de travail qu’ils ont su créer au quotidien : Vicky Alain, Sabrina Grenier, Maxime Bellemare, Philippe Dorion, Annabelle St-Pierre, Rosemarie Morin, Alexandre Tessier, Jade-Amélie Genest, Aurélie Geroffroy, Marc-Antoine Cimon, Florence Giroux et Younès Bareha (Université du Québec à Trois-Rivières et Innofibre). Merci à Philippe Dorion et Vicky Alain pour leur soutien technique tout au long du projet. Une mention spéciale à Marguerite Cinq-Mars, qui m’a formée au laboratoire avec patience et bienveillance, et m’a transmis bien plus que des compétences techniques. Sa passion pour les microalgues, ses nombreuses implications et sa générosité m’ont profondément inspirée.

Un énorme merci à ma codirectrice, Nathalie Bourdeau, pour sa proactivité, ses conseils judicieux et son écoute tout au long de ce projet. Je remercie également mon directeur, Simon Barnabé, pour toutes les opportunités et les nombreuses « side quests » qui ont marqué mon parcours, et qui m’ont, entre autres, permis de prendre l’avion pour la toute première fois! Ces expériences ont été incroyablement enrichissantes, tant sur le plan personnel que professionnel.

Une mention spéciale va également à Claudia Nault, ma fidèle amie en sciences de l’environnement, pour son soutien, ses encouragements et toutes nos séances de travail dans des cafés.

Enfin, je souhaite remercier ma famille, qui m’a toujours soutenue et encouragée à poursuivre mes études. Une pensée toute particulière va à mon papa, qui n’a malheureusement pas pu rester jusqu’à la fin de cette aventure.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire a été réalisé dans le cadre de la maîtrise en sciences de l'environnent sous la supervision de Simon Barnabé, professeur dans le Département de chimie, biochimie et physique à l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), et de Nathalie Bourdeau, responsable de la recherche chez Innofibre et professeur associée à l'UQTR. Le projet de recherche a été réalisé dans le cadre du projet MITACS *VERTECH II : Culture de microalgues dans des eaux usées et incorporation à une pâte cellulosique destinée à la fabrication de produits thermoformés,* en partenariat avec la municipalité de Victoriaville (Chaire de recherche municipale pour les villes durables). Le travail présenté dans ce mémoire porte sur l'optimisation de la production d'amidon par un consortium de microalgues-bactéries en vue de son intégration dans les emballages papetiers.

Ce mémoire se divise en 3 chapitres : une introduction générale du projet, suivi d'un article scientifique en anglais présentant les résultats clés du projet, et se termine par une conclusion des différents résultats ainsi qu'une discussion générale.

RÉSUMÉ

La demande pour les emballages en carton a fortement augmenté au cours des dernières années, et une partie de leur production repose sur l'amidon. Actuellement, cet amidon provient majoritairement de cultures terrestres telles que le maïs, dont l'utilisation à des fins non alimentaires suscite diverses préoccupations quant à sa durabilité. La recherche de sources alternatives et durables d'amidon devient donc essentielle. Dans ce contexte, les consortiums microalgues-bactéries constituent une piste prometteuse : les microalgues sont déjà reconnues pour leur capacité à produire et accumuler de grandes quantités d'amidon, et un consortium microalgues-bactéries pourrait offrir de multiples avantages industriels, notamment en termes de productivité, de robustesse et de valorisation de résidus.

Le présent mémoire expose l'évaluation du potentiel de production d'amidon du consortium indigène VERTECH et de ses conditions optimales de culture. Pour ce faire, une stratégie expérimentale en deux étapes a été mise en place : la première favorise la croissance de la biomasse, et la seconde induit l'accumulation d'amidon par des conditions de stress contrôlées. Les travaux se sont concentrés sur l'étape d'induction de l'amidon.

D'abord, les paramètres de la photosynthèse ont été étudiés grâce à un plan composite centré à trois facteurs, soit l'intensité lumineuse, la photopériode et la concentration en CO_2, chacun à trois niveaux. Le modèle obtenu suggère qu'une optimisation supplémentaire est nécessaire, mais que 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 24 h de lumière continue et 10 % de CO_2 permettent d'augmenter significativement la concentration d'amidon du consortium. Ensuite, la limitation des macronutriments a été testée, révélant que la limitation en azote est la plus efficace, permettant d'atteindre des concentrations d'amidon atteignant près de 30 % de la biomasse sèche du consortium. Enfin, l'ajout d'eaux usées industrielles (5–10 % d'eaux provenant d'une usine de produits chimiques) a été exploré dans le but d'augmenter la durabilité et la viabilité économique du procédé. Cette approche n'a pas permis d'améliorer la production d'amidon dans le contexte testé, mais elle reste prometteuse et mérite des investigations supplémentaires.

Ces résultats montrent que le consortium VERTECH peut accumuler de l'amidon de manière significative, même sans optimisation complète, et confirment son potentiel pour une production d'amidon durable. Bien que plusieurs défis subsistent avant de mettre en œuvre une production industrielle, par exemple la validation de la qualité d'amidon obtenu, le développement de procédés de purification et la mise à l'échelle du procédé, cette étude suggère que poursuivre l'investigation est pertinent et que le consortium VERTECH pourrait constituer une solution intéressante pour répondre aux besoins industriels tout en réduisant l'empreinte environnementale.

Mots-clés : Microalgues, Consortium de microalgues-bactéries, Amidon, Photopériode, Intensité lumineuse, Injection de CO_2, Limitation en azote, Eaux usées industrielles

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **III**
AVANT-PROPOS ..... **IV**
RÉSUMÉ ..... **V**
LISTE DES TABLEAUX ..... **IX**
LISTE DES FIGURES ..... **X**
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES ..... **XII**
LISTE DES SYMBOLES ..... **XIII**
CHAPITRE I **1**
INTRODUCTION **1**
1.1 Mise en contexte 1
1.2 Les microalgues et leurs applications industrielles 3
1.3 Les microalgues comme productrice d'amidon 4
1.3.1 Paramètres de la photosynthèse 5
1.3.2 Compostition du milieu de culture 8
1.3.3 Culture en deux étapes 9
1.4 Amidon produit par les consortiums de microalgues 9
1.5 Projet dans lequel l'étude s'inscrit 12
1.6 Objectifs 13
CHAPITRE II **14**
OPTIMIZING STARCH PRODUCTION OF AN INDIGENOUS MICROALGAE-BACTERIA CONSORTIUM: IMPACT OF PHOTOSYNTHESIS PARAMETERS AND NUTRIENT LIMITATION **14**
2.1 Contribution des auteurs 14
2.3 Résumé de l'article 14
2.3 Article scientifique en anglais 16
2.3.1 Introduction 16
2.3.2 Material and methods 19
2.3.2.1 Microorganism and culture condition 19
2.3.2.2 Cultivation strategy 19

2.3.2.3Microbial growth and starch accumulation assessments 22
2.3.3 Results and discussion 23
2.3.3.1 Photosynthesis parameters 23
2.3.3.2 Effect of nutrient limitations 31
2.3.3.3 Effect of wastewater 35
2.3.4 Implications and potential applications 38
2.3.5 Conclusions 39
2.3.6 Acknowledgements 40
2.3.7 Conflict of interest 40
2.3.8 References 40
2.3.7 Supplementary data 45
CHAPITRE III 49
DISCUSSION 49
3.1 Retour sur la problématique et les résultats 49
3.2 Limites et perspectives 53
3.3 Conclusion générale 56
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau **Page**

Tableau 1 Récapitulatif des travaux sur la production d'amidon par les microalgues. 10
Tableau 2 Factors and levels of the CCD..... 21
Tableau 3 Estimated regression coefficients, standard errors and significance levels of the fitted linear model for starch concentration 26
Tableau 4 Complete experimental design matrix for the three-factor central composite design (CCD) evaluating light intensity, CO_2 concentration and photoperiod (n=33) 45
Tableau 5 Consortia integrity at the end of the second phase of growth (hour 72) of the photosynthesis experiment. 48
Tableau 6 Consortia integrity at the end of the second phase of growth (hour 96) of the nutrient limitation experiment 48
Tableau 7 Consortia integrity at the end of the second phase of growth (hour 96) of the wastewater experiment 48

LISTE DES FIGURES

Figure **Page**

Figure 1 « Matériels de livraison express utilisés en 2017 et en 2018 ». Graphique et légende tirée de Lai et al. [1]. 1
Figure 2 « Résumé de la photosynthèse. Ce diagramme présente les réactifs et les principaux produits des réactions photochimiques et de celles du cycle de Calvin à mesure qu'elles se déroulent dans les chloroplastes. La bonne marche de l'opération repose sur l'intégrité structurale des chloroplastes et de leurs membranes. Les enzymes situées dans les chloroplastes et dans le cytosol convertissent les 3-phosphoglycéraldéhyde (PGAL), le produit direct du cycle de Calvin, en plusieurs autres composés organiques. » L'image et la légende proviennent du livre Campbell Biologie [23] 6
Figure 3 « Effet des périodes alternées de lumière et de noirceur sur le contenu relatif d'amidon (% de la biomasse sèche). Les périodes d'obscurité sont représentées par les bandes en noir. Les cultures ont été cultivées en photobioréacteur dans un laboratoire ayant une intensité lumineuse incidente de 780µmol·m^2·s^1) avec différente concentration de biomasse sèche initiale (g·L^{-1}) identifiée au-dessus des courbes » Graphique et légende tirés de Brányiková et al. [2] 7
Figure 4 « Effet des limitations d'azote, de phosphore et de soufre sur la concentration en biomasse (biomasse sèche en g·L^{-1}) (A), le contenu en amidon (g·L^{-1}) (B) et le contenu relatif en amidon (% de la biomasse sèche) (C) dans une culture de Chlorella vulgaris asynchronisée. » Graphiques et légende tirés de Brányiková et al. [2]. 9
Figure 5 Pareto chart of standardized effects for starch concentration of the VERTECH consortium at hour 60 of culture. The vertical dashed line indicates the 0.05 significance threshold. 24
Figure 6 Response surface plots illustrating the predicted starch concentration of the VERTECH consortium as a function of (A) light intensity and CO_2 concentration, (B) light intensity and photoperiod, and (C) CO_2 concentration and photoperiod. Color gradients represent predicted starch concentration (mg·L^{-1}) 28
Figure 7 Starch concentration of the VERTECH consortia over the 72-hour period of the experiment for the cultures exposed to a) 500µmol and 10% CO_2 under the three photoperiods tested, b) 24L:0D and 500µmol·m^{-2}·s^{-1} under the three CO_2 concentrations and c) 10%v/v CO_2 and 24L:0D under the three light intensities. Hour 0 was the first illumination hour of each photoperiod. 31

Figure 8 Average of a) cell concentration, b) dry biomass, c) starch concentration, d) percentage of starch in the dry biomass and e) starch productivity, of the triplicates of each treatment described in the legend on the right during the second phase of culture. The error bars represent the standard deviation. 32
Figure 9 Average of a) cell concentration, b) dry biomass, c) starch concentration, d) percentage of starch in the dry biomass and e) starch productivity, of the triplicates of each treatment described in the legend on the right during the second phase of culture. The error bars represent the standard deviation. 36
Figure 10 Effect of luminosity ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), CO_2 concentration (%v/v) and photoperiod over starch productivity of the VERTECH consortia cultures. Dark periods are represented by the grey bars and error bars represent standard deviation 46
Figure 11 A) Dry biomass, B) starch concentration and C) percentage of starch in dry biomass, of the eleven cultures tested for each photoperiod (12L:12D, 18L:6D and 24L:0D) at hour 60 of the second phase of the experiment. Every culture had a different combination of light intensity (100, 300 or 500$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) and percentage of CO_2 injected (0.04%, 5% or 10% v/v) as shown in Table 3. Error bars represent the standard deviation. 47

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ANOVA: Analyse de la variance

BBM: Milieu de culture Bold's Basal Medium

BBM-N: Bold's Basal Medium sans azote

BBM-P: Bold's Basal Medium sans phosphore

BBM-S: Bold's Basal Medium sans soufre

CCD: Plan en composite centrée

CO_2: Dioxyde de carbone

DW: Biomasse sèche

Fe : Fer

GES ou GHG: Gaz à effet de serre

N: Azote

p: Valeur de probabilité

P: Phosphore

R^2 : Coefficient de détermination

S: Soufre

spp.: Espèce

TSA: Agar trypticase soja

WW: Eau usée

µmol : Micromole

LISTE DES SYMBOLES

°C: Degrés Celcius

g: Gramme

h: Heure

ha : Hectare

L: Litre

L:D : Lumière : Noirceur

m : Mètre

mg: Milligramme

rpm: Rotation par minute

s : Seconde

v/v: Volume par volume

vvm: Volume de gaz par minute par volume de liquide ($\frac{L/min}{L}$)

w/w: Poids par poids

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Depuis les années 2000, le nombre d'achats en ligne ne cesse d'augmenter, et ce notamment depuis la pandémie de la COVID-19. Cette recrudescence d'achat est fortement corrélée à l'utilisation accrue d'emballages à usage unique pour le transport [3]. À l'échelle mondiale, les boîtes de carton ondulé sont les emballages de livraison les plus utilisés pour les colis (Figure 1) [1].

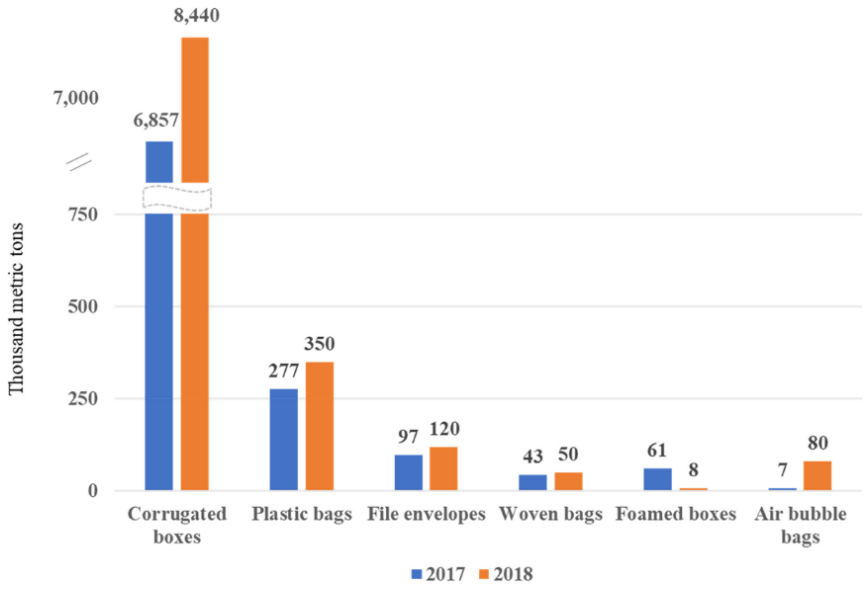


Figure 1 « Matériels de livraison express utilisés en 2017 et en 2018 ». Graphique et légende tirée de Lai et al. [1].

En 2022, les boîtes de carton ondulées ont été responsables de 22 % de l'impact carbone total des achats en ligne [1]. Compte tenu de la croissance anticipée de ce secteur, il est essentiel de réduire l'empreinte environnementale associée au commerce électronique [4]. Une des avenues privilégiées pour y parvenir consiste à améliorer la durabilité des emballages utilisés pour le transport des marchandises.

L'utilisation d'amidon alternatif à plus faible impact carbone pourrait contribuer à cette amélioration. En effet, les boîtes de carton sont majoritairement composées de fibre de bois et d'un adhésif à base d'amidon. Ce dernier améliore les propriétés mécaniques du carton ainsi que la qualité de sa surface ce qui permet, entre autres, d'avoir un matériel qui est plus robuste et sur lequel les pigments imprimés adhèrent efficacement [5, 6]. De ce fait, l'amidon est le troisième intrant majeur en matière première dans l'industrie papetière [6], laquelle est d'ailleurs reconnue comme le principal secteur de consommation d'amidon à l'échelle mondiale [7]. Ainsi, son rôle clé dans la fabrication des emballages en fait une cible pertinente pour réduire leur empreinte environnementale.

L'amidon $(C_6H_{10}O_5)_n$ est un polymère naturel. Actuellement, les sources industrielles pour ce polysaccharide complexe proviennent majoritairement des plants de maïs, patates, blé et tapioca, ce qui pose plusieurs problématiques au niveau environnemental, économique et éthique [6, 8, 9]. Plus précisément, la culture de ces végétaux pour la production d'amidon industriel engendre des préoccupations au niveau de la sécurité alimentaire. En effet, elle monopolise des terres arables qui ne serviront pas à la production d'aliments, mais à la création d'intrants industriels. La production d'amidon entre ainsi en compétition avec la culture de ressources alimentaires [8, 10]. Au niveau environnemental, ces monocultures végétales impliquent fréquemment l'utilisation excessive de fertilisants et de pesticides qui génère de fortes émissions de gaz à effet de serre (GES) [11]. De plus, ces additifs ruissèleront ultimement dans les cours d'eau, entrainant ainsi plusieurs conséquences négatives sur l'environnement, dont l'accélération de l'eutrophisation [9]. Ces cultures nécessitent aussi l'utilisation intensive d'eau et de plusieurs machineries lourdes alimentées par des combustibles fossiles [11, 12].

Dans ce contexte, le développement de sources alternatives d'amidon, plus durables, apparaît nécessaire. Parmi les options envisagées, les microalgues représentent une avenue particulièrement prometteuse.

1.2 Les microalgues et leurs applications industrielles

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques du domaine des eucaryotes. Elles sont omniprésentes dans l'environnement et se retrouvent majoritairement dans les habitats aquatiques. Dans les dernières décennies, elles ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur croissance rapide, possible toute l'année et peu contraignante, ainsi que de leur potentiel pour l'innovation industriel [13-15]. Contrairement aux plantes terrestres, les microalgues ne nécessitent pas de terre arable pour se développer. Elles peuvent être cultivées en systèmes ouverts, tels que des bassins extérieurs, ou en systèmes fermés comme des photobioréacteurs [14]. Leur croissance repose principalement sur l'apport d'eau, de lumière, de carbone et de nutriments.

Plus précisément, la culture microalgale requiert des macronutriments, tels que l'azote et le phosphore, ainsi que des micronutriments présents en plus faibles quantités [16]. L'ajout de ces nutriments s'avère toutefois assez couteux. Afin de réduire ce coût, des eaux usées riches en nutriments peuvent être utilisées comme milieu de culture. Ainsi, les microalgues utilisent les nutriments présents dans les eaux usées, ce qui leur permet de croître tout en effectuant une partie de la phycoremédiation des eaux usées [15, 17, 18].

Le carbone constitue également un élément essentiel à leur développement. D'ailleurs, il est recommandé d'ajouter au minimum une injection de 5 % de CO_2 dans les cultures de microalgues autotrophes afin d'accroitre la concentration cellulaire [19]. Pour ce faire, il est possible d'injecter du CO_2 à partir de bonbonne de gaz comprimé, mais cela augmente les coûts de cultures. Alternativement, une façon plus économique et écologique est d'injecter des effluents gazeux industriels. De ce fait, les microalgues fixent le carbone contenu dans le CO_2 lors la photosynthèse ce qui réduit les émissions de GES de l'usine [14, 20].

De plus, la culture des microalgues permet de produire une biomasse qui peut être valorisée de différentes façons. En effet, les microalgues produisent plusieurs molécules d'intérêt, dont des lipides, glucides, protéines, pigments et vitamines [21]. Il est possible de moduler l'accumulation de ces molécules d'intérêt en soumettant les microalgues à différentes conditions de culture. De ce fait, la biomasse algale peut être utilisée directement ou transformée en produit à valeur ajoutée. Dépendamment des molécules

contenues dans les microalgues, les produits peuvent être intéressants pour le secteur de l'agriculture, de la pharmaceutique, de l'énergie, de la chimie ou même de l'alimentation [15].

Somme toute, les cultures de microalgues peuvent être utilisées en synergie avec différentes industries afin de réduire leurs GES et/ou traiter leurs eaux usées, en plus de fournir une biomasse qui peut être transformée en produits à valeur ajoutée. De cette façon, les microalgues peuvent déclencher le déploiement de boucles d'économie circulaire au sein de certaines industries en leur permettant de valoriser divers résidus. Les microalgues peuvent ainsi favoriser des pratiques plus durables au sein des entreprises en réduisant leur impact environnemental [15].

1.3 Les microalgues comme productrice d'amidon

Parmi les molécules d'intérêt produites par les microalgues, l'amidon peut être accumulé en grande quantité dans les cellules. Il constitue d'ailleurs la principale forme de réserve de carbone chez les microalgues vertes unicellulaires eucaryotes [22]. Lors de la photosynthèse, ces microorganismes convertissent l'énergie lumineuse et le CO_2 en molécules riches en énergie, notamment sous forme de sucre simple tel que le D-glucose [23]. Cependant, sous forme libre, ce monosaccharide est chimiquement réactif notamment en raison de la présence d'une fonction aldéhyde, peut être oxydé et agir comme agent réducteur, ce qui le rend susceptible de participer à des réactions chimiques avec d'autres constituants cellulaires [24]. De plus, comme il est soluble, à forte concentration, le glucose libre peut perturber l'équilibre osmotique cellulaire [25, 26]. Afin de limiter ces effets et de constituer des réserves énergétiques stables, les cellules polymérisent le glucose en chaînes plus longues et moins solubles, formant ainsi de l'amidon. Cette forme de stockage, osmotiquement inerte, permet l'accumulation efficace de carbone et d'énergie sous forme de granules d'amidon, généralement localisés dans les plastes [24, 25, 27, 28].

Certaines microalgues peuvent ainsi atteindre des teneurs élevées en amidon. Sous conditions optimisées, des espèces du genre *Chlorella* peuvent accumuler jusqu'à 60 % d'amidon dans leur biomasse sèche [16]. De plus, certaines espèces ont une plus grande

productivité d'amidon par hectare que les plantes terrestres conventionnelles, pouvant aller jusqu'à une productivité 10 fois supérieure [10]. À titre d'exemple, l'étude de Gifuni et al. (2017) a identifié que la productivité d'amidon moyenne du maïs est de 6 tonnes·ha^{-1}·an^{-1}, comparativement à 58 tonnes·ha^{-1}·an^{-1} pour la microalgue *Chlorella sorokiniana* [29].

Diverses études ont mis en évidence que les conditions de culture influencent fortement l'accumulation de molécules d'intérêt chez les microalgues, notamment l'amidon [8, 30-32]. D'une part, la production de ce polysaccharide varie selon les intrants de la photosynthèse, dont l'intensité lumineuse, la photopériode et la concentration de CO_2 injectée. D'autre part, la composition du milieu de culture peut influencer la production de ce polymère [2].

1.3.1 Paramètres de la photosynthèse

La production d'amidon est étroitement liée à la photosynthèse, processus biochimique se déroulant dans les chloroplastes des microalgues et permettant la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisable. La photosynthèse comprend deux grandes phases (Figure 2) : les réactions photochimiques, au cours desquelles l'énergie lumineuse est captée par les photosystèmes des thylakoïdes et convertie en ATP et en NADPH, et le cycle de Calvin, où ces molécules riches en énergie sont utilisées pour fixer le CO_2 et produire des trioses phosphates, notamment le phosphoglycéraldéhyde (PGAL). Ces intermédiaires peuvent ensuite être dirigés vers la synthèse d'amidon pour le stockage au sein du chloroplaste ou convertis en saccharose pour être exportés hors de celui-ci [23, 33].

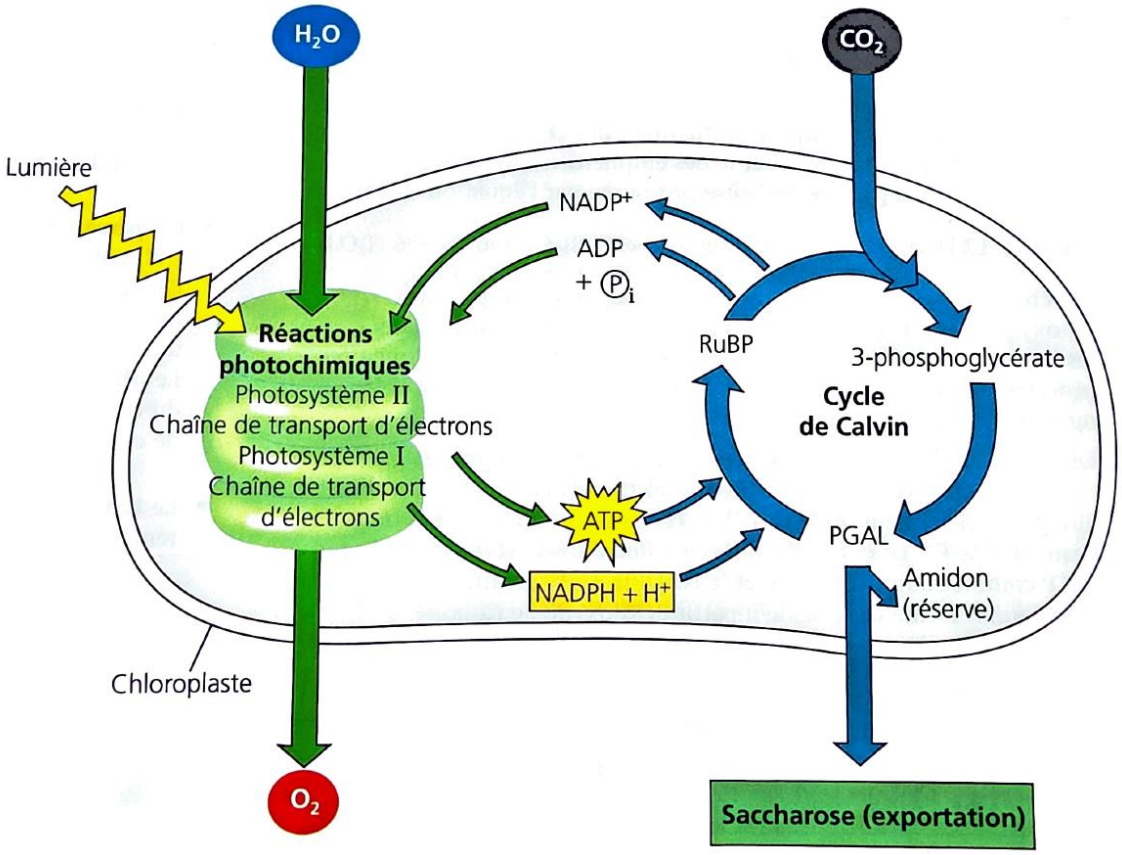


Figure 2 « Résumé de la photosynthèse. Ce diagramme présente les réactifs et les principaux produits des réactions photochimiques et de celles du cycle de Calvin à mesure qu'elles se déroulent dans les chloroplastes. La bonne marche de l'opération repose sur l'intégrité structurale des chloroplastes et de leurs membranes. Les enzymes situées dans les chloroplastes et dans le cytosol convertissent les 3-phosphoglycéraldéhyde (PGAL), le produit direct du cycle de Calvin, en plusieurs autres composés organiques. » L'image et la légende proviennent du livre Campbell Biologie [23]

Ainsi, l'intensité lumineuse joue un rôle majeur sur l'accumulation de l'amidon. En effet, l'énergie lumineuse est essentielle à la production d'ATP et de NADPH dans la phase des réactions photochimiques, molécules qui sont essentielles dans le cycle de Calvin pour la fixation du carbone et donc la formation de glucides [34]. Une augmentation de l'intensité lumineuse favorise donc la production d'ATP et de NADPH, et par conséquent l'accumulation d'amidon, tant que la photoinhibition n'est pas atteinte ou que d'autres facteurs, comme le CO_2, ne deviennent pas limitants [16, 35]. Il est important de noter que l'intensité lumineuse ne dépend pas uniquement de la lumière incidente, mais également de la concentration cellulaire dans le milieu de culture. Plus la densité cellulaire est élevée, plus la quantité de lumière disponible par cellule diminue [2].

Ensuite, la photopériode influence également la production d'amidon en régulant le temps d'expositions des microalgues à lumière. Une photopériode plus longue augmente le temps disponible pour la production d'ATP et de NADPH, favorisant ainsi l'accumulation d'amidon. À l'inverse, pendant les périodes d'obscurité, les microalgues cessent la photosynthèse et utilisent leurs réserves d'amidon comme source d'énergie pour maintenir leurs fonctions métaboliques essentielles [36].

Le graphique suivant (Figure 3), tiré de l'étude de Brányiková et al. (2011), illustre bien l'influence de la lumière sur la dynamique d'accumulation d'amidon de *Chlorella vulgaris*. Il est possible de constater une augmentation rapide de l'amidon durant les 12 premières heures, correspondant à la phase de luminosité. À l'inverse, durant la période d'obscurité (12 à 24 h), les réserves diminuent. Le cycle suivant montre une accumulation plus faible, ce qui s'explique notamment par l'augmentation de la densité cellulaire, réduisant la lumière disponible par cellule [2]. Ces observations mettent en évidence le rôle central de la lumière dans l'accumulation d'amidon et l'importance de considérer conjointement l'intensité lumineuse, la photopériode et la densité cellulaire lors de l'optimisation des cultures.

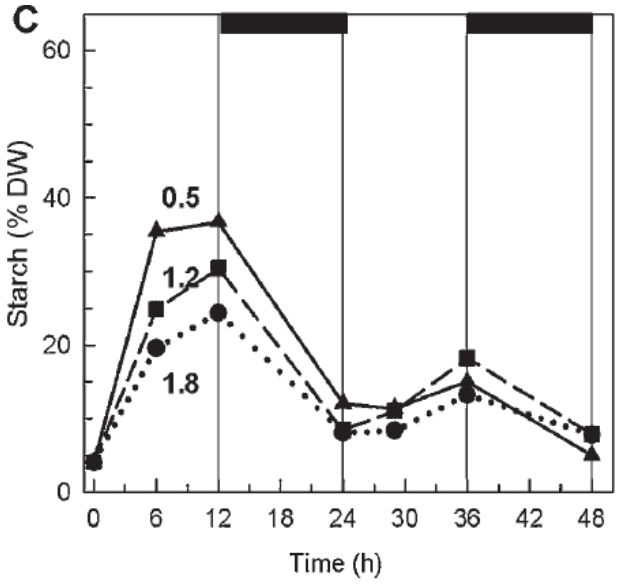


Figure 3 « Effet des périodes alternées de lumière et de noirceur sur le contenu relatif d'amidon (% de la biomasse sèche). Les périodes d'obscurité sont représentées par les bandes en noir. Les cultures ont été cultivées en photobioréacteur dans un laboratoire ayant une intensité lumineuse incidente de 780µmol·m^{-2}·s^{-1}) avec différente concentration de biomasse sèche initiale (g·L^{-1}) identifiée au-dessus des courbes » Graphique et légende tirés de Brányiková et al. [2]

Enfin, la concentration de CO_2 dans le milieu de culture influence aussi l'accumulation d'amidon. L'injection de CO_2 augmente la disponibilité d'un substrat inorganique de carbone pouvant être fixé lors du cycle de Calvin, favorisant ainsi la production d'amidon [22, 33, 34, 37]. Toutefois, une concentration excessive de CO_2 peut entraîner une acidification rapide du milieu, provoquant une diminution du pH et induisant un stress cellulaire susceptible de nuire à la croissance et à la survie des microalgues [20]. Il est également important de noter que la tolérance au CO_2 varie selon les espèces et les souches de microalgues, certaines pouvant s'adapter à des concentrations plus élevées que d'autres [20].

1.3.2 Compostition du milieu de culture

Le contenu en amidon dans les cellules varie également selon la phase du cycle cellulaire. La division cellulaire demande l'utilisation de grandes quantités d'énergie, notamment sous forme d'amidon. Ainsi, la concentration en amidon est la plus élevée dans les cellules juste avant la division cellulaire, alors qu'elle est au plus faible juste après la division cellulaire [2, 38]. Afin d'augmenter la production de ce polysaccharide, il est possible de bloquer temporairement le processus de division cellulaire. Par exemple, l'ajout de cycloheximide (1 $mg \cdot L^{-1}$), un antibiotique, permet de bloquer la division de *Chlorella vulgaris* et d'augmenter la production d'amidon en quelques heures seulement [2]. Cependant, l'utilisation de cette substance n'est pas envisageable pour les cultures à grande échelle, puisque cela représenterait un trop grand risque environnemental en cas de déversement en plus de ne pas être viable économiquement [2].

Une solution plus réaliste consiste à induire des limitations de macronutriments, tels que des limitations d'azote, de phosphore ou de soufre. Comme ces nutriments sont essentiels à la division cellulaire, leur restriction limite la multiplication des cellules et favorise ainsi une augmentation rapide de la production d'amidon, tout en étant peu coûteuse [2, 30, 31, 37]. La Figure 4, tirée de Brányiková et al. (2011), illustre bien ce phénomène. Effectivement, il est possible de voir que la limitation en soufre entraîne la plus forte teneur en amidon dans la biomasse sèche (%DW) de *Chlorella* vulgaris Figure 4 C). Toutefois, la restriction d'un macronutriment peut ralentir, voire arrêter la division

cellulaire, ce qui réduit la production de biomasse totale [22]. Ainsi, bien que le pourcentage d'amidon soit plus élevé dans le traitement sans soufre, la biomasse produite demeure inférieure à celle du traitement contrôle contenant l'ensemble des nutriments (Figure 4 A). Par conséquent, la quantité totale d'amidon produite ($g \cdot L^{-1}$) est également inférieure dans le traitement sans soufre comparativement au contrôle (Figure 4 B). Ce résultat met en lumière le dilemme entre l'accumulation d'amidon et la production de biomasse. Ce phénomène, largement documenté dans la littérature, doit être pris en compte lors de la planification des cultures microalgales [2, 16, 22, 37].

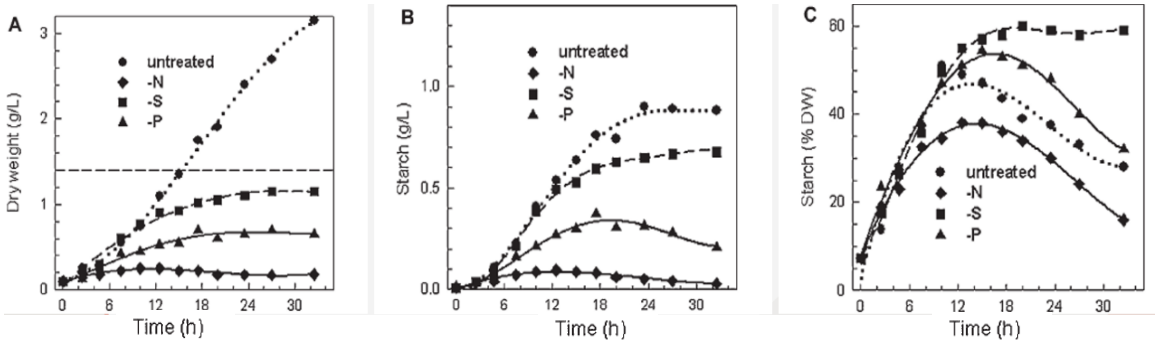


Figure 4 « Effet des limitations d'azote, de phosphore et de soufre sur la concentration en biomasse (biomasse sèche en $g \cdot L^{-1}$) (A), le contenu en amidon ($g \cdot L^{-1}$) (B) et le contenu relatif en amidon (% de la biomasse sèche) (C) dans une culture de Chlorella vulgaris asynchronisée. » Graphiques et légende tirés de Brányiková et al. [2].

1.3.3 Culture en deux étapes

Le dilemme entre l'accumulation d'amidon et la production de biomasse de microalgues peut cependant être facilement éliminé en utilisant la méthode de culture en deux étapes. Il s'agit d'abord d'acclimater la souche à son milieu de culture et ensuite de produire de la biomasse algale dans des conditions optimales de croissance. Lorsque la concentration cellulaire désirée est obtenue, des conditions de stress peuvent être induites sur la culture dans une seconde étape afin d'augmenter la production de la molécule d'intérêt désiré, dans ce cas-ci l'amidon [16, 33, 37].

1.4 Amidon produit par les consortiums de microalgues

À ce jour, plusieurs études ont été réalisées sur de nombreuses espèces de microalgues afin d'optimiser leur production d'amidon (Tableau 1).

Tableau 1 Récapitulatif des travaux sur la production d'amidon par les microalgues.

Souche	Condition de culture particulière	Production en amidon	Références
Culture pure de *Tetraselmis subcordiformis*	Limitation en S, 3% CO_2, illumination continue de 200 µmol·m^{-2}·s^{-1}	620 mg·L^{-1}·d^{-1} 62,1% DW	[31]
Culture pure de *Chlorella zofingiensis*	Limitation en N, 1% CO_2, 150 µmol·m^{-2}·s^{-1},	43.4% DW	[39]
Culture pure de *Chlorella vulgaris*	Limitation en S, 2% de CO_2, illumination continue de 780 µmol·m^{-2}·s^{-1}	60% DW	[2]
Culture pure de *Chlorella* sp. AE10	10% CO_2, illumination de 1000 µmol·m^{-2}·s^{-1}, 0,375g·L^{-1} $NaNO_3$	311 mg·L^{-1}·d^{-1} 60,3% DW	[33]
Culture pure de *Chlorella vulgaris*	Limitation en N et Fe, illumination de 70 µmol·m^{-2}·s^{-1}	>40%DW	[16]
Culture pure de *Chlorella salina*	Limitation en N et S, illumination continue de lumière rouge	30.51 mg·L^{-1}	[37]
Culture pure de *Chlorella vulgaris*	Limitation en N, illumination de lumière rouge, photopériode de 16L :6D, température de 39°C	576,7 mg·L^{-1}·d^{-1}	[40]
Coculture de *Chlorella sorokiniana* et de *Azosporillum brasilense* Cd	Culture hétérotrophe, ajout de D-glucose et de N	38,83 mg·L^{-1}	[41]
Coculture de *Chlorella vulgaris* et de *Pseudomonas aeruginosa*	Culture mixotrophe, illumination continue, 400 mg·L^{-1} de N	493,9 mg·L^{-1}	[42]

Cependant, peu d'études se sont intéressées aux consortiums microalgues-bactéries. Les consortiums microalgues-bactéries présentent pourtant plusieurs avantages par rapport aux cultures pures, notamment dans un contexte d'application industrielle. En effet, des interactions de mutualisme ou de commensalisme peuvent avoir lieu entre les différents microorganismes, ce qui engendre plusieurs bénéfices [43-45]. Entre autres, les échanges métaboliques entre les espèces peuvent atténuer certaines conditions de stress, conférant aux consortiums une meilleure résistance face aux fluctuations environnementales [46-48]. Grâce à ces interactions, ils sont aussi plus résistants à l'invasion d'espèces indésirables [43]. Ces caractéristiques rendent les consortiums particulièrement adaptés à une culture en milieu non stérile, ce qui est avantageux sur le plan économique à grande échelle. De plus, les interactions entre microorganismes peuvent stimuler la croissance, ce qui se traduit souvent par une production de biomasse plus élevée [48]. La récolte de la biomasse peut également être facilitée, car les consortiums ont tendance à former des bioflocs ou des agrégats, ce qui simplifie la récolte de la biomasse et réduit ainsi les coûts [43, 45]. Finalement, les consortiums microalgues-bactéries sont souvent plus efficaces pour retirer les nutriments présents dans les eaux usées que les cultures composées d'une seule espèce de microalgue. Cela s'explique notamment par la capacité des bactéries à dégrader la matière organique, ce qui libère des nutriments assimilables par les microalgues et fournis également du CO_2 nécessaire à leur croissance [43, 45, 46, 48]. Ensemble, ces avantages rendent l'utilisation de consortiums particulièrement intéressante pour les applications industrielles comparativement aux monocultures de microalgues.

À ce jour, peu d'études ont évalué l'utilisation de consortiums indigènes pour la production d'amidon. Néanmoins, certaines recherches se sont intéressées à l'accumulation d'amidon dans des cocultures produites en laboratoire, combinant une espèce de microalgue et une espèce bactérienne reconnue pour leurs interactions mutualistes. Les résultats montrent que l'accumulation d'amidon peut être plus élevée dans ces cocultures que dans des cultures où seule l'espèce de microalgue est cultivée [41, 42]. Toutefois, l'accumulation d'amidon dans des communautés microbiennes aussi complexes que des consortiums indigènes demeure encore peu étudiée. Des recherches

supplémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer le potentiel des consortiums dominé par les microalgues pour la production d'amidon à grande échelle.

1.5 Projet dans lequel l'étude s'inscrit

L'étude présentée dans ce mémoire s'inscrit dans le projet VERTECH. Celui-ci a pour objectif de valoriser les eaux usées industrielles de certaines entreprises situées à Victoriaville (Qc, Canada) en bioproduits qui pourront être utilisés localement. Les différents acteurs de ce projet, soit la Ville de Victoriaville, les entreprises locales participantes ainsi que l'Université du Québec à Trois-Rivières et leurs collaborateurs, se sont associés en 2014 dans le but d'évaluer si l'intégration de culture de microalgues pourrait être utilisée afin de répondre à l'objectif du projet. Depuis, un consortium dominé par les microalgues, soit le consortium VERTECH, a été isolé dans les eaux usées du parc industriel de Victoriaville. Des études antérieures ont mis en évidence le potentiel du consortium pour réduire les nutriments et les métaux contenus dans les eaux usées du parc industriel de Victoriaville [17, 46].

Ce projet s'intéresse maintenant aux possibilités de bioproduits qui pourraient être fabriqués à partir de la biomasse algale et qui pourrait être utilisée par les entreprises participantes. Comme ces dernières sont des utilisatrices de divers emballages, elles souhaiteraient explorer la possibilité d'utiliser la biomasse de microalgues pour fabriquer des emballages écoresponsables. Les molécules d'intérêt visées sont l'amidon et d'autres hydrates de carbone, dont les polyhydroxyalcanoates (PHA), pour la fabrication d'emballage à partie de pâte cellulosique mélangée à une biomasse de microalgues riche en ces hydrates de carbone. Par conséquent, deux équipes travaillent sur le projet : l'une sur l'optimisation de la production des molécules d'intérêt désirées et l'autre sur la production des emballages. La présente étude, qui s'insère dans ce contexte, se concentre sur la production d'une biomasse algale riche en amidon qui pourrait être utilisé pour la fabrication des nouveaux emballages cellulosiques.

1.6 Objectifs

Le but de cette étude est d'identifier les paramètres de culture permettant d'augmenter la production d'amidon du consortium VERTECH et d'évaluer l'intégration de la phycoremédiation d'eaux usées industrielles dans le procédé.

Sur la base des connaissances issues de la littérature, il est posé comme hypothèse que les paramètres de culture reconnus pour favoriser l'accumulation d'amidon en culture pure de microalgues, notamment l'intensité lumineuse, la photopériode, la concentration en CO_2 et les carences en nutriments, permettront également d'augmenter la production d'amidon au sein du consortium VERTECH.

Ainsi, pour atteindre ce but et valider ou infirmer l'hypothèse, les objectifs spécifiques de recherche sont les suivants :

1. Identifier les paramètres de la photosynthèse (intensité lumineuse, photopériode et concentration de CO_2 injecté) qui permettent d'augmenter la concentration d'amidon dans le consortium en utilisant un plan expérimental.
2. Identifier la carence en macronutriment (N, P ou S) induisant la plus grande accumulation d'amidon dans le consortium.
3. Comparer la production d'amidon du consortium cultivé dans les eaux usées et dans le milieu optimisé déterminées lors du second objectif.

L'originalité de ce projet réside dans le développement de nouvelles connaissances sur la production d'amidon, destinée au secteur des pâtes et papiers, à partir de microalgues (en symbiose avec des bactéries) cultivées dans des eaux usées. Ce projet aura alors comme retombée la fabrication potentielle d'éco-emballages à partir de mélanges de pâtes cellulosiques et de biomasse de microalgues.

CHAPITRE II

OPTIMIZING STARCH PRODUCTION OF AN INDIGENOUS MICROALGAE-BACTERIA CONSORTIUM: IMPACT OF PHOTOSYNTHESIS PARAMETERS AND NUTRIENT LIMITATION

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais qui sera prochainement soumis au journal *Bioressource Technology*.

2.1 Contribution des auteurs

Cet article a été principalement rédigé par Lauriane Thibault, qui a également réalisé l'ensemble des travaux expérimentaux à l'origine des résultats présentés. La conception et la planification du projet, incluant la revue de littérature, la définition de la problématique et des objectifs, ainsi que l'élaboration de la méthodologie, ont été menées sous la supervision de Simon Barnabé (directeur de maîtrise, UQTR) et de Nathalie Bourdeau (codirectrice de maîtrise, Innofibre). La version finale du manuscrit a été révisée par Younès Bareha et Simon Barnabé.

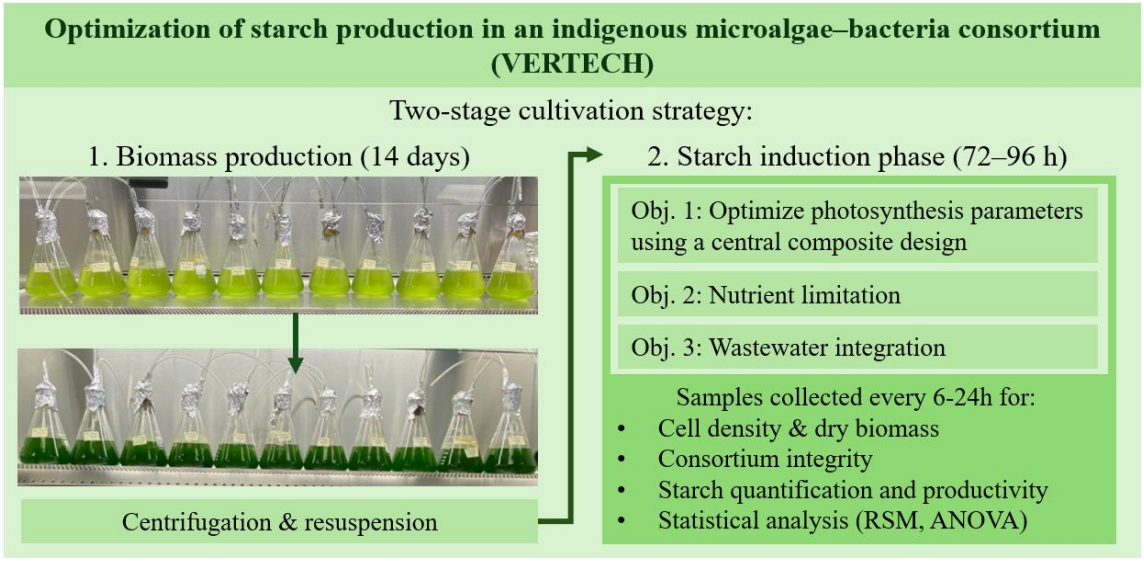
2.3 Résumé de l'article

Highlights:

- A Central Composite Design was used to optimize CO_2 concentration, light intensity, and photoperiod for starch accumulation in an indigenous microalgae-bacteria consortium, using a two-stage cultivation strategy.
- Continuous illumination (24L:0D) combined with 10% (v/v) CO_2 and high light intensity (500µmol·m^{-2}·s^{-1}) strongly enhanced starch concentration.
- Nitrogen limitation induced a 33.6% starch content (DW of consortium biomass) after 96 hours, confirming its major role in carbon partitioning.

- Addition in the media of 10% v/v industrial wastewater from a cleaning-product manufacturing plant inhibited starch accumulation, likely due to a high chemical stress inhibiting photosynthesis.

Graphical abstract:



Abstract:

Uses of starch, commonly derived from terrestrial crops, raise concerns related to land use, greenhouse gas emissions, and food competition. Microalgae represent a promising alternative, capable of producing starch while mitigating CO_2 emissions and treating wastewater. This study investigated starch production in an indigenous microalgae-bacteria consortium and assessed its potential for integration into wastewater valorization processes. A two-stage cultivation strategy was used: the first phase maximized biomass production, and the second phase optimized starch accumulation through modulation of photosynthetic parameters (light intensity, photoperiod, CO_2 concentration) and macronutrient limitation (N, P, S). A 3 factors central composite design (CCD) identified potentially optimal photosynthetic conditions at 10% CO_2, 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ light intensity, and continuous illumination (24L:0D), achieving 21.1% starch in dry biomass (6.01 $mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ productivity). Among nutrient limitations, nitrogen deprivation induced the highest starch content (28.16% DW; 7.05 $mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ productivity) without

compromising consortium stability. Conversely, the addition of 5–10% (v/v) industrial wastewater from a cleaning-product manufacturing plant inhibited starch synthesis likely due to chemical stress inhibiting photosynthesis. These findings confirm that nitrogen limitation and enhanced photosynthetic activity are key drivers of starch accumulation in the indigenous microalgae-bacteria consortium, while suggesting that wastewater composition should be investigated prior to utilization.

Keywords

Microalgae-bacteria consortium, Starch accumulation, Nitrogen limitation, CO_2 enrichment, Photoperiod and light intensity, Wastewater valorisation

2.3 Article scientifique en anglais

Optimizing starch production of an indigenous microalgae-bacteria consortium: impact of photosynthesis parameters and nutrient limitation.

Lauriane Thibault (LT)[a], Nathalie Bourdeau (NB)[b], Younès Bareha[a] and Simon Barnabé (SB)[a]

[a] Institut d'innovation en éco-matériaux, éco-produits et éco-énergies à base de biomasse (I2E3), Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), 3351 Boulevard des Forges, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada.

[b] Innofibre, 3351 Bd des Forges, Trois-Rivières, QC, G9A 5E6, Canada.

2.3.1 Introduction

Starch $(C_6H_{10}O_5)_n$, a natural polymer, represents the third most important raw material input in the pulp and paper industry. It is widely used in paperboard packaging adhesives, where it plays a key role to enhance mechanical strength and surface properties [1, 2]. However, industrial starch is mainly derived from terrestrial plants such as corn and wheat, raising environmental, economic and ethical concerns. The cultivation of these crops monopolizes arable land, generate greenhouse gas (GHG) emissions through the use

of fertilizers and pesticides, and put food production in competition with industrial inputs [3-5]. In parallel, the rapid expansion of online shopping has led to increased demand for delivery packaging, predominantly composed of corrugated cardboard, thereby further intensifying starch consumption [6]. Developing alternative and more sustainable starch sources therefore represents a critical challenge for the pulp and paper industry. Microalgae, with their unique properties, represent a promising alternative for sustainable starch production.

Indeed, microalgae are photosynthetic microorganisms cultivated in aquatic environments and offer significant advantages: they do not require arable land, exhibit rapid growth rates, can be produced year-round, have the potential to be integrated into wastewater treatment systems, and use CO_2, thereby contributing to the mitigation of GHGs [7-9]. When exposed to environmental stresses, particularly nutrient deprivation or intense light, many eukaryotic green microalgae redirect photosynthetically fixed carbon toward the accumulation of energy-dense compounds, including starch and lipids [10]. Among the molecules of interest produced by microalgae, starch is one that can be obtained in significant quantities. It is the main carbon storage form found in green unicellular eucaryote microalgae chloroplasts [11]. For example, *Chlorella* sp. can reach up to 60% of starch in their dry biomass under optimized conditions [12, 13]. Certain microalgae species can also achieve starch productivity per hectare up to ten times higher than those of conventional terrestrial crops [3, 11].

Numerous studies have explored starch production in pure microalgal cultures and have shown that starch accumulation often occurs as a protective response to environmental stimuli [10]. Those studies highlighted various abiotic factors influencing starch accumulation, such as light intensity, photoperiod, light spectrum, CO_2 concentration, temperature, addition of cell division inhibitors, and nutrient availability [12, 14-18]. Among these, macronutrient limitation, particularly in nitrogen, phosphorus, or sulfur, has been shown to strongly induce starch accumulation in pure microalgae cultures. However, these limitations often lead to a reduction in cell growth, and thus a trade-off between biomass and starch production. Consequently, the use of two-stage cultivation has been highlighted as an effective strategy to increase both starch and biomass production [15-17, 19]. Since the response to these environmental stimuli varies

across microalgal species and strains [13], selecting conditions tailored to each organism is essential.

To date, starch production in mutualistic indigenous microalgae–bacteria consortia have received limited attention in the literature. Compared to monocultures, these consortia may offer several advantages for industrial applications. The coexistence of microalgae and bacteria can bring beneficial interactions such as mutualism and commensalism [20-22]. These interactions can promote growth and enhance tolerance to environmental fluctuations, as metabolic exchanges between species help buffer stress conditions [23, 24]. These systems are often better suited to open or non-sterile environments, where microbial interactions contribute to greater ecological stability [22]. In addition, the formation of aggregates or bioflocs in mixed cultures may facilitate biomass harvesting, reducing downstream processing costs [20, 22]. Furthermore, bacterial species can enhance nutrient recycling and organic matter degradation, thereby improving phytoremediation efficiency while increasing the availability of inorganic nutrients and CO_2 for microalgal uptake [20, 22, 23]. Through these synergistic interactions, microalgae–bacteria consortia may ultimately exhibit increased resilience and sustained productivity compared to monocultures. Moreover, studies investigating synthetic co-culture systems have shown that mutualistic interactions between microalgae and bacteria can enhance starch accumulation in microalgal cells [25, 26]. These findings provide encouraging insights into the potential of indigenous microalgae–bacteria consortia for starch production. However, the mechanisms governing carbon allocation and starch accumulation in such complex communities remain largely unexplored, highlighting the need for further research to optimize their large-scale applications.

The purpose of this study is to identify the parameters for increasing starch production in an indigenous microalgae-bacteria consortium, i.e. the VERTECH consortium, and to evaluate the potential of coupling starch production with phycoremediation of industrial wastewater. The specific objectives are as follows:

1. Determine the optimal photosynthesis parameters (light intensity, photoperiod, and injected CO_2 concentration) that increase starch concentration of the consortium using an experimental plan.

2. Identify which macronutrient (N, P, or S) limitation induces the highest starch production in the consortium.
3. Evaluate and compare the starch production of the consortium in wastewater (WW) with the optimized medium.

2.3.2 Material and methods

2.3.2.1 Microorganism and culture condition

The indigenous microalgae-bacteria consortium used for this study is a natural microbial consortium isolated from a sample of WW from an agri-food factory in the Victoriaville industrial park (Quebec, Canada). A metagenomic identification revealed that it is predominantly composed of microalgae from the Trebouxiophyceae family, which includes the genus of *Chlorella* spp., and several species of bacteria, cyanobacteria and fungi [27]. Previous studies demonstrated that this indigenous microalgae-bacteria consortium, named the VERTECH consortium, can efficiently grow in industrial WW, concurrently removing nitrogen and carbon while synthesizing valuable metabolites such as lipids and polyhydroxyalkanoates [23, 24, 27].

Prior to experiments, the consortium was maintained at 22 ± 1 °C in autoclaved (121°C for 15 min) Bold's Basal standard medium (BBM) [28]. It was cultivated under fluorescent lighting of 12 h of light and 12 h of darkness (12L:12D) with an incident light intensity of 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (measured by a Quantum Flux Apogee Instruments). Cultures were maintained under mechanical agitation (orbital shaker, 125 rpm) and continuously aerated with air enriched with 5% (v/v) CO_2 at a rate of 0.2 vvm. Microscopic observations were carried out weekly to ensure the integrity of the consortium and all cultures were subcultured in fresh BBM biweekly.

2.3.2.2 Cultivation strategy

To overcome the trade-off between biomass and starch productivity, all experiments were performed in two stages. The first stage was designed to maximizing biomass production. The consortium was grown in 1L Erlenmeyer flasks containing 700

mL of the BBM medium and inoculated with $3x10^6$ cells·mL^{-1}. Culture conditions were identical to those described above. The first cultivation phase lasted 14 days, corresponding to the end of exponential growth phase. At this point, the cultures were centrifuged at room temperature at 3000 g for 5 min and the resulting cell pellet was resuspended in fresh medium for the second cultivation phase.

In the second cultivation phase, designed to enhance starch accumulation, each culture was subjected to specific stress conditions depending on the experimental objective. The first objective investigated photosynthetic parameters, the second macronutrient limitation, and the third included WW in the growth medium. At each sampling time, 15 mL of culture was collected: 10 mL was frozen at −20 °C for subsequent starch analysis, while the remaining 5 mL was immediately used for growth measurements.

Photosynthesis parameters

The first objective aimed to identify the photosynthetic parameters, i.e. incident light intensity, photoperiod and injected CO_2 concentration, that optimize starch production in the consortium. A central composite design (CCD) was established using SAS JMP 10.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), including three factors: light intensity, CO_2 concentration, and photoperiod, each tested at three levels (Table 2). Due to logistical constraints preventing the simultaneous implementation of the three photoperiod regimes, the experimental design was conducted separately for each photoperiod. Thus, the CCD for light intensity and CO_2 concentration was replicated under each photoperiod condition, each including three central points to allow estimation of experimental error. In total, the complete experimental matrix comprised 33 cultures. This CCD was used to identify operational conditions that promote starch accumulation in the consortium rather than to maximize starch productivity. The experimental design aimed to assess the relative influence of photosynthetic parameters and to identify favorable parameter ranges, serving as an indicator of the most performant conditions for starch induction.

Light intensity was measured on the surface of the cultures. CO_2 was mixed with filtered air with an aeration rate of 0.2 vvm. The second stage of experiment lasted 72 h and samples were collected every 6 h, except during periods of darkness.

Table 2 Factors and levels of the CCD.

	Levels		
Factors	-1	0	1
CO_2 concentration in ambient air (%v/v)	0.04	5.04	10.04
Incident light intensity (µmol·m^{-2}·s^{-1})	100	300	500
Photoperiod (hours Light: hours Dark)	12L:12D	18L:6D	24L:0D

Nutrients limitation

One of the objectives aimed to identify which macronutrients (N, P or S) limitation promotes the highest starch accumulation in the VERTECH consortium. In the second growth phase, cultures were exposed to different culture media: nitrogen-limited (BBM-N), phosphorus-limited BBM (BBM-P), sulfur-limited BBM (BBM-S) and standard BBM as a control. In the BBM-N the $NaNO_3$ was replaced with NaCl to maintain the same Na^+ concentration, in BBM-P K_2HPO_4 and KH_2PO_4 were replaced with KCl to maintain K^+ levels, in the BBM-S $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ was replaced with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ and $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ was replaced with $FeCl_3$ to preserve Mg^{+2} and Fe^{+2} concentrations. Each treatment was performed in triplicate, using the optimal photosynthesis parameters determined by the model of the first objective. However, due to aging of the light bulbs, the light intensity was 350 µmol·m^{-2}·s^{-1}. The nutrient limitation phase lasted 96 h and samples were collected every 24 h.

Industrial wastewater

The industrial wastewater (WW) used for this objective was collected from a cleaning product manufacturing plant based in Victoriaville's industrial park (Victoriaville, Quebec, Canada). This WW was selected based on Cinq-Mars et al. (2022), who assessed phytoremediation performances of the VERTECH consortium on a mix of WW from different factories in the same industrial park. While the other WW in that study originated primarily from the dairy industry and were rich in nitrogen and phosphorus, the industrial cleaning product WW contained only traces of nitrogen. Therefore, they were chosen to test the hypothesis that nitrogen limitation to enhanced starch accumulation. However, the industrial cleaning products WW contains many antimicrobial compounds, limiting its use

to a maximum of 10% (v/v) in cultures to avoid inhibiting consortium growth [17]. Accordingly, 5% and 10% (v/v) of the industrial cleaning product WW were added to BBM-N medium in the second phase of the experiment. The VERTECH consortium had no prior acclimation to the WW. Each experiment was performed in triplicate and compared to cultures grown in BBM-N under the same photosynthesis conditions defined in Objective 2.

2.3.2.3Microbial growth and starch accumulation assessments

Growth measurements

Microalgae cell concentration was calculated by performing cell counts using a hemocytometer (Bright-Line) under a phase contrast microscope (Axio Scope A1 from Zeiss, Germany) according to the method described by Guillard and Sieracki [28]. Dry biomass was monitored by adding 4 mL of culture to pre-weighed 5mL centrifuge tubes and centrifuging them at 3,000 g for 5 minutes, then rinsed twice with demineralized water. They were then dried at 60°C until stable weight.

Consortia integrity

To ensure VERTECH consortium stability, its integrity was monitored throughout the experiments. The assessment was performed using the method described by Bourdeau et al. (2017), which allows the detection of potential contaminants such as rotifers or protists. This method also enables the observation of the ratio of microalgae to other visible organisms in the hemocytometer, including fungal hyphae and cyanobacteria. Additionally, as recommended by Cinq-Mars (2021), culture spreads on tryptone soy agar (TSA) and Sabouraud agar were performed at the beginning, middle, and end of each growth stage of the experiments to evaluate bacterial and fungal dynamics in the cultures.

Starch analysis

Starch content was measured based on the method of Brányiková and al. (2011), involving complete hydrolysis with 30% perchloric acid and subsequent colorimetric quantification of the released glucose. Duplicates of 5mL of each sample were analysed.

Total starch productivity in consortium biomass was then calculated using the equation of Yao and al. (2012) as follows:

$$P_s = \frac{DW_t C_{st} - DW_0 C_{s0}}{t}$$

P_s : starch productivity ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

C_s: Percentage of microalgal starch (% w/w)*

DW: Dry weight ($g \cdot L^{-1}$)*

t : Time of cultivation (h)

*The subscript 0 refers to the initial value measured at the beginning of the cultivation period (t = 0 h).

Statistics

To determine the optimal photosynthetic parameters for starch production from the consortium, a response surface model was performed using JMP Student Edition 18 software. The model included starch concentration (g/L) measured at hour 60 of the CCD experiments (table 2). Hour 60 was selected because it corresponded to the last time point at which cultures of all three photoperiods were exposed to light (supplementary data B). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the data.

For the nutrient limitation and wastewater experiments, ANOVA was applied to compare the means of the different treatments. A post-hoc Tukey test ($p < 0.05$) was then conducted to identify significant pairwise differences between treatment means. All statistical analyses were performed using RStudio (version 2023.06.1).

2.3.3 Results and discussion

2.3.3.1 Photosynthesis parameters

Effect analysis according to CCD

To identify the optimal photosynthetic conditions for starch accumulation in the VERTECH consortium, 33 combinations of CO_2 concentration, light intensity, and photoperiod were evaluated using a central composite design (Table 2). Starch

concentration measured at hour 60 was used as the response variable to build the model. The effects of the main photosynthetic factors, as well as their interaction and quadratic terms, were assessed. Non-significant terms were removed to obtain a reduced model containing only statistically significant effects (Figure 1 and Table 4).

The Pareto chart (Figure 5) indicates that light intensity was the most influential factor affecting starch concentration in the VERTECH consortium. This observation is consistent with the literature, as light provides the energy required for photosynthetic carbon fixation and subsequent carbohydrate synthesis [14, 17]. Increased irradiance enhances the production of ATP and NADPH during the light reactions, thereby supporting greater carbon assimilation and starch accumulation when other factors are not limiting [29]. In the present study, the highest light intensity tested (500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) resulted in enhanced starch accumulation. The absence of a significant quadratic effect suggests that photoinhibition was not reached within the tested range. Therefore, exploring higher irradiance levels could help determine whether starch accumulation continues to increase or whether a saturation or inhibitory threshold exists for the consortium.

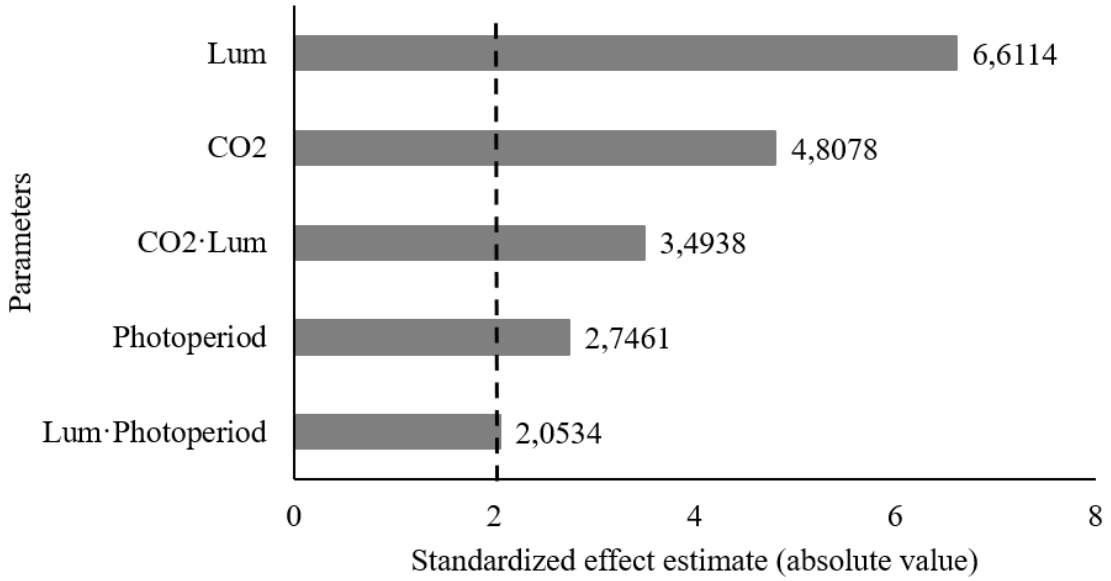


Figure 5 Pareto chart of standardized effects for starch concentration of the VERTECH consortium at hour 60 of culture. The vertical dashed line indicates the 0.05 significance threshold.

CO_2 concentration was identified as the second most influential factor affecting starch accumulation. Increased CO_2 availability enhances the supply of inorganic carbon

for the Calvin cycle and can stimulate carbon fixation under favorable photosynthetic conditions [14, 15, 19, 29]. Within the tested range, no significant quadratic effect was observed, suggesting that a maximum response was not reached under the experimental conditions and that further optimization is possible. This suggest that higher CO_2 concentration could be tested to further stimulate starch production. However, while elevated CO_2 levels can promote photosynthesis and carbon assimilation, excessively high concentrations may negatively affect growth and photosynthetic performance, mainly due to CO_2 induced acidification of the culture medium [30].

The significant interaction between light intensity and CO_2 concentration indicates that their effects on starch accumulation are not independent. From a physiological perspective, this interaction is expected, as carbon fixation requires both sufficient inorganic carbon and adequate photochemical energy (ATP and NADPH). Increasing CO_2 supply alone cannot enhance starch accumulation if light-driven energy production becomes limiting, and conversely, high irradiance cannot be fully exploited under carbon-limited conditions [29, 31]. This interaction is consistent with the findings of Rao et al., who demonstrated that the optimal CO_2 concentration for *Nannochloropsis oceanica* growth and carbon fixation varies depending on light intensity, highlighting the interdependent effects of irradiance and inorganic carbon supply [32].

Photoperiod was also identified as a significant factor influencing starch accumulation. Continuous illumination positively affected starch concentration, likely by reducing the dark-phase degradation of starch that typically occurs to sustain cellular respiration and metabolic maintenance [33]. This response has been documented in *Chlorella vulgaris* in Brányiková & al. study, where dark periods generate a drop in starch concentration [17].

The significant interaction between light intensity and photoperiod further confirms that starch accumulation is governed by the combined effects of irradiance and exposure duration. From a physiological standpoint, this interaction is expected, as both parameters jointly determine the total daily photon flux received by the culture. While light intensity controls the rate of photosynthetic energy production, photoperiod regulates the duration over which carbon fixation can occur [33]. Consequently, high irradiance

may not lead to maximal starch accumulation if exposure time is limited, and extended photoperiods may not compensate for insufficient light intensity.

Model response obtained from the CCD

To quantitatively describe these combined effects, a response surface model was fitted to the experimental data (Table 3).

Table 3 Estimated regression coefficients, standard errors and significance levels of the fitted linear model for starch concentration

Terms	Estimation	Standard error	T ratio	P value
Constant	-77.8240	18.4818	-4.21	0.0003
CO_2	5.8293	1.1103	5.25	<0.0001
Luminosity	0.1889	0.0276	6.83	<0.0001
Photoperiod	2.8871	0.8336	3.46	0.0018
CO_2·luminosity	0.0280	0.0068	4.12	0.0003
Luminosity·photoperiod	0.0159	0.0056	2.82	0.0088
R^2				0.8046
R^2 adjusted				0.7685

The model explained 77 % of the variability in starch concentration, indicating a strong overall fit. All main effects and interaction terms retained in the model were statistically significant ($p < 0.01$), confirming their contribution to starch accumulation. However, a significant lack-of-fit ($p = 0.0011$) indicates that the model does not fully capture the response surface, suggesting that additional factors or unaccounted sources of variability may contribute to starch fluctuations. For instance, light spectral quality may influence carbohydrate metabolism. Six et al. (2024) reported enhanced starch accumulation in *Chlorella vulgaris* under red light, highlighting the potential importance of spectral composition in regulating carbon storage [12]. Furthermore, the CCD experiments were conducted at three separate time points to evaluate each photoperiod condition. Although consortium integrity was monitored through hemocytometer counts and qualitative plate observations (supplementary data C), minor biological shifts may

have occurred between experimental runs. Such variations in community structure could have contributed to variability in starch production. A metagenomic assessment of consortium composition would have allowed a more precise verification of community stability across experimental phases.

The fitted regression equation describing starch concentration of the VERTECH consortia after 60 h as a function of the studied factors can be expressed as:

$$S = -77{,}8240 + 5.8293 \cdot C + 0.1889 \cdot L + 2{,}8871 \cdot P + 0{,}0280 \cdot (L - 300) \cdot (C - 5.04) + 0{,}0159 \cdot (P - 18) \cdot (L - 300)$$

S: starch concentration ($mg \cdot L^{-1}$)

C: CO_2 concentration (%v/v)

L: light intensity ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)

P: hours of light per 24h

The response surface plots derived from the regression model further illustrate the combined influence of the studied factors on starch productivity (Figure 6).

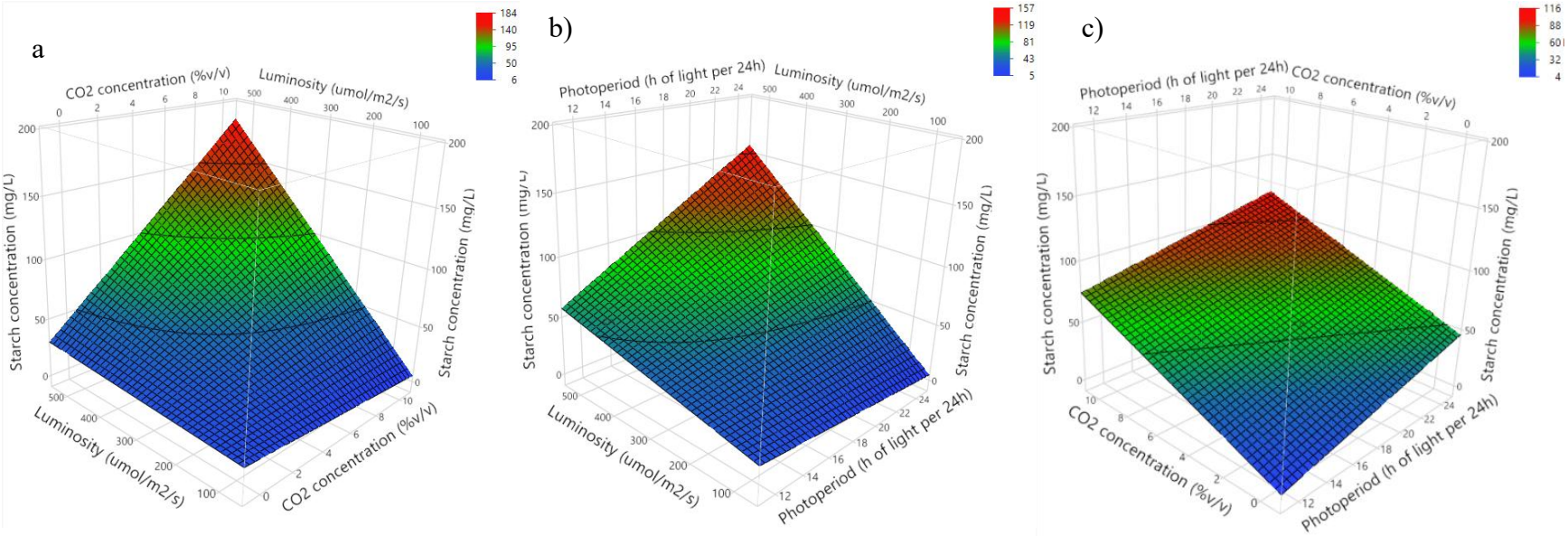


Figure 6 Response surface plots illustrating the predicted starch concentration of the VERTECH consortium as a function of (A) light intensity and CO_2 concentration, (B) light intensity and photoperiod, and (C) CO_2 concentration and photoperiod. Color gradients represent predicted starch concentration ($mg \cdot L^{-1}$)

Across all three response surfaces, starch productivity increased progressively toward the upper ranges of the studied variables. In particular, the highest predicted starch concentrations were observed when light intensity, CO_2 concentration, and photoperiod were simultaneously at their maximum tested levels. In Figure 6a), the surface demonstrates a synergistic increase in starch concentration at high irradiance and high CO_2 concentration, confirming the positive interaction between carbon availability and photochemical energy supply. Similarly, Figure 6b) shows that extended photoperiod enhances the positive effect of high light intensity, supporting the concept of cumulative daily photon flux influencing carbon storage. Finally, Figure 6c) indicates that CO_2 enrichment combined with longer photoperiod further promotes starch accumulation, although this interaction is less pronounced than those involving light intensity. Overall, the response surfaces confirm that maximal starch concentration within the experimental range studied is achieved under conditions where carbon supply, light intensity, and exposure duration are jointly optimized.

Dynamic starch accumulation

To further investigate temporal dynamics, starch concentration was subsequently monitored over time under the optimal conditions identified for each parameter combination (Figure 7). Results of the other conditions tested, as well as growth monitoring (cell concentration, dry biomass and consortia integrity) are available in supplementary data B, C & D. Under the 12L:12D and 18L:6D photoperiods, starch levels fluctuated over time and remained relatively low throughout cultivation. In contrast, continuous illumination (24L:0D) resulted in a steady increase in starch concentration, ultimately reaching the highest final values. These results emphasize the fundamental difference between light-dark cycles and continuous illumination in regulating starch storage. Increasing CO_2 supplementation further enhanced starch accumulation over time, with the highest concentrations obtained at 10% CO_2. Similarly, increasing light intensity promoted starch production, confirming the strong dependence of carbon storage on photochemical energy supply. Altogether, highest starch concentration was achieved under continuous lighting at 10% CO_2 and 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, reaching 480.15 $mg \cdot L^{-1}$ at hour 72, which represented 21.1% (w/w) of the dry biomass and a productivity of 6.01

$mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. Although the 21.1% starch content is lower than some monocultures, it confirms that the consortium approach can deliver substantial accumulation under optimal photosynthetic parameters. Further improvements may be achievable through additional optimization of cultivation parameters, such as higher CO_2 concentrations, increased irradiance levels, extended cultivation time, or modification of light spectral composition. These results therefore highlight both the current performance and the optimization potential of the VERTECH consortium for enhanced starch production.

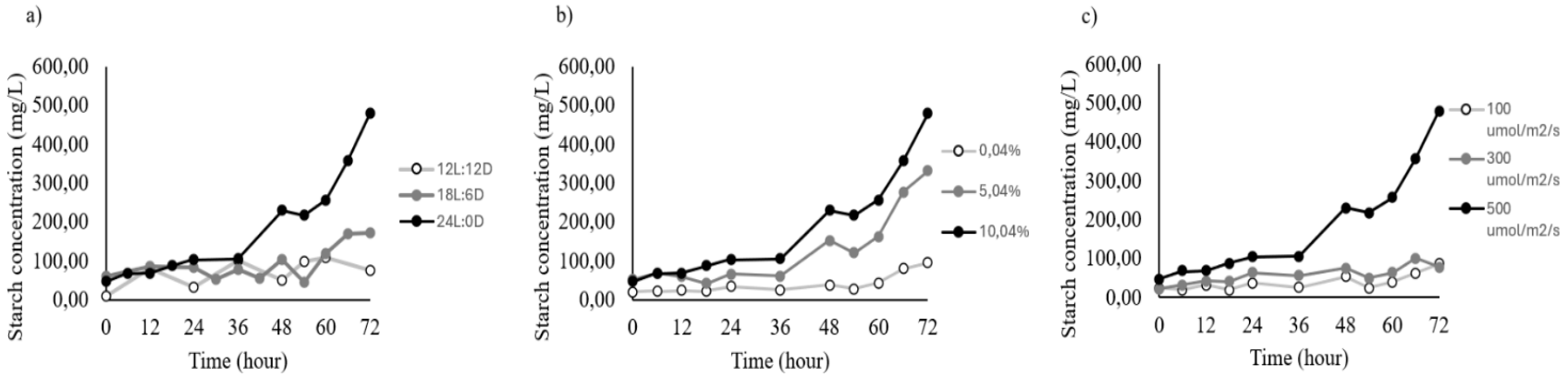


Figure 7 Starch concentration of the VERTECH consortia over the 72-hour period of the experiment for the cultures exposed to a) 500µmol and 10% CO_2 under the three photoperiods tested, b) 24L:0D and 500µmol·m^{-2}·s^{-1} under the three CO_2 concentrations and c) 10%v/v CO_2 and 24L:0D under the three light intensities. Hour 0 was the first illumination hour of each photoperiod.

Since starch content continued increasing under the 24L:0D condition beyond 72 h, extending the cultivation period appears advantageous. Building on these optimized photosynthesis parameters, the subsequent experiments focus on how macronutrient (N, P, S) limitation influences carbon allocation and starch accumulation over a longer (96-hour) period.

2.3.3.2 Effect of nutrient limitations

Based on the optimized photosynthetic parameters established above, the second phase aimed to identify which macronutrient limitation, nitrogen (N), phosphorus (P), or sulfur (S), would most effectively promote starch accumulation in the VERTECH consortium. Therefore, cultures were transferred into modified BBM media lacking one of these nutrients and monitored for 96 hours (Figure 8).

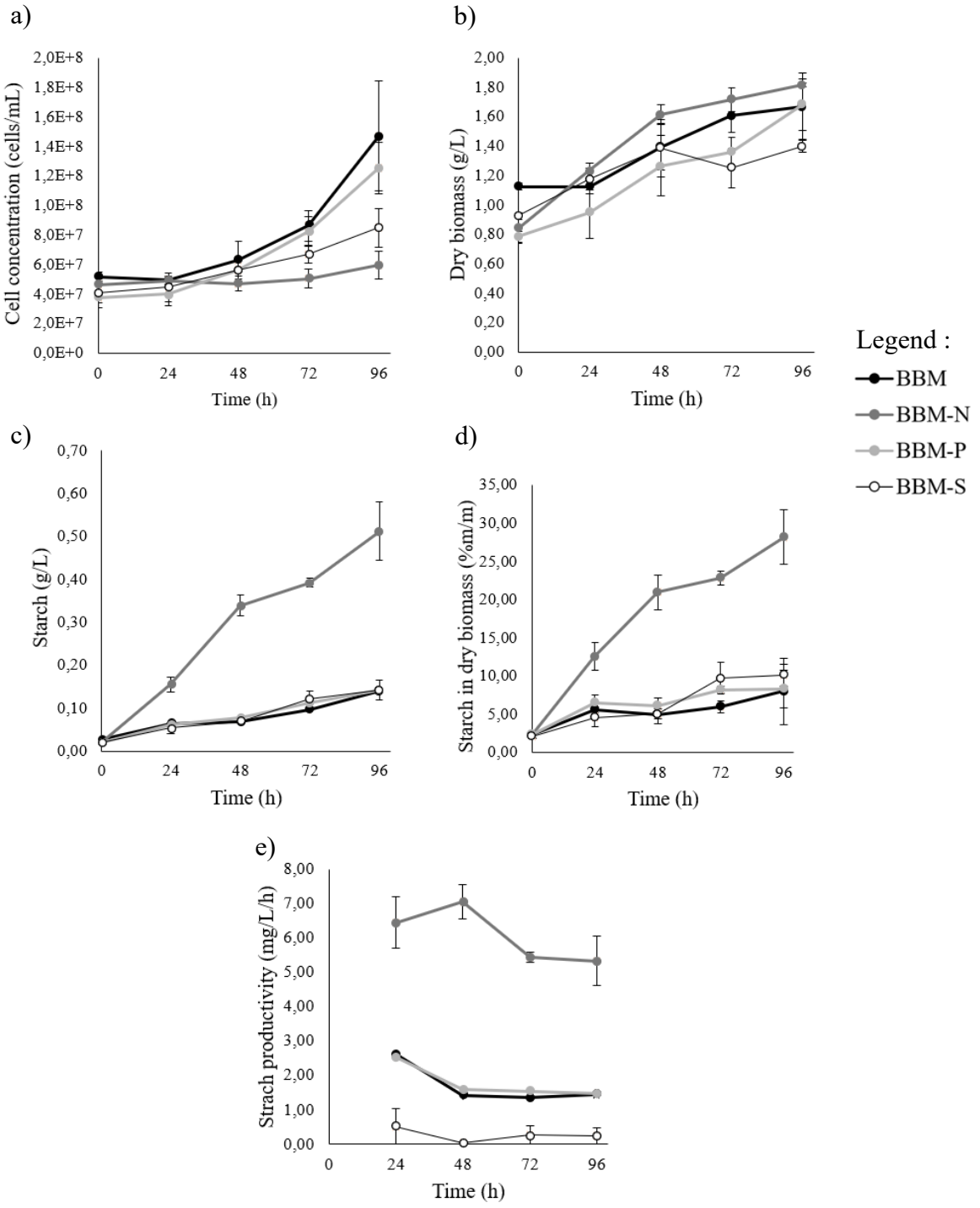


Figure 8 Average of a) cell concentration, b) dry biomass, c) starch concentration, d) percentage of starch in the dry biomass and e) starch productivity, of the triplicates of each treatment described in the legend on the right during the second phase of culture. The error bars represent the standard deviation.

The cell concentration increased in all treatments except for the nitrogen-depleted medium (BBM-N), where growth remained stable (Figure 4a). After 96 hours, control cultures (BBM) reached the highest cell density, while BBM-N cultures exhibited the lowest, with a statistically significant difference ($p = 0.0056$). Nitrogen-deprived cultures also developed a lighter green coloration, consistent with chlorophyll degradation and nitrogen remobilization processes that sustain cell survival under N stress [14].

Dry biomass increased in all treatments (Figure 4b). Interestingly, the highest dry biomass was measured in BBM-N cultures, which produced 0.27 $g \cdot L^{-1}$more biomass than BBM.

Starch concentration increased moderately in BBM, BBM-P, and BBM-S treatments, but much more in BBM-N cultures (Figure 4c). After 96 hours, BBM-N reached a starch concentration of 511.98 $mg \cdot L^{-1}$, approximately 0.4 $g \cdot L^{-1}$higher than the other treatments. Correspondingly, starch content in dry biomass rose sharply under nitrogen limitation (Figure 4d), averaging 28.16 ± 3.53 %DW, while averaging 8.81% DW in the other treatments. Starch productivity followed the same trend, peaking at 7.05 $mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ after 48 hours in BBM-N and remaining the lowest in BBM-S (Figure 4e). Altogether, these results confirm that nitrogen limitation is the most effective trigger for starch accumulation in the VERTECH consortium, while maintaining high biomass concentration.

Upon nitrogen depletion, cells redirect carbon flux toward starch biosynthesis, a well-documented stress response in microalgae. Because nitrogen is essential for protein synthesis and cell division, its limitation slows or stops growth. However, photosynthetic carbon fixation can continue for a certain period, resulting in an excess of fixed carbon that cannot be incorporated into new biomass. This surplus carbon is therefore redirected toward the synthesis of storage compounds, primarily starch [13, 34, 35]. The two-stage cultivation strategy employed effectively combined high starch yield with sustained biomass accumulation.

The experimental starch concentration measured in the BBM control during the nutrient experiment averaged 82.25 $mg \cdot L^{-1}$ (mean of 48 h and 72 h sampling points). According to the response surface model developed at 60 h in the photosynthesis experiment, the predicted starch concentration under identical conditions was 127.65

$mg \cdot L^{-1}$ which was approximately 35.6 % higher than the experimental average. This discrepancy may reflect the fact that the model explained 77% of the variability in starch concentration and exhibited a significant lack-of-fit, validating that it does not fully capture the complexity of the response surface. In addition, starch accumulation dynamics may not be strictly linear between 48 h and 72 h, and physiological differences between the RSM experiment and the independent nutrient experiment could further contribute to this deviation. These findings suggest that while the model reliably describes general trends within the experimental domain, its predictive accuracy decrease when applied outside the specific temporal and experimental framework in which it was developed.

Although the highest starch concentration achieved (511.98 $mg \cdot L^{-1}$) was relatively high, the starch content (28.16% DW) remained lower than that reported for some microalgal monocultures, such as *Chlorella zofingiensis* under nitrogen starvation (43.4%DW) [35]. This discrepancy likely arises from the mixed nature of the consortium: bacteria and fungi contribute to total dry biomass but store carbohydrates as glycogen rather than starch [36, 37]. As a result, the starch fraction appears lower when expressed relative to total biomass. Nonetheless, the presence of these additional microorganisms may confer industrial advantages, such as improved culture stability, nutrient recycling, improved phytoremediation, robustness under stress and easier harvest [20, 23, 24]. However, the presence of bacteria and fungi may reduce starch purity compared to monocultures, potentially requiring additional downstream purification steps, although this trade-off may be acceptable given the improved robustness and stability of consortia-based systems.

These findings highlight nitrogen limitation as a key driver of starch accumulation in the VERTECH consortium, especially when applied after a biomass productive growth phase. They also point to avenues for further optimization, including the simultaneous limitation of multiple nutrients, an approach that has been shown to enhance starch accumulation in *Chlorella salina* [15]. Consequently, the next experimental phase explored the incorporation of industrial WW in the second phase of culture.

2.3.3.3 Effect of wastewater

To evaluate the effect of wastewater (WW) on starch production in the VERTECH consortium, cultures were exposed during the second stage to 0%, 5%, or 10% (v/v) of industrial WW from a cleaning product manufacturing plant in Victoriaville mixed with BBM-N medium (Figure 9).

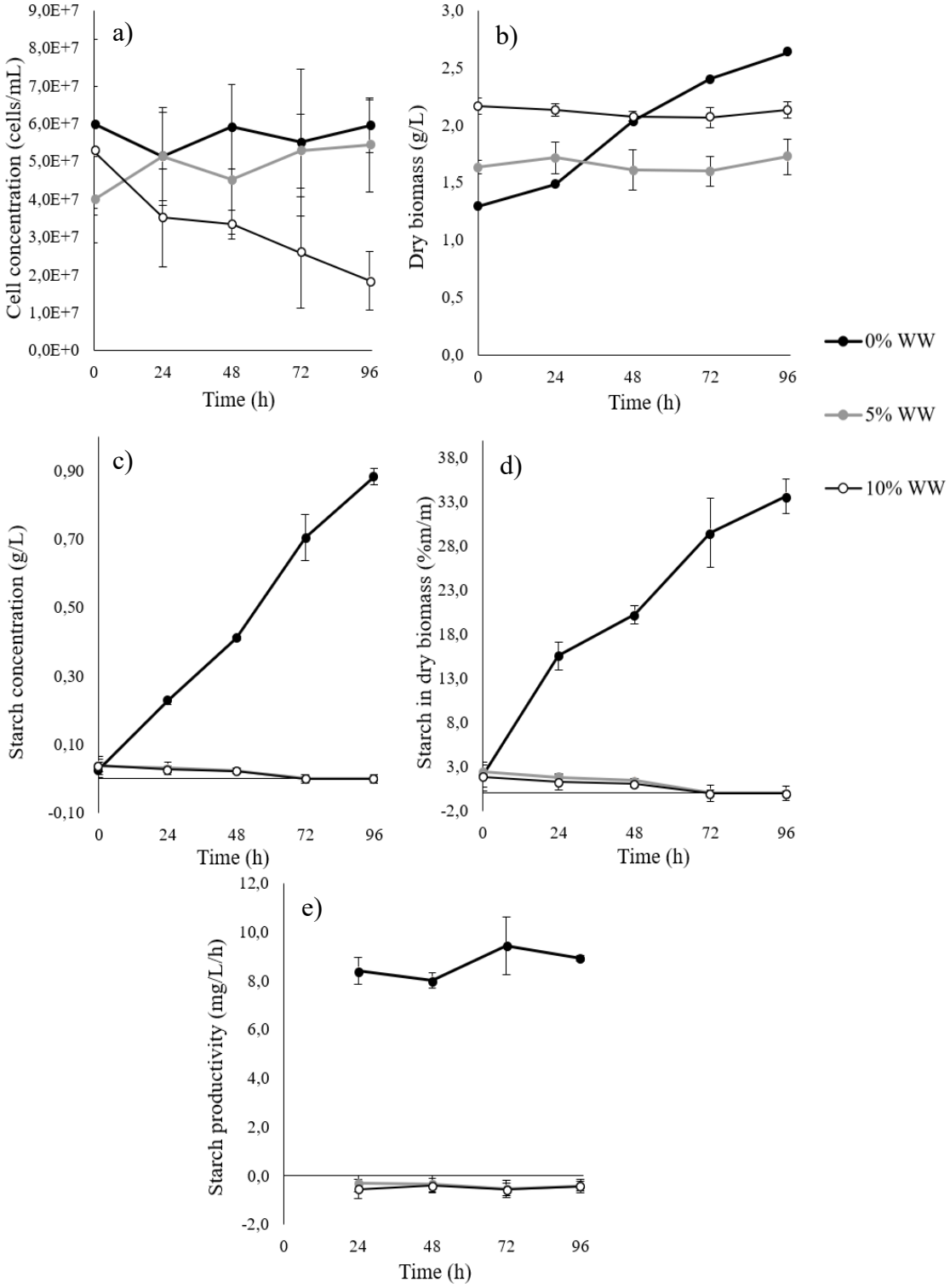


Figure 9 Average of a) cell concentration, b) dry biomass, c) starch concentration, d) percentage of starch in the dry biomass and e) starch productivity, of the triplicates of each treatment described in the legend on the right during the second phase of culture. The error bars represent the standard deviation.

Cultures exposed to only BBM-N (0%WW) showed trends comparable to those observed under the same condition in the nutrient limitation experiment (Figure 9). Indeed, cell concentration stayed stable over 96-hours period, consistent with previous observations. In contrast, dry weight doubled during this time, similar to the previous results, indicating that, despite stable cell density, microalgae accumulated intracellular storage compounds. Starch concentration and starch content both increased markedly in BBM-N cultures, rising from 0.027 $g \cdot L^{-1}$and 1.93% DW at hour 0 to 0.88 $g \cdot L^{-1}$ and 33.64% DW after 96 hours. The final starch concentration was 0.37 $g \cdot L^{-1}$ higher than in the nitrogen-depleted cultures in Figure 4, likely due to the greater initial cell density in this experiment. When normalized to dry biomass, starch content was comparable between the two experiments (Figure 4: 28.16 ± 3.53 %DW; Objective 3: 33.64 ± 1.96 %DW). The consistency of starch accumulation patterns across independent experiments supports the reproducibility of the nitrogen-depletion response in the VERTECH consortium.

Cultures exposed to industrial WW from a cleaning product manufacturing plant showed a clear loss of pigmentation. Microalgae grown in 10% WW turned completely white after only 24 hours, while those in 5% WW became white after 48 hours. Cell concentration decreased sharply in 10% WW but remained relatively stable in 5% WW (Figure 5a). Dry biomass was initially higher in cultures containing WW (Figure 5b), likely due to suspended matter contributing to measured dry weight. This suggests that another method should be used to quantify biomass derived solely from the consortium. Although dry weight remained relatively stable over time, this observation may partly reflect the presence of non-biological particulate matter or cellular debris, rather than true biomass maintenance. Therefore, caution is required when interpreting dry weight trends in WW treatments. Starch concentration and percentage in the WW treatments decreased dramatically after 48 hours, reaching undetectable levels. Starch productivity remained negative throughout the entire experiment.

The integrity of the microalgae-bacteria consortium was also affected by the presence of WW. A reduction of approximately two logarithmic units in bacterial abundance was observed in cultures containing 5% WW, and a three-log reduction occurred at 10% WW. Fungal populations were completely eliminated in both WW

treatments, indicating high sensitivity to the chemical composition of the cleaning product effluent. Microscopic observations revealed that, although the relative proportions of microalgae and cyanobacteria remained constant, the microalgal cells tended to aggregate into small clusters under stress conditions. This morphological change likely reflects an adaptive response to environmental stress, possibly to reduce surface exposure to toxic compounds or to facilitate mutual protection within the consortium [38].

The addition of industrial WW from a cleaning product manufacturing plant completely inhibited starch synthesis, likely due to severe chemical and oxidative stress that caused chlorophyll degradation and photosynthetic arrest, thus stopping starch production. The stable dry weight observed under these conditions indicates a possible repartitioning of intracellular carbon from carbohydrate toward lipid biosynthesis pathways, a well-documented adaptive response to oxidative or nutrient stress in microalgae [10]. This hypothesis should be explored by characterising biomass composition.

Future work should investigate pre-acclimation of the VERTECH consortia to wastewater, as demonstrated by Cinq-Mars et al. (2022), where gradual adaptation to industrial cleaning product WW did not affect chlorophyll content. Furthermore, testing WW sources less chemically intensive than cleaning product effluents, especially those low in nitrogen, could offer more favorable conditions for starch production while contributing to WW valorization. Alternatively, nutrient-rich wastewater (e.g., high in nitrogen and phosphorus) could be used during the first growth stage to support biomass accumulation before applying nitrogen limitation in the second stage to trigger starch synthesis. A longer contact time during this initial phase could also enhance wastewater treatment efficiency and lower production cost.

2.3.4 Implications and potential applications

Although this work provides promising results, several aspects warrant further investigation to fully assess the potential of the VERTECH consortium for starch production. Future studies should aim to optimize cultivation parameters to further

enhance starch accumulation, including photosynthetic conditions (light intensity, CO_2 supply, and spectral quality) as well as culture medium composition. Beyond biological optimization, future research should also address process cost reduction strategies. These may include optimizing light input to balance energy consumption and starch productivity, integrating wastewater streams as nutrient sources, and valorizing industrial CO_2 rich flue gas as carbon inputs. Such approaches could significantly improve the economic and environmental sustainability of the process. In addition, characterizing the physicochemical properties of the produced starch, such as the amylose-to-amylopectin ratio and granule morphology, will be essential to evaluate its suitability for specific industrial applications. Finally, assessing large-scale implementation and conducting technical-economic analyses will be necessary to determine the overall industrial viability of starch production using the VERTECH consortium.

2.3.5 Conclusions

This study demonstrated the potential of the VERTECH indigenous microalgae-bacteria consortium for starch production under controlled photosynthetic and nutrient stress conditions. Using a two-stage cultivation strategy, starch accumulation was significantly enhanced by combining nitrogen limitation, high light intensity (350-500$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), continuous illumination, and elevated CO_2 levels (10%). These conditions triggered stress-induced carbon storage, leading to starch contents exceeding 30% of dry biomass.

Although the industrial WW originating from the cleaning product manufacturing plant did not promote starch accumulation under the tested conditions, likely due to chemical stress impairing photosynthetic performance, these findings should be interpreted as specific to this wastewater type and experimental setup. The results provide valuable insights into the tolerance limits and adaptability of the consortium when exposed to complex industrial effluents. Further investigations are needed to optimize wastewater integration.

Together, these findings confirm that nitrogen limitation and optimized photosynthetic parameters are key factors driving starch biosynthesis in the VERTECH

consortium. The integration of such systems with industrial effluents remains promising but requires additional work.

2.3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank Vicky Alain, Philippe Dorion & Florence Giroux for their technical support. This work was funded by the City of Victoriaville (Municipal research chair for sustainable cities) and MITACS (IT31600).

2.3.7 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

2.3.8 References

1. Li, H., et al., Starch and its derivatives for paper coatings: A review. Progress in Organic Coatings, 2019. 135: p. 213-227.

2. Özden, Ö. and S. Sönmez, Starch usage in paper industry. Research and Reviews in Engineering, 2019. 2019: p. 207.

3. Di Caprio, F., et al., Two stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production. Chemical Engineering Transactions, 2016. 49: p. 415-420.

4. Withers, P.J., et al., Agriculture and eutrophication: where do we go from here? Sustainability, 2014. 6(9): p. 5853-5875.

5. Usubharatana, P. and H. Phungrassami, Carbon footprint of cassava starch production in North-Eastern Thailand. Procedia CIRP, 2015. 29: p. 462-467.

6. Lai, N.Y.G., et al., Toward sustainable express deliveries for online shopping: Reusing packaging materials through reverse logistics. Thunderbird International Business Review, 2022. 64(4): p. 351-362.

7. Moreno-Garcia, L., et al., Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017. 76: p. 493-506.

8. Thomas, D.M., J. Mechery, and S.V. Paulose, Carbon dioxide capture strategies from flue gas using microalgae: a review. Environmental Science and Pollution Research, 2016. 23(17): p. 16926-16940.

9. Olabi, A., et al., Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. Science of The Total Environment, 2023. 854: p. 158689.

10. Zhu, S., et al., The roles of starch and lipid in Chlorella sp. during cell recovery from nitrogen starvation. Bioresource Technology, 2018. 247: p. 58-65.

11. Di Caprio, F., et al., Exploring different processes for starch extraction from microalgae and synthesis of starch-chitosan plastic films. Bioresource Technology, 2024. 413: p. 131516.

12. Six, A., et al., Red light induces starch accumulation in Chlorella vulgaris without affecting photosynthesis efficiency, unlike abiotic stress. Algal Research, 2024. 80: p. 103515.

13. Klein, U., Intracellular carbon partitioning in Chlamydomonas reinhardtii. Plant physiology, 1987. 85(4): p. 892-897.

14. Ran, W., et al., Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. Bioresource Technology, 2019. 291: p. 121894.

15. Chong, J.F., et al., Two-stage cultivation of the marine microalga Chlorella salina for starch and carbohydrate production. Aquaculture International, 2019. 27: p. 1269-1288.

16. Dragone, G., et al., Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. Applied energy, 2011. 88(10): p. 3331-3335.

17. Brányiková, I., et al., Microalgae—novel highly efficient starch producers. Biotechnology and bioengineering, 2011. 108(4): p. 766-776.

18. Rehman, Z.U. and A.K. Anal, Enhanced lipid and starch productivity of microalga (Chlorococcum sp. TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production. Biotechnology Reports, 2019. 21: p. e00298.

19. Cheng, D., et al., Improving carbohydrate and starch accumulation in Chlorella sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. Biotechnology for biofuels, 2017. 10(1): p. 1-14.

20. Zhang, B., et al., Microalgal-bacterial consortia: from interspecies interactions to biotechnological applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020. 118: p. 109563.

21. Ramanan, R., et al., Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. Biotechnology advances, 2016. 34(1): p. 14-29.

22. Dai, C. and F. Wang, Potential applications of microalgae–bacteria consortia in wastewater treatment and biorefinery. Bioresource Technology, 2024. 393: p. 130019.

23. 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.

24. Serrano-Blanco, S., et al., Isolation and characterisation of a native cyanobacteria for a microalgal consortium producing PHAs in agrifood residues. Algal Research, 2025. 89: p. 104030.

25. Palacios, O.A., et al., Influence of tryptophan and indole-3-acetic acid on starch accumulation in the synthetic mutualistic Chlorella sorokiniana–Azospirillum brasilense system under heterotrophic conditions. Research in Microbiology, 2016. 167(5): p. 367-379.

26. Tavakol, M. and F. Naeimpoor, Single and co-cultivation of Chlorella vulgaris and Pseudomonas aeruginosa: Efficient nutrient removal and lipid/starch formation by photoperiodic co-culture. Bioresource Technology, 2025: p. 132983.

27. Cinq-Mars, M., et al., Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization. Algal Research, 2022. 62: p. 102628.

28. Andersen, R.A., Algal culturing techniques. 2005: Elsevier.

29. Lehninger, A.L., Lehninger Principles of Biochemistry: David L. Nelson, Michael M. Cox. 2004: Recording for the Blind & Dyslexic New York.

30. Aditya, L., et al., Role of culture solution pH in balancing CO2 input and light intensity for maximising microalgae growth rate. Chemosphere, 2023. 343: p. 140255.

31. Giordano, M., J. Beardall, and J.A. Raven, CO 2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. Annu. Rev. Plant Biol., 2005. 56(1): p. 99-131.

32. Rao, M., et al., Light conditions determine optimal CO2 concentrations for Nannochloropsis oceanica growth with carbon fixation. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022. 10(27): p. 8799-8814.

33. Carvalho, A.P., et al., Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. Applied microbiology and biotechnology, 2011. 89(5): p. 1275-1288.

34. Yao, C., et al., Enhancing starch production of a marine green microalga Tetraselmis subcordiformis through nutrient limitation. Bioresource Technology, 2012. 118: p. 438-444.

35. Zhu, S., et al., Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in Chlorella zofingiensis induced by nitrogen starvation. Applied biochemistry and biotechnology, 2014. 174: p. 2435-2445.

36. Ball, S.G. and M.K. Morell, From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. Annual review of plant biology, 2003. 54(1): p. 207-233.

37. Ruiz, C.A.S., et al., Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems. Algal Research, 2020. 46: p. 101801.

38. Muir, E., et al., Self-aggregation for sustainable harvesting of microalgae. Algal Research, 2024. 83: p. 103685.

2.3.7 Supplementary data

Supplementary data A

Table 4 Complete experimental design matrix for the three-factor central composite design (CCD) evaluating light intensity, CO_2 concentration and photoperiod (n=33)

Experimental number	CO_2 concentration (%v/v)	Light intensity ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	Photoperiod (Light:Dark)
1	0.04	500	12L:12D
2	5.04	500	12L:12D
3	10.04	500	12L:12D
4	0.04	300	12L:12D
5	5.04	300	12L:12D
6	5.04	300	12L:12D
7	5.04	300	12L:12D
8	10.04	300	12L:12D
9	0.04	100	12L:12D
10	5.04	100	12L:12D
11	10.04	100	12L:12D
12	0.04	500	18L:6D
13	5.04	500	18L:6D
14	10.04	500	18L:6D
15	0.04	300	18L:6D
16	5.04	300	18L:6D
17	5.04	300	18L:6D
18	5.04	300	18L:6D
19	10.04	300	18L:6D
20	0.04	100	18L:6D
21	5.04	100	18L:6D
22	10.04	100	18L:6D
23	0.04	500	24L:0D
24	5.04	500	24L:0D
25	10.04	500	24L:0D
26	0.04	300	24L:0D
27	5.04	300	24L:0D
28	5.04	300	24L:0D
29	5.04	300	24L:0D
30	10.04	300	24L:0D
31	0.04	100	24L:0D
32	5.04	100	24L:0D
33	10.04	100	24L:0D

Supplementary data B

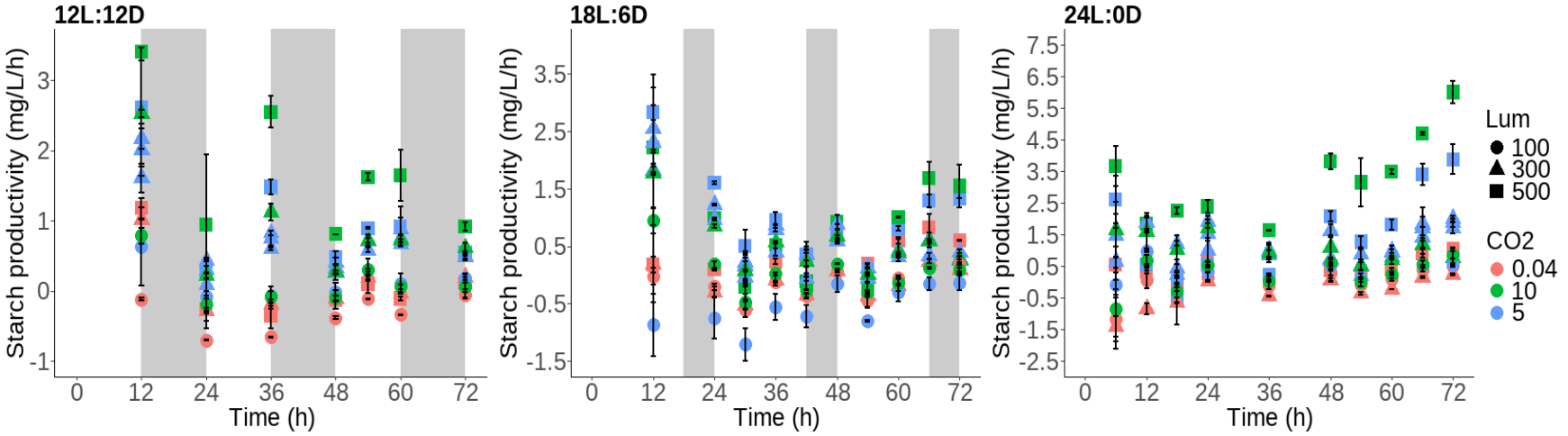


Figure 10 Effect of luminosity (µmol·m^{-2}·s^{-1}), CO_2 concentration (%v/v) and photoperiod over starch productivity of the VERTECH consortia cultures. Dark periods are represented by the grey bars and error bars represent standard deviation

Supplementary data C

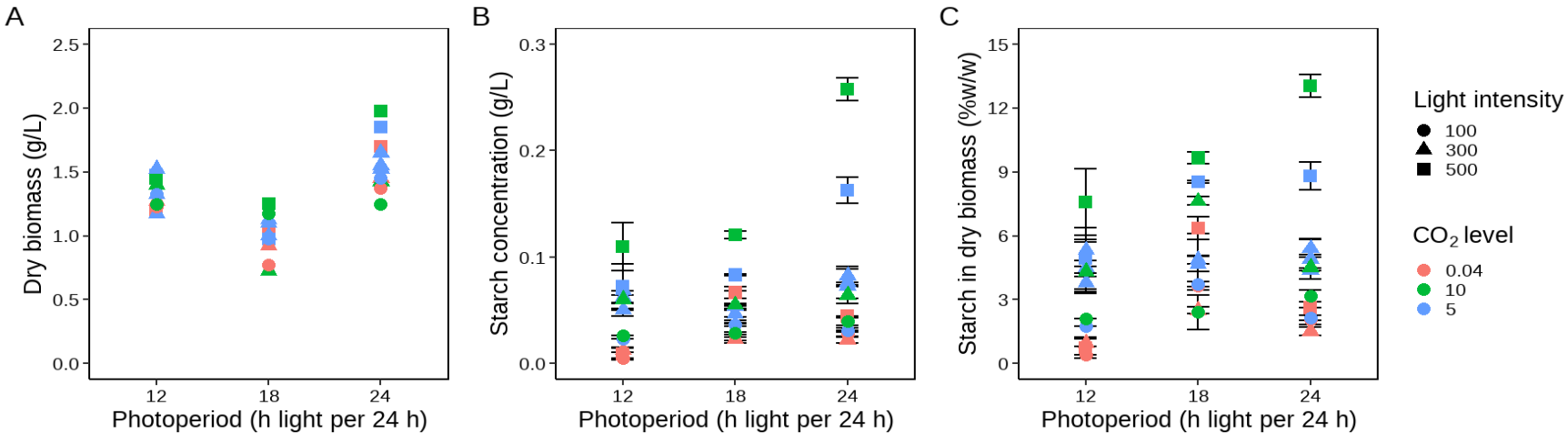


Figure 11 A) Dry biomass, B) starch concentration and C) percentage of starch in dry biomass, of the eleven cultures tested for each photoperiod (12L:12D, 18L:6D and 24L:0D) at hour 60 of the second phase of the experiment. Every culture had a different combination of light intensity (100, 300 or 500µmol·m^{-2}·s^{-1}) and percentage of CO_2 injected (0.04%, 5% or 10% v/v) as shown in Table 3. Error bars represent the standard deviation.

Supplementary data D

Table 5 Consortia integrity at the end of the second phase of growth (hour 72) of the photosynthesis experiment.

Photoperiod (Light :Dark)	CO_2 (%v/v)	Luminosity ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	Consortia integrity (%)
12L :12D	10.04	500	99.8
12L :12D	10.04	300	99.9
12L :12D	10.04	100	99.9
12L :12D	5.04	500	99.9
12L :12D	5.04	300	99.9
12L :12D	5.04	300	99.8
12L :12D	5.04	300	99.9
12L :12D	5.04	100	99.9
12L :12D	0.04	500	99.9
12L :12D	0.04	300	99.9
12L :12D	0.04	100	99.8
18L :6D	10.04	500	99.9
18L :6D	10.04	300	99.9
18L :6D	10.04	100	99.9
18L :6D	5.04	500	99.9
18L :6D	5.04	300	99.9
18L :6D	5.04	300	99.9
18L :6D	5.04	300	99.9
18L :6D	5.04	100	99.9
18L :6D	0.04	500	99.9
18L :6D	0.04	300	99.9
18L :6D	0.04	100	99.9
24L :0D	10.04	500	99.6
24L :0D	10.04	300	99.8
24L :0D	10.04	100	99.9
24L :0D	5.04	500	99.8
24L :0D	5.04	300	99.8
24L :0D	5.04	300	99.7
24L :0D	5.04	300	99.8
24L :0D	5.04	100	99.9
24L :0D	0.04	500	99.7
24L :0D	0.04	300	99.8
24L :0D	0.04	100	99.9

Table 6 Consortia integrity at the end of the second phase of growth (hour 96) of the nutrient limitation experiment

Experimental condition	Average consortia integrity (%)
BBM	99.9
BBM-N	99.9
BBM-P	99.9
BBM-S	99.9

Table 7 Consortia integrity at the end of the second phase of growth (hour 96) of the wastewater experiment

Experimental condition	Average consortia integrity (%)
BBM-N	99.9
BBM-N + 5%WW	99.9
BBM-N + 10%WW	99.9

CHAPITRE III

DISCUSSION

3.1 Retour sur la problématique et les résultats

L'industrie des pâtes et papiers est une grande consommatrice d'amidon, lequel constitue un ingrédient clé dans la fabrication des emballages en carton [5, 6]. Or, cet amidon provient majoritairement de cultures végétales terrestres, dont la valorisation industrielle peut entrer en compétition avec les besoins alimentaires et exercer une pression sur les ressources naturelles [8, 9]. Par ailleurs, la consommation d'emballages en carton ne cesse d'augmenter au cours des dernières années, accentuant ainsi la demande mondiale de ce polysaccharide [1]. Dans ce contexte, il devient essentiel d'identifier des sources alternatives d'amidon plus durables.

Les microalgues représentent une avenue prometteuse, puisqu'elles sont capables d'accumuler d'importantes quantités d'amidon tout en présentant des taux de croissance élevés et en nécessitant moins de ressources terrestres que les cultures agricoles traditionnelles [8]. Bien que la production d'amidon par des cultures d'une seule espèce de microalgues ait été largement étudiée dans la littérature scientifique, l'utilisation de consortiums microalgues-bactéries demeure encore peu explorée dans ce contexte. Pourtant, ces consortiums présentent plusieurs avantages pour le développement de procédés à grande échelle, notamment une meilleure stabilité écologique, une plus grande résilience aux variations environnementales, une plus grande production de biomasse et une récolte moins couteuse [43-46]. Ainsi, l'étude de consortiums microalgues-bactéries apparaît pertinente afin d'évaluer leur potentiel comme source alternative d'amidon dans une perspective industrielle.

Le présent projet avait donc pour but d'optimiser la production d'amidon du consortium microalgues-bactéries VERTECH en modulant certains paramètres

photosynthétiques et nutritionnels, tout en évaluant la possibilité d'intégrer la phycoremédiation des eaux usées au processus de production.

Afin de répondre au premier objectif, un plan composite centré à trois facteurs (intensité lumineuse, photopériode et concentration en CO_2) comprenant chacun trois niveaux a été réalisé (Table 2). En raison de contrainte logistique, ce plan d'expérience a été réalisé en trois phases, chacune correspondant à une photopériode distincte. Au total, 33 conditions de culture, incluant les points centraux, ont été testées sur une période de 72 h. À partir des résultats obtenus, un modèle de surface de réponse a été développé afin d'évaluer l'effet des paramètres photosynthétiques sur l'accumulation d'amidon du consortium VERTECH.

Ce modèle, expliquant 77 % de la variabilité observée de la concentration en amidon, a révélé que l'intensité lumineuse, la concentration en CO_2, leur interaction, la photopériode ainsi que l'interaction entre l'intensité lumineuse et la photopériode influencent significativement l'accumulation d'amidon. Le modèle suggère que la concentration d'amidon atteint son maximum lorsque les trois paramètres étudiés se situent à leur valeur la plus élevée dans la plage expérimentale, soit une intensité lumineuse de 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, une photopériode continue et une concentration de CO_2 injecté de 10 % v/v.

Toutefois, aucune relation quadratique significative n'a été observée pour l'intensité lumineuse ni pour la concentration en CO_2. Théoriquement, ces deux paramètres devraient présenter une relation quadratique avec la concentration d'amidon. En effet, une intensité lumineuse trop élevée peut entraîner un phénomène de photoinhibition chez les microalgues, tandis qu'une concentration excessive de CO_2 peut induire un stress cellulaire, affectant négativement le processus de photosynthèse et, par conséquent, la production d'amidon [16, 20, 35]. L'absence de relation quadratique dans le modèle suggère donc que les valeurs maximales testées dans cette étude n'ont pas atteint ces seuils d'inhibition. Il est ainsi possible que des valeurs encore plus élevées d'intensité lumineuse ou de concentration en CO_2 puissent favoriser une plus forte accumulation d'amidon dans le consortium. Cette hypothèse devrait toutefois être validée à l'aide d'un nouveau plan d'expérience incluant une plage de valeurs plus étendue pour ces paramètres.

Par ailleurs, le coefficient de détermination ajusté du modèle (R^2 ajusté = 0,77) indique que celui-ci n'explique pas entièrement la variabilité de l'accumulation d'amidon au sein du consortium. Cette limite pourrait notamment s'expliquer par le fait que le plan d'expérience n'a pas été réalisé simultanément, mais plutôt en trois expériences distinctes. Des points centraux additionnels ont été intégrés dans chacune de ces expériences afin de réduire ce biais expérimental. Toutefois, l'inoculum utilisé pour chaque série d'expériences n'était pas strictement identique et a pu évoluer au fil du temps. Bien que les observations microscopiques des microalgues et cyanobactéries ainsi que les suivis sur gélose des colonies bactériennes et fongiques aient suggéré une stabilité globale du consortium, de légères variations dans sa composition microbienne demeurent possibles. Des analyses métagénomiques plus approfondies, telles que réalisé dans les travaux de Cinq-Mars et al. (2022), auraient permis de confirmer plus précisément la stabilité du consortium au cours des différentes expériences.

D'autres paramètres pourraient également expliquer la variabilité non captée par le modèle. En effet, certains facteurs photosynthétiques connus pour influencer la production d'amidon n'ont pas été inclus dans le plan d'expérience. Par exemple, la qualité spectrale de la lumière est reconnue pour influencer le métabolisme des microalgues. Une étude a notamment montré que *Chlorella vulgaris* produit davantage d'amidon lorsqu'elle est cultivée sous lumière rouge [40].

De plus, il a été observé qu'après 72 h de culture, la concentration en amidon n'avait pas atteint de plateau, ce qui suggère qu'une durée de culture plus longue pourrait permettre une accumulation encore plus importante d'amidon.

Dans un second temps, afin de répondre au deuxième objectif une expérience visant à évaluer l'effet de la limitation en macronutriments (azote, phosphore et soufre) sur l'accumulation d'amidon a été réalisée en utilisant les paramètres photosynthétiques optimaux identifiés lors du premier objectif. Toutefois, l'intensité lumineuse appliquée était légèrement inférieure à la valeur optimale déterminée, soit 350 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ plutôt que 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Les résultats ont démontré que le consortium VERTECH accumule la plus grande quantité d'amidon sous condition de limitation en azote. Dans ces conditions, une concentration d'environ 512 $mg \cdot L^{-1}$ d'amidon a été atteinte après 96 h, ce qui correspond à 28,16 % de la biomasse sèche. Les limitations en phosphore et en soufre

n’ont pas entraîné d’augmentation significative de la production d’amidon par rapport au contrôle contenant l’ensemble des nutriments.

Ces résultats sont encourageants, puisqu’ils démontrent que le consortium VERTECH est capable d’accumuler des quantités importantes d’amidon, même dans des conditions qui ne sont pas encore entièrement optimisées. Plusieurs pistes d’amélioration peuvent toutefois être envisagées, notamment une optimisation plus poussée des paramètres photosynthétiques, l’exploration d’autres limitations nutritionnelles ou de combinaisons de macronutriments, ainsi que l’évaluation de périodes de culture plus longues (supérieures à 96 h).

Enfin, afin de répondre au troisième objectif, l’intégration d’eaux usées industrielles provenant d’une usine de produits nettoyants a été ajoutée à des concentrations de 5 % et 10 % v/v dans le milieu de culture. L’ajout de ces eaux usées n’a toutefois pas permis d’augmenter la production d’amidon du consortium, mais a plutôt entraîné l’effet inverse. En raison de la présence de nombreux composés chimiques dans ces effluents et de l’absence d’acclimatation préalable du consortium, les cellules microalgales ont rapidement perdu leur pigmentation après seulement quelques heures de culture. Ce phénomène peut être attribué à un stress chimique et oxydatif important ayant entraîné la dégradation de la chlorophylle [49]. En l’absence de chlorophylle fonctionnelle, les microalgues ne peuvent plus réaliser la photosynthèse et, par conséquent, produire de l’amidon [23].

Il est toutefois important de souligner que ces résultats sont spécifiques au type d’eaux usées utilisé dans cette étude. L’intégration d’eaux usées dans le processus de production demeure une avenue prometteuse, à condition d’identifier des effluents mieux adaptés à la culture du consortium. Par exemple, des eaux usées contenant moins de composés biocides ou provenant d’industries présentant un profil chimique compatible avec la croissance microalgale pourraient constituer des alternatives intéressantes à explorer.

3.2 Limites et perspectives

Bien que ce projet ait permis d'initier l'optimisation de la production d'amidon par le consortium VERTECH et d'identifier plusieurs paramètres influençant son accumulation, certaines limites demeurent et plusieurs avenues de recherche pourraient être explorées afin d'améliorer davantage le procédé.

Tout d'abord, bien que les résultats obtenus soient prometteurs, des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin d'atteindre des concentrations d'amidon encore plus élevées. L'optimisation réalisée dans ce projet s'est concentrée sur certains paramètres photosynthétiques et nutritionnels, mais d'autres variables pourraient également influencer l'accumulation d'amidon. Tel que mentionné plus haut, la qualité spectrale, la température ainsi que la combinaison de carence de nutriment sont reconnues pour avoir un impact sur la production d'amidon [37, 40].

Au-delà de l'optimisation biologique, le développement d'un procédé économiquement viable représente également un enjeu majeur. En effet, le marché de l'amidon est déjà bien établi et dominé par des sources végétales conventionnelles [7]. Afin que la production d'amidon à partir de microalgues puisse constituer une alternative réaliste, les coûts de production devront être compétitifs par rapport à ceux du marché actuel.

L'intégration d'eaux usées dans le procédé constitue une stratégie prometteuse pour réduire les coûts de culture. Utilisées lors de la phase de production de biomasse, des eaux usées riches en nutriments (notamment en azote et en phosphore) peuvent servir de source alternative à des apports synthétiques, tout en contribuant au traitement biologique des effluents.

Parmi les types d'eaux usées potentiellement intéressants, celles provenant de l'industrie des pâtes et papiers pourraient représenter une option particulièrement intéressante. Ces effluents contiennent généralement des concentrations importantes d'azote, de phosphore et de matière organique dissoute [50]. Leur utilisation comme milieu de culture pourrait ainsi fournir les nutriments nécessaires à la croissance du consortium tout en contribuant au traitement biologique de ces effluents. Une telle approche permettrait également de créer une boucle d'économie circulaire dans laquelle

l'industrie papetière participerait à la production de l'amidon utilisé dans ses propres procédés.

Une autre piste d'optimisation concerne l'approvisionnement en CO_2. Les résultats de ce projet suggèrent que le consortium produit davantage d'amidon lorsque les cultures sont supplémentées avec au moins 10 % v/v de CO_2. Toutefois, l'utilisation de CO_2 pur provenant de bonbonnes de gaz comprimé représente un intrant relativement coûteux. Dans une perspective industrielle, il serait pertinent d'envisager l'utilisation d'effluents gazeux industriels riches en CO_2, tels que ceux provenant de certaines usines. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré la faisabilité de l'utilisation de ces gaz comme source de carbone pour la culture de microalgues [13, 51]. Dans cette optique, l'intégration du procédé en synergie avec l'industrie des pâtes et papiers apparaît particulièrement intéressante, ce secteur constituant une source importante d'émissions de gaz à effet de serre, principalement sous forme de CO_2 issu des procédés de combustion [52]. Une telle approche pourrait contribuer à réduire les coûts de production tout en réduisant les GES et en valorisant des émissions industrielles de CO_2.

Des travaux supplémentaires seraient également nécessaires afin d'évaluer la faisabilité d'un tel procédé à plus grande échelle. Sa mise à l'échelle impliquerait notamment de revoir certaines étapes expérimentales afin de réduire leur coût énergétique et leur complexité opérationnelle. Par exemple, les cultures pourraient être réalisées dans des systèmes non stériles, ce qui simplifierait considérablement les opérations et réduirait les coûts de production. Bien que les environnements non stériles puissent favoriser l'apparition de contaminations, l'utilisation d'un consortium microalgues-bactéries plutôt que d'une culture contenant une seule espèce de microalgue pourrait atténuer ce risque. En effet, les consortiums sont généralement plus robustes et plus résilients face à l'invasion d'espèces indésirables [43].

De plus, certaines étapes de traitement de la biomasse utilisées dans ce projet, comme la centrifugation, sont difficiles à transposer à grande échelle en raison de leur coût énergétique élevé [53]. Des alternatives moins énergivores, telles que la filtration membranaire ou d'autres techniques de séparation adaptées aux cultures microalgales, devraient donc être envisagées dans un contexte industriel [54].

Enfin, avant de pouvoir envisager l'intégration de l'amidon produit par le consortium VERTECH dans l'industrie des pâtes et papiers, plusieurs étapes supplémentaires devront être considérées, notamment en ce qui concerne l'extraction, la purification et la caractérisation du produit obtenu. Contrairement à une culture pure de microalgues, l'utilisation d'un consortium peut complexifier les étapes de récupération du produit d'intérêt dans la biomasse. En effet, la présence d'autres microorganismes dans la biomasse peut entraîner une diminution de la concentration relative du composé cible et augmenter la complexité de séparation et de purification, comme l'ont démontré Fuentes et al. (2016) dans le cas des lipides [55]. De ce fait, le développement et l'optimisation de méthodes efficaces pour séparer et extraire l'amidon de la biomasse mixte seront nécessaires, afin de minimiser les coûts et les pertes de matière.

Une fois l'amidon isolé, il serait important de caractériser ses propriétés physicochimiques, notamment le ratio amylose/amylopectine, la structure des granules d'amidon ainsi que ses propriétés fonctionnelles. Ces analyses permettraient de déterminer si l'amidon produit est directement compatible avec les procédés industriels existants ou si des étapes supplémentaires de conditionnement ou de modification seraient nécessaires avant son intégration dans les applications papetières [29]. L'efficacité et la viabilité économique des procédés d'extraction et de purification de l'amidon représenteront également un facteur déterminant pour l'intégration de ce processus à l'échelle industrielle.

De plus, la stabilité de la composition du consortium est un aspect important à considérer. La composition des communautés microalgales et bactériennes peut évoluer au fil du temps, ce qui pourrait potentiellement influencer la composition et les propriétés de l'amidon produit. À cet égard, l'étude de Cinq-Mars et al. (2022) a montré que la structure du consortium VERTECH cultivé en eaux usées peut se modifier. En effet, les travaux mettent en lumière que celui-ci a évolué en deux consortiums différents, l'un dominé par les microalgues vertes et le second par les cyanobactéries. Ainsi, il serait pertinent d'évaluer l'impact potentiel de ces variations sur la qualité et la composition de l'amidon produit, afin d'assurer une reproductibilité adéquate du procédé à l'échelle industrielle.

3.3 Conclusion générale

Somme toute, les travaux réalisés mettent en lumière que le consortium microalgues-bactéries VERTECH est capable d'accumuler des quantités significatives d'amidon. Même sans optimisation complète du procédé, l'approche de culture en deux étapes a permis d'obtenir une biomasse abondante présentant des concentrations élevées en amidon. En effet, sous forte intensité lumineuse (350 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) en continu, avec une injection de 10% v/v de CO_2 et une limitation en azote, le consortium a atteint des concentrations de près de 30 % dans sa biomasse sèche en amidon. Bien que ces résultats constituent une première base d'optimisation, des travaux supplémentaires seront nécessaires afin d'améliorer davantage la production d'amidon par le consortium.

L'intégration d'eaux usées industrielles issues d'une usine de produits chimiques n'a toutefois pas permis d'améliorer la production d'amidon dans les conditions étudiées. Ce résultat semble fortement dépendant du type d'effluent utilisé, mais ne remet pas en question l'intérêt de cette approche. L'utilisation d'eaux usées demeure une avenue particulièrement intéressante dans une perspective de réduction des coûts et d'empreinte environnementale, et mérite d'être explorée davantage avec d'autres types d'effluents ou conditions expérimentales.

Dans l'ensemble, bien que plusieurs défis subsistent avant d'envisager une application à l'échelle industrielle, notamment en ce qui concerne l'optimisation des conditions de culture, le choix d'effluents adaptés, la mise à l'échelle du procédé, l'extraction ainsi que la purification de l'amidon, les résultats obtenus suggèrent que cette investigation est pertinente. Le potentiel du consortium VERTECH, combiné aux avantages qu'il pourrait offrir en contexte industriel, en fait une piste de recherche prometteuse pour le développement de procédés de production d'amidon plus durables.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lai, N.Y.G., et al., *Toward sustainable express deliveries for online shopping: Reusing packaging materials through reverse logistics.* Thunderbird International Business Review, 2022. **64**(4): p. 351-362.

2. Brányiková, I., et al., *Microalgae—novel highly efficient starch producers.* Biotechnology and bioengineering, 2011. **108**(4): p. 766-776.

3. Kim, Y., J. Kang, and H. Chun, *Is online shopping packaging waste a threat to the environment?* Economics Letters, 2022. **214**: p. 110398.

4. Soava, G., A. Mehedintu, and M. Sterpu, *Analysis and forecast of the use of E-commerce in enterprises of the European Union States.* Sustainability, 2022. **14**(14): p. 8943.

5. Li, H., et al., *Starch and its derivatives for paper coatings: A review.* Progress in Organic Coatings, 2019. **135**: p. 213-227.

6. Özden, Ö. and S. Sönmez, *Starch usage in paper industry.* Research and Reviews in Engineering, 2019. **2019**: p. 207.

7. Vilpoux, O.F. and J.F.S.S. Junior, *Global production and use of starch*, in *Starchy crops morphology, extraction, properties and applications*. 2023, Elsevier. p. 43-66.

8. Di Caprio, F., et al., *Two stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production.* Chemical Engineering Transactions, 2016. **49**: p. 415-420.

9. Withers, P.J., et al., *Agriculture and eutrophication: where do we go from here?* Sustainability, 2014. **6**(9): p. 5853-5875.

10. Di Caprio, F., et al., *Exploring different processes for starch extraction from microalgae and synthesis of starch-chitosan plastic films.* Bioresource Technology, 2024. **413**: p. 131516.

11. Usubharatana, P. and H. Phungrassami, *Carbon footprint of cassava starch production in North-Eastern Thailand.* Procedia CIRP, 2015. **29**: p. 462-467.

12. Toor, M., et al., *Relationship between environment and agriculture: a review.* SunText Rev. Biotechnol, 2020. **1**(2): p. 1-5.

13. Thomas, D.M., J. Mechery, and S.V. Paulose, *Carbon dioxide capture strategies from flue gas using microalgae: a review.* Environmental Science and Pollution Research, 2016. **23**(17): p. 16926-16940.

14. Moreno-Garcia, L., et al., *Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017. **76**: p. 493-506.

15. Olabi, A., et al., *Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy.* Science of The Total Environment, 2023. **854**: p. 158689.

16. Dragone, G., et al., *Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae.* Applied energy, 2011. **88**(10): p. 3331-3335.

17. Cinq-Mars, M., et al., *Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization.* Algal Research, 2022. **62**: p. 102628.

18. Gonçalves, A.L., J.C. Pires, and M. Simões, *A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment.* Algal Research, 2017. **24**: p. 403-415.

19. McGinn, P.J., et al., *Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations.* Photosynthesis research, 2011. **109**(1): p. 231-247.

20. Yen, H.W., et al., *CO2, NOx and SOx removal from flue gas via microalgae cultivation: A critical review.* Biotechnology journal, 2015. **10**(6): p. 829-839.

21. Venkatesan, J., P. Manivasagan, and S.-K. Kim, *Marine microalgae biotechnology: present trends and future advances*, in *Handbook of marine microalgae*. 2015, Elsevier. p. 1-9.

22. Ran, W., et al., *Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients.* Bioresource Technology, 2019. **291**: p. 121894.

23. Reece, J., et al., *Campbell Biologie 4e édition*. 2012: Pearson Education inc. 1458.

24. Kelsay, D.G.a.T., *Biology I Cellular Processes Laboratory Manual*. s.d.: Hillsborough Community College.

25. Pfister, B. and S.C. Zeeman, *Formation of starch in plant cells.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**: p. 2781-2807.

26. Zhang, X., S. Heschl, and J. Liesche, *Resolving subcellular sucrose concentrations in plant tissues.* Journal of Experimental Botany, 2026: p. erag048.

27. Ruiz, C.A.S., et al., *Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems.* Algal Research, 2020. **46**: p. 101801.

28. Aditya, L., et al., *Role of culture solution pH in balancing CO2 input and light intensity for maximising microalgae growth rate.* Chemosphere, 2023. **343**: p. 140255.

29. Gifuni, I., et al., *Microalgae as new sources of starch: Isolation and characterization of microalgal starch granules.* Chemical Engineering Transactions, 2017. **57**: p. 1423-1428.

30. Rehman, Z.U. and A.K. Anal, *Enhanced lipid and starch productivity of microalga (Chlorococcum sp. TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production.* Biotechnology Reports, 2019. **21**: p. e00298.

31. Yao, C., et al., *Enhancing starch production of a marine green microalga Tetraselmis subcordiformis through nutrient limitation.* Bioresource Technology, 2012. **118**: p. 438-444.

32. Zhu, S., et al., *The roles of starch and lipid in Chlorella sp. during cell recovery from nitrogen starvation.* Bioresource Technology, 2018. **247**: p. 58-65.

33. Cheng, D., et al., *Improving carbohydrate and starch accumulation in Chlorella sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution.* Biotechnology for biofuels, 2017. **10**(1): p. 1-14.

34. Lehninger, A.L., *Lehninger Principles of Biochemistry: David L. Nelson, Michael M. Cox*. 2004: Recording for the Blind & Dyslexic New York.

35. Yuan, Y., et al., *Phototropin connects blue light perception to starch metabolism in green algae.* Nature communications, 2025. **16**(1): p. 2545.

36. Carvalho, A.P., et al., *Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.* Applied microbiology and biotechnology, 2011. **89**(5): p. 1275-1288.

37. Chong, J.F., et al., *Two-stage cultivation of the marine microalga Chlorella salina for starch and carbohydrate production.* Aquaculture International, 2019. **27**: p. 1269-1288.

38. Torres-Romero, I., et al., *Chlamydomonas cell cycle mutant crcdc5 over-accumulates starch and oil.* Biochimie, 2020. **169**: p. 54-61.

39. Zhu, S., et al., *Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in Chlorella zofingiensis induced by nitrogen starvation.* Applied biochemistry and biotechnology, 2014. **174**: p. 2435-2445.

40. Six, A., et al., *Red light induces starch accumulation in Chlorella vulgaris without affecting photosynthesis efficiency, unlike abiotic stress.* Algal Research, 2024. **80**: p. 103515.

41. Palacios, O.A., et al., *Influence of tryptophan and indole-3-acetic acid on starch accumulation in the synthetic mutualistic Chlorella sorokiniana–Azospirillum brasilense system under heterotrophic conditions.* Research in Microbiology, 2016. **167**(5): p. 367-379.

42. Tavakol, M. and F. Naeimpoor, *Single and co-cultivation of Chlorella vulgaris and Pseudomonas aeruginosa: Efficient nutrient removal and lipid/starch formation by photoperiodic co-culture.* Bioresource Technology, 2025: p. 132983.

43. Dai, C. and F. Wang, *Potential applications of microalgae–bacteria consortia in wastewater treatment and biorefinery.* Bioresource Technology, 2024. **393**: p. 130019.

44. Ramanan, R., et al., *Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications.* Biotechnology advances, 2016. **34**(1): p. 14-29.

45. Zhang, B., et al., *Microalgal-bacterial consortia: from interspecies interactions to biotechnological applications.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020. **118**: p. 109563.

46. 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.

47. Serrano-Blanco, S., et al., *Isolation and characterisation of a native cyanobacteria for a microalgal consortium producing PHAs in agrifood residues.* Algal Research, 2025. **89**: p. 104030.

48. Makut, B.B., D. Das, and G. Goswami, *Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: A sustainable approach.* Algal research, 2019. **37**: p. 228-239.

49. Koletti, A., et al., *Oxidative stress responses in microalgae: Modern insights into an old topic.* Applied Microbiology, 2025. **5**(2): p. 37.

50. Liang, X., et al., *Sustainable utilization of pulp and paper wastewater.* Water, 2023. **15**(23): p. 4135.

51. Douskova, I., et al., *Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs.* Applied microbiology and biotechnology, 2009. **82**(1): p. 179-185.

52. Bhander, G. and W. Jozewicz, *Universal industrial sectors integrated solutions module for the pulp and paper industry.* Nordic pulp & paper research journal, 2017. **32**(3): p. 375.

53. Zhang, S., et al., *A review on biodiesel production from microalgae: influencing parameters and recent advanced technologies. Front Microbiol 13: 970028*. 2022.

54. Castro-Muñoz, R. and O. García-Depraect, *Membrane-based harvesting processes for microalgae and their valuable-related molecules: A review.* Membranes, 2021. **11**(8): p. 585.

55. Fuentes, J.L., et al., *Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds.* Marine drugs, 2016. **14**(5): p. 100.