



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Chimie*

**Ecole doctorale SDLM**

présentée par

**Cyril Marcilhac**

Préparée à l'unité de recherche GERE  
Gestion environnementale et traitement biologique des déchets  
IRSTEA

---

**Etude des conditions  
de culture d'un  
écosystème  
complexe  
microalgues/  
bactéries :  
Application au  
développement d'un  
procédé d'extraction-  
valorisation des  
nutriments issus des  
digestats.**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 18 décembre 2014**

devant le jury composé de :

**Olivier BERNARD**

Directeur de recherche, INRIA Sophia Antipolis /  
*président, rapporteur*

**Eric FOUILLAND**

Chargé de recherche, CNRS - Ecosym / *rapporteur*

**Cristina GONZALEZ**

Chercheur confirmé, IMDEA Energy Madrid /  
*examineur*

**Bruno SIALVE**

Chargé de projet, INRA Transfert Paris /  
*examineur*

**Julien THUAL**

Ingénieur, ADEME / *examineur*

**Nicolas BERNET**

Directeur de recherche, INRA Narbonne / *co-  
Directeur de thèse*

**Fabrice BÉLINE**

Directeur de recherche, Irstea Rennes / *Directeur  
de thèse*



## **Remerciements**

Je remercie en premier lieu les rapporteurs de cette thèse, Olivier Bernard et Eric Fouilland, ainsi que les examinateurs, Cristina Gonzalez, Bruno Sialve et Julien Thual, pour avoir accepté de faire partie de mon jury et de lire mes travaux.

Un grand merci à Fabrice Béline (directeur de thèse) pour le temps qu'il a su m'accorder. Je sais que ça n'a pas dû être facile pour toi avec les obligations de ta prise de position de directeur d'unité, de l'arrivée de ton troisième enfant, de l'encadrement de la thèse de Faustine, et de toutes les autres choses. C'était très agréable de se sentir épaulé, ton optimisme a bien souvent permis d'apaiser mes doutes. Heureusement que tu étais là pour restructurer quelque peu les chapitres et les formulations !

Merci aussi à Nicolas Bernet, mon co-directeur de thèse, pour avoir activement participé aux comités de pilotage et pour le temps consacré à la correction de ce manuscrit et des articles.

Je tiens aussi à remercier Anne-Marie Pourcher et Bruno Sialve qui ont tous deux aidé à réfléchir sur ce travail lors des comités de pilotage. Merci Bruno entre autre pour le temps que tu m'as accordé à Narbonne pour la « formation microalgues » et merci aussi à Enrica. Anne-Marie, merci à toi pour l'initiation à la microbiologie et pour les bons clafoutis (sans lait).

Je tiens à remercier José Martinez, directeur régional du centre de Rennes, pour m'avoir accueilli au sein du centre ainsi que Philippe Duchêne, chef du département Ecotechnologies, de s'être laissé convaincre par Fabrice et d'avoir finalement accepté un projet sur les microalgues.

Je remercie Julien Léaustic et Christelle Blouet pour leur contribution à ce travail dans le cadre de leur stage sur la microbiologie et biologie moléculaire ainsi que sur l'étude de l'influence du carbone inorganique respectivement.

Ce projet aurait été impossible sans le soutien financier d'Irstea, de la région Bretagne et de l'ADEME, je les remercie donc.

Un grand merci à tous les collègues pour la bonne ambiance qui règne à Irstea et qui donne envie d'y rester et pour l'aide qu'ils m'ont apportée, notamment à Amaury, Arnaud, Céline, Christine, Julie, Nicolas, Pascal, Sophie, ainsi que tous ceux qui ne sont pas nommés car la liste serait trop longue mais ils se reconnaîtront. Et bien sûr je remercie les doctorants, post-doctorants et CDD pour les pauses et repas « instructifs » ainsi que pour les soirées : Axelle, Etienne, Faustine, Jordan, Jérem, Lucas et Sam. Merci aussi aux joueurs de basket pour ces matchs, quand il faisait beau, donc pas si souvent que ça sur l'année...

A mes amis qui m'ont soutenu et encouragé jusqu'au bout, je leur dis merci. Particulièrement, merci à Djo, Jibé, Nico, Patou et Val mes amis de lycée et Adèle, Adrien, Armelle, Fabien, Mareva, Solène, Yaya et Yo mes amis e(n)sipiens. Merci aussi à Christine pour le soutien et les apéros entre voisins. Je remercie très chaleureusement ma famille et ma belle-famille (valeur ajoutée comme dirait Herme), officielle depuis peu, pour leurs encouragements et pour être venus nous voir lorsqu'il nous était impossible de rentrer. Merci donc pour leur bienveillance à Maman et Papa, Mamie et Grand-père, Françoise et Michel, Aurélie et Ju, Pauline et David, Lara et Louis. Je m'excuse auprès de tous les autres membres de ma famille dont je n'extrapolerai pas les prénoms c'est-à-dire mes oncles, tantes, (petit(e)s-)cousin(e)s pour leur inaltérable tendresse (ils/elles se reconnaîtront) et les en remercie.

Enfin, je remercie tendrement Hermeline, ma femme, de m'avoir soutenu et de continuer à me supporter malgré mes défauts ainsi que d'avoir toujours été là pour moi dans la thèse et de manière générale.

## **Liste des communications relatives à cette thèse**

### ***Publications scientifiques***

C. Marcilhac, B. Sialve, A.-M. Pourcher, C. Ziebal, N. Bernet, F. Béline. 2014. Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water Research*, 64, 278-287.

C. Marcilhac, B. Sialve, A.-M. Pourcher, C. Ziebal, N. Bernet, F. Béline. 2014. Control of nitrogen behavior by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate. *Bioresource Technology* – *in press* (DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.022).

### ***Communications affichées***

C. Marcilhac, N. Bernet, B. Sialve, A.-M. Pourcher, A. Trémier, F. Béline. 2013. Recycling of digestate from agricultural anaerobic digestion with microalgae - effect of color of the influent and light. Ramiran, Versailles.

C. Marcilhac, N. Bernet, B. Sialve, A.-M. Pourcher, A. F. Béline. 2014. Recycling of digestate from agricultural anaerobic digestion with microalgae - effect of color of the influent and light on nutrient removal. Journée des doctorants, école doctorale SDLM.



# Table des matières

<i>Remerciements</i> .....	3
<i>Liste des communications relatives à cette thèse</i> .....	5
<i>Table des matières</i> .....	7
<i>Liste des figures</i> .....	14
<i>Liste des tableaux</i> .....	21
<i>Introduction générale</i> .....	23
<b>1. Etat des lieux</b> .....	23
<b>2. Plan de la thèse</b> .....	29
<b>CHAPITRE 1. Etat de l'art</b> .....	31
<b>Sous-chapitre 1. 1. Les filières de méthanisation des effluents d'élevage</b> .....	32
<b>1. Description des processus et des procédés de digestion anaérobie</b> .....	32
1.1. Processus de la digestion anaérobie .....	32
1.1.1. Azote .....	33
1.1.2. Phosphore .....	34
1.2. Mise en œuvre des processus .....	35
1.3. Biogaz .....	37
1.4. Intrants .....	38
<b>2. La méthanisation au sein d'une filière de traitement/valorisation</b> .....	39
<b>Sous-chapitre 1. 2. Généralité biologiques sur les microalgues</b> .....	43
<b>1. Définition</b> .....	43
<b>2. Croissance</b> .....	44
<b>3. Métabolisme</b> .....	45
3.1. Mode de nutrition .....	45
3.2. Photosynthèse .....	46
<b>4. Stœchiométrie</b> .....	48
<b>5. Algues rencontrées en milieu eutrophe</b> .....	49
5.1. Milieux naturels eutrophisés .....	49
5.2. Lisier/digestat .....	50
<b>Sous-chapitre 1. 3. Mise en œuvre de cultures de microalgues</b> .....	52
<b>1. Facteurs abiotiques :</b> .....	52

1.1.	Source de carbone.....	52
1.2.	Besoins énergétiques .....	55
1.3.	Température.....	56
1.4.	Besoin en nutriments .....	57
1.4.1.	Azote.....	57
1.4.2.	Phosphore.....	57
1.4.3.	Métaux .....	59
1.5.	Toxicité.....	60
<b>2.</b>	<b>Facteurs biotiques.....</b>	<b>60</b>
2.1.	Bactéries .....	60
2.2.	Zooplancton et insectes.....	61
<b>3.</b>	<b>Paramètres du procédé .....</b>	<b>62</b>
3.1.	Agitation .....	62
3.2.	pH .....	63
3.3.	Dilution de l'influent .....	64
3.4.	Temps de séjour hydraulique.....	64
<b>4.</b>	<b>Culture de microalgues à grande échelle .....</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>Cultures dans lisier/digestat .....</b>	<b>69</b>
5.1.	Croissance.....	69
5.2.	Epuration.....	71
<b>Sous-chapitre 1. 4. Modélisation de la croissance des microalgues.....</b>		<b>74</b>
<b>1.</b>	<b>Généralités sur la modélisation biocinétique .....</b>	<b>74</b>
1.1.	Présentation de la matrice de Gujer .....	74
1.2.	Bilan matière.....	75
<b>2.</b>	<b>Modélisation de la biomasse algale .....</b>	<b>76</b>
2.1.	Lumière.....	76
2.2.	Autres paramètres environnementaux .....	78
2.2.1.	Carbone inorganique.....	78
2.2.2.	Phosphore.....	79
2.2.3.	Température .....	79
<b>Conclusions et perspectives .....</b>		<b>82</b>
<b>CHAPITRE 2.</b>	<b><i>Matériels et méthodes</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>1.</b>	<b>Pilote de laboratoire .....</b>	<b>86</b>
1.1.	Description.....	86
1.2.	Caractérisation des réacteurs .....	89

1.2.1.	Détermination de temps de séjour .....	89
1.2.2.	Répétabilité du transfert de CO <sub>2</sub> .....	90
1.2.3.	Répétabilité de croissance.....	91
1.3.	Conservation de l'inoculum.....	92
<b>2.</b>	<b>Analyses.....</b>	<b>93</b>
2.1.	Caractérisation de la croissance algale et bactérienne .....	93
2.1.1.	Matières en suspension .....	93
2.1.2.	Densité optique .....	94
2.1.3.	Comptage et observation microscopique .....	95
2.1.4.	Dénombrement des bactéries aérobies cultivables .....	95
2.1.5.	Biologie moléculaire .....	96
2.1.5.1.	Extraction de l'ADN.....	96
2.1.5.2.	Quantification des bactéries totales .....	97
2.1.5.3.	SSCP et clonage sur les microalgues.....	98
2.2.	Caractérisation de l'épuration du milieu.....	100
2.2.1.	Cations & anions.....	100
2.2.2.	Demande chimique en oxygène (DCO).....	101
2.2.3.	Carbone total, inorganique et organique en solution .....	101
2.3.	Mesure du flux de photons photosynthétiques .....	101
<b>3.</b>	<b>Déroulement des expérimentations.....</b>	<b>102</b>
3.1.	Inoculum .....	102
3.2.	Déroulement des expérimentations.....	103
3.2.1.	Chapitre 3 : couleur-lumière .....	105
3.2.2.	Chapitre 4 : phosphore .....	106
3.2.3.	Chapitre 5 : carbone .....	107
3.2.3.1.	Etude des transferts gazeux .....	107
3.2.3.2.	Croissance en photobioréacteurs avec du CO <sub>2</sub> gazeux .....	108
3.2.3.3.	Jar-test.....	109
3.2.4.	Chapitre 6 : SRT .....	109
<b>4.</b>	<b>Calage et simulation .....</b>	<b>111</b>

**CHAPITRE 3.           *Etude et modélisation des interactions entre la lumière et la couleur du digestat sur la dynamique d'un écosystème microalgues/bactéries et la dynamique de l'azote associée***  
**113**

**Sous-chapitre 3. 1.    Caractérisation des digestats..... 115**

**1.           Caractéristiques des unités de méthanisation..... 115**

2.	<b>Caractérisation chimique.....</b>	<b>116</b>
2.1.	Digestats bruts .....	116
2.2.	Phase liquide du digestat .....	117
3.	<b>Caractérisation optique .....</b>	<b>119</b>
<b>Sous-chapitre 3. 2. Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem.....</b>		
<b>122</b>		
1.	<b>Introduction .....</b>	<b>123</b>
2.	<b>Materials and methods.....</b>	<b>125</b>
2.1.	Characterization of digestates.....	126
2.2.	Inoculum .....	126
2.3.	Pilot and methods .....	126
2.4.	Analytical measurements.....	129
2.4.1.	Color of the digestate and light penetration.....	129
2.4.2.	Nutrient analysis .....	129
2.4.3.	Determination of biomass growth.....	130
2.4.4.	Capillary Electrophoresis-SSCP analysis .....	130
2.4.5.	Cloning and sequencing.....	131
3.	<b>Results and discussion.....</b>	<b>132</b>
3.1.	Characterization of the digestate .....	132
3.2.	Biomass growth and nitrogen removal .....	133
3.3.	Light penetration.....	137
3.4.	Interaction of microalgae with nitrifying bacteria .....	138
3.5.	Evolution of communities of microalgae .....	139
4.	<b>Conclusion.....</b>	<b>140</b>
<b>Sous-chapitre 3. 3. Modélisation de la limitation de la lumière.....</b>		
<b>144</b>		
1.	<b>Les modèles de croissance algale.....</b>	<b>144</b>
2.	<b>Substrat lumière .....</b>	<b>145</b>
2.1.	Détermination du coefficient d'atténuation .....	145
2.2.	Calcul de la lumière disponible .....	148
3.	<b>Comparaison des modèles (Contois/Monod) .....</b>	<b>149</b>
<b>CHAPITRE 4. Etude et modélisation de l'influence de la concentration en phosphore et du ratio N/P sur la dynamique d'un écosystème microalgues/bactéries.....</b>		
<b>155</b>		
<b>Sous-chapitre 4. 1. Control of nitrogen behaviour by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate.....</b>		
<b>157</b>		
1.	<b>Introduction .....</b>	<b>158</b>

<b>2.</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>160</b>
2.1.	Inoculum .....	160
2.2.	Experimental set up and methods .....	160
2.3.	Analytical measurement .....	162
2.3.1.	Determination of biomass growth.....	162
2.3.2.	Solid analysis .....	162
2.3.3.	Nutrient analysis in the liquid phase .....	163
2.3.4.	Community analysis .....	163
<b>3.</b>	<b>Results and discussion.....</b>	<b>164</b>
3.1.	Biomass production .....	164
3.1.1.	Microalgae growth .....	164
3.1.2.	Biomass composition .....	165
3.1.3.	Evolution of microalgae communities .....	167
3.2.	Nutrients behaviours .....	169
3.2.1.	Microalgae or bacteria assimilation? .....	169
3.2.2.	Phosphorus .....	169
3.2.3.	Nitrogen .....	170
<b>4.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>172</b>
<b>Sous-chapitre 4. 2. Modélisation de l'influence du phosphore sur la dynamique d'un</b>		
<b>écosystème microalgues/bactéries .....</b>		
<b>1.</b>	<b>Le modèle de Droop .....</b>	<b>175</b>
<b>2.</b>	<b>Simulation du stockage du phosphore.....</b>	<b>176</b>
2.1.	Détermination des paramètres du modèle.....	176
2.2.	Analyse de sensibilité .....	179
<b>3.</b>	<b>Modélisation des interactions microalgues/nitrification liées au phosphore ..</b>	<b>181</b>

<b>CHAPITRE 5.</b>	<b><i>Etude et modélisation de l'influence du carbone inorganique et des</i></b>	
	<b><i>transferts dans un écosystème microalgues/bactéries .....</i></b>	<b>183</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>184</b>
<b>2.</b>	<b>Rappel sur les notions de transfert .....</b>	<b>185</b>
<b>3.</b>	<b>Résultats et discussions de l'étude en bioréacteurs .....</b>	<b>187</b>
3.1.	Etude du transfert du CO <sub>2</sub> .....	187
3.1.1.	Etude en eau claire .....	187
3.1.2.	Etude en conditions process.....	189
3.2.	Influence de la concentration en carbone inorganique .....	190
3.2.1.	Croissance algale .....	190

3.2.2.	Evolution du carbone inorganique .....	192
3.2.3.	Nutriments .....	196
<b>4.</b>	<b>Modélisation de l'impact du carbone inorganique sur la croissance algale en jar-test</b>	<b>198</b>
4.1.	Modèle .....	198
4.2.	Calage et simulation .....	199
<b>5.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>200</b>
<b>CHAPITRE 6.            Influence du temps de séjour des solides sur les mécanismes d'épuration dans un écosystème algues-bactéries.....</b>		
		<b>203</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>204</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>205</b>
2.1.	Batch initial.....	206
2.2.	Croissance des microalgues .....	206
2.3.	Dynamiques de l'azote .....	207
2.4.	Elimination du phosphore.....	212
<b>3.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>214</b>
<b>CHAPITRE 7.            Premiers éléments de dimensionnement et étude de faisabilité d'un procédé de culture de microalgues pour l'extraction et la valorisation des nutriments contenus dans les digestats agricoles .....</b>		
		<b>215</b>
<b>1.</b>	<b>Définition du système considéré.....</b>	<b>216</b>
1.1.	Caractéristique de l'élevage et du système de méthanisation.....	216
1.2.	Description du procédé de culture de microalgues étudié .....	217
1.3.	Flux de lumière disponible .....	217
1.4.	Gaz d'échappement comme source de carbone.....	219
1.5.	Thermique des bassins et réutilisation de la chaleur excédentaire .....	222
1.6.	Densité optique du milieu .....	225
<b>2.</b>	<b>Simulation numérique de la croissance algale et de l'épuration associée .....</b>	<b>225</b>
<b>3.</b>	<b>Dimensionnement de la filière .....</b>	<b>227</b>
<b>4.</b>	<b>Discussions .....</b>	<b>229</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>		
		<b>231</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		
		<b>241</b>
<b>Sommaire des annexes.....</b>		
		<b>255</b>
<b>Résumé.....</b>		
		<b>267</b>



## Liste des figures

Figure 1 : Schéma de principe du procédé de méthanisation, cogénération et culture algale. ....	26
Figure 2 : Schéma du cycle de l'azote et du phosphore dans le système envisagé.....	27
Figure 3 : Cycle de l'azote dans une culture algale. ....	28
Figure 4 : Processus de la digestion anaérobie (Moletta 2008) .....	33
Figure 5 : Représentation des différents équilibres de l'azote dans le méthaniseur d'après Möller et Müller (2012) .....	34
Figure 6 : Représentation des différents équilibres du phosphore dans le méthaniseur d'après Möller et Müller (2012) .....	35
Figure 7 : Potentiel méthanogène de différents substrats (ADEME 2006).....	39
Figure 8 : Schéma de l'insertion de la digestion anaérobie dans une filière de gestion des effluents d'élevage. ....	40
Figure 9 : Techniques de traitement du digestat (DETEC-OFEN 2009).....	40
Figure 10 : Arbre phylogénétique simplifié d'après Sadava <i>et al.</i> (2011). Les ensembles contenant tout ou partie des algues sont surlignés en jaune, les cyanobactéries en vert. ....	44
Figure 11 : Phases de croissance des cultures algales en batch (Becker 1994). ....	45
Figure 12 : Photosystème I et II et production d'ATP et de NADPH (Boseret) .....	47
Figure 13 : Schéma des réactions de la photosynthèse. Relation entre les réactions photochimiques et le cycle de Calvin (Ray <i>et al.</i> 2006).....	48
Figure 14 : Graphique représentant les ratios molaires et atomiques N:P dans les cellules algales par rapport à ces mêmes ratios dans le milieu de culture (Fulton 2009).....	49
Figure 15 : Utilisation et pertes du dioxyde de carbone fourni aux microalgues (Doucha <i>et al.</i> 2005) .....	53
Figure 16 : Production de biomasse algale en fonction de la consommation de carbone inorganique à partir de données issues de la littérature (Kurano <i>et al.</i> 1995 ; Yun <i>et al.</i> 1997; Wang <i>et al.</i> 2008 ; Ryu <i>et al.</i> 2009 ; Tang <i>et al.</i> 2011 ; Van Den Hende <i>et al.</i> 2011 ). ....	54
Figure 17 : Atténuation de la lumière en fonction de la profondeur dans un réacteur contenant de l'eau distillée , la phase liquide d'un lisier dilué 1 :9 et la phase liquide d'un lisier dilué avec des cellules de <i>Chlorella</i> à une concentration de $2,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ . Les pointillés indiquent une irradiance équivalente ou inférieure au point de compensation pour <i>Chlorella vulgaris</i> ( $5 \text{ W /m}^2$ ). (Fallowfield and Garrett 1985) .....	56
Figure 18 : Diagramme récapitulatif des pools de phosphore des microalgues de lagunes de stabilisation de déchets (Powell <i>et al.</i> 2009).....	59

Figure 19 : A, diagramme de prédominance de l'acide carbonique avec les formes $H_2CO_3$ (bleu), $HCO_3^-$ (rose) et $CO_3^{2-}$ (jaune) ; B, diagramme de prédominance de l'ammonium avec $NH_4^+$ (bleu) et $NH_3$ (rose). .....	63
Figure 20: Evolution de la composition de <i>Scenedesmus sp.</i> en fonction de différents temps de séjour hydrauliques, HRT (Dickinson <i>et al.</i> 2013) .....	65
Figure 21 : Situation géographique des installations de culture de microalgues à grande échelle. ...	66
Figure 22 : Revue de la productivité en fonction de la lumière (A) et de la température (B). .....	71
Figure 23 : Représentation de l'azote éliminé en fonction de la productivité algale de la littérature. La ligne rouge représente 10 % d'azote massique dans la biomasse. ....	73
Figure 24 : Schéma de principe des photobioréacteurs.....	88
Figure 25 : Schéma et photo du pilote de culture de microalgues .....	89
Figure 26 : Réponse expérimentale et théorique de la sortie d'un réacteur à un échelon lors de la détermination de temps de séjour. La courbe théorique est en rose tandis que la courbe expérimentale est en bleu. ....	90
Figure 27 : répétabilité du transfert gazeux dans les réacteurs. ....	91
Figure 28 : Répétabilité de croissance sur les 6 réacteurs.....	92
Figure 29 : Stock de microalgues.....	93
Figure 30 : Spectre d'absorption de la chlorophylle.....	94
Figure 31 : Plaque de Neubauer .....	95
Figure 32 : Dispositif de mesure du flux de photons photosynthétiques dans la culture algale. ....	102
Figure 33 : Image microscopique de l'inoculum.....	103
Figure 34 : Evolution du pourcentage de matières sèches (MS) et de la demande chimique en oxygène (DCO) des phases liquides de 3 digestats agricoles sur 1 an .....	117
Figure 35 : Spectre d'absorption entre 475 et 800 nm de 3 digestats agricoles centrifugés et dilués 10 fois (D1, D2 et D3) provenant de 3 installations différentes. A montre la phase liquide prélevée sur site et son évolution au cours du temps (T1, T2 et T3), B montre la même phase davantage séparée au laboratoire.....	119
Figure 36 : Vérification de la linéarité en fonction de la dilution sur des phases liquides des digestats agricoles (D2).....	121
Figure 37 : Schematic diagram of the experimental set up.....	127
Figure 38 : Absorption spectra between 475 and 800 nm of 3 ten-fold diluted liquid phases of digestates (D1, D2 & D3) from the three different facilities. A shows the liquid phases sampled on site and how they evolved over time (T1, T2 & T3), B shows the same phases after further centrifugation at the laboratory. ....	133

Figure 39 : Microalgae growth over time of the optimal condition considered in this study (O.D. of 0.221 and a light level of $244 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).	134
Figure 40 : Response surface for the reduction of nitrogen assimilation rate (% of maximum NAR) as a function of optical density (O.D.) and light. Blue dots represent experimental points and red lines represent the deviation from the model.	136
Figure 41 : Photosynthetic photon flux (PPF) measured in the digestate matrix of different optical densities containing <i>Scenedesmus</i> sp. The light provided was $240 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and the PPF was measured at 2.3 (A) and 4.8 cm (B) from the surface. Optical densities ranged from 0.22 to 1.36 at 680 nm.	138
Figure 42 : Changes in microalgae communities under different light availability levels. Favorable (A), intermediate (B) and unfavorable (C) light conditions for microalgae were chosen as part of the experimental design. Genera identified were <i>Scenedesmus</i> sp. (▨) and <i>Chlorella</i> sp. (▩). The solid line represents the light measured 4.8 cm from the surface of the culture vessel. T0, T2, T8 and T14 respectively represent the initial, 2nd, 8th and 14th day of the experiment.	140
Figure 43 : Schéma de la mesure du flux de photon à l'intérieur des réacteurs	146
Figure 44 : Couples de concentration en microalgues et densité optique du milieu utilisés pour le calcul du coefficient d'atténuation (A) ; Représentation graphique du coefficient d'atténuation simulé en fonction du coefficient d'atténuation calculé d'après les mesures (B).	147
Figure 45 : Représentation de la méthode de calcul de la variable Lum, utilisée comme substrat des microalgues dans le modèle. La partie gauche montre le découpage de la section du réacteur et après le calcul selon la méthode d'Euler avec la relation de Beer-Lambert et le calcul de la moyenne, la partie droite représentée avec la seule variable Light pour toute la surface.	148
Figure 46 : Flux moyens calculés avec Euler (Light ; carrés bleus) rapportés à la lumière fournie (PPF) et les lignes bleu et roses représentent respectivement la régression polynômiale et les limites de confiance à 95 %.	149
Figure 47 : Exemples de calage sur la concentration en microalgues avec les modèles de Monod et de Contois. High, low et medium correspondent respectivement à une forte lumière en milieu clair, une faible lumière en milieu coloré et un cas intermédiaire.	150
Figure 48 : Boîte à moustaches des comparaisons entre les valeurs expérimentales et calculées de la concentration en azote avec le modèle de Contois (162 valeurs)	152
Figure 49 : Représentation du modèle de croissance de microalgues dans un milieu coloré, intégrant l'influence de la lumière	153
Figure 50 : Evolution of microalgae growth on 14-days for HPC, IPC1, IPC2 and LPC.	165
Figure 51 : Carbon and nitrogen content of biomass at the end of the experiments. a, b, c and d represents statistically different values ( $P < 0.05$ ; Student's t test).	166

Figure 52 : N:P mass ratio in biomass function of N:P ratio in medium.....	167
Figure 53 : CE-SSCP of microalgae communities for HPC and LPC, <span style="color: green;">■</span> represents <i>Chlorella</i> sp. (C) and <span style="color: blue;">■</span> <i>Scenedesmus</i> sp. (S) and C* & S* their respective artefacts. ....	168
Figure 54 : Phosphorus (A) and nitrogen (B) distribution at the end of the experiment. ....	169
Figure 55 : Impact of initial phosphate concentration on nitrification (represented by NO <sub>x</sub> ).....	172
Figure 56 : Evolution du phosphore avec le modèle de Droop non modifié .....	177
Figure 57 : Croissance des microalgues (A) et évolution de la concentration en phosphore (B) expérimentales et simulées pour différentes concentration initiales en P.....	179
Figure 58 : Représentation schématique du modèle intégrant la limitation de croissance par la lumière dans un milieu coloré et le stockage du phosphore. ....	180
Figure 59 : Concentrations en microalgues et en bactéries nitrifiantes (AOB) simulées pour des concentrations initiales en phosphore de 2,5 (min) et 66,7 (max) mg.L <sup>-1</sup> . ....	181
Figure 60 : Modèle des couches limites (pas à l'échelle) selon Langley <i>et al.</i> (2012).....	186
Figure 61 : Cinétique de dissolution de l'O <sub>2</sub> en eau claire et sa représentation en logarithme népérien pour déterminer le k <sub>L</sub> a. ....	188
Figure 62 : Influence du débit d'injection sur le coefficient de transfert.....	188
Figure 63 : Evolution du coefficient $\alpha$ en fonction de la concentration en algues dans le milieu du transfert .....	189
Figure 64 : Evolution de la concentration en microalgues en fonction du temps pour les différents débits d'injection.....	190
Figure 65 : Productivité en biomasse selon le débit.....	191
Figure 66 : Evolution du carbone inorganique du milieu durant la culture pour les différents débits d'injection. ....	192
Figure 67 : Schéma des transferts du carbone dans une culture algale.....	193
Figure 68 : Corrélations de l'évolution du carbone organique dissous en fonction de la densité optique à 680 nm et de la concentration en algues. ....	193
Figure 69 : Evolution du taux de transfert en fonction du temps dans la culture en batch pour le débit Q <sub>2</sub> .....	194
Figure 70 : Taux de transfert (%) en fonction de la teneur en carbone inorganique dissous du milieu. ....	195
Figure 71 : Carbone transféré entre l'injection de CO <sub>2</sub> et la biomasse entre 40 et 65 h de culture en fonction du débit, exprimé en pourcentage et en valeur absolue. ....	196
Figure 72 : Evolution de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> et de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> au cours de la culture algale à différents débits de CO <sub>2</sub> . ....	197

Figure 73 : Evolution du carbone inorganique total en jar-test. Les concentrations sont ajustées manuellement pour fixer 6 niveaux de concentration (C0 à C6). .....	199
Figure 74 : Concentrations en microalgues expérimentales et simulées pour les conditions C0 à C5. ....	200
Figure 75 : Concentration en microalgues dans les 6 réacteurs durant le batch précédent l'étude du temps de séjour des solides. ....	206
Figure 76 : Productivité des microalgues pour les différentes stratégies de temps de séjour des solides. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j <sup>-1</sup> respectivement. ....	207
Figure 77 : Elimination de l'azote en fonction du temps de séjour des solides et de la fréquence d'extraction. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j <sup>-1</sup> respectivement. ....	208
Figure 78 : Mécanismes d'élimination de l'azote estimés pour différentes stratégies d'extraction et temps de séjour hydraulique (A). Devenir de l'azote nitrifié (B). Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j <sup>-1</sup> respectivement.....	209
Figure 79 : Répartition de l'azote oxydé. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j <sup>-1</sup> respectivement. ....	211
Figure 80 : Elimination du phosphore en fonction du temps de séjour des solides et de la fréquence d'extraction. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j <sup>-1</sup> respectivement. ....	212
Figure 81 : Carte de l'irradiation solaire en France (A). Flux de photons photosynthétiques et temps d'ensoleillement moyens mensuels à Rennes (B).....	218
Figure 82 : Rapport de la lumière calculée pour un HRAP de 30 cm sur la lumière calculée pour les photobioréacteurs cylindriques de 10 cm en fonction du coefficient d'atténuation. ....	219
Figure 83 : Schéma des pools de carbone inorganique disponibles rapportés à l'azote à traiter.....	220
Figure 84 : Température moyennes mensuelles à Rennes entre 2000 et 2009 .....	222
Figure 85 : Pertes de surface calculée comprenant la puissance dissipée par évaporation, rayonnement et convection ainsi que la puissance apportée par l'ensoleillement. ....	224
Figure 86 : Evolution de la concentration en biomasse simulée pour un SRT de 4,5 j et 3 fréquences d'extractions (1, 0,5 et 0,33 j <sup>-1</sup> ) pour une D.O. de 0.2 et une lumière de 280 $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . ....	226

Figure 87 : Epuration de l'azote simulé (A,  $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) et concentration en algues à stabilisation (B,  $\text{cells.mL}^{-1}$ ) avec une D.O. de 0,2 et un flux de photons de 280 et de 930  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . .....227

Figure 88 : Schéma de la culture de microalgues. ....228

Figure 89 : Représentation de l'azote éliminé en fonction de la productivité algale de la littérature (losange) et des expérimentations de cette étude (rond). La ligne rouge représente 10 % d'azote massique dans la biomasse.....235



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classement des technologies des procédés selon plusieurs critères d'après Weiland (2013).....	36
Tableau 2 : Composition moyenne du biogaz issu de digestion anaérobie à la ferme (Peu 2011)....	37
Tableau 3 : Composition moyenne des gaz d'échappement suite à la cogénération de biogaz agricole (Edelmann <i>et al.</i> 2001 ; Heck 2003). ....	38
Tableau 4 : Post-traitements envisageables de la phase liquide des digestats (Burton and Turner 2003; DETEC-OFEN 2009 ).....	41
Tableau 5 : Microalgues rencontrées sur milieux eutrophisés (Dabbadie 1992).....	49
Tableau 6 : Espèces de microalgues observées sur lisier et digestat de lisier.....	50
Tableau 7 : Installation de culture de microalgues à grande échelle (Laski and Schwartz ; Benemann and Oswald 1993 ; Ben-Amotz 2011 ; Delrue 2012 ; Titica 2012 ).....	67
Tableau 8 : Revue des concentrations maximales, productivités et taux de croissance spécifique de microalgues développées sur lisier de porc et digestat de lisier de porc.....	69
Tableau 9 : Revue des rendements d'élimination de l'azote et du phosphore à l'aide de microalgues sur du lisier de porc et du digestat de lisier de porc. ....	72
Tableau 10 : Processus, cinétique et stœchiométrie pour la croissance d'une biomasse, d'après Henze et al. (2000). ....	75
Tableau 11 : Modèles intégrant la limitation de la lumière sur la croissance de microalgues d'après Filali (2012).....	77
Tableau 13 : Principales caractéristiques du matériel utilisé sur le pilote .....	86
Tableau 14 : Conditions testées pour les kits QBT et NS.....	96
Tableau 15 : Caractéristiques des amorces utilisées .....	97
Tableau 16 : Composition du mix utilisé pour la quantification par qPCR.....	98
Tableau 17 : Programmation des qPCR.....	98
Tableau 18 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la PCR nichée chlorophyceae.....	99
Tableau 19 : Variation de la méthode pour les différentes expériences. ....	104
Tableau 20 : Composition initiale en macronutriments du milieu de culture (chapitre 3) .....	105
Tableau 21 : Composition initiale en macronutriments du milieu de culture (chapitre 4) .....	106
Tableau 22 : Conception des expériences pour étudier le temps de rétention des solides et la fréquence d'alimentation. ....	110
Tableau 23 : Intrants des unités de méthanisation .....	115

Tableau 24 : Composition en matières sèches et DCO des 3 digestats bruts considérés, valeurs moyennées sur 1 an.....	116
Tableau 25 : Composition chimique de la phase liquide de digestats de lisiers agricoles(en mg/L) .....	118
Tableau 26 : Initial composition of macronutrients of the growth medium .....	128
Table 27 : Mean composition of the liquid phase of the three digestates ( $\pm$ standard deviation)....	132
Tableau 29 : Paramètres cinétiques obtenus à partir de la calibration sur la concentration en microalgues et sur la concentration en azote. ....	151
Tableau 32 : Paramètres du modèle représentant le stockage du phosphore (basé sur Droop) calés manuellement sur la concentration en phosphore et en microalgues.....	178
Tableau 33 : Analyse de sensibilité des paramètres du modèle.....	179
Tableau 34 : Matrice de Petersen représentant l'influence de la lumière et du carbone inorganique sur la croissance algale.....	198
Tableau 35 : Ratio N :P éliminé en fonction des conditions de temps de séjour des solides et de fréquence d'extraction.....	213
Tableau 36 : Calculs de la quantité de CO <sub>2</sub> mobilisable pour la croissance des algues par gramme d'azote des digestats.....	219
Tableau 37 : Calculs de la puissance thermique excédentaire sur site (cas de D2) .....	223
Tableau 38 : Calculs de la puissance dissipée par m <sup>2</sup> de bassin, cas du mois de juin. ....	223
Tableau 39 : Dimensionnement d'une installation basé sur le temps de séjour des solides et sur la lumière pour une densité optique de 0,2 et un flux de photons de 280 $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .....	229
Tableau 40 : Matrice de Petersen du modèle global. ....	237

## **Introduction générale**

Aujourd'hui, la majorité des animaux issus de l'agriculture sont élevés de manière intensive en hors sol ou sur des surfaces réduites. Cette forte densité animale engendre des productions localement importantes d'effluents concentrés, les lisiers, qui sont majoritairement épandus sur les terres arables localisées dans les bassins de production animale afin de fertiliser les cultures, notamment en azote.

### **1. Etat des lieux**

On observe, dans ces bassins de production animale, des problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation des cours d'eau et la formation de marées vertes ou encore la détérioration de la qualité des eaux souterraines. A titre d'exemple, dans le cas de la Bretagne, la concentration moyenne des rivières en nitrates est de 35 mg/L en 2012 tandis que la limite européenne recommandée est de 25 mg/L (Directive n° 75/440/CEE du 16/06/75). Ces concentrations élevées en nitrates sont principalement liées à la gestion des effluents d'élevage produits sur le territoire. En effet, environ 2/3 de l'azote épandu en Bretagne est de l'engrais organique issu des déjections des vaches (57%), porcs (31%) et volailles (12%). De cet azote épandu, 25 kg par hectare en moyenne et parfois jusqu'à 95 kg/ha sont rejetés par an dans les cours d'eau, allant jusqu'à la mer (Ministère français de l'écologie du développement durable et de l'énergie 2010). De plus, au cours de l'épandage de ces déjections et lors de la gestion en amont (bâtiment et stockage), la quantité d'azote émise sous forme d'ammoniac peut atteindre 50 % de l'azote total excrété par les animaux (Portejoie *et al.* 2003). Ces émissions diffuses engendrent des pertes d'azote, des nuisances olfactives ainsi que l'acidification de l'environnement.

Enfin, localement, des engrais minéraux sont également utilisés afin de compenser une partie de ces pertes ou bien lorsque les conditions ne permettent pas l'utilisation de déjections animales. Plus globalement, des quantités importantes d'engrais minéraux sont utilisées et pourraient également être substituées par ces effluents bruts ou transformés. En effet, le prix des engrais minéraux, qui suit le prix de l'énergie, est en constante augmentation. Il pourrait même augmenter plus rapidement que le prix de l'énergie, à cause de la faible concurrence des producteurs d'engrais et de la demande croissante des pays émergents (Peyraud *et al.* 2012). De plus, la production d'engrais minéraux est énergivore et engendre des impacts environnementaux associés importants. Notamment, le cas du phosphore est important car cette ressource est limitée

sur la Terre et ses stocks risquent d'être épuisés d'ici une centaine d'années s'il n'est pas recyclé (Cordell *et al.* 2009).

Les normes concernant l'épandage sont régies au niveau départemental à partir des législations nationale et européenne. Les périodes d'épandage sont réglementées suivant les caractéristiques des effluents (permettant de les catégoriser en types de fertilisants, ratio carbone/azote) et le type d'occupation du sol (prairie ou culture annuelle) et de culture à venir. Globalement un certain nombre d'interdictions d'épandage sont définies suivant le calendrier (activité touristique), le terrain, le matériel et les conditions météorologiques : si le sol est pris en masse par le gel ou abondamment enneigé (sauf solides), si dispositif d'aérodispersion produisant des brouillards fins, sur terrain à forte pente qui entrainerait un ruissellement hors de la zone d'épandage ou encore proche de cours d'eau, de lieux de baignade, de zones de pisciculture ou conchylicoles (code de l'environnement, article R216-8). La fertilisation des sols doit être équilibrée afin d'éviter les ruissellements et les percolations rapides dans les nappes. L'azote organique épandable annuellement est plafonné à 170 kg N-org/ha ; les secteurs dont l'azote épandable est supérieur à cette valeur sont classés en zone d'excédent structurel (ZES). Dans certains cas il peut être nécessaire de définir un territoire en zone à actions complémentaires (ZAC) dont l'apport en azote de toutes origines est limité à 210 kg N/ha. Pour les ZES, des programmes de résorption des excédents d'azote d'origine animal ont été mis en place à partir de 1996. Ils impliquent des réductions d'azote à la source (intrants alimentaires), une réduction du cheptel, une augmentation de la surface épandable par la mise en œuvre de divers procédés et le traitement des déjections pour diminuer la charge azotée. L'objectif de ces mesures étant de passer en dessous du seuil de 170 kg N-org/ha. Le transfert de l'azote vers d'autres territoires est autorisé dans la mesure où ce territoire est à moins de 140 kg N-org/ha. Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2011, un plafond maximal de 95 kg P organique plus minéral a été imposé sur le SDAGE Loire-Bretagne, imposant en plus de la réglementation sur l'azote une limite au phosphore sur les exploitations soumises à autorisation.

Dans les régions d'élevage, les flux d'azote et de phosphore générés par les déjections animales sont trop importants pour être utilisés localement ; une partie doit donc être exportée vers d'autres territoires pour rétablir l'équilibre et valoriser au maximum les nutriments. En effet, ces lisiers liquides, principalement composés d'eau (>90%) et riches en matières organiques, sont difficiles à transporter et l'azote et le phosphore, présents en excès, sont des ressources inutiles sur des zones d'excédent structurel alors qu'ils peuvent être valorisés sur d'autres territoires. La valorisation des effluents d'élevage peut en outre permettre des retombées commerciales dans le cas d'appartenance à des labels tels « agriculture biologique », « labels de qualité » ou encore

« indication d'origine ». Ces labels peuvent être accordés à condition d'un cahier des charges concernant la fertilisation (pas d'engrais minéral) et sont compatibles avec l'épandage d'effluent d'élevage bio (Conseil de l'Union Européenne 2007), dans le cas du label « agriculture biologique » par exemple.

Ainsi, dans le contexte actuel, l'efficacité de l'azote des déjections animales apparaît très limitée du fait des difficultés d'utilisation (hétérogénéité, volatilité de l'azote, quantités localement importantes, ...) et des difficultés de transport (élément soluble et dilué) avec d'une part des impacts environnementaux importants (eutrophisation et acidification) et d'autre part des besoins en engrais minéraux, et donc en énergie, pour compenser les pertes.

Depuis quelques années, la digestion anaérobie (méthanisation) est en développement en France, notamment en ce qui concerne les effluents d'élevage. La méthanisation permet d'abattre une partie de la matière organique avec production de biogaz principalement valorisé dans des moteurs de cogénération permettant de produire de l'électricité et de la chaleur. Plus récemment, l'injection de biogaz épuré directement dans le réseau de gaz naturel se développe également. L'Allemagne et les pays scandinaves sont très avancés dans la maîtrise de ce procédé mais aussi en termes d'implantation avec plus de 7500 unités en Allemagne en 2012 (Fachverband-Biogaz 2013). En France, le gouvernement soutient le développement de la méthanisation sur le territoire, qui commence à s'amorcer (environ 115 unités agricoles/territoriales en fonctionnement fin 2013). La production d'énergie renouvelable et la réduction des émissions de gaz à effet de serre sont des points forts de ce procédé. La digestion anaérobie permet la minéralisation des nutriments, ce qui les rend plus biodisponible, mais dans le cas de l'azote, la forme minéralisée ( $\text{NH}_3$ ) est plus volatile et donc parfois plus difficile à conserver. Les déjections animales représentent un potentiel de valorisation énergétique important, notamment en méthanisation, mais cela représente aussi de forts flux d'azote et de phosphore. Ces flux sont assez mal utilisés à cause des pertes d'ammoniac et de nitrates par exemple (percolation, ruissellement). Donc au-delà des aspects énergétiques, il faut trouver des solutions pour améliorer l'efficacité de ces nutriments et donc chercher des synergies avec la méthanisation pour optimiser le recyclage.

Les solutions actuellement existantes sur le marché en matière de traitement et recyclage des pollutions et des nuisances sont assez coûteuses. On peut par exemple trouver des procédés de concentration tels que le traitement membranaire, le stripping de l'ammoniac avec récupération sous forme de sulfate d'ammonium, la précipitation sous forme de struvite ou encore le séchage. Des solutions de traitement telles que la nitrification-dénitrification sont aussi utilisées, mais elles

ne permettent pas de valoriser les nutriments et, dans cet exemple, représentent des coûts énergétiques associés importants à cause de l'oxygénation pour la nitrification. De plus ces technologies nécessitent des quantités d'additifs (acides, bases, etc.) ou d'énergie (séchage, membranes) importantes. Une solution plus rustique, potentiellement moins onéreuse et plus simple d'exploitation est à envisager.

Ce travail de thèse est donc centré sur le développement d'une alternative, répondant à ces critères, par le biais d'un couplage de la digestion anaérobie à une culture de microalgues autotrophes. Ce type de procédé peut être vu en quatre grandes étapes (voir Figure 1) :

- L'élimination de la partie du carbone biodégradable avec production de biogaz,
- La cogénération avec une production d'électricité, de chaleur et ayant comme déchet le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ),
- L'accumulation des principaux nutriments (N, P & K) dans la biomasse algale ainsi que la séquestration d'une fraction du  $\text{CO}_2$  généré,
- Suite à une séparation liquide-solide : l'utilisation de la biomasse algale sous forme d'engrais (Mulbry *et al.* 2005; De Jesus Raposo and De Morais 2011).

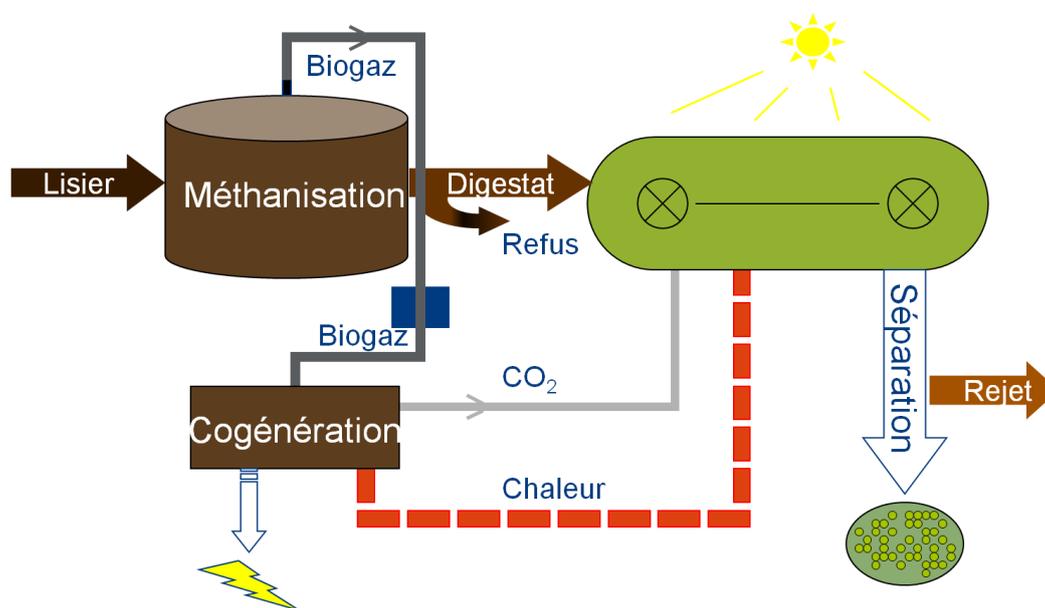


Figure 1 : Schéma de principe du procédé de méthanisation, cogénération et culture algale.

Les microalgues sont capables de capter et d'assimiler les nutriments contenus dans le milieu de culture, notamment l'azote et le phosphore sous forme minéralisée. De plus, elles produisent de l'oxygène lors de la photosynthèse pouvant permettre la nitrification de l'azote excédentaire. Plusieurs voies de valorisation des algues sont envisageables telles que la récupération

de produits à haute valeur ajoutée (comme des molécules pharmaceutiques), la production de biocarburants, la production d'aliments pour l'aquaculture ou l'élevage, ou encore l'utilisation en engrais. Dans une optique d'épuration, la dernière voie est la plus adéquate et la plus facile à mettre en œuvre sur un territoire agricole. Le produit final contient les principaux nutriments et permet de boucler leur retour au sol en réduisant les inconvénients du digestat brut (évaporation, percolation, ruissellement, odeurs, *etc.*) et les difficultés de transport.

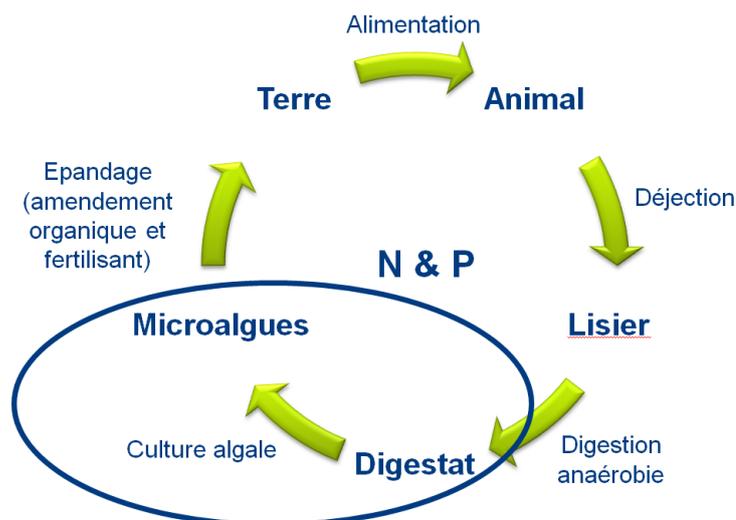


Figure 2 : Schéma du cycle de l'azote et du phosphore dans le système envisagé.

En envisageant une production d'engrais (biomasse algale), les nutriments passent successivement de la terre, aux plantes qui servent à nourrir les animaux, puis sont évacués dans les déjections qui sont méthanisées et les nutriments sont ensuite captés par les microalgues puis épanchés sur les terres (Figure 2). L'excédent de nutriments peut ainsi être exporté hors de la zone d'excédent structurel permettant un meilleur équilibre, avec un produit plus facile à transporter que le digestat et ne présentant pas ses inconvénients, tout en réutilisant les ressources azotées et phosphorées.

Le carbone est aussi réutilisé dans ce système et suit un cycle car le lisier méthanisé produit du biogaz riche en méthane ( $\text{CH}_4$ ) qui sert de source d'énergie à la cogénération. Une fois le biogaz brûlé, les gaz d'échappement sont principalement composés de dioxyde de carbone (et d'eau),  $\text{CO}_2$  qui serait utilisé par les microalgues autotrophes comme source de carbone inorganique. Ces dernières, en retournant au sol apportent un amendement organique.

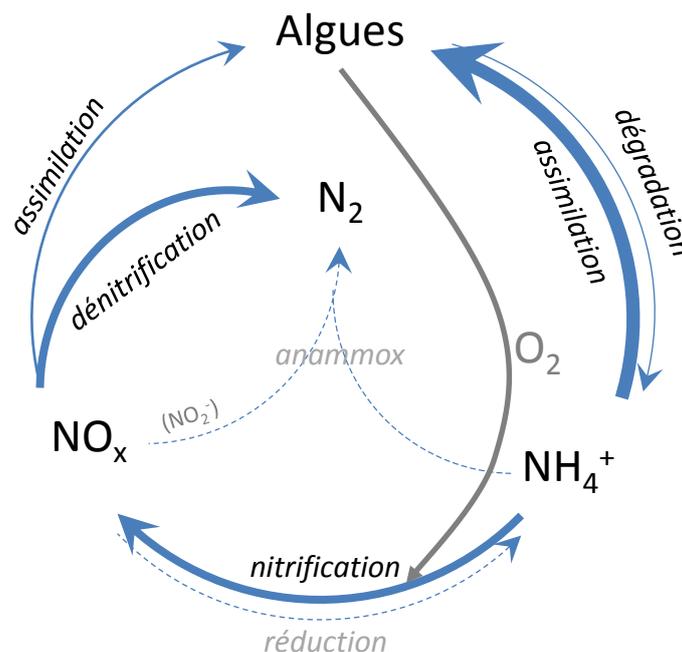


Figure 3 : Cycle de l'azote dans une culture algale.

Bien que l'objectif de ce type de procédé soit de valoriser les nutriments et notamment l'azote, il a été montré que l'assimilation par les microalgues dans ce type de milieu (digestat) est mal connue et souvent surestimée (González-Fernández *et al.* 2011). En effet, dans ce type de procédé non axénique, les bactéries sont présentes et peuvent contribuer pour une forte part à l'élimination de l'azote observée en association avec les microalgues. Plusieurs mécanismes du cycle de l'azote autre que l'assimilation peuvent avoir lieu dans une culture algale, notamment les processus de nitrification-dénitrification. La Figure 3 décrit les différents processus susceptible de se dérouler dans une culture algale avec des bactéries. La nitrification est possible grâce à l'apport d'oxygène par les algues (de Godos *et al.* 2009) et dès que les conditions deviennent anoxiques, la nuit par exemple, la dénitrification peut avoir lieu s'il y a suffisamment de matière organique. Ainsi, suivant les conditions de cultures, une partie importante de l'azote du système peut être éliminée sous forme gazeuse. De plus, d'autres processus du cycle de l'azote peuvent potentiellement se dérouler tels anammox (en anaérobie) ou la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium, mais de manière anecdotique semble-t-il.

La technologie qui semble la plus adaptée à l'épuration, pour faire croître une population algale, est l'utilisation d'un lagunage à haut rendement, HRAP (Oswald 1988). Ce procédé est constitué d'un chenal avec une agitation par roues à aubes avec un rapport surface/volume suffisant pour permettre aux algues d'accéder à la lumière. Les algues doivent être extraites régulièrement pour maintenir une population stable, mais le problème de la séparation liquide-solide reste

important. La taille et la teneur en lipides des microalgues (suivant les conditions) peuvent défavoriser la décantation, utilisée classiquement pour la séparation de la biomasse. La recherche sur les microalgues dans le but de faire des biocarburants étant en plein essor, la question de la séparation y est fréquemment examinée.

## **2. Plan de la thèse**

A la suite de cette introduction, un état de l'art est présenté. Il met en relief les filières actuelles de méthanisation des effluents d'élevage puis traite de la biologie des microalgues et enfin la modélisation biocinétique est présentée et notamment son application à la croissance algale.

Le second chapitre décrit le dispositif expérimental ainsi que les méthodes et les moyens analytiques classiques et ceux développés dans le cadre de ce travail de thèse.

Les quatre chapitres suivant sont focalisés sur les problématiques spécifiques à l'influent étudié et aux conditions de cultures spécifiques à ce type d'influent à travers des travaux expérimentaux et des travaux de modélisation.

Le chapitre 3 est consacré à une caractéristique particulièrement spécifique à l'utilisation de digestat : la pénétration de la lumière. Ce chapitre présente d'abord la caractérisation de ces digestats en termes physico-chimiques et de couleur, puis l'impact de cette couleur et de la lumière sur l'écosystème ont conjointement été étudiés et modélisés.

La problématique du phosphore est ensuite abordée dans le chapitre 4. L'étude de l'influence de la concentration en P sur la culture algale a permis d'aboutir à un modèle décrivant le stockage du phosphore conjointement au modèle développé dans le chapitre 3. Dans ces deux chapitres, les interactions entre microalgues et bactéries ont été soulignées.

Le chapitre 5 regroupe l'étude du transfert du dioxyde de carbone dans la culture et l'impact du CO<sub>2</sub> sur la croissance de la biomasse.

Après l'étude de ces paramètres de culture, le temps de séjour des solides, paramètre de procédé majeur dans les cultures algales, a été investigué dans des conditions semi-continues.

Dans le dernier chapitre, l'intégration de ces résultats permet une première approche de dimensionnement d'une installation de traitement des digestats avec des microalgues. Ce chapitre est plus technique et repose sur un ensemble d'hypothèses mais il permet d'estimer les

caractéristiques d'un tel système de traitement et d'appréhender la faisabilité et les marges de progression envisageables.

Enfin les différents résultats sont regroupés et synthétisés puis ils sont mis en perspectives.

## **CHAPITRE 1. Etat de l'art**

Ce sous-chapitre traite de la digestion anaérobie des effluents d'élevage avec un regard sur les principaux paramètres pouvant influencer le couplage avec un procédé de culture de microalgues : l'évolution des nutriments, les types d'intrants et la qualité du biogaz et des gaz d'échappement. De plus, l'intégration de ce procédé au sein de la filière de traitement est discutée.

## **Sous-chapitre 1. 1. Les filières de méthanisation des effluents d'élevage**

En France, les déjections animales représentent environ 300 millions de tonnes de matière brute par an, parmi lesquels la moitié est directement produite en prairie lors du pâturage (Biomasse-Normandie 2002). Les flux d'azote générés par ces déjections sont de 1820 kt N/an , ce qui correspond à de fortes quantités à gérer et à valoriser (Peyraud *et al.* 2012). Les quantités de matière organique contenues dans ces déjections constituent également un potentiel énergétique important. Au vu de ce gisement, la valorisation énergétique est incontournable et en cours de développement dans le monde avec la digestion anaérobie. Elle permet de plus de réduire les émissions de gaz à effet de serre de ces effluents organiques (Pellerin *et al.* 2013). Cependant, il apparait nécessaire de récupérer l'azote et le phosphore et d'en améliorer l'efficacité en développant des synergies avec la digestion anaérobie.

### **1. Description des processus et des procédés de digestion anaérobie**

#### 1.1. Processus de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie, encore appelée méthanisation, est un procédé visant à transformer la matière organique du substrat en méthane ( $\text{CH}_4$ ) à l'aide de microorganismes en l'absence d'oxygène. La méthanisation est réalisée en quatre étapes majeures : l'hydrolyse, l'acidogenèse, l'acétogenèse et la méthanogenèse. Ces étapes successives permettent de transformer des macromolécules en monomères simples, puis en acides gras et en alcools, ensuite en acétate et hydrogène et enfin en dioxyde de carbone et en méthane (Figure 4).

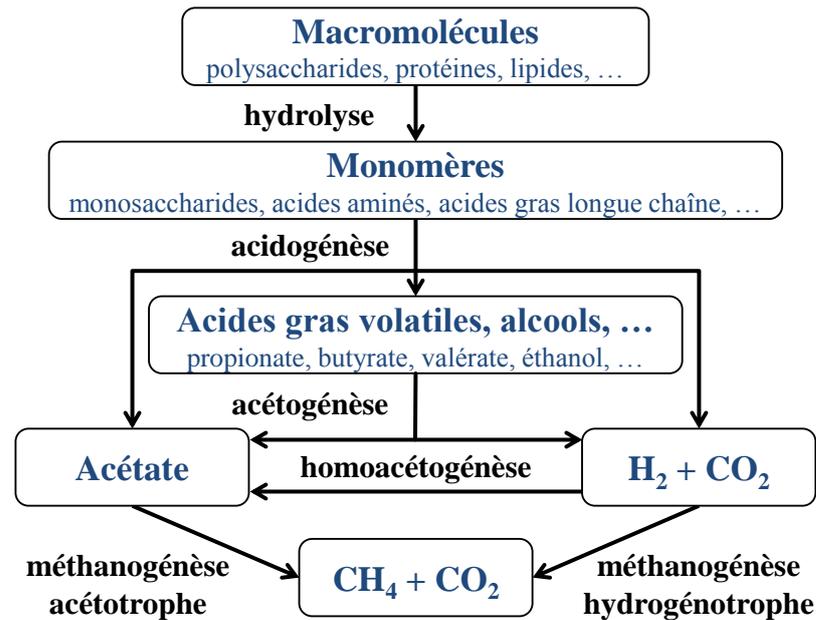


Figure 4 : Processus de la digestion anaérobie (Moletta 2008)

Toutes ces réactions sont catalysées par une biomasse microbienne anaérobie. Les trois premières étapes sont réalisées par des bactéries, tandis que la méthanogénèse est réalisée par des archées.

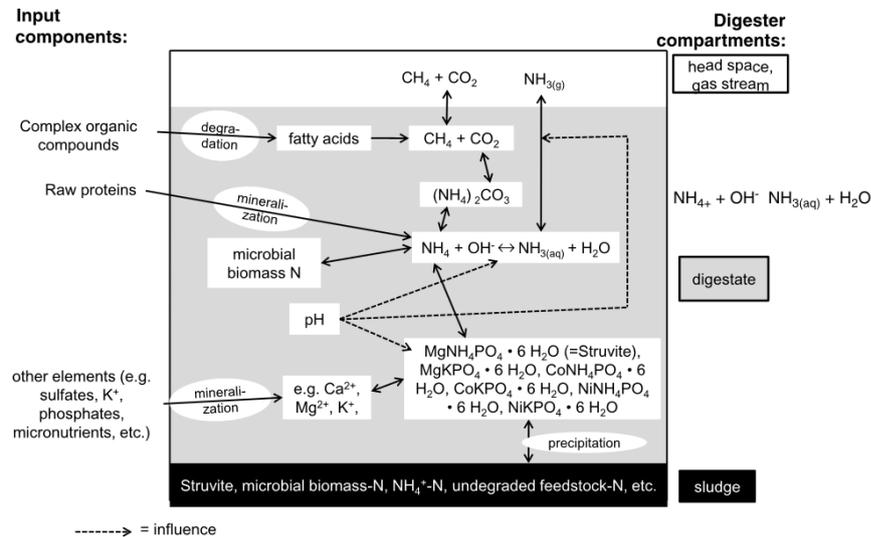
Lors de la digestion anaérobie, les formes de l'N et du P évoluent au cours des processus, la digestion anaérobie conduit alors, outre la production de biogaz, à la minéralisation des nutriments. En effet, lors de la dégradation de la matière organique, une partie de l'N et du P contenus notamment dans les protéines sont libérés sous forme de  $\text{NH}_4^+$  et de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Malgré l'évolution des formes de ces composés, les quantités totales de N et P ne sont pas affectées par le procédé de digestion anaérobie.

### 1.1.1. Azote

Möller et Müller (2012) ont référencé les formes et les équilibres de l'azote dans un méthaniseur (Figure 5). Les différentes réactions biologiques et physico-chimiques sont interdépendantes et majoritairement fonction du pH. Après la minéralisation en  $\text{NH}_4^+$ , l'azote peut être assimilé par la biomasse, précipiter sous forme de sels (carbonates, struvite, etc.) ou encore passer dans la phase gazeuse ( $\text{NH}_3$ ). Comme il peut être observé sur la figure suivante, l'azote peut se retrouver dans la phase liquide ou bien sous forme particulaire.

En termes de bilan sur un digesteur, l'azote est principalement conservé dans la phase liquide (soluble et en suspension), alors que moins d'un pourcent est volatilisé et sort du système

avec le biogaz (Möller and Müller 2012). D'après la littérature, on retrouve dans le digestat environ 20 % de l'azote sous forme solide (sels précipités, biomasse, matière organique particulaire peu biodégradable) alors que la majorité de l'azote est soluble, sous forme d'ammonium (ADEME 2011).

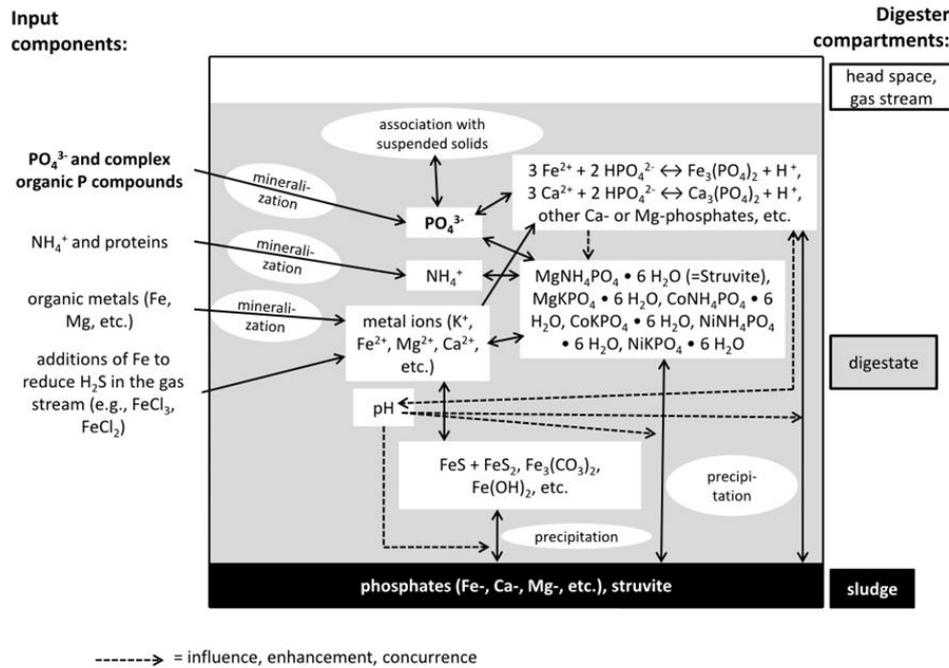


**Figure 5 : Représentation des différents équilibres de l'azote dans le méthaniseur d'après Möller et Müller (2012)**

### 1.1.2. Phosphore

Les différentes formes de phosphate, constituant l'essentiel du phosphore présent, sont en équilibre dans le digestat, principalement sous contrôle du pH (Figure 6). Ces phosphates s'associent avec certains cations tels Fe, Ca, Mg, *etc.* pour former des précipités ou encore des cristaux plus complexes tels la struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ) lorsque le pH atteint des valeurs plus élevées (Capdevielle *et al.* 2013). La matière organique présente a aussi un rôle important en s'associant aux phosphates. Enfin, comme l'azote, le phosphore est utilisé pour la croissance microbienne (Möller and Müller 2012).

Bien qu'en théorie le phosphore soit conservé dans le digestat, certains auteurs indiquent de faibles pertes en P inférieures à 10 % (Schievano *et al.* 2011) sur des bilans sur le méthaniseur, tandis que d'autres observent des pertes jusqu'à 36% (Marcato *et al.* 2008). La raison est probablement la rétention et l'accumulation du phosphore sous forme solide dans le réacteur suite à une précipitation (Möller and Müller 2012).



**Figure 6 : Représentation des différents équilibres du phosphore dans le méthaniseur d'après Möller et Müller (2012)**

A l'inverse de l'azote, le phosphore est principalement sous forme solide dans le digestat brut. Par exemple, Zhang *et al.* (2012) ont observé sur des échantillons de 9 digestats d'origine agricole une moyenne de 70% du phosphore sous forme solide, contre 30 % dans le liquide interstitiel. Ces chiffres peuvent être assez variables suivant les co-substrats et la gestion du méthaniseur. Le pH ayant une forte influence sur les formes du phosphore, ces proportions peuvent varier assez fortement. De plus, Paavola *et al.* (2008) ont montré que le P sous forme solide augmentait au cours du stockage du digestat, réduisant de ce fait la quantité de phosphore soluble disponible. Leur hypothèse est que ce changement a été provoqué par un changement dans la composition chimique des composés se liant au phosphore.

## 1.2. Mise en œuvre des processus

Les différents types de procédé existant ont tous le même objectif de favoriser le développement et l'activité de la biomasse réalisant la digestion anaérobie afin de produire du biogaz.

Les deux principaux types de méthanisation utilisés pour les déjections animales sont la méthanisation par voie liquide et par voie sèche. Ces deux types d'installations peuvent fonctionner en système discontinu (batch) ou en système continu.

De manière générale, les différentes technologies peuvent être classées en fonction de plusieurs critères, dont les principaux sont référencés dans le Tableau 1. Dans le contexte agricole, le système le plus utilisé est la méthanisation en voie liquide en continu, même si la méthanisation par voie sèche en batch est en cours de développement (Moletta 2008). La méthanisation en « voie liquide » est préférée lorsque l'effluent a une teneur en matières sèches inférieure à 15 %, pour des valeurs supérieures, la « voie sèche » est utilisée (Motte *et al.* 2013). Cependant, la teneur en MS n'est pas le seul critère, le type de procédé dépend aussi de la rhéologie des substrats. Les réacteurs de type « infiniment mélangés » (CSTR : continuous stirred tank reactor) sont ainsi les plus couramment rencontrés en méthanisation agricole.

**Tableau 1 : Classement des technologies des procédés selon plusieurs critères d'après Weiland (2013).**

Critères	Caractéristiques distinctives
Teneur en matières sèches dans le fermenteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fermentation par voie liquide</li> <li>• Digestion par voie sèche</li> </ul>
Type de chargement	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Discontinu</li> <li>• Continu</li> </ul>
Nombre d'étapes du procédé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une étape</li> <li>• Deux étapes (plusieurs)</li> </ul>
Température du procédé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mésophile</li> <li>• Thermophile</li> </ul>

Une autre caractéristique importante des réacteurs de digestion anaérobie est la température. On distingue les conditions thermophiles (50-55 °C), mésophiles (30-35 °C) et aussi psychrophiles (5-20 °C) (Verstraete *et al.* 1996). En France, la plupart des digesteurs anaérobies utilisés dans le cadre de traitement d'effluent d'élevage ou des eaux usées sont mésophiles, les conditions psychrophiles étant principalement utilisées dans certains pays comme le Canada (Heduit 1987).

Dans la digestion en voie liquide, un brassage est nécessaire afin de permettre une bonne accessibilité des microorganismes aux différents substrats. Les principaux types de brassage sont des agitations mécaniques (agitateur axial, agitateur entrée latérale, agitateur submersible, agitateur paddelgant, agitateur à pales pour piston), des agitations par le biogaz produit ou un déplacement du digestat par pulsation à travers des grilles perforées (Moletta 2008 ; Weiland 2013).

Par ailleurs, le temps de séjour hydraulique (HRT) théorique varie pour ces installations entre 10 et 35 jours (Burton and Turner 2003 ; Rousseau *et al.* 2008). Cependant, d'après Girault

(2011), les HRT utilisés en pratique sont beaucoup plus long (entre 30 et 50 jours) et le digestat est souvent envoyé vers un post-digesteur qui peut être chauffé ou non.

### 1.3. Biogaz

Un des objectifs principaux de la digestion anaérobie est la production de biogaz afin de produire de l'électricité et de la chaleur par cogénération. L'alternative d'injecter le biogaz sur le réseau se développe, mais la production d'électricité reste le choix le plus représenté (Girault *et al.* 2010).

Le paramètre mesuré pour déterminer la quantité de biogaz maximum que peut produire un substrat en condition anaérobie est le potentiel méthanogène (Biochemical Methanogenic Potential, BMP). La méthode consiste à suivre la production de biogaz (composition et quantité) d'un flacon hermétique contenant un mélange substrat-inoculum éventuellement dilué avec une matrice plus ou moins chargée en éléments nutritifs (ISO). Ce paramètre est utilisé pour dimensionner la filière de valorisation du biogaz (cogénératrice, traitement du gaz).

Le biogaz est composé principalement de méthane et de dioxyde de carbone, mais comporte aussi d'autres gaz minoritaires, résultants de la biodégradation de la matière organique en milieu anaérobie, tels que l'azote moléculaire, l'H<sub>2</sub>S et l'ammoniac. Le biogaz issu d'installation de méthanisation a une composition moyenne décrite dans le Tableau 2, avec un pourcentage volumique de 55 à 70 % en méthane.

**Tableau 2 : Composition moyenne du biogaz issu de digestion anaérobie à la ferme (Peu 2011).**

Gaz	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	NH <sub>3</sub>	Autres gaz
% volumique	55-70 %	30-45 %	0-2 %	100 - 20 000 ppm	~ 100 ppm	traces

Afin d'être utilisé, dans les deux cas, le biogaz doit respecter une certaine qualité. La teneur en H<sub>2</sub>S par exemple est particulièrement importante, puisqu'en se combinant avec de l'eau, ce gaz s'oxyde en acide sulfurique qui détériore génératrices et réseaux. La majorité des constructeurs de d'équipement de valorisation du biogaz issu du secteur agricole garantissent leurs matériels pour des teneurs maximales de 1 à 7 % de H<sub>2</sub>S dans le biogaz (Wellinger and Linberg 2000).

En sortie de combustion, les gaz d'échappement sont principalement composés de dioxyde de carbone (Tableau 3). D'autres composés tels le monoxyde de carbone, le méthane, les oxydes d'azote ou de dioxyde de soufre sont aussi présents, mais à l'état de traces.

**Tableau 3 : Composition moyenne des gaz d'échappement suite à la cogénération de biogaz agricole (Edelmann *et al.* 2001 ; Heck 2003).**

Gaz	CO <sub>2</sub>	CO	CH <sub>4</sub>	NO <sub>x</sub>	SO <sub>2</sub>
% volumique	99.5-99.9 %	5-20 ppm	1-10 ppm	2-16 ppm	0.1-5 ppm

#### 1.4. Intrants

Du fait de leur dilution, la digestion anaérobie des déjections animales seules produit en général de faibles quantités de biogaz par rapport aux volumes des ouvrages nécessaires à la mise en œuvre du procédé. C'est pourquoi il peut être intéressant d'ajouter des co-substrats extérieurs afin d'augmenter la production de biogaz, cela s'appelle la codigestion. Sur les territoires, ces co-substrats ont donc des enjeux économiques, mais aussi législatifs, environnementaux et sociaux. Leur origine est de plusieurs horizons tels des industries agro-alimentaires, des collectivités ou encore des restaurateurs privés ou collectifs ainsi que des grandes ou moyennes surfaces de distribution (ADEME 2006).

Ces différents co-substrats ont un impact direct sur le procédé en termes de production de biogaz, car ils ont généralement un potentiel biométhanogène (BMP) plus élevé que les lisiers. La Figure 7 représente les potentiels méthanogènes de quelques substrats montrant les différences de BMP et donc leur intérêt dans la méthanisation agricole. Néanmoins, certains co-substrats tels les graisses, bien que très énergétiques, sont à modérer pour éviter l'accumulation d'acides gras à longues chaînes qui peuvent inhiber la phase de méthanogenèse (Girault 2011).

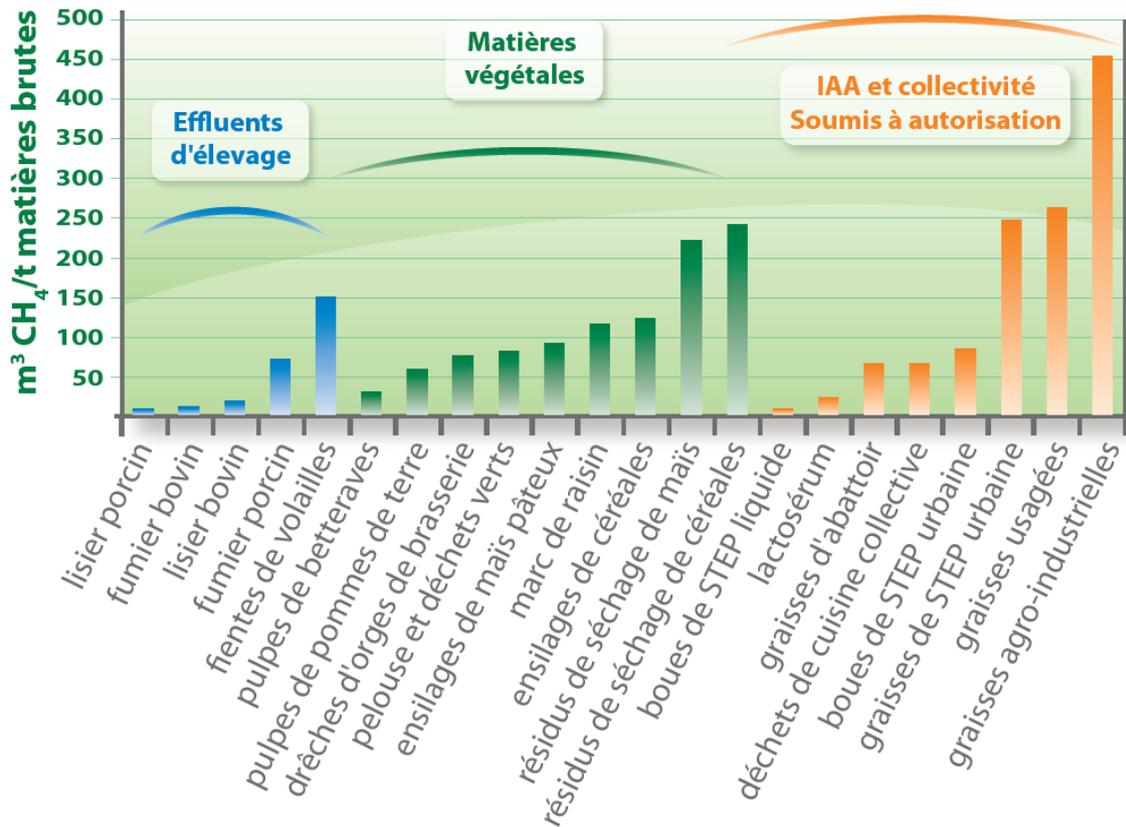


Figure 7 : Potentiel méthanogène de différents substrats (ADEME 2006)

La présence de co-substrats peut modifier de façon significative la composition en nutriments des digestats. L'azote est le plus souvent la préoccupation majeure, mais les autres éléments deviennent aussi problématiques. La teneur en nutriments (N, P) est ainsi directement fonction de l'influent et donc des co-substrats, qui peuvent aussi avoir un impact sur la couleur du digestat. Par exemple, l'utilisation de substrats protéinés a ainsi tendance à augmenter le ratio N/P du digestat, tandis que les boues biologiques de station d'épuration le réduisent (Girault *et al.* 2013). Camarillo *et al.* (2013) ont fait un bilan élémentaire sur les substrats d'une unité de méthanisation agricole pratiquant la codigestion avec du lisier, du fumier, du sorgho et des déchets alimentaires. Dans cette étude, les fractions de l'azote et du phosphore entrant provenant du lisier et du fumier correspondent à 78 et 73 %. Les autres ions sont aussi impactés, par exemple le chlore et le potassium sont apportés à hauteur de 33 et 43 % par le sorgho. Suivant les types de substrats utilisés, la composition en nutriments des digestats peut alors être fortement modifiée.

## 2. La méthanisation au sein d'une filière de traitement/valorisation

Les installations de méthanisation agricoles sont généralement constituées (Figure 8) d'un système de stockage et de chargement des substrats, d'un digesteur réalisant la digestion anaérobie,

d'une cuve de stockage du digestat et d'un dispositif d'épuration et d'utilisation du biogaz (Weiland 2013). Le stockage du biogaz est souvent réalisé dans l'espace de tête du digesteur.

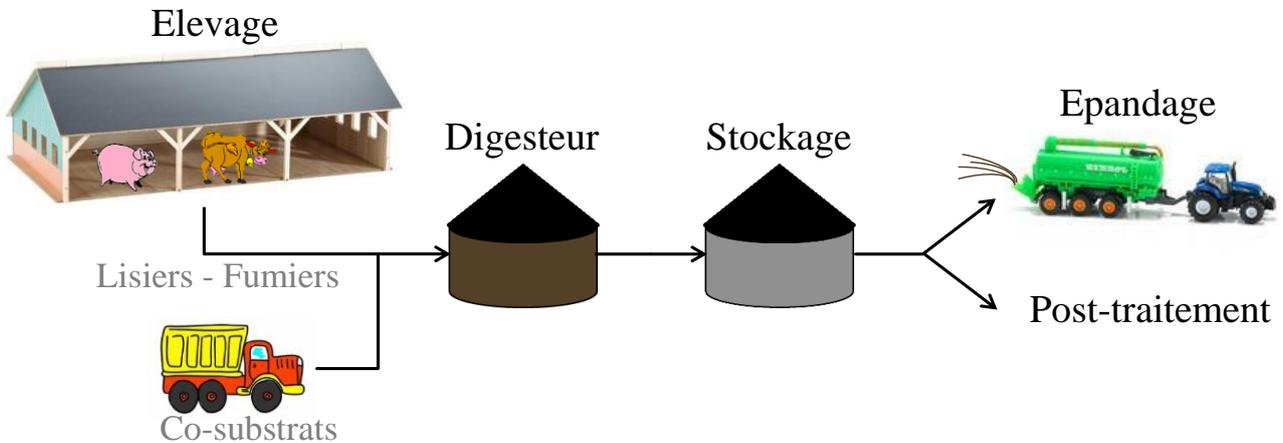


Figure 8 : Schéma de l'insertion de la digestion anaérobie dans une filière de gestion des effluents d'élevage.

Les digestats peuvent ensuite être directement épandus ou séchés ou encore traités après séparation liquide-solide suivant la quantité d'effluents, la surface agricole utile et l'azote épandable (Figure 9). La phase solide des digestats peut, dans le cas d'une séparation de phase, être épandue directement, séchée ou encore compostée.

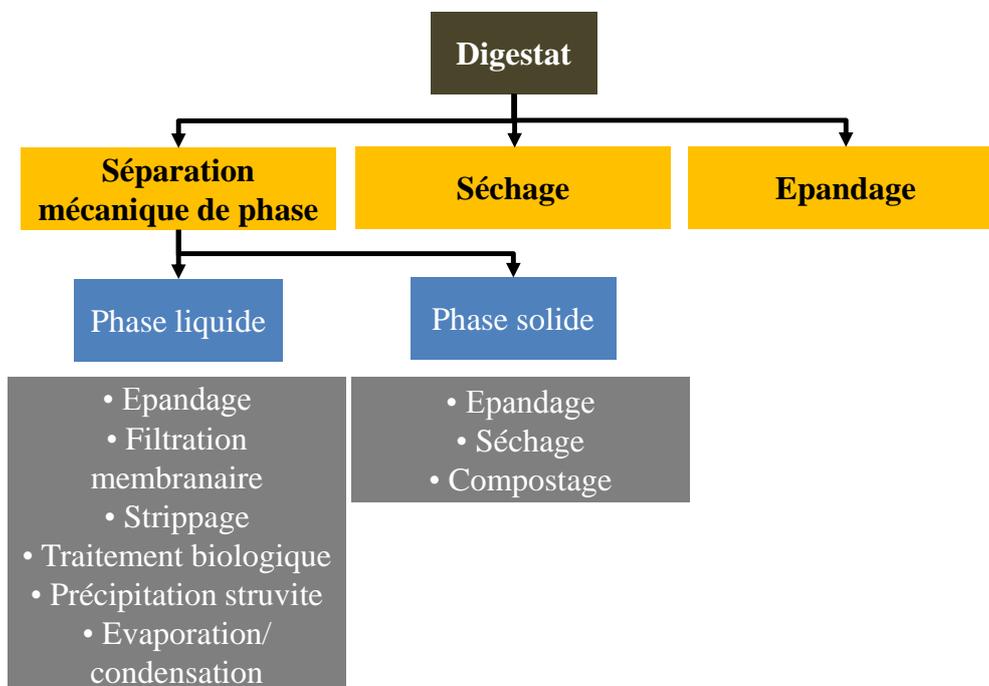


Figure 9 : Techniques de traitement du digestat (DETEC-OFEN 2009).

Des traitements complémentaires de l'azote et/ou du phosphore de la phase liquide peuvent se révéler nécessaire sur certains territoires pratiquant l'élevage intensif (Tableau 4). Ces nutriments peuvent être épurés à l'aide de technologies telles la filtration membranaire, le stripping, le traitement biologique, la précipitation sous forme de struvite ou encore l'évaporation-condensation (DETEC-OFEN 2009). Ces procédés sont tous basés sur la concentration des nutriments dans le but d'être exporté vers d'autres territoires à moindre coût, excepté le traitement biologique qui transforme une partie de l'azote en  $N_2$ .

**Tableau 4 : Post-traitements envisageables de la phase liquide des digestats (Burton and Turner 2003; DETEC-OFEN 2009).**

	<b>avantages</b>	<b>inconvénients</b>
<b>Filtration membranaire</b> (ultrafiltration, osmose inverse)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- concentration</li> <li>- filtrat utilisables comme eau utilitaire (osmose inverse) ou pour l'irrigation</li> <li>- réduction des volumes</li> <li>- stérilité des produits</li> <li>- séparation physique sûre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- coûts d'investissement</li> <li>- besoin de produits chimie (nettoyage des membranes)</li> <li>- membranes sensibles au colmatage</li> <li>- prétraitement nécessaire (MS max 3 %)</li> <li>- surveillance</li> <li>- coûts d'entretien et d'électricité</li> <li>- risque de concentration des polluants dans les concentrés</li> </ul>
<b>Stripping</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réduction des émissions d'ammoniac</li> <li>- possibilité de produire un fertilisant solide</li> <li>- haut rendement de séparation/concentration de l'azote ammoniacal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- consommation d'énergie</li> <li>- utilisation de produits chimiques</li> <li>- coûts d'investissement et d'entretien élevés</li> <li>- risque de blocage du garnissage et de formation de mousse</li> <li>- ne traite que <math>NH_4^+</math></li> </ul>
<b>Traitement biologique</b> (NDN, shunt des nitrates et anammox)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- également élimination</li> <li>- production d'un effluent peu chargé en polluants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production de boues d'épuration</li> <li>- pas de conservation d'azote</li> <li>- seulement élimination partielle de l'azote</li> <li>- consommation importante d'énergie (aération)</li> <li>- contrôle du moussage</li> <li>- émissions de <math>N_2O</math> et <math>NH_3</math></li> </ul>
<b>Précipitation sous forme de struvite</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production d'un fertilisant contenant des phosphates</li> <li>- procédé facile et fiable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production de grandes quantités de précipités</li> <li>- surveillance</li> <li>- le marché du produit fini doit exister (demande d'engrais N:P à 1:1 faible)</li> <li>- consommation de produits</li> </ul>

---

		chimiques élevée
<b>Evaporation/ condensation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- technologie standard</li> <li>- production d'un fertilisant concentré</li> <li>- possibilité d'utiliser la chaleur excédentaire de la cogénération</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- besoin important en chaleur</li> <li>- risque de production de mousse</li> </ul>

---

Chacun de ces procédés présente un certain nombre d'avantages, mais présente aussi pour la plupart une consommation d'énergie ou de produits chimique importante. D'autres procédés moins consommateurs et/ou qui seraient potentiellement plus simple à l'exploitation sont en cours de développement. Parmi eux, la culture de microalgues permet de récupérer et de valoriser ces nutriments.

La digestion anaérobie minéralise les nutriments de la matière organique les rendant ainsi plus accessibles à la biomasse algale. La forme sous laquelle se trouvent les nutriments dans le digestat est très importante dans le cadre d'une épuration avec des microalgues car celles-ci vont être capables de n'accéder qu'à leur forme soluble. Le digestat doit être préalablement séparé afin de ne pas avoir de particules en suspension qui limitent la croissance en absorbant de la lumière. Comme démontré précédemment, sur du digestat d'effluent d'élevage l'azote se retrouve principalement dans la phase liquide tandis que le phosphore se retrouve majoritairement dans la phase solide. Suite à une séparation, les nutriments alors contenus dans la phase solide ne sont plus disponibles pour la croissance algale. Dans le cas de l'utilisation du surnageant pour la culture de microalgues, il est alors possible de traiter jusqu'à 80 % de l'azote entrant en méthanisation. Dans cette même optique, il serait alors possible de ne traiter que ces 30 % du phosphore disponibles en phase liquide, alors que la majorité est retirée à la séparation liquide-solide.

En outre, le biogaz est co-généré sur site produisant des gaz d'échappement composés principalement de dioxyde de carbone, élément nécessaire au développement de la biomasse. Cette synergie pourrait permettre de concentrer les nutriments sans ajout de carbone inorganique exogène.

Ce sous-chapitre présente les principales généralités concernant les microalgues. Une définition est proposée, et la croissance et le métabolisme de ces microorganismes photosynthétiques ainsi que leur stœchiométrie sont présentés. De plus, les digestats étant par définition des milieux eutrophisés, un regard a été porté sur les espèces capables de se développer sur de tels milieux.

## **Sous-chapitre 1. 2.      Généralité biologiques sur les microalgues**

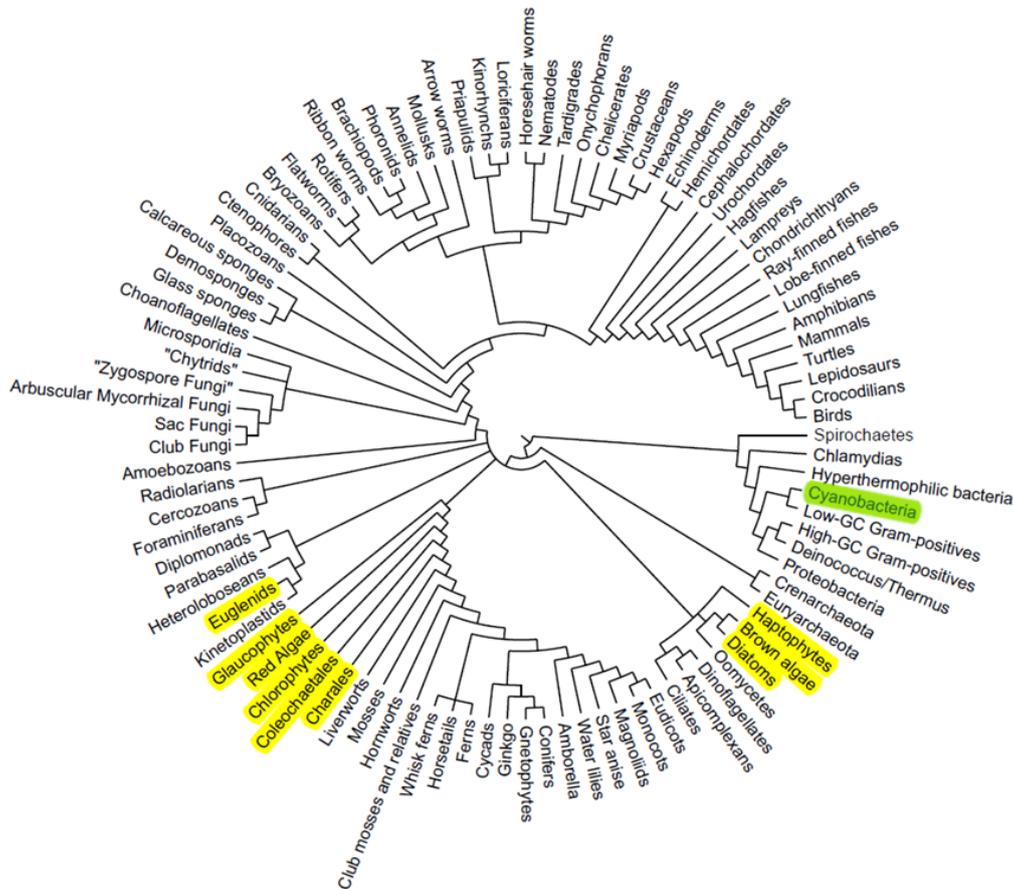
Dans le procédé envisagé, les microalgues sont au cœur des processus. Ainsi, il est important de bien connaître et comprendre leurs caractéristiques et leur mode de fonctionnement.

### **1. Définition**

Les algues sont composées de 11 groupes, classés selon des considérations morphologiques et biochimiques (de Reviers 2002) : 10 groupes d'algues eucaryotes et 1 groupe de microorganismes procaryotes (cyanobactéries). Cet ensemble peut être morphologiquement séparé en macroalgues et en microalgues.

Le terme de microalgues est un terme générique, car il peut être utilisé pour désigner les algues microscopiques au sens strict ainsi que les cyanobactéries. Les microalgues étant polyphylétiques, elles ne peuvent donc pas être considérées comme un taxon. La classification a été remaniée depuis les années 1990 à l'aide de la biologie moléculaire et permet désormais de réarranger les organismes (voir Figure 10) selon leur histoire évolutive (Godet 2008).

Le génome des microalgues serait le résultat de transferts de gènes qui se sont produits, à chaque endosymbiose, entre les génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux des hôtes et des endosymbiotes (Hackett *et al.* 2004; Li *et al.* 2006). Selon les groupes, les microalgues seraient issues de 1 à 3 phénomènes successifs d'endosymbioses.



**Figure 10 : Arbre phylogénétique simplifié d'après Sadava *et al.* (2011). Les ensembles contenant tout ou partie des algues sont surlignés en jaune, les cyanobactéries en vert.**

Globalement, les microalgues peuvent être définies comme l'ensemble des individus microscopiques, Eucaryotes (excluant les cyanobactéries), le plus souvent photosynthétiques et possédant de la chlorophylle a, et dont le cycle de vie se déroule en milieu humide (de Reviers 2002).

Par la suite, lorsque sera utilisé le terme « algue », il fera référence aux microalgues sans y inclure les cyanobactéries. Ce travail est focalisé sur les microalgues d'eau douce, les microalgues marines ne sont donc pas abordées.

## 2. Croissance

La croissance algale peut être schématisée en 6 étapes, comme sur la Figure 11. Ces différentes phases ne sont pas toujours clairement distinguées et peuvent durer plus ou moins longtemps ainsi qu'avoir des pentes différentes (Becker 1994). La phase 1 représente la phase d'adaptation des microorganismes au nouveau milieu, elle est aussi appelée phase de latence. Les phases 2 et 3 représentent respectivement la croissance après adaptation, ou phase d'accélération de la croissance, et la phase de croissance exponentielle, sans limite de nutriments ni de lumière.

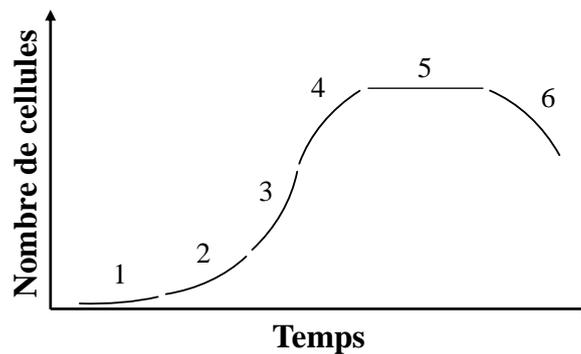


Figure 11 : Phases de croissance des cultures algales en batch (Becker 1994).

Le taux de croissance spécifique, appelé  $\mu$ , correspond à la phase de croissance exponentielle (3 sur la Figure 11). Les phases 4 et 5 correspondent à une croissance limitée et une stagnation de la croissance venant du self-shading, de la concentration en nutriments qui commence à être limitante et/ou de l'accumulation d'éléments toxiques. Enfin dans la dernière phase (6), les cellules algales commencent à mourir, libérant des substances organiques, souvent inhibitrices de la croissance. Cette phase est atteinte à cause de conditions environnementales défavorables, d'un âge de la culture trop avancé et limité en substrat et lumière ou encore à cause de la contamination par d'autres microorganismes.

### 3. Métabolisme

#### 3.1. Mode de nutrition

Les microalgues sont presque toutes capables de se développer en autotrophie, c'est-à-dire en utilisant le carbone inorganique comme source de carbone et la lumière comme source d'énergie. Cependant beaucoup d'algues sont aussi capables d'assimiler de la matière organique en tant que source de carbone et d'énergie. On appelle ce mode de nutrition, l'hétérotrophie. Toutes les espèces ne sont pas hétérotrophes ou mixotrophes (ce qui signifie être capable d'utiliser un mélange des différentes sources d'énergie et de carbone).

La mixotrophie peut être de deux types : soit toutes les algues appartenant à une espèce peut se développer à la fois en autotrophie et en hétérotrophie, soit une partie se développe en autotrophie et l'autre en hétérotrophie. Les algues vertes appartenant à l'embranchement des Chlorophytes (dont *Scenedesmus* et *Chlorella*), que l'on retrouve sur les effluents d'élevage (voir 5.1), sont notamment capables d'utiliser ces deux modes de nutrition.

D'après Kong *et al.* (2011), les rendements de croissance et de productivité sont supérieurs en mixotrophie, puis en hétérotrophie et enfin en autotrophie. Chojnacka et Noworyta (2004) ajoutent que la mixotrophie réduit le phénomène de photoinhibition (inhibition de la croissance à cause d'une surexposition lumineuse). De plus, les cultures mixotrophes nécessitent moins de lumière pour la croissance et ont une plus forte activité métabolique.

Dans cette étude qui a pour objectif l'épuration du digestat, il a été choisi de favoriser principalement le mode autotrophe pour 2 raisons :

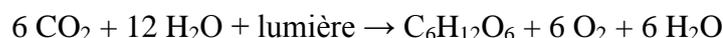
- la consommation d'une partie du dioxyde de carbone émis par la cogénération (afin d'amoinrir l'impact du procédé en diminuant l'indice carbone)
- le carbone organique restant à la suite de la digestion anaérobie est en trop faible quantité pour un fonctionnement hétérotrophe ou majoritairement mixotrophe. Ce carbone résiduel est en outre difficilement biodégradable.

Il n'est néanmoins pas exclu qu'une partie de la population étudiée ait un comportement mixotrophe, utilisant d'éventuels restes de carbone organique accessibles.

L'autotrophie chez les algues se manifeste par la photoautotrophie, utilisant ainsi la photosynthèse.

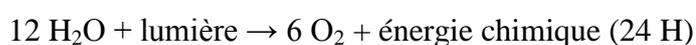
### 3.2. Photosynthèse

La photosynthèse est l'ensemble des processus biologiques permettant d'utiliser l'énergie lumineuse pour convertir le dioxyde de carbone en molécules organiques (glucides). La photolyse de l'eau fournit l'énergie chimique nécessaire à la photosynthèse dégageant comme sous-produit l'oxygène. La formule générale de la photosynthèse est la suivante :



Les réactions se décomposent en deux phases : la phase claire (ou lumineuse) et la phase sombre (ou obscure).

La phase claire se déroule en présence de lumière car c'est la source d'énergie. Elle implique les réactions photochimiques qui vont permettre de synthétiser l'adénosine triphosphate (ATP) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) dans les photosystèmes II et I respectivement, l'accepteur final d'électrons étant le NADP pour les algues autotrophes.



Les photosystèmes (PS) sont le coeur du captage d'énergie de la photosynthèse, ils sont composés de protéines et de pigments dont la chlorophylle. Les PS I et II sont situés dans les membranes thylakoïdales des cyanobactéries et dans les chloroplastes pour les cellules végétales. Le PS II utilise l'énergie des photons de longueurs d'onde optimum égale à 680 nm qui permet de libérer un électron énergétique vers l'accepteur primaire (ATP). De la même manière, le PS I utilise les photons de longueur d'onde maximale égale à 700 nm pour synthétiser le NADPH (Miles 2003).

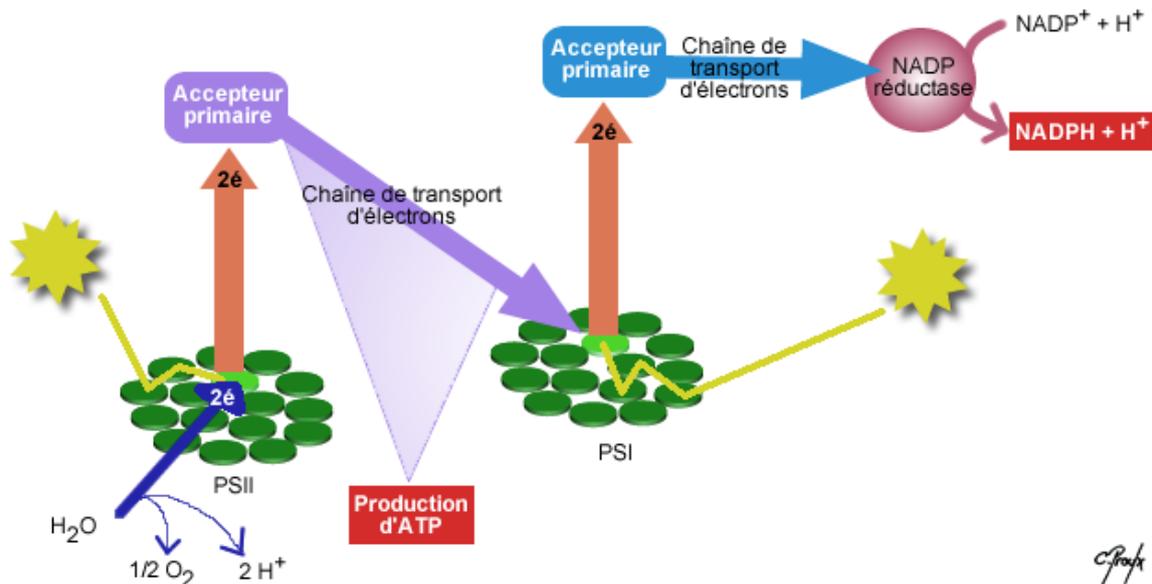
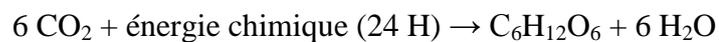


Figure 12 : Photosystème I et II et production d'ATP et de NADPH (Boseret)

La phase sombre consiste en l'utilisation de l'énergie chimique et du potentiel d'oxydoréduction générés en phase claire (ATP et NADPH) pour transformer le dioxyde de carbone en glucides *via* le cycle de Calvin.



Le schéma suivant présente les phases claires et sombres de la photosynthèse (Figure 13).

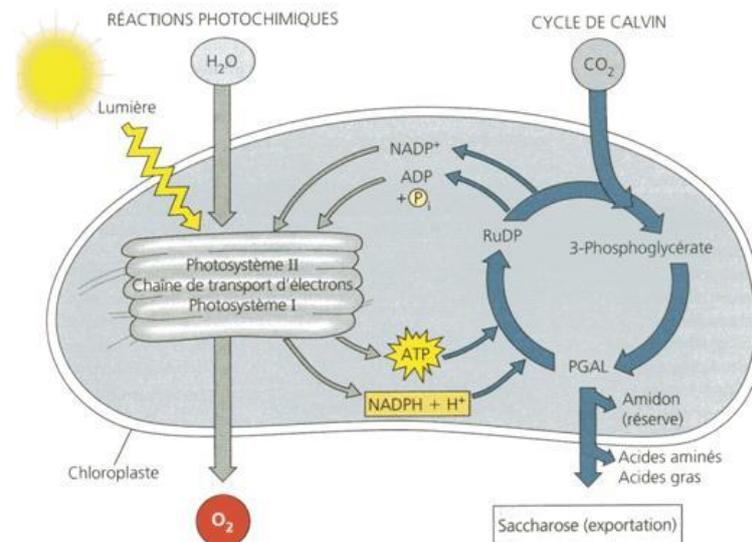


Figure 13 : Schéma des réactions de la photosynthèse. Relation entre les réactions photochimiques et le cycle de Calvin (Ray *et al.* 2006)

#### 4. Stœchiométrie

Hillebrand *et al.* (1999) ont observé des changements de la stœchiométrie algale sur un ensemble de microalgues benthique en réponse à différents ratios C:N et N:P. Ils ont cependant pu établir que le ratio C:N:P de ces microalgues est de 119:17:1 pour un milieu équilibré en azote et en phosphore. Ce ratio est légèrement plus élevé que le ratio de Redfield (1958) de 106:16:1, qui est considéré comme optimal pour la croissance de phytoplancton, mais reste comparable.

Fulton (2009) a mis en relation le ratio N:P dans le milieu avec le contenu des cellules microalgales. En effet, la stœchiométrie des cellules est, selon cet auteur, flexible car le ratio N:P des cellules est directement proportionnel au ratio N:P du milieu sur une gamme d'environ 3 à 60 g N.g P<sup>-1</sup> (voir Figure 14). Des observations similaires ont été faites par Wu et Pond (1981), basées sur la teneur en protéine sur différents digestats agricoles. Cette proportionnalité ne semble cependant valable que pour des cultures avec une concentration en nutriments stable. L'accumulation de polyphosphates en cas de stress est discutée en 1.4.2 (p 57).

D'autres auteurs précisent que le ratio N : P n'a pas d'effet sur la croissance, tant que le milieu n'est pas trop carencé (Pouliot *et al.* 1986).

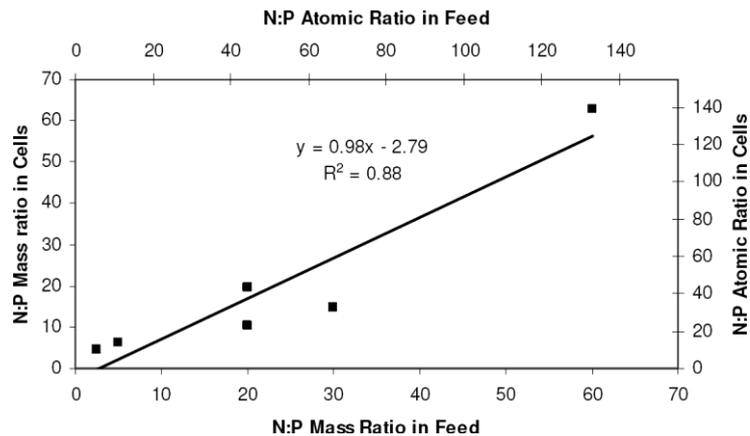


Figure 14 : Graphique représentant les ratios molaires et atomiques N:P dans les cellules algales par rapport à ces mêmes ratios dans le milieu de culture (Fulton 2009)

## 5. Algues rencontrées en milieu eutrophe

Un milieu eutrophe est défini par la surabondance d'éléments nutritifs menant à un développement bactérien et végétal entraînant une désoxygénation de l'eau. Dans le milieu naturel, l'eutrophisation conduit à un développement accru d'algues. Les effluents d'élevage sont par définition des milieux très fortement eutrophisés qui peuvent permettre un développement algal.

### 5.1. Milieux naturels eutrophisés

Il existe de nombreuses espèces de microalgues, mais seule une partie est capable de se développer sur un milieu eutrophisé. Le Tableau 5 présente les différents groupes d'algues dont certaines espèces sont capables de se développer sur un tel milieu. La majorité de ces espèces appartient aux algues vertes.

**Tableau 5 : Microalgues rencontrées sur milieux eutrophisés (Dabbadie 1992)**

Groupe	Genres	Nom commun
Chlorococcales	<i>Chlorella</i>	Algues vertes
	<i>Scenedesmus</i>	
	Autres	
Volvocales		Algues vertes
Diatomées		Algues brunes
Cyanobactéries		Algues bleues
Euglénophycées		Euglènes

Les lisiers et digestats de lisier étant des milieux fortement eutrophisés par définition, une partie des espèces ci-dessus sera capable d'y survivre et d'y croître.

## 5.2. Lisier/digestat

Sur des lisiers ou digestats agricoles, on peut retrouver plusieurs espèces, dont la présence va dépendre de plusieurs paramètres tels que la concentration en azote et en DCO, la température, *etc.* (voir 0). Le Tableau 6 présente quelques microalgues se développant sur du lisier de porc ou du digestat de lisier (issu de digestion anaérobie). Dans ce cadre, les microalgues les plus observées sont *Chlorella* et *Scenedesmus*.

**Tableau 6 : Espèces de microalgues observées sur lisier et digestat de lisier**

Auteur	Substrat	Espèces
Dabbadie (1994)	Lisier de porc	<i>Scenedesmus</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Cryptomonas</i> , diatomées
De Godos <i>et al.</i> (2009)	Lisier de porc	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Microspora</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Achnanthes</i> , <i>Protoderma</i> , <i>Selenastrum</i> , <i>Oocystis</i> , <i>Ankistrodesmus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Scenedesmus</i>
Fallowfield and Garrett (1985)	Lisier de porc	<i>Chlorella</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Scenedesmus</i>
Groeneweg <i>et al.</i> (1980)		
Sevrin-Reyssac <i>et al.</i> (1996)	Lisier de porc	<i>Scenedesmus</i> , <i>Chlorella</i>
Molinuevo-Salces <i>et al.</i> (2010)	Digestat de lisier de porc	<i>Oocystis</i> , <i>Scenedesmus</i>
Chen <i>et al.</i> (2012)	Digestat de lisier de vache	<i>Scenedesmus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Limnothrix</i> , <i>Phormidium</i>

Les espèces de microalgues présentes sur les lisiers et digestats de lisier sont naturellement sélectionnées en fonction des conditions de culture. Par exemple, une forte concentration en azote va inhiber en partie voire totalement la majeure partie de ces espèces.

Les microalgues sont des microorganismes complexes, dont le terme regroupe beaucoup d'espèces. Celles qui peuvent être retrouvées sur des effluents d'élevage sont cependant moins nombreuses. Ces effluents contenant de la matière organique résiduelle peut permettre l'utilisation de plusieurs métabolismes pour les microalgues, ce qui peut complexifier la compréhension des phénomènes. En outre, la composition en nutriments, notamment N et P, semble variable.

Dans le cadre de l'épuration, il est capital de s'intéresser aux différents facteurs affectant la croissance des algues et leur composition, ainsi que les rendements d'épuration des nutriments.

Ce sous-chapitre présente les différents paramètres liés à la mise en œuvre d'une culture algale. Ces paramètres sont différenciés en fonction des microalgues (facteurs biotiques et abiotiques) et sur des considérations de génie des procédés de manière générale. Un regard sur les installations en fonctionnement à grande échelle est enfin apporté.

### **Sous-chapitre 1. 3. Mise en œuvre de cultures de microalgues**

Comme pour tous les microorganismes, la culture des microalgues est régie par un certain nombre de paramètres. Ils peuvent être globalement répartis en trois catégories : les facteurs abiotiques qui peuvent être contrôlés, les facteurs biotiques et les paramètres du génie des procédés.

#### **1. Facteurs abiotiques :**

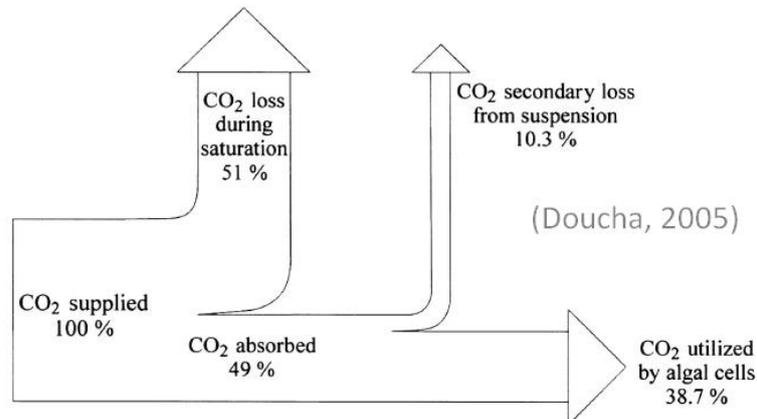
##### 1.1. Source de carbone

Un des paramètres clés pour les autotrophes est le dioxyde de carbone. En effet, ce dernier est la source de carbone inorganique dont elles ont besoin pour se multiplier. Ce carbone n'est pas suffisant par simple diffusion depuis l'air ambiant, car sa concentration naturelle de 0,04% v:v est trop faible pour favoriser une forte croissance et une forte productivité. Les cultures d'eau douce doivent donc être dopées pour assurer une croissance suffisante. Une forte agitation des cultures, bien que suffisante pour dissoudre le dioxyde de carbone, est souvent substituée par une injection d'air enrichi en CO<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> pur ou de bicarbonates (Becker 1994).

Or la méthanisation couplée à la cogénération produit du CO<sub>2</sub>, via les gaz de combustion. C'est pourquoi il peut être intéressant de coupler ces procédés et d'injecter les gaz dans les bassins d'algues. Doucha *et al.* (2005) n'ont pas montré de différence de croissance des microalgues (*Chlorella*) entre une injection de dioxyde de carbone pur ou de gaz de combustion. Kastanek *et al.* (2010) complètent qu'il n'y a pas d'accumulation de composés nuisibles (Cd, Pb, Hg, benzo[a]pyren, HAP) provenant des gaz issus de la cogénération détectée dans la biomasse. En termes d'épuration, l'élimination du carbone, de l'azote et du phosphore n'est pas affectée par les gaz de combustion (de Godos *et al.* 2010).

On estime (selon les formules théoriques) que le besoin en carbone inorganique est d'environ 1,9 kgCO<sub>2</sub>/kg algue. Dans le cas d'une injection de gaz, il faut prendre en compte le

transfert gaz/liquide et les pertes secondaires en culture (Doucha *et al.* 2005). La Figure 15 schématise les pertes et le pourcentage de CO<sub>2</sub> réellement transmis aux microalgues dans un cas d'injection de gaz de combustion à 8% v:v en fed batch en extérieur. Ce cas particulier montre que moins de 40 % du CO<sub>2</sub> est transmis aux algues.



**Figure 15 : Utilisation et pertes du dioxyde de carbone fourni aux microalgues (Doucha *et al.* 2005)**

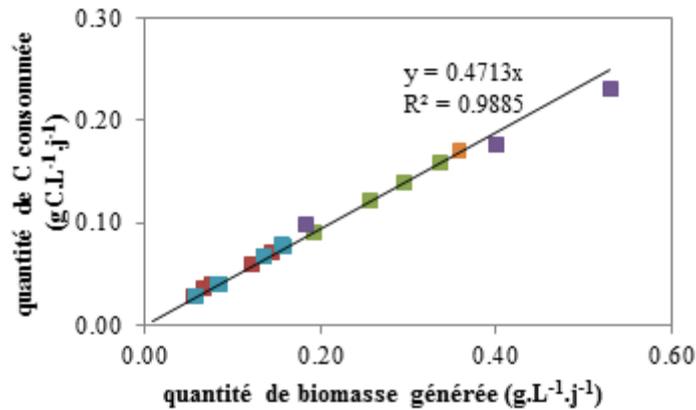
Il faut toutefois faire attention à ne pas injecter du dioxyde de carbone en excès, car une trop forte concentration peut inhiber les algues (Soletto *et al.* 2008). La littérature rapporte des optimums très variables entre 5 et 100 % de CO<sub>2</sub> dans le gaz (Olaizola 2003; Tang *et al.* 2011). Cependant, la concentration du gaz seule est insuffisante pour représenter la quantité biodisponible et nécessite d'être couplée avec le débit et le volume de réacteur. Selon Van Den Hende *et al.* (2012) la concentration en carbone inorganique dissous est plus caractéristique.

De plus, cette inhibition est liée à la lumière fournie ; si le flux de photon est insuffisant, un ajout excédentaire de CO<sub>2</sub> sera plus délétère que si l'on soumet les algues à un fort flux de photon. Cependant, ces observations sont à pondérer en fonction de l'espèce cultivée. Par exemple, *Scenedesmus* est capable de supporter de plus fortes concentrations en carbone inorganique que *Chlorella* (Hanagata *et al.* 1992).

En outre, en termes de procédés, il semble préférable d'injecter le CO<sub>2</sub> de façon intermittente pour avoir une meilleure croissance des algues (Chiu *et al.* 2011). Dans le procédé envisagé, l'épuration d'une partie des gaz de combustion est un atout, car elle permet de réduire les émissions de CO<sub>2</sub> du système.

Dans la littérature, on trouve une gamme d'élimination du carbone inorganique s'étendant de 0,10 à 96,8% (Annexe 1). Ces chiffres sont fortement dépendants de la productivité algale obtenue dans chaque étude mais aussi de la méthode d'injection. Deux paramètres qui ressortent dans l'étude bibliographique sont la charge en gaz (vvm) et la concentration du gaz en CO<sub>2</sub>. Un

autre critère à prendre en compte est le transfert gaz-liquide qui dépend du dispositif d'injection de gaz.



**Figure 16 : Production de biomasse algale en fonction de la consommation de carbone inorganique à partir de données issues de la littérature (Kurano *et al.* 1995 ; Yun *et al.* 1997; Wang *et al.* 2008 ; Ryu *et al.* 2009 ; Tang *et al.* 2011 ; Van Den Hende *et al.* 2011 ).**

La Figure 16 représente les productivités en fonction de l'élimination du carbone de six sources différentes de la littérature, regroupant 29 données (Kurano *et al.* 1995 ; Yun *et al.* 1997; Wang *et al.* 2008 ; Ryu *et al.* 2009 ; Tang *et al.* 2011 ; Van Den Hende *et al.* 2011 ). On peut observer une proportionnalité entre ces deux paramètres, bien que les souches, dispositifs expérimentaux et méthodes soient différents. Ainsi, de manière assez constante, 2.2 g de biomasse seraient produits par g de carbone consommé soit 47 % de C dans la biomasse, ce qui est proche des 49% établis par Watson *et al.* (2011).

Pour établir cette courbe, les résultats de certaines études ont été écartés de la bibliographie (Chiu *et al.* 2008 ; Francisco *et al.* 2010 ; Sydney *et al.* 2010). En effet, les données portent à croire que la totalité du carbone retiré du gaz n'a pas été intégré dans la biomasse. Par exemple, les résultats de Jacob-Lopez *et al.* (2010) indiqueraient que la biomasse comporte 5,6% de carbone au lieu des 50% mesurés par analyse élémentaire. Les auteurs présumant l'existence de routes parallèles d'utilisation du carbone, sous forme de composés organiques volatils et de biopolymères notamment.

Les études convergent vers la conclusion qu'il existe une quantité de CO<sub>2</sub> optimale à fournir, au-delà de laquelle augmenter la quantité de carbone fourni a un impact néfaste sur le taux de croissance de la culture (Silva and Pirt 1984; Sung *et al.* 1999; Chang and Yang 2003; Hu and Gaol 2003; de Morais and Costa 2007; Chiu *et al.* 2009). La valeur optimale est cependant très différente d'une étude à l'autre, les conditions opératoires étant variables.

## 1.2. Besoins énergétiques

En tant qu'organismes photo-autotrophes, la source d'énergie des microalgues est la lumière. Les photons sont captés par la chlorophylle lors de la photosynthèse. Or la pénétration de la lumière bien qu'importante est souvent limitée dans les dispositifs de culture. Les paramètres de dimensionnement impliqués sont la forme et la hauteur/épaisseur des bioréacteurs. Les dispositifs les plus rencontrés pour faire pousser des algues sont les photobioréacteurs (PBR) verticaux en plastique, les réacteurs tubulaires verticaux et les lagunages à haut rendement (HRAP : high rate algal pond). Ces derniers sont les plus adaptés dans le cas d'une épuration de digestat agricole car ils sont plus économiquement viables pour produire des engrais et facilement adaptables sur une ferme. Les profondeurs les plus rencontrées dans les HRAP vont de 15 à 45 cm avec une prépondérance des valeurs inférieures à 30 cm.

Pour un influent tel que le lisier, Rusten et Ashish (2011) préconisent la dilution pour augmenter le pourcentage de transmittance (fraction de la lumière incidente qui passe à travers l'échantillon). En effet, ces effluents présentent une forte coloration qui réduit le passage de la lumière. Sur la Figure 17, on peut voir l'influence de la coloration due aux microalgues et celle due au lisier (Fallowfield and Garrett 1985). En une dizaine de centimètres, le flux de photons est divisé par 3 dans le cas du lisier traité dilué seul et il approche 0 quand les microalgues sont présentes. Bien sûr cette importance relative va dépendre du lisier (ou digestat) initial mais aussi de la dilution et des conditions de croissance des algues. On remarque que, dans ce cas, la coloration initiale est plus impactante que l'absorption due aux algues.

Il y a toutefois peu de référence sur la couleur et la variabilité de cette couleur en fonction des différents lisiers et encore moins après méthanisation.

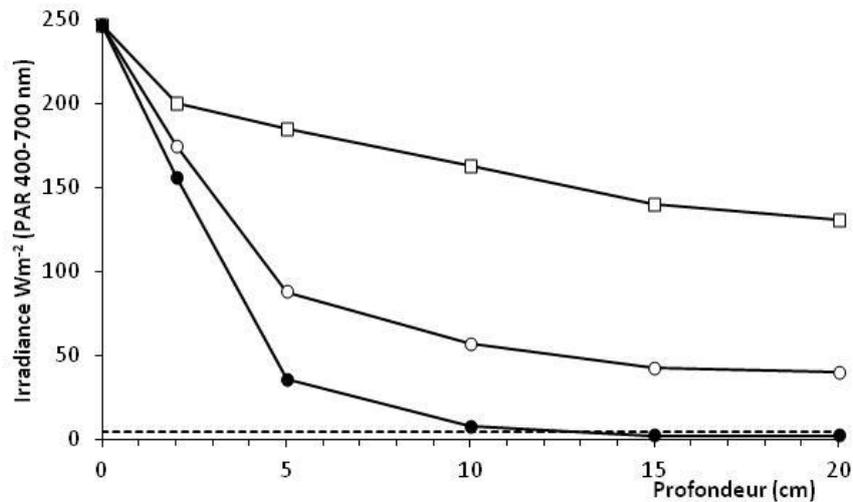


Figure 17 : Atténuation de la lumière en fonction de la profondeur dans un réacteur contenant de l'eau distillée □, la phase liquide d'un lisier dilué 1 :9 ○ et la phase liquide d'un lisier dilué avec des cellules de *Chlorella* à une concentration de  $2,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$  ●. Les pointillés indiquent une irradiance équivalente ou inférieure au point de compensation pour *Chlorella vulgaris* ( $5 \text{ W/m}^2$ ). (Fallowfield and Garrett 1985)

Le rendement énergétique des organismes réalisant la photosynthèse est appelé efficacité photosynthétique (PE). Elle représente la quantité de biomasse produite par mole de photons. Cette efficacité augmente lorsque la lumière est limitante, la productivité peut néanmoins être affectée négativement à cause des zones n'ayant pas accès à la lumière (Eriksen 2008). Carlozzi *et al.* (2006) indiquent qu'en cultures extérieures, les plus fortes efficacités photosynthétiques sont observées le matin et le soir, quand la lumière est plus faible.

### 1.3. Température

Globalement, la température de développement optimum des microalgues se trouve entre 25 et 35°C. Néanmoins, cela est variable d'une espèce à l'autre. Ainsi, *Chlorella* est une espèce eurithermique (de Pauw *et al.* 1980), qui supporte une grande gamme de température. Par conséquent, elle va mieux supporter les changements de température entre l'été et l'hiver. C'est principalement à cause de ces optimums que Canovas *et al.* (1996) ont observé des changements d'espèces en extérieur entre l'hiver et le printemps sur des HRAP.

Plusieurs auteurs ont remarqué que la température suboptimale est le principal facteur qui réduit la croissance en hiver et non pas l'exposition lumineuse (Dabbadie 1994; Cuaresma Franco *et al.* 2011). Cela est peut-être dû au fait que la photoinhibition est plus forte à faible température qu'à la température optimale (Jensen and Knutsen 1993). On peut donc envisager de réduire la photoinhibition en augmentant la température (Markou and Georgakakis 2011). Dans le cadre du

procédé envisagé, la cogénération fournit de la chaleur en plus de l'électricité. Elle pourrait être réutilisée afin de chauffer une partie de bassin ou encore l'affluent.

A l'inverse, au-delà d'environ 35°C, la température devient trop élevée pour le développement de la plupart des microalgues et réduit voire stoppe la croissance de la majorité d'entre elles (Sandnes *et al.* 2005).

#### 1.4. Besoin en nutriments

##### 1.4.1. Azote

Les microalgues assimilent l'azote dans le but de synthétiser des protéines, aminoacides et acides nucléiques (Bougaran *et al.* 2010). Les besoins en azote peuvent être calculés à partir de la formule générale des microalgues. A partir de la formule de Watson *et al.* (2011), l'azote nécessaire serait d'environ 93 gN/kg algue. Dans une étude de Rusten *et al.* (2011), l'analyse de la biomasse montre une teneur de 91 gN/kg algue au maximum et 81 gN/kg algue en moyenne sur 12 jours. Malgré le manque de données, ces comparaisons montrent une assez bonne évaluation de la formule générale.

Les microalgues sont capables d'assimiler les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et un certain nombre d'entre elles est capable d'assimiler les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), l'urée ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) et le monoxyde d'azote (NO). Xin *et al.* (2010) ont montré que les microalgues se développent plus vite avec des ions ammonium qu'avec des nitrates ou de l'urée, si le pH est bien géré (voir 3.2). Les cyanobactéries, capables d'assimiler l'azote atmosphérique, utilisent préférentiellement  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  (Markou and Georgakakis 2011).

En outre, Perez-Garcia *et al.* (2010) ont montré que les rendements cellulaires par rapport à l'azote sont meilleurs en hétérotrophie qu'en autotrophie.

##### 1.4.2. Phosphore

La forme du phosphore qui est utilisée par les microalgues est la forme orthophosphate :  $\text{PO}_4^{3-}$ . Le phosphore est utilisé dans des constituants essentiels de la cellule tels les acides nucléiques (ARN et ADN) la membrane phospholipidique et l'ATP (Geider and La Roche 2002). Il ne semble pas possible d'évaluer la quantité de phosphore absorbée à partir de la même formule générale que pour l'azote car le stock cellulaire de phosphore est variable en fonction des conditions expérimentales. En effet, les microalgues sont capables d'assimiler du phosphate pour plusieurs usages. La croissance algale incorpore le phosphore dans les constituants tels les phospholipides, les

nucléotides et les acides nucléiques, mais les algues sont aussi capables de stocker du phosphore dans la biomasse sous forme de polyphosphates, ce phénomène est appelé « luxury uptake » (Powell *et al.* 2008; Chu *et al.* 2013). Ces polyphosphates sont présents sous deux fractions : les polyphosphates solubles dans l'acide (ASP) et les polyphosphates insolubles dans l'acide (AISP). Cette première forme est utilisée par le métabolisme, tandis que la seconde correspond au stockage utilisé lorsque les phosphates deviennent limitants. Néanmoins les ASP peuvent aussi servir de stockage de phosphore à court terme (Powell *et al.* 2009). La Figure 18 est un diagramme représentant les pools de phosphore dans les microalgues. Ces auteurs ont montré que la concentration en phosphates ainsi que la température ont un impact sur l'accumulation de plusieurs fractions phosphorées : constituants, ASP et AISP. De plus, d'autres auteurs montrent que le taux d'absorption des phosphates est plus faible dans les environnements sombres qu'éclairés car l'utilisation des phosphates nécessite de l'énergie (Falkner *et al.* 1980; Rigby *et al.* 1980). Ces remarques rejoignent les observations de Powell *et al.* (2009) qui avancent que l'intensité lumineuse influence l'accumulation d'ASP, c'est-à-dire du stockage à court terme pour le métabolisme. De plus, Falkner *et al.* (1980) et Rigby *et al.* (1980) ont remarqué qu'un manque d'ions tels que  $K^+$  ou  $Mg^{2+}$  diminue le taux d'absorption des phosphates.

Chu *et al.* (2013) ont montré que pour *C. vulgaris* en carence d'azote, le taux d'absorption du phosphore est 3,8 fois plus rapide que lorsque l'azote est non limitant et ce sans limiter la croissance algale. A l'inverse, une plus faible quantité de phosphore disponible pour l'ATP et le NADP a une importance majeure dans les processus énergétiques (Klausmeier *et al.* 2007).

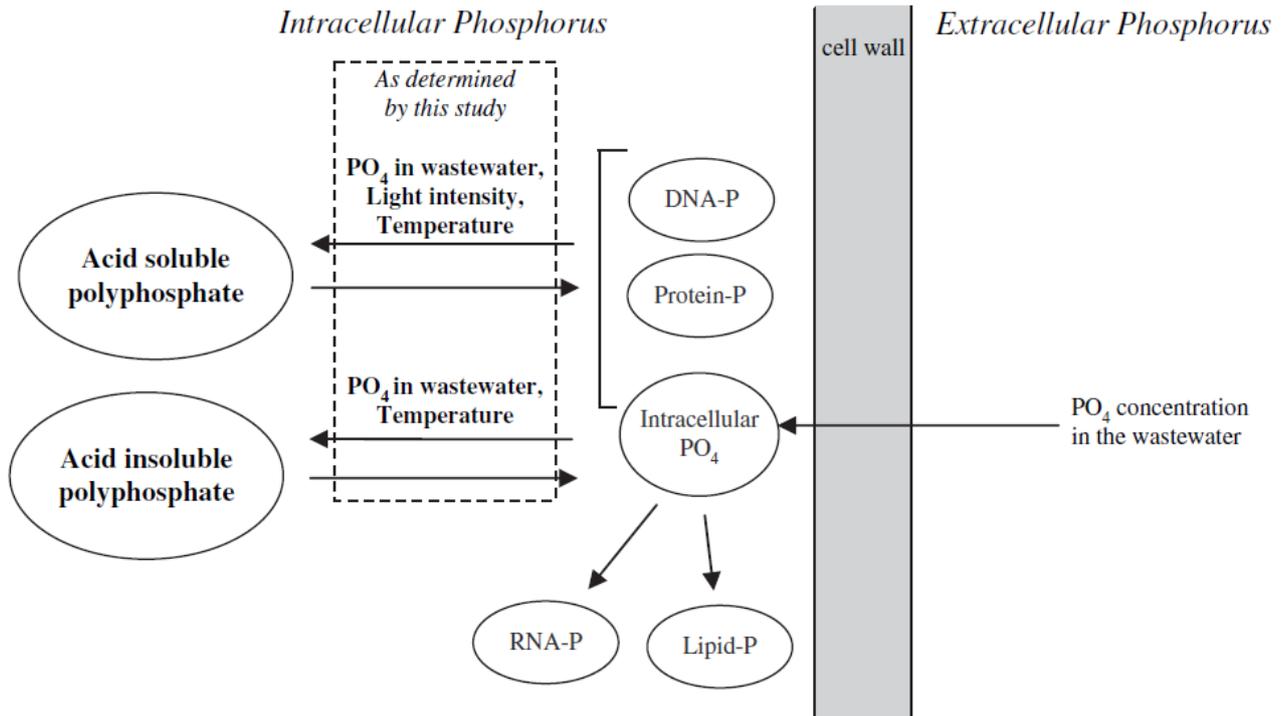


Figure 18 : Diagramme récapitulatif des pools de phosphore des microalgues de lagunes de stabilisation de déchets (Powell *et al.* 2009).

Ce stockage du phosphore a été observé dans des lagunes de stabilisation des déchets et est donc un phénomène qui pourrait être appliqué à l'épuration. On retrouve un mécanisme proche dans les stations d'épuration à boues activées utilisant la déphosphatation biologique. Certains microorganismes sont ainsi capables de sur-accumuler le phosphore sous forme de polyphosphates dans certaines conditions.

Afin d'éliminer de fortes quantités de phosphore, il faut à la fois une forte croissance des microalgues et une grosse quantité de polyphosphates stockés par cellule. Powell *et al.* (2011) ont observé séparément ces conditions, mais elles ne semblent pas apparaître naturellement de façon simultanée car les stocks de phosphore sont consommés lors d'une forte croissance menant à une concentration élevée en algue avec une concentration intracellulaire plus faible.

### 1.4.3. Métaux

Comme tous les microorganismes, les algues ont besoin de métaux pour se développer. On peut citer par exemple des macronutriments tels : Mg, K, *etc.* ou encore des micronutriments comme Mo, Co, Cd, B, *etc.*

Le magnésium est un élément très important pour les algues car cet ion métallique fait partie du complexe de la chlorophylle qui est un pigment photosynthétique majeur chez beaucoup d'espèces. De plus, il est aussi présent dans les cofacteurs enzymatiques, molécules liées à une

enzyme participant aux transformations biochimiques. D'après Park *et al.* (2010), ce métal peut même devenir limitant dans un procédé en continu car il est très consommé. Il est reporté que Mg est limitant pour une croissance dans du digestat de lisier de porc (Bjornsson *et al.* 2013). Cette remarque est néanmoins à modérer car des intrants de méthanisation riches en magnésium, dans le cadre d'une codigestion, ou une gestion de la ferme différente, avec une utilisation de plus d'eau qui contient du Mg, peuvent corriger ce déséquilibre.

Le potassium est nécessaire pour toutes les microalgues, tandis que le sodium est nécessaire pour les cyanobactéries (e.g. *Spirulina*) et d'autres algues, mais pas pour toutes (Becker 1994).

### 1.5. Toxicité

Plusieurs composés ont été reportés dans la littérature comme toxiques pour les microalgues. Un des plus notables est l'ammoniac, Pouliot *et al.* (1986) estiment son seuil de toxicité à environ 45 mg/L. Azov and Goldman (1982) l'estiment quant à eux à environ 20 mg/L. Il peut être géré en contrôlant le pH et la quantité d'azote introduite.

Le cuivre connu pour ses propriétés antibactériennes est soupçonné par Pouliot *et al.* (1986) d'avoir un effet toxique pour les algues. Il a été mis en évidence que cette toxicité, ainsi que celle du plomb, doivent être mises en relation avec la densité cellulaire. Debelius *et al.* (2009) proposent de l'expliciter sous forme de « quota cellulaire toxique », qui correspond au ratio de la concentration en toxique sur la concentration en cellules algales. Dans le cadre du traitement des digestats, il faut néanmoins se poser la question de la biodisponibilité du cuivre quant à son effet toxique.

Traviesco *et al.* (2006) ont trouvé une inhibition de la croissance par la matière organique pour une concentration en DCO initiale de 1100 mgO<sub>2</sub>/L. La dilution peut donc être adaptée pour éviter de se retrouver dans ce cas. Il semble en outre plus favorable de développer une culture d'algues sur du digestat que sur du lisier non méthanisé, à cause de la plus faible teneur en matière organique.

## 2. Facteurs biotiques

### 2.1. Bactéries

Plusieurs études réfèrent des interactions entre les algues et les bactéries. Ces interactions sont de deux natures suivant les articles : antagonistes ou synergiques.

D'une part, certains auteurs observent une inhibition mutuelle entre les bactéries hétérotrophes et les algues lorsqu'elles sont cultivées sur une longue période (Baumgarten *et al.* 1999). Les algues auraient une activité antibactérienne (Debro and Ward 1979), tandis que les bactéries auraient une activité anti algale (Dakhama *et al.* 1993). De plus, Risgaard-Petersen *et al.* (2004) suggèrent l'exclusion compétitive des AOB (Ammonia Oxidizing Bacteria) par les microalgues sur les nutriments dans les sédiments. Ils ajoutent que les bactéries dénitrifiantes semblent être aussi affectées négativement par la présence de microalgues actives. Choi *et al.* (2010) ont montré une inhibition de la nitrification en présence d'algues et de bactéries en excès de nutriments. Cependant, ils émettent l'hypothèse d'une compétition sur la source de carbone, le dioxyde de carbone. Les interactions bactériennes dans les cultures d'algues sont « essentiellement antagonistes et non synergiques » (Toerien *et al.* 1984).

D'autre part, on trouve des articles notant que les microorganismes nitrifiants épurent les fortes concentrations en ammoniacale qui peuvent être inhibiteur de la croissance algale (Källqvist and Svenson 2003). De plus, van den Hende *et al.* (2010) expliquent que l'échange de dioxyde de carbone (source de carbone des microalgues) provenant des bactéries hétérotrophes et du dioxygène (accepteur final d'électron des bactéries aérobies) favorise la formation de floes bactériens/microalgaux. En outre, il a été mis en évidence que le taux de croissance des microalgues diminuait avec l'augmentation de la pression partielle en oxygène, donc que les bactéries qui consomment l'oxygène lors de la respiration favorisent la croissance algale en réduisant la tension d'oxygène photosynthétique (Mouget *et al.* 1995; Sousa *et al.* 2013).

Ces interactions sont donc encore assez mal connues et semblent être variables, probablement à cause de conditions environnementales différentes : concentrations en carbone organique et inorganique, en nutriments, *etc.*, mais aussi du pH, du temps de séjour hydraulique et des autres paramètres du procédé.

## 2.2. Zooplancton et insectes

Outre les interactions avec les communautés bactériennes, les cultures de microalgues peuvent être sujettes à la prédation par du zooplancton (rotifères, *etc.*) ou des larves d'insectes (Becker 1994).

La contamination avec *Lycrymanis sp.*, *Colpidium sp.* et *Vorticella sp.* a été occasionnellement rapportée mais elle a un effet négligeable sur la croissance algale. Cependant, la

contamination avec un groupe de rotifères appelés *Branchionus* (rotifère) peut être plus grave, pouvant nuire à la croissance jusqu'à anéantir les cultures. Le traitement est d'abaisser le pH à environ 3 pendant 1 à 2 h puis de le rétablir vers 7,5, ne causant pas de problème pour les algues, mais étant très efficace sur les rotifères.

Les *Moina* peuvent aussi causer un effondrement de la population algale dans les lagunes. Le traitement consiste à augmenter le pH jusqu'à 9 mais cela réduit aussi la productivité algale. L'agitation en continu semble être efficace pour contrôler la prédation et améliorer la stabilité des lagunes.

Becker (1994) rapporte que parmi les contaminations dues aux insectes, *Chironomus* pour *Scenedesmus* et *Ephydra* pour *Spirulina* ont été observés plusieurs fois lors de projets. Ces insectes pondent à la surface des bassins et, après éclosion, les larves se nourrissent des microalgues, sans prédateur. La solution proposée pour *Chironomus* est de retirer les œufs des cultures avant l'éclosion avec un filet. Pour *Ephydra*, il n'existe pas de moyen de protection efficace, mais il a été observé une plus faible ponte dans les bassins bien agités que dans les cultures agitées occasionnellement.

### **3. Paramètres du procédé**

La capacité à assimiler les nutriments (N, P, K, etc.) couplée à leur forte croissance font des microalgues des microorganismes épurateurs d'intérêt. Un certain nombre de paramètres liés au procédé ont un impact sur la croissance algale et donc sur l'épuration.

#### 3.1. Agitation

Afin de permettre une bonne accessibilité à la lumière pour toutes les algues, l'agitation est très importante. Elle sert à limiter le phénomène appelé « self-shading », soit le fait que les microalgues se fassent ombrager entre elles. Il faut modérer les vitesses de rotation pour ne pas abîmer certaines cellules et éviter le stress hydrodynamique (Gudin and Chaumont 1991). Par exemple, *Haematococcus pluvialis* s'enkyste lorsque son flagelle est coupé, ce qui stoppe sa croissance. Néanmoins, dans le cas de *Chlorella* et *Scenedesmus*, il n'y a pas de fortes contraintes hydrodynamiques car elles ne sont pas flagellées et ont une paroi cellulaire assez résistante.

Il est préconisé d'utiliser des roues à aubes dans les « high rate algal pond » (HRAP) en complément à l'éventuel ajout de gaz carbonique pour avoir un mélange turbulent et donc une meilleure exposition lumineuse. Grobbelar (2011) préconise de placer les vannes aux extrémités des

bassins et des dispositifs de mélange au long des canaux pour éliminer les zones mortes et des flux laminaires.

### 3.2. pH

Le pH est aussi un paramètre délicat, quoiqu'assez facilement ajustable avec l'ajout de  $\text{CO}_2$ . Il est conseillé par les cultivateurs de microalgues (Becker 1994) d'injecter le dioxyde de carbone à un pH de 8,3-8,5 (voir Figure 19 A), de façon à ce que les ions hydrogénocarbonates soient la forme prédominante du carbone inorganique (en rose).

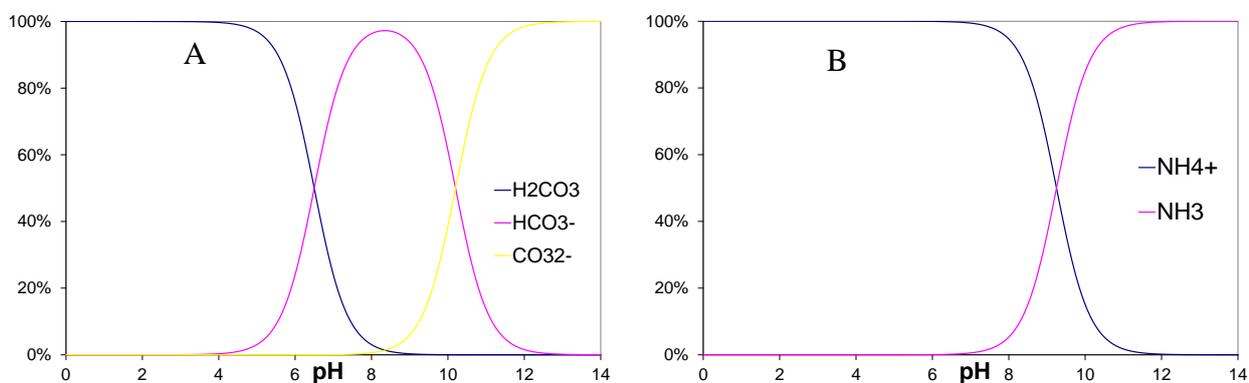


Figure 19 : A, diagramme de prédominance de l'acide carbonique avec les formes  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (bleu),  $\text{HCO}_3^-$  (rose) et  $\text{CO}_3^{2-}$  (jaune) ; B, diagramme de prédominance de l'ammonium avec  $\text{NH}_4^+$  (bleu) et  $\text{NH}_3$  (rose).

Le pH doit, en général, être supérieur à 6 pour permettre un développement correct des microalgues (Xin *et al.* 2010), même si on trouve des genres comme *Euglena* qui supportent un pH très faible de 4. De plus, le pH gouverne la spéciation  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Si le pH est supérieur à 8,5-9, le  $\text{NH}_3$  peut être facilement strippé (voir Figure 19 B). Si l'agitation est insuffisante et ne strippe pas l'ammoniac, il inhibe la croissance à partir d'une concentration de 45 mgN- $\text{NH}_3/\text{L}$  (voir 1.5). En cherchant à accumuler les nutriments et plutôt qu'à les volatiliser, il est préférable de rester en dessous de ces valeurs de pH.

De plus, la croissance algale peut faire varier le pH de deux façons : en l'augmentant, lors de la photosynthèse à cause de la consommation de  $\text{CO}_2$  (García *et al.* 2006); en le diminuant, lors de l'utilisation des ions ammonium. En effet lorsque les algues assimilent  $\text{NH}_4^+$  elles libèrent des ions  $\text{H}^+$  qui font baisser le pH. En revanche, l'assimilation de nitrates libère des ions  $\text{OH}^-$  ce qui augmente le pH (Markou *et al.* 2014). Globalement en culture, le pH augmente et peut être régulé par exemple avec l'ajout de dioxyde de carbone.

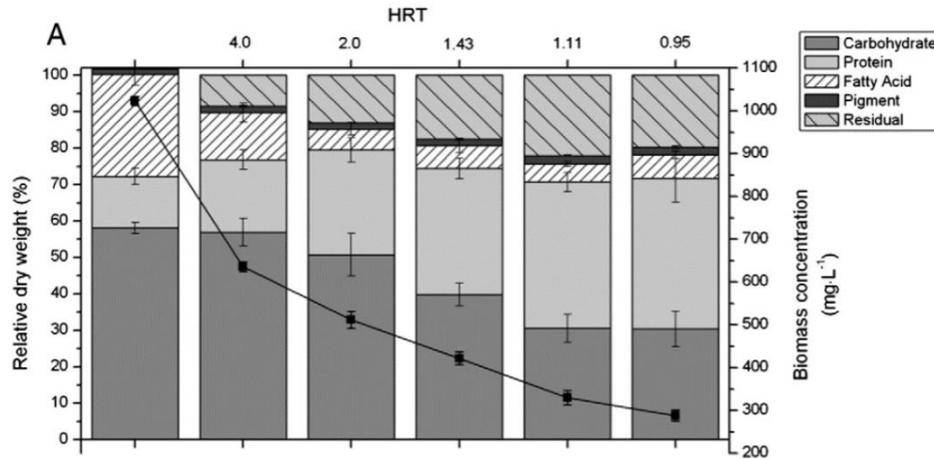
### 3.3. Dilution de l'influent

Les études qui ont été réalisées sur des lisiers rapportent souvent des dilutions préalables à l'introduction dans les bassins de microalgues pour faciliter la pénétration de la lumière et diminuer la concentration en nutriments. On peut donc trouver dans la littérature des concentrations en azote des lisiers dilués allant de 30 à 2400 mgN/L (Gantar *et al.* 1991; González *et al.* 1997; González *et al.* 2008; de Godos *et al.* 2009), les informations concernant la pénétration de la lumière dans ces matrices sont rarement citées.

Le problème qui se pose est la survie des espèces introduites face aux espèces autochtones. En effet, Gantar *et al.* (1991) ont mis en évidence un remplacement des souches introduites (*Scenedesmus* & *Spirulina*) pour un apport de lisier avec une concentration en azote de 2,4 gN/L (dilution à 50%). Le problème est peut-être dû à un manque de période d'adaptation. D'ailleurs, sans période d'adaptation les microalgues meurent en quelques heures (Martin 2011). Cet auteur recommande une période d'adaptation d'environ 2 semaines avec une augmentation progressive de la concentration en lisier.

### 3.4. Temps de séjour hydraulique

L'épuration à l'aide de microalgues se fait grâce à l'accumulation des nutriments dans la biomasse algale puis récupération de cette dernière. Pour éliminer l'azote, la croissance des algues doit donc être suffisante, mais la teneur en nutriments à l'intérieur des cellules doit aussi être convenable. Par exemple, l'azote est stocké principalement sous forme de protéines dans les cellules, donc la teneur en protéines dans les microalgues va aussi être un paramètre important. Plusieurs auteurs ont montré le fort impact du temps de séjour sur la composition des microalgues (Converti *et al.* 2009; Dickinson *et al.* 2013).



**Figure 20: Evolution de la composition de *Scenedesmus sp.* en fonction de différents temps de séjour hydrauliques, HRT (Dickinson *et al.* 2013)**

L'augmentation du temps de séjour hydraulique influe négativement sur la teneur en protéines des algues (Figure 20), le pourcentage de protéines est d'environ 20% pour un HRT de 4 jours, tandis qu'il atteint 40% pour un HRT de 0,95 jours. Mais le temps de séjour a un impact inverse sur la croissance algale, un compromis doit ainsi être trouvé afin d'éliminer le maximum de nutriments du milieu. Dans le cas de la figure 13, l'optimum se trouve vers un temps de séjour de 2 jours.

#### **4. Culture de microalgues à grande échelle**

Bien que la culture de microalgues ne soit pas très utilisée dans le cadre du traitement des déchets, des installations sont déjà assez répandues et visent à étudier ou commercialiser principalement des produits à haute valeur ajoutée, des algues destinées à l'alimentation ou à la production de biofuel.

Le Tableau 7 représente un état de ces installations à grande échelle (Laski and Schwartz ; Benemann and Oswald 1993 ; Ben-Amotz 2011 ; Delrue 2012 ; Titica 2012 ). La plus grande d'entre elles, d'une superficie de 100 ha, est située en Australie et vise à produire du biofuel/biodiesel, de la nourriture et des produits pharmaceutiques. La situation géographique de ces installations, représentée Figure 21 est principalement comprise entre les latitudes 20° et 50° nord ainsi qu'en Australie. Les pays où elles sont implantées sont des pays industrialisés ou émergents (membre ou invité du G20 excepté Israël) avec une majorité d'installation aux USA. Il est cependant important de noter que toutes ces installations ne sont pas exploitées à des fins commerciales et que nombre d'entre elles sont destinées à la recherche et au développement.

Les technologies de culture les plus rencontrées sont des lagunes à haut rendement suivies par des photobioréacteurs tubulaires. Ces derniers présentent un avantage sanitaire dans le cas de la production destinée à l'alimentation ou encore de produits pharmaceutiques. Les produits à haute valeur ajoutée extraits industriellement à partir des algues sont notamment : omega-3,  $\beta$ -carotène, astaxanthine, ainsi que d'autres composés utilisés dans les pharmaceutiques et les cosmétiques.



**Figure 21 : Situation géographique des installations de culture de microalgues à grande échelle.**

Dans le cadre de l'épuration, le lagunage à haut rendement est plus approprié. D'après les nombreux exemples, il semble réalisable d'établir un lagunage à grande échelle sans problèmes de gestion insurmontables. Il faut pondérer cette remarque en fonction du type de culture, par exemple pour une culture de *Chlamydomonas*, un pH de 4 peut permettre d'éviter l'implantation d'algues autochtones et donc de simplifier l'exploitation.

**Tableau 7 : Installation de culture de microalgues à grande échelle (Laski and Schwartz ; Benemann and Oswald 1993 ; Ben-Amotz 2011 ; Delrue 2012 ; Titica 2012 )**

Company/research center	Place	Size	Technology	Final product	Comments
Sapphire Energy	Columbus, New Mexico	404686 m <sup>2</sup>	Raceway	Fuel/Diesel	
	Las Cruces, New Mexico	89030 m <sup>2</sup>	Raceway	-	R&D
Heliae	Gilbert, Arizona	24281 m <sup>2</sup>	?	high value nutraceutical and cosmaceutical products	R&D
EVERIS and BTME	Cadiz, Spain	90000 L	Tubular bioreactor	human food, production of omega-3 fatty acids and other uses	commercial and R&D
Algae.Tec Ltd.	Atlanta	6503 m <sup>2</sup>	?	Fuel/Diesel	R&D
Algatechnologies	Israel	40469 m <sup>2</sup>	Tubular bioreactor	cosmetics, nutritional supplements and energy	
Touchstone	Wooster, Ohio	52609 m <sup>2</sup>	Raceway	fuels and other high-value products	R&D
AlgaeBio	Arizona	?	?	Omega-3	
Bioprocess Algae	Shenandoah, Iowa	?	Biofilm	high value, feedstock for feeds, food and fuel	
W2	?	?	Tubular bioreactor	food, health and bio-fuel markets	
Cellana	Hawaiï	24281 m <sup>2</sup>	Raceway combined to photobioreactor	renewable fuels, renewable chemicals and sustainable feed	R&D
Solix Biosystems	Colorado	180000 L	immersed tubular bioreactor	Fuels, nutrition, cosmetics	R&D, technologic support
Phyco BioSciences, Inc.	Arizona	647360 m <sup>2</sup>	?	fuels and food	
Seambiotic and Chinese Power Company	Penglai, China	120000 m <sup>2</sup>	?	foodstock and nutraceutical industries	
Aurora Algae	Karratha, Australia	4000 m <sup>2</sup>	Raceway	food, fuel, and pharmaceuticals	R&D
	Karratha, Australia	1000000 m <sup>2</sup>	Raceway	food, fuel, and pharmaceuticals	commercial
Earthrise Farms	California	185000 m <sup>2</sup>	Raceway	food	spirulina
Betatene	Australia	125000 m <sup>2</sup>	Raceway	B-caroten	Dunaliella salina, commercial
Parry Nutraceuticals Ltd.	India	526000 m <sup>2</sup>	Raceway	food	Spirulina, commercial
Algomed	Allemagne	500 km of tubes	Tubular bioreactor	food	Chlorella, commercial
Biotechnologia de microalgas	Jerez, Spain	87000 L 4500 m <sup>2</sup>	Tubular bioreactor Raceways	7 algal species and derivates	commercial
Novagreen	Bergheim, Deutschland	4600 L	Plastic bags	food, cosmetics and pharmaceutical industry	
microalgae bioenergy development program	Taiïwan	?	from round pond to raceway	biofuel	R&D
Nature Beta Technologies Ltd.	Eilat, Israel	100000 m <sup>2</sup>	Raceway	B-caroten	Dunaliella, commercial
Microbio Resources	San Diego	?	?	caroten	
Cyanotech Corp.	Hawaiï	225000 m <sup>2</sup>	Raceway	astaxanthin & spirulina	commercial

Seambiotic Ltd.

Israel

1000 m<sup>2</sup>

Raceway

CO<sub>2</sub> sequestration, biofuel, nutritional additive

R&D

---

## 5. Cultures dans lisier/digestat

### 5.1. Croissance

Les densités, productivités et taux de croissance spécifique que l'on peut trouver dans la littérature (voir Tableau 8) pour les lisiers et digestats de lisier de porc sont assez difficiles à comparer à cause des conditions expérimentales différentes. Certains auteurs ont par exemple étudié la croissance des algues en extérieur en HRAP alors que d'autres les ont étudié en PBR verticaux en intérieur avec lumière artificielle. De plus, l'expression de leurs résultats est difficilement comparable dans la plupart des cas à cause de l'utilisation d'unités différentes pour la lumière et la productivité principalement. Dans le but de confronter les données, ces deux paramètres ont été recalculés. La lumière a été convertie en flux de photons photosynthétiques en considérant que la lumière est la lumière du soleil. L'hypothèse pour le calcul de la productivité est encore plus forte, puisque lorsque la productivité est exprimée par rapport à une surface, nous avons considéré une profondeur de lagune de 30 cm afin de recalculer cette productivité par rapport à un volume et dans le but d'homogénéiser les données.

**Tableau 8 : Revue des concentrations maximales, productivités et taux de croissance spécifique de microalgues développées sur lisier de porc et digestat de lisier de porc**

N affluent (mg.L <sup>-1</sup> )	Température (°C)	Lumière (μmolE. m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Densité maximale	productivité (mg.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	taux de croissance spécifique (i <sup>-1</sup> )	Auteur, année
<b><u>Lisier de porc</u></b>						
NTK : 49-4900	24	75*		20* (6 g/m <sup>2</sup> /j)		Bai (2011)
TN : 114	37	400	1610 mg/L	73* (22 g/m <sup>2</sup> /j)		Barlow (1975)
	20	50-117*	1,5.10 <sup>11</sup> cells/L			Baumgarten (1999)
	25	42	750 mg/L			Cheung (1981)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 35-75	12	28*	1,6 mg Chl/L			Dabbadie (1994)
NTK : 59-370	17	1122*	1310 mgVSS/L	93* (28 g/m <sup>2</sup> /j)		de Godos (2009)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 20	15	1000*	1,1.10 <sup>13</sup> cells/L			de Godos (2010)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 150-310	25	75*	940 mgMS/L			de Godos (2010)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 21-24	10		200 mg/L	12		de le Noüe (1994)

				(3,5 g/m <sup>2</sup> /j)		
TN : 137,2			0,62-3,44.10 <sup>9</sup> cells/L	60* (18 g/m <sup>2</sup> /j)		Fallowfield (1985)
NTK : 65-315	19	1080*	1300 mgVSS/L			Ferrero, (2012)
NTK : 570				50-67* (15-20 g/m <sup>2</sup> /j)		Goh (1984)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 60-2460	32		1520 mg/L	110-360	0,23	Kim (2000)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 41-246	30	33*	2.10 <sup>8</sup> cells/L		0,4	Mezzomo (2010)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 40	20			146		Pouliot (1986)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 2000-2400	20	45*	200-250 mg/L	12-30* (3,5-9 g/m <sup>2</sup> /j)		Sevrin-Reysac (1996)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 40-57,4	21		213 mg/L	2-30* (0,68-9 g/m <sup>2</sup> /j)		Sevrin-Reysac (1998)
			1.10 <sup>9</sup> cells/L			Sim (1988)
TN : 170-230	26	1064*			0,26 à 0,62	Traviesco (2004)
TN : 8,5-37	26	1064*	50 mg Chl/L		1,2	Traviesco (2006)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 32-126	26	63*	290 mg/L	40	0,57	Wang (2012)

**Digestat de lisier de porc**

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 20-100	20	114*	450-750 mg/L	31-53		de la Noüe (1989)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 300-500			1500 mgVSS/L	7-33* (2-10 g/m <sup>2</sup> /j)		González- Fernández (2011)
TN : 400	30		830 mg/L			Koopman (1983)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1000	26,5		9.10 <sup>9</sup> cells/L		0,312	Kumar (2010)
NTK : 60	25	200	1000 mg/L	158		Levine (2011)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 96-736	35	200*		163-332		Molinuevo-Salces (2010)
TN : 46,6	32	144	770 mg/L			Olguín (2001)
TN : 28,1-30,4	30	1500		57* (17 g/m <sup>2</sup> /j)		Olguín (2003)
TN : 122		100*	2400 mg/L	118	0,091	Park (2010)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1-60	17	493*		46* (13,9 g/m <sup>2</sup> /j)		Svoboda (1989)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 50-100	27,5	55*	2.10 <sup>9</sup> cells/L (≈ 1800 mg/L)	33-133* (10-40 g/m <sup>2</sup> /j)		Waygood (1980)

\*valeur calculée (voir texte)

On peut observer que la gamme des concentrations étudiées en azote est très étendue, d'environ 1 mg à 1g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. Suivant les conditions (espèce d'algues, type de bassin, température, lumière, nutriments, *etc.* ; cf 1), les taux de croissance spécifiques s'étendent de 0,09 à 1,2 j<sup>-1</sup>, les productivités vont de 2 à 360 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> et les valeurs de concentrations maximales sont comprises entre 200 et 2 400 mg MES/L (2.10<sup>8</sup> à 1,1.10<sup>13</sup> cellules.L<sup>-1</sup>). La moyenne de productivité utilisant comme substrat du digestat (100 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) est supérieure à celle utilisant du lisier (80 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), mais au vu de l'écart type (environ 100 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), il est impossible d'affirmer que les digestats sont un meilleur milieu de culture pour les algues que le lisier. D'autre part, il n'a pas été possible d'établir, à partir de ces données, de relation claire entre la productivité et la température ou la lumière comme le montre la Figure 22.

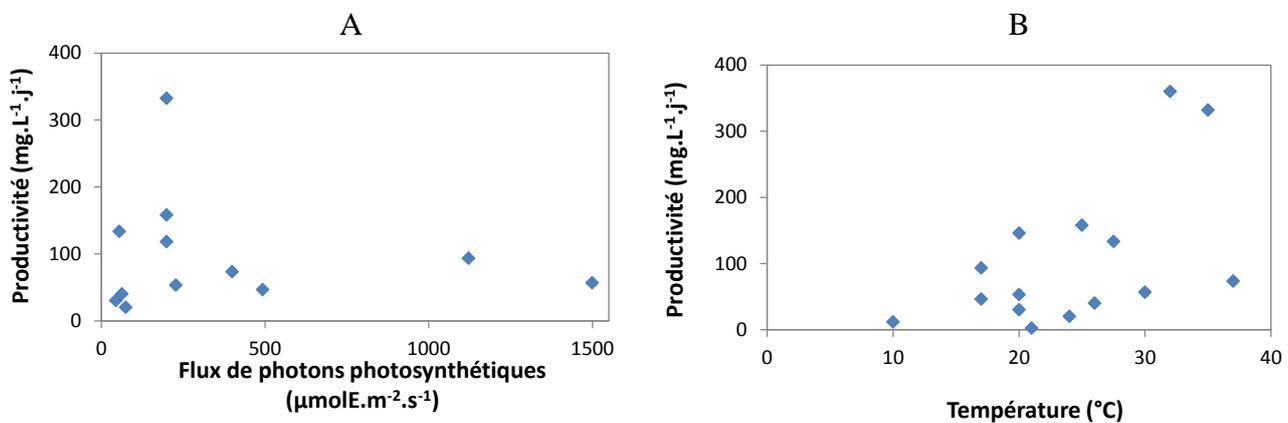


Figure 22 : Revue de la productivité en fonction de la lumière (A) et de la température (B).

Les raisons de non adéquation sont multiples et peuvent être partiellement expliquées par l'hypothèse de la conversion de la productivité, par la photo-inhibition possible pour les forts flux lumineux et en raison de la disparité des dispositifs et des conditions opératoires (espèces d'algues, agitation, temps de séjour, *etc.*). Parmi les autres paramètres que la lumière et la température pouvant impacter la productivité, la couleur de l'influent est un paramètre important qui peut impacter fortement la diffusion de la lumière et il apparaît nécessaire de mieux appréhender ce paramètre par exemple à travers une mesure de la densité optique du milieu et il serait nécessaire d'en tenir compte dans la comparaison.

## 5.2. Epuración

Comme pour la croissance, les conditions appliquées par les auteurs sont très différentes. Les rendements d'épuration (voir Tableau 9) ne sont donc pas très comparables à cause notamment de la concentration en azote de l'affluent, néanmoins en admettant qu'ils le soient, ceux pour l'azote

sont élevés sur l'ensemble des références, avec une moyenne de 84% (écart type de 20%). Ceux du phosphore sont un peu inférieurs avec 77% (écart type de 23%) mais restent correctes. Ces résultats encouragent le développement d'un bioprocédé utilisant les microalgues comme microorganismes épurateur ou co-épurateur, s'il se révèle que l'impact provient principalement de l'apport d'oxygène (Mouget *et al.* 1995). Il est difficile d'observer des différences de rendement d'épuration de l'azote et du phosphore entre le lisier et le digestat de lisier de porc pour ces mêmes raisons. Cependant, N et P dans le digestat sont minéralisés et sont donc directement assimilables par les microalgues, tandis que les formes organiques doivent être réduites par des bactéries dans le cas du lisier.

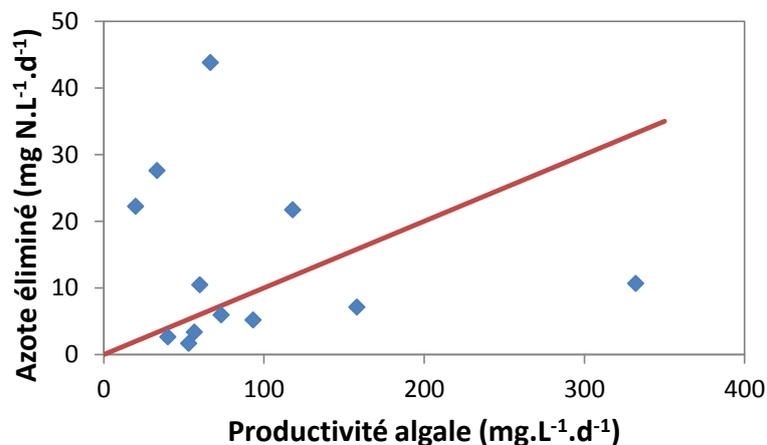
**Tableau 9 : Revue des rendements d'élimination de l'azote et du phosphore à l'aide de microalgues sur du lisier de porc et du digestat de lisier de porc.**

N affluent (mg.L <sup>-1</sup> )	Température (°C)	Lumière (μmolE. m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Rendement d'élimination		Auteur, année
			N (%)	P (%)	
<b><u>Lisier de porc</u></b>					
TN : 114	37	400	35		Barlow (1975)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 35-75	12		80		Dabbadie (1994)
NTK : 59-370	17	1122*	88 (NTK)	< 10	de Godos (2009)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 660			100	90	de Godos (2009)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 20	15	1000*	99		de Godos (2010)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 150-310	25	75*	39	65	de Godos (2010)
TN : 137,2			54-98	42-89	Fallowfield (1985)
NTK : 65-315	19	1080*	88 (NTK)		Ferrero (2012)
TN : 475-2370	25		92,2-99,3 (TN)	98-100	Gantar (1991)
NTK : 570			88 (NTK)	85	Goh (1984)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 36	20	60	95	60	González (1997)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1331-2250	30	75*	65		González (2008)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 180	30	167*	99 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	80	González (2008)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 60-2460	32		N <sub>inorga</sub> 93 N <sub>orga</sub> 56	93 (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	Kim (2000)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 41-246	30	33*		42	Mezzomo (2010)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 40	20		100	99	Pouliot (1986)
TN : 170-230	26	1064*	79	74	Traviesco (2004)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 32-126	26	63	82,5 TN	75	Wang (2012)

<u>Digestat de lisier de porc</u>					
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 20-102	25	22,4	48 TN	68	Cañizares-Villanueva (1994)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 20-100	20	228*	61,9-100	42,1-94,7	de la Noüe (1989)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 300-500	30		92 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )		González-Fernandez (2011)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 1000	26.5	93	54	100	Kumar (2010)
NTK : 60	25	200	90-95		Levine (2011)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : 96-736	35	200*	94-100	75-80	Molinuevo-Salces (2010)
TN : 28,1-30,4	30	1500	96	87	Olguín (2003)
TN : 122		200*	89		Park (2010)

\*valeur calculée (voir texte)

Il n'est pas possible de confronter directement la productivité algale et le pourcentage d'épuration. En revanche, à l'aide de concentration initiale et de la durée du traitement (ou HRT) il est possible de comparer la productivité à une vitesse d'élimination calculée. La Figure 23 représente l'azote éliminé en fonction de la productivité.



**Figure 23 : Représentation de l'azote éliminé en fonction de la productivité algale de la littérature. La ligne rouge représente 10 % d'azote massique dans la biomasse.**

La teneur massique en azote varie classiquement de 5 à 10 % de la matière sèche (Markou *et al.* 2014). La ligne rouge, représente une concentration hypothétique de 10% d'azote massique dans la biomasse (Sous-chapitre 4. 1, p 157). Les points situés au-dessus de cette ligne correspondent à une élimination de l'azote supérieur à ce que la biomasse seule peut théoriquement assimiler, on peut ainsi estimer que d'autres mécanismes d'élimination de l'azote sont en présence pour les productivités algales faibles (nitrification-dénitrification, stripping, etc.).

## Sous-chapitre 1. 4. Modélisation de la croissance des microalgues

La modélisation de la croissance des microalgues est abordée dans ce travail afin d'une part de confronter les résultats expérimentaux aux concepts théoriques actuellement développés afin d'enrichir la réflexion, et d'autre part, la modélisation numérique de la croissance des microalgues et de l'épuration associée est envisagée comme un outil permettant de faciliter le changement d'échelle pour passer du laboratoire à l'échelle industrielle afin de réaliser un premier dimensionnement d'une filière à taille réelle.

### 1. Généralités sur la modélisation biocinétique

Un modèle biocinétique est une image conceptuelle de la façon dont un système biologique fonctionne. Il ne représente pas tous les processus physiques, chimiques et biologiques, mais tend à reproduire les principaux comportements observés. Parmi les modèles biocinétiques les plus connus en traitement des effluents, on trouve les modèles du type Activated Sludge Model (ASM), développés par le groupe de travail sur la modélisation mathématique pour le dimensionnement et le fonctionnement des systèmes biologiques de traitement de l'International Water Association (IWA) (Henze *et al.* 1987). Le principe général de la modélisation biocinétique est basé sur les bilans de matière.

#### 1.1. Présentation de la matrice de Gujer

Ces modèles sont représentés sous forme de matrices, appelées matrices de Gujer (ou matrice de Petersen). Sur les lignes sont représentés les processus (j), c'est-à-dire les réactions pouvant avoir lieu, et en colonne on retrouve les variables d'état du modèle (i).

Ce principe est présenté sur l'exemple d'une situation simple, où une biomasse se développe sur un substrat (Henze *et al.* 2000). On peut considérer le modèle le plus simple pour cette situation avec deux variables (Tableau 10) : la biomasse et le substrat dissous ; deux processus sont mis en œuvre : la croissance et la mort de la biomasse. On utilisera la nomenclature standardisée par Corominas *et al.* (2010) comme règle de notation pour les paramètres et variables. Dans cette nomenclature, le symbole S désigne les composés solubles, le X, les composés particuliers.

Les éléments dans la matrice comprennent les coefficients stœchiométriques,  $v_{ij}$ , qui fixent les relations massiques entre les composés dans les processus. On utilise le signe négatif pour la

consommation et positif pour la production. Par exemple, la croissance de la biomasse (+I) apparaît lors de la consommation du substrat soluble (-I/Y).

**Tableau 10 : Processus, cinétique et stœchiométrie pour la croissance d'une biomasse, d'après Henze et al. (2000).**

		Continuité			
		Variable →	i	1	2
Bilan matière	j ↓	Processus	X	S <sub>B</sub>	
	1	Croissance	1	$-\frac{1}{Y}$	$\mu_{\max} \cdot \frac{S_B}{K_S + S_B} X$
	2	Mort	-1		$b \cdot X$
		Taux de conversion observés [M.L <sup>-3</sup> .T <sup>-1</sup> ]	$r_i = \sum_i r_{ij} = \sum_i v_{ij} \rho_{ij}$		<u>Paramètres cinétiques :</u> Taux de croissance spécifique maximum : $\mu_{\max}$
		<u>Paramètre stœchiométrique</u> Taux de croissance réel : $Y$	Biomasse [M(DCO).L <sup>-3</sup> ]	Substrat [M(DCO).L <sup>-3</sup> ]	Coefficient de demi-vitesse : $K_S$ Taux de mort spécifique : $b$

*X : biomasse ; S<sub>B</sub> : substrat soluble*

En plus de la stœchiométrie, la cinétique de réaction est essentielle pour pouvoir calculer l'évolution des variables. La plus simple est la mort de la biomasse, elle va dépendre directement de sa concentration (X) et du taux de mort spécifique. En ce qui concerne la croissance, plusieurs paramètres sont pris en compte. La cinétique de croissance dépend du taux de croissance spécifique maximum, d'un terme de Monod fonction de la concentration en substrat et de la concentration en biomasse. Ce terme de Monod est utilisé comme « interrupteur » de la cinétique : si les conditions de disponibilité du substrat sont mauvaises, la cinétique de croissance est réduite. A l'inverse, ce terme tend vers 1 pour des conditions favorables (croissance maximale). D'autres termes existent pour définir une limitation de la croissance, comme le modèle de Contois. En outre, la croissance peut être limitée par des composés inhibiteurs ou par des compétitions avec d'autres types de biomasse. Cela peut, de la même manière, être intégré dans le modèle global à l'aide de relations mathématiques limitant la cinétique.

### 1.2. Bilan matière

Dans un système donné, la concentration d'un composé peut être affectée par plusieurs processus, par exemple les nitrites sont produits et consommés dans un système réalisant la nitrification-dénitrification. La présentation en matrice permet de voir facilement les processus impliqués dans la modification des concentrations de chaque composé, ainsi que les composés impliqués dans les processus. L'équation fondamentale du bilan matière est la suivante :

$$\text{Entrée} + \text{Réaction} = \text{Sortie} + \text{Accumulation}$$

Les termes d'entrée et de sortie sont des termes de transports qui sont seulement dus à la configuration physique de la station. Le terme de réaction,  $r$ , est défini par le modèle biocinétique et est obtenu grâce à la matrice de Gujer comme ci-après :

$$r = \sum_i r_{ij} = \sum_i V_{ij} \rho_{ij}$$

Le terme de réaction ainsi obtenu pour la biomasse est :

$$r_X = \frac{\mu_{\max} \cdot S_B}{K_S + S_B} X - bX$$

La vérification du bilan matière ne peut se faire que dans une configuration particulière. La matrice seule n'est pas suffisante, il faut les limites de définition du système ainsi que les termes de transport.

## 2. Modélisation de la biomasse algale

Les modèles disponibles dans la littérature concernant la croissance algale sont nombreux. Les principaux paramètres pris en compte par ces modèles sont la lumière, le carbone inorganique, l'azote, le phosphore et la température.

### 2.1. Lumière

Contrairement aux autres conditions expérimentales, la lumière est spécifique aux microalgues, comparées aux bactéries, puisque c'est leur source d'énergie. Le Tableau 11 regroupe des modèles traduisant l'effet de la limitation de la lumière sur la croissance des microalgues (d'après Filali, 2012). Les modèles intégrant l'effet de la lumière sont nombreux et il ne semble pas y avoir de consensus sur un modèle décrivant cet effet (Béchet *et al.* 2013).

**Tableau 11 : Modèles intégrant la limitation de la lumière sur la croissance de microalgues d'après Filali (2012).**

Modèles	Structure	Paramètres du modèle
Monod (1941) appliqué à <i>Spirulina platensis</i> , Cornet et al. (1995)	$\mu = \mu_{max} \frac{I}{K_{SI} + I}$	$K_{SI}$ : constante de demi-saturation relative à la lumière
Tamiya et al. (1953) appliqué à <i>Chlorella vulgaris</i>	$\mu = \mu_{max} \frac{\alpha \cdot I}{\mu_{max} + \alpha \cdot I}$	$\alpha$ : valeur empirique
Van Oorschot (1955) appliqué à <i>Isochrysis galbana</i> (Grima et al. 1996)	$\mu = \mu_{max} \left(1 - e^{-\left(\frac{I}{I_{max}}\right)}\right)$	$I_{max}$ : intensité lumineuse de saturation correspondant à $\mu_{max}$ ( $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
Ramesh (1997) appliqué à <i>Scrippsiella sp.</i>	$\mu = \mu_{max} \frac{(I - I_C)}{K_1 + (I - I_C) - A e^{-\left(\frac{K}{I}\right)}}$	$I_C$ : intensité lumineuse minimale nécessaire à la croissance ( $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) $A, K_1$ : constantes $K$ : paramètre équivalent à l'énergie d'activation
Moser (1985) appliqué à <i>Isochrysis galbana</i> (Grima et al. 1996)	$\mu = \mu_{max} \frac{I^n}{I_k^n + I^n}$	$I_k$ : Affinité des microalgues à la lumière ( $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) $n$ : valeur empirique (sans dimension)
Ogbonna et al. (1995) appliqué à <i>Chlorella pyrenoidosa</i> et <i>Spirulina platensis</i>	$\mu = K \cdot \left(\frac{\varepsilon \cdot \alpha \cdot I_0}{V}\right)$	$\varepsilon$ : constante $\alpha$ : surface éclairée ( $\text{m}^2$ ) $V$ : volume de culture ( $\text{m}^3$ ) $K$ : constante équivalente à un rendement de croissance $I_0$ : intensité lumineuse incidente ( $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

---

Martínez Sancho et al. (1999) appliqué à <i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	$\mu = \alpha \cdot e^{-\beta \cdot I_0} \cdot \sqrt[n]{q_E - m_E}$	<p><math>\alpha, \beta</math> : constantes</p> <p><math>q_E</math> : vitesse spécifique de consommation de l'énergie lumineuse (KJ.g<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)</p> <p><math>m_E</math> : énergie d'utilisation de la lumière pour la maintenance (KJ.g<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)</p> <p><math>n</math> : paramètre empirique (sans dimension)</p>
---	---	---

---

Avec  $I$  (μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) l'intensité lumineuse moyenne dans le réacteur et  $\mu_{max}$  (h<sup>-1</sup>) le taux de croissance spécifique maximal.

Ces modèles présentent différents niveaux de complexité avec de 2 à 5 paramètres. Ils semblent se diviser en deux sortes : soit ils utilisent comme « substrat » la lumière moyenne dans le réacteur, soit ils utilisent la lumière incidente. Cette deuxième catégorie limite l'universalité de l'approche, puisque les paramètres utilisés pour valider le modèle sont dépendants des conditions opératoires (Béchet *et al.* 2013).

## 2.2. Autres paramètres environnementaux

Un certain nombre d'autres paramètres ont été étudiés et modélisés dans la littérature. On retiendra pour cet état de l'art ceux concernant le carbone inorganique, le phosphore et la température.

### 2.2.1. Carbone inorganique

Le carbone inorganique est la source de carbone des microalgues. Il est généralement modélisé dans la littérature à l'aide d'un terme de Monod sur la variable CO<sub>2</sub>, ou carbone inorganique total, TIC (King 1970 ; Goldman *et al.* 1974; Novak and Brune 1985 ). Watson (2009) a modélisé l'influence de deux sources de carbone, CO<sub>2</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, dont le dioxyde de carbone est consommé préférentiellement (d'après Filali, 2012). La vitesse de croissance de la biomasse algale sur les hydrogénocarbonates est ainsi limitée par la présence de dioxyde de carbone :

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{[HCO_3^-]}{K_{S,HCO_3^-} + [HCO_3^-]} \cdot \frac{K_{S,CO_2}}{K_{S,CO_2} + [CO_2]}$$

$\mu_{max}$  : vitesse de croissance maximale ( $h^{-1}$ )

$[HCO_3^-]$  : concentration en hydrogénocarbonates dissous ( $mol.L^{-1}$ )

$[CO_2]$  : concentration en dioxyde de carbone dissous ( $mol.L^{-1}$ )

$K_{S,HCO_3^-}$  : constante de demi-saturation relative à  $HCO_3^-$  ( $mol.L^{-1}$ )

$K_{S,CO_2}$  : constante de demi-saturation relative au  $CO_2$  ( $mol.L^{-1}$ ).

### 2.2.2. Phosphore

Le phosphore est modélisé le plus souvent avec un modèle de Droop (1973). Ce type de modèle fait apparaître une variable supplémentaire, la concentration intracellulaire en élément, qui permet de découpler la consommation du substrat et la croissance algale (Bougaran *et al.* 2010). Le taux de croissance s'exprime ainsi :

$$\mu = \mu_{max} \cdot \left(1 - \frac{Q_{min}}{Q}\right)$$

$Q_{min}$  : quota intracellulaire minimum ( $g\ P.g\ biomasse^{-1}$ )

$Q$  : quota intracellulaire ( $g\ P.g\ biomasse^{-1}$ )

Ce type de modèle peut aussi être utilisé pour représenter la croissance algale et le stockage de l'azote (Bernard and Gouze 1995; Lemesle and Mailleret 2008 ).

### 2.2.3. Température

L'influence de la température sur le taux de croissance des microalgues est principalement définie, de la même manière que pour les bactéries, à l'aide d'une loi de type Arrhenius.

$$\mu = A_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Avec  $\mu$  le taux de croissance ( $h^{-1}$ ),  $T$  la température (K),  $A_0$  le taux de croissance spécifique à la température  $T_0$  et  $R$  la constante des gaz parfaits

Cependant, cette loi empirique a été développée pour des réactions chimiques et ne peut pas prédire l'impact de températures élevées sur des systèmes biologiques (Ahlgren 1987). Les modèles décrits dans le Tableau 12 représentent différentes approches pour prendre en compte cet effet. On notera notamment que certains modèles représentent l'impact seul de la température tandis que d'autres lient cet impact avec l'intensité lumineuse. Cette deuxième approche, pouvant se révéler plus complexe, représente l'interdépendance de la lumière et de la température, observée expérimentalement (Fawley 1984).

Tableau 12 : Modèles représentant l'effet de la température sur la croissance algale (2012).

Modèles	Structure	Paramètres du modèle
Bitaubé Pérez <i>et al.</i> (2008) appliqué à <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	$\mu = A_0 \cdot e^{\left(\frac{E_a}{RT} - \frac{T - T_0}{T_0}\right)} - B_0 \cdot e^{\left(\frac{E_b}{RT} - \frac{T - T_0}{T_0}\right)}$	$E_a, E_b$ : respectivement, l'énergie d'activation pour la croissance et pour la dégradation cellulaire (Kcal.mol <sup>-1</sup> ) R : constante des gaz parfaits (8.314 KJ.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> ) T <sub>0</sub> : température de référence égale à 293 K A <sub>0</sub> , B <sub>0</sub> : respectivement, vitesse spécifique de croissance et de dégradation cellulaire pour T <sub>0</sub> (h <sup>-1</sup> ) T <sub>opt</sub> : température optimale de croissance (K) μ <sub>max,Topt</sub> : vitesse maximale de croissance à T <sub>opt</sub> (h <sup>-1</sup> )
Nouals (2000) appliqué à <i>Porphyridium</i> <i>purpureum</i>	$\mu_{max} = \mu_{max,Topt} \cdot e^{\left(\frac{E_g}{RT} \left(\frac{1}{T_{opt}} - \frac{1}{T}\right)\right)} \cdot \frac{1}{\left[1 + A \cdot e^{\left(\frac{\Delta G_d}{R} \left(\frac{1}{T_{opt}} - \frac{1}{T}\right)\right)}\right]}$	$E_g$ : énergie d'activation du processus de croissance (KJ.mol <sup>-1</sup> ) ΔG <sub>d</sub> : variation d'énergie libre de la réaction de dénaturation des protéines (KJ.mol <sup>-1</sup> ) A : constante sans dimension

Goldman et  
Carpenter (1974)

$$\mu = A \cdot e^{\left(\frac{E(I)}{RT}\right)} \cdot \left[ \frac{S}{K_S(T) + S} \right]$$

$A$  : vitesse spécifique de croissance ( $\text{h}^{-1}$ )

$E(I)$  : énergie d'activation, fonction de la lumière  $I$  ( $\text{cal.mol}^{-1}$ )

$K_S(T)$  : constante de demi-saturation fonction de la température ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$S$  : concentration en substrat limitant ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$T$  : température (K)

D'autres auteurs utilisent une approche différente de la loi d'Arrhenius en exprimant le taux de croissance spécifique en fonction des températures minimum, maximum et optimum pour la photosynthèse (Bernard and Rémond 2012).

$$\mu(I) = \mu_{m,0}(I) \cdot \frac{(T - T_{\max})(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{opt}} - T_{\min})[(T_{\text{opt}} - T_{\min})(T - T_{\text{opt}}) - (T_{\text{opt}} - T_{\max})(T_{\text{opt}} + T_{\min} - 2T)]}$$

## **Conclusions et perspectives**

Les effluents d'élevage sont produits en grande quantité, notamment dans les zones d'élevage intensif, et nécessitent d'être mieux gérés afin d'améliorer leur valorisation et de réduire leurs impacts. Ils représentent un potentiel énergétique important, c'est pourquoi la digestion anaérobie s'avère incontournable pour la production de biogaz et donc d'énergie. En revanche, les nutriments, dont principalement l'azote et le phosphore, nécessitent d'être mieux gérés et valorisés. Dans ce contexte, la culture de microalgues peut se révéler intéressante.

Ces microorganismes regroupent de nombreuses espèces et ont un métabolisme complexe. Sur des matrices eutrophisées on retrouve cependant peu d'espèces parmi lesquelles *Scenedesmus sp.* et *Chlorella sp.* sont les plus représentées. La mise en œuvre de leur culture pour l'épuration semble la plus appropriée en lagunage à haut rendement (HRAP), et ce type de procédé semble réalisable, puisque des installations à grande échelle sont déjà en application dans d'autres contextes.

Cette synthèse bibliographique confirme la possibilité d'épurer les effluents chargés en nutriments et colorés que sont les digestats d'effluents d'élevage. Les rendements d'élimination obtenus sur l'azote et le phosphore sont satisfaisants dans les études menées précédemment. Cette synthèse met cependant en exergue plusieurs points importants ayant une forte influence sur la croissance des microalgues et la qualité de l'épuration.

La température est un paramètre important ayant un fort impact. Dans le procédé proposé, il est possible d'atteindre une température plus proche de la température optimale en réchauffant l'affluent ou une partie du bassin avec la chaleur excédentaire de la cogénération. Elle est largement étudiée dans la littérature et il ne semble pas nécessaire de pousser les recherches plus en profondeur dans ce contexte, où il est difficile de maintenir une température identique entre hiver et été et même dans différentes zones du bassin.

La source d'énergie des algues, la lumière, est régie par la profondeur des bassins, l'agitation et l'exploitation (dilution initiale, recirculation et concentration en algues) mais aussi par la couleur du digestat. Les impacts de l'agitation et de la profondeur des bassins sont assez durs à approcher en laboratoire. Dans une première phase expérimentale, il a été choisi pour bien comprendre l'influence de la disponibilité de la lumière et la quantifier, d'étudier l'influence de la coloration de l'effluent et de la lumière appliquée à composition en nutriments fixe.

A cause des équilibres, le phosphore peut être en faible quantité dans la phase liquide du digestat comparé à l'azote. De plus, le stockage du phosphore dans la biomasse pour usage ultérieur a été reporté dans la littérature. Il a donc été ensuite étudié l'impact de la concentration en phosphore dans le milieu sur la croissance des microalgues et sur l'épuration de N et P.

Le dioxyde de carbone émis lors de la cogénération peut être utilisé comme source de carbone inorganique des microalgues et a une forte influence sur la croissance algale d'après la littérature. L'éventuelle inhibition de la croissance à cause des composés présents dans les gaz de combustion ne se révèle pas significative, de même il n'y a pas (ou peu) d'accumulation de composés nuisibles dans la biomasse. L'injection de CO<sub>2</sub> (acide faible) est en outre un moyen simple et efficace de réguler le pH pour se situer proche du pH optimal. Dans le procédé envisagé il est possible de maîtriser la quantité de carbone inorganique fournie. L'étude des transferts et de l'impact de la quantité de CO<sub>2</sub> sur les microalgues a ensuite été étudiée.

L'impact des bactéries sur la population algale est encore mal connu et divise la communauté scientifique. Elles sont présentes dans les digestats et se développent dans des conditions similaires aux algues (pour ce qui est des nutriments et du temps de génération) et jouent un rôle autant dans la stabilité de la culture que dans l'épuration. Leur interaction mutuelle peut ainsi être observée en parallèle des expérimentations.

Dans ce procédé, le paramètre opérationnel le plus important est probablement le temps de séjour des solides, puisqu'il régit la concentration en biomasse du système et donc de nutriments retirés du digestat. Puisque l'effluent est épuré par les algues, en association avec des bactéries, ce paramètre va aussi influencer la part de la nitrification-dénitrification dans les processus d'épuration. La dernière phase expérimentale consistera donc à étudier l'impact du temps de séjour des solides sur ces paramètres.

Pour cette étude, il a donc été nécessaire de développer en premier lieu un pilote d'expérimentation (photobioréacteurs), en laboratoire, afin d'étudier ces paramètres de culture importants. Le dispositif d'étude est présenté dans le chapitre suivant. En outre, il est important de connaître la composition chimique et la coloration des digestats ainsi que leur variabilité dans le temps. C'est pourquoi, trois sites de méthanisation d'effluents agricoles ont été suivis (avec le projet ANR DIVA, Irstea Rennes) sur un an.

Enfin, pour fédérer les données acquises dans les diverses études, la modélisation biocinétique semble particulièrement approprié. Cet outil devrait permettre de changer d'échelle entre le dispositif expérimental et la culture en taille réelle afin réaliser un premier dimensionnement pour l'installation envisagée.

## **CHAPITRE 2. Matériels et méthodes**

Afin d'étudier l'impact de la lumière, du phosphore, du carbone inorganique et du temps de séjour des solides et pour bien comprendre la croissance des microalgues mais aussi des bactéries, il est important de suivre notamment la croissance et les nutriments à l'aide d'analyse chimique, physique et biologique. Ainsi, le développement méthodologique a mené à la construction d'un dispositif expérimental, mais aussi à différentes méthodes analytiques générales et spécifiques qui n'existaient pas toutes au laboratoire.

Des photobioréacteurs tubulaires verticaux ont été choisis plutôt qu'un lagunage à haut rendement pour des raisons pratiques de mise à l'échelle et de contrôle du chemin optique sur le pilote. Leur volume de quelques litres permet de réaliser plusieurs expérimentations en même temps et dans des conditions maîtrisées. De plus, ce volume est suffisamment conséquent pour permettre de faire des prélèvements pour le suivi analytique.

## 1. Pilote de laboratoire

### 1.1. Description

Un pilote de laboratoire a été développé pour étudier la croissance des microalgues à partir de digestats agricoles liquides ainsi que l'épuration associée. Ce pilote est composé de six photobioréacteurs cylindriques verticaux en verre de 2,5 L. Les principales caractéristiques du matériel utilisé pour ce pilote sont répertoriées dans le Tableau 13.

La température des réacteurs, facteur important de développement de la biomasse, est régulée à l'aide d'un cryothermostat faisant circuler de l'eau dans une double enveloppe de chaque réacteur (1, Figure 24) réalisée à l'aide de 2 tubes de verre imbriqués. La circulation du fluide caloporteur (eau) est faite *via* des nourrices qui permettent de régler les débits respectifs à chaque réacteur afin d'avoir une bonne maîtrise de la température.

**Tableau 13 : Principales caractéristiques du matériel utilisé sur le pilote**  
caractéristiques

Réacteurs	Hauteur totale	40 cm			
	Hauteur utile	35 cm			
	Diamètre intérieur	10 cm			
	Diamètre extérieur	15.6 cm			
Cryothermostat	Puissance frigorifique	à	20	0	-20 °C
			450	390	150 W

---

	Puissance de chauffe	2000W
Rampes de néons	2 tubes Grolux – Sylvania	40 W
	2 tubes « cool white »	40 W
	Flux de photons	
	photosynthétiques (PPF)	50 à 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
Injection $\text{CO}_2$	Pression injection	1,5 bar absolu
	Electrovanne	Tout ou rien
	Rotamètre	Débit $\approx$ 0-0,55 L/min (stratégie 1) Débit $\approx$ 0,3 L/min (stratégie 2)
Pompe péristaltique		Débit = 6,3 L/min
Sonde $\text{O}_2$	Electrode de Clark	
Sonde pH	Electrolyte gélifiée	

---

L'énergie est apportée aux microalgues (fonctionnement autotrophe) à l'aide d'un éclairage (2) dont le spectre lumineux est proche de celui émis par le soleil. Le flux est perpendiculaire aux réacteurs dont la conception permet un positionnement de cet éclairage allant de 6 à 60 cm de la surface des réacteurs, permettant ainsi de faire varier le flux lumineux entre 50 et 250  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  à la surface des réacteurs. Le système d'éclairage est composé de deux dispositifs identiques séparés par une paroi verticale et éclairant respectivement trois réacteurs chacun. Ce système permet des expérimentations simultanées avec des flux lumineux différents permettant la prise en compte de l'effet lumière grâce à une gestion indépendante de l'éloignement du système d'éclairage et, en conséquence, de la variation du flux lumineux pour chacun des groupes de trois réacteurs.

Pour s'approcher du spectre de lumière du soleil, chaque rampe de tubes fluorescents est composée de 2 tubes de croissance Grolux (Sylvania) et de 2 tubes de couleur « cool white ». De plus, afin d'éviter les perturbations apportées par la lumière du soleil, l'ensemble du dispositif est recouvert d'une enceinte opaque.

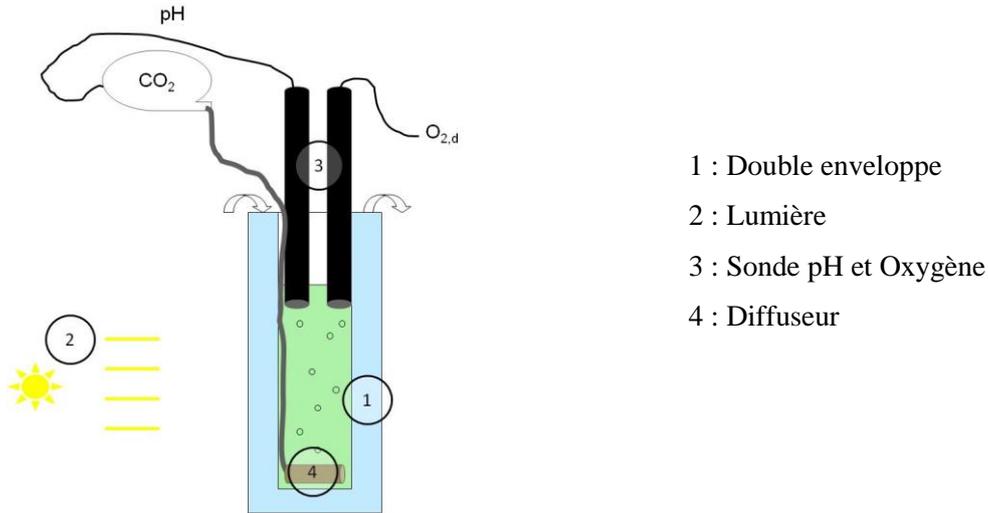
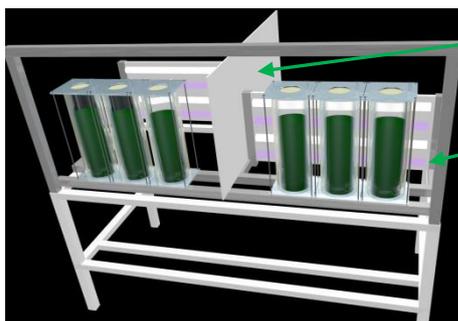


Figure 24 : Schéma de principe des photobioréacteurs

Afin de permettre une bonne accessibilité à la lumière sans endommager les algues, une agitation de 230 tours par minute est appliquée sur chaque réacteur à l'aide d'une pale d'agitation d'un diamètre de 8 cm et placée à 3,5 cm du fond du réacteur.

En outre, chaque réacteur de ce pilote de laboratoire est équipé d'une sonde permettant le suivi de la concentration en oxygène dissous (3), caractéristique de l'activité algale et d'une sonde pH (3) permettant le suivi de ce paramètre mais également le contrôle de l'injection de CO<sub>2</sub>. Ces deux paramètres sont mesurés en continu (toutes les 30 s) et enregistrés via une centrale d'acquisition et de commande (Agilent 34970) reliée à un ordinateur contrôlé par un logiciel développé spécifiquement sous Labview 2011. L'interface ainsi que le diagramme de l'application sont joints en annexes 2 et 3 pour une des stratégies utilisées.

L'injection de CO<sub>2</sub> est assurée par des diffuseurs (4) d'aquarium, soit des tuyaux poreux de 40 cm de long enroulés en spirale de 9 à 10 cm de diamètre, placés en fond de réacteurs. Le CO<sub>2</sub> injecté (0,5 bar) provient d'une bouteille et passe par une nourrice à gaz où sont raccordés des électrovannes puis des rotamètres pour brider le débit de gaz et est enfin injecté par les diffuseurs en fond de réacteur selon les stratégies utilisées (Figure 25). Ces électrovannes sont également contrôlées à l'aide du programme Labview et reliées à la centrale d'acquisition et de commande.



Paroi pour dissocier les réacteurs en 2 x 3 réacteurs  
 Tubes fluorescent : néon de croissance Grolux (Sylvania) et néon couleur « cool white »

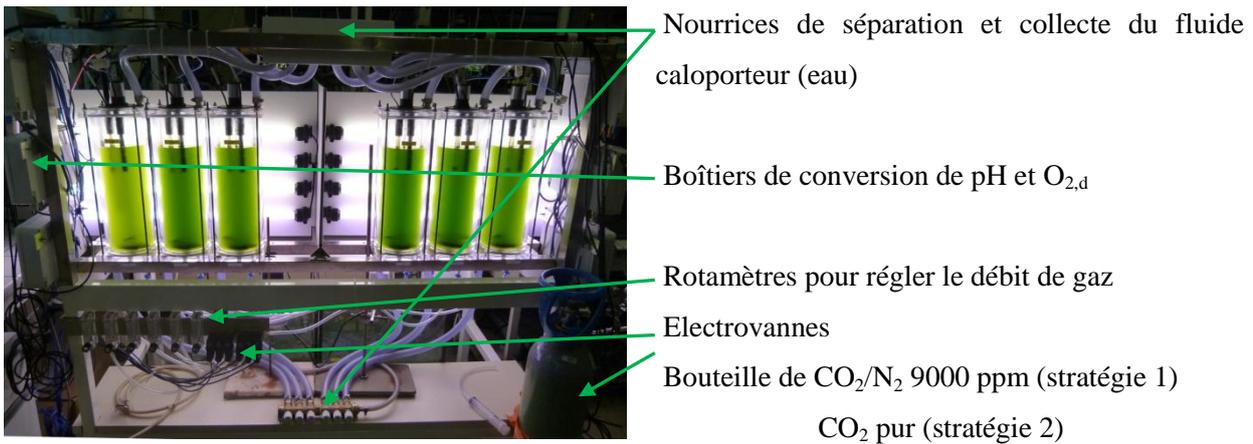


Figure 25 : Schéma et photo du pilote de culture de microalgues

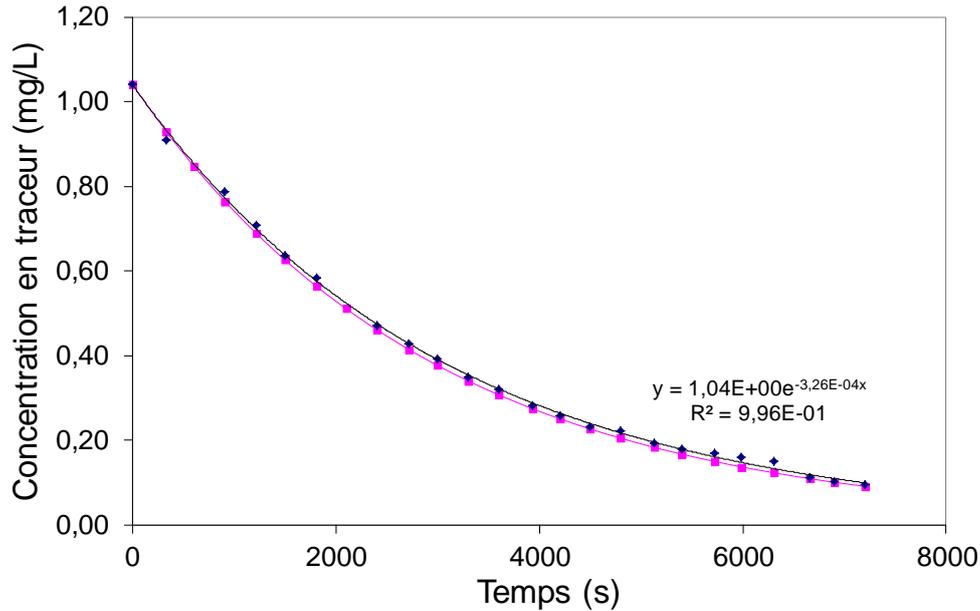
## 1.2. Caractérisation des réacteurs

Afin de fiabiliser l'interprétation des résultats expérimentaux obtenus sur le pilote de laboratoire, les 6 réacteurs ont été caractérisés en terme d'agitation et de répétabilité entre les différents réacteurs.

### 1.2.1. Détermination de temps de séjour

Pour la caractérisation de l'agitation des réacteurs, une détermination de temps de séjour (DTS) a été réalisée sur les 6 réacteurs afin de vérifier qu'ils sont assimilables à des réacteurs parfaitement agités. La DTS est normalement réalisée sur des réacteurs continus alors que le pilote est fait pour fonctionner en batch. Les réacteurs ont ainsi été aménagés afin de répondre à ce critère lors des DTS. Le principe de cette détermination est de suivre l'évolution de la concentration d'un traceur lors du fonctionnement en continu. En fonction du type d'injection et de la forme du signal en sortie, il est possible de déterminer s'il existe ou non des zones mortes et des courts-circuits.

Le traceur utilisé est du bleu de méthylène, traceur coloré, qui a initialement été introduit dans le réacteur à une concentration d'environ 1 mg/L. Il a été choisi de suivre la décroissance de la densité optique à 660 nm en sortie du réacteur tandis que l'entrée du réacteur était composée d'eau (injection échelon).



**Figure 26 : Réponse expérimentale et théorique de la sortie d'un réacteur à un échelon lors de la détermination de temps de séjour. La courbe théorique est en rose tandis que la courbe expérimentale est en bleu.**

La concentration théorique en traceur en sortie du réacteur est définie par la relation suivante :

$$C_t = C_0 e^{-\frac{t}{HRT}}$$

Avec  $C_t$  et  $C_0$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) la concentration en traceur au temps  $t$  (s) et au temps initial respectivement et  $HRT$  le temps de rétention hydraulique (s).

Le signal de sortie est représenté sur la Figure 26. Les réponses expérimentales et théoriques sont assez bien corrélées et ne présentent pas de signe important caractéristique de court-circuit ou de zone morte. Les ordonnées à l'origine et pente des courbes linéarisées (logarithme népérien) sont statistiquement identiques ( $P < 5\%$ ; test t-student). Les déterminations de temps de séjour ont donc permis d'assimiler les 6 réacteurs à des réacteurs parfaitement agités.

### 1.2.2. Répétabilité du transfert de $\text{CO}_2$

La mesure du coefficient de transfert gazeux,  $k_{LA}$ , a été réalisée afin de comparer l'injection du  $\text{CO}_2$  dans les 6 réacteurs. Le  $k_{LA}$  a été mesuré dans de l'eau distillée à  $25^\circ\text{C}$  avec une injection d'air comprimé à un débit d'environ  $0,5 \text{ L.min}^{-1}$ . La Figure 27 représente le coefficient de transfert dans les mêmes conditions pour les 6 réacteurs. Le coefficient de variation observé est de 3,9 %, cette faible valeur permet de valider l'équivalence des 6 réacteurs en terme de transfert.

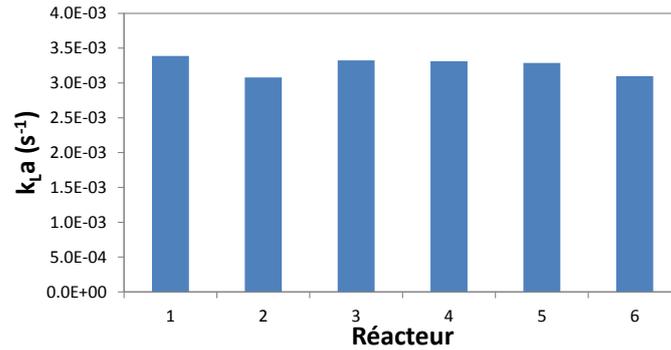


Figure 27 : répétabilité du transfert gazeux dans les réacteurs.

### 1.2.3. Répétabilité de croissance

Des tests ont été réalisés dans les mêmes conditions sur les six réacteurs afin de vérifier la répétabilité des résultats avec du digestat dilué au 30<sup>ème</sup> (D1, CHAPITRE 2. Sous-chapitre 3. 1). La température et la lumière ont été fixées respectivement à 25 °C et 240  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . De plus, la régulation du pH a été réalisée par ajout automatique de  $\text{CO}_2$  *via* la centrale d'acquisition et de commande et le programme Labview.

La Figure 28 représente la croissance des microalgues dans un digestat dilué afin d'atteindre une densité optique initiale de 0,8 à 680 nm. La croissance non limitante est équivalente dans tous les réacteurs. En comparant les pentes deux à deux avec un test de Fisher, les 6 courbes se révèlent identiques au risque de 5%. On observe cependant un coefficient de variation (cv) de 18%, la variabilité étant principalement due au comptage manuel (cv de 7%) et à l'échantillonnage.

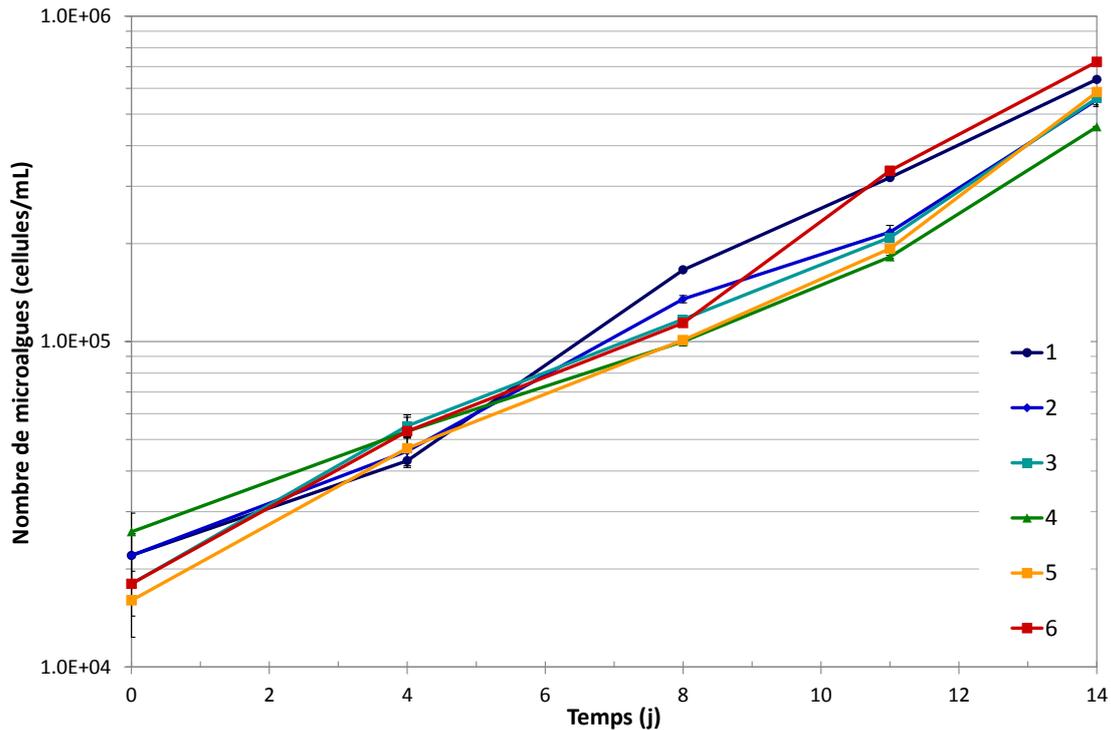


Figure 28 : Répétabilité de croissance sur les 6 réacteurs

### 1.3. Conservation de l'inoculum

Pour l'ensemble des expérimentations conduites au cours de ce travail, il a été nécessaire d'inoculer les réacteurs en début d'expérimentation avec un inoculum de microalgues/bactérie adaptée.

L'entretien de cet inoculum dans le cadre de cette thèse est assez rustique. Il est réalisé dans un aquarium de 25 L (60x24x20 cm utiles) dont les zones mortes des extrémités ont été réduites, agité par circulation du mélange (Figure 29). En outre une lumière minimum de  $175 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  en surface latérale est apportée (en plus de la lumière du soleil). L'éclairage est horizontal, afin d'éviter que les particules flottantes ne réduisent la lumière. Le pH, la densité optique et les nutriments N, P,  $C_{\text{inorg}}$  y sont contrôlés et l'ammonium et le carbone inorganique sont maintenus à  $200 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$  (apporté par de l'engrais pour plantes vertes dopé en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) et  $0.4 \text{ gC.L}^{-1}$  (apporté sous forme d'hydrogénocarbonate de sodium).

Le renouvellement de ce stock est fait de façon hebdomadaire afin de maintenir une densité optique à 680 nm de 0,500 (soit environ 130 mg/L) dans les aquariums. De plus, un curage complet est réalisé toutes les 2 semaines environ pour éliminer les microorganismes fixés sur les parois et éviter une éventuelle accumulation de prédateurs (rotifères, etc.).



Figure 29 : Stock de microalgues

## 2. Analyses

Comme discuté au début de ce chapitre, la caractérisation de la croissance des microalgues et de l'épuration des nutriments nécessite des analyses d'ordre chimiques, physiques et biologiques. On retrouve notamment les MES, la densité optique, et le dénombrement qui vont permettre de quantifier la population d'algues et des analyses élémentaires pour la caractériser (C, N et P). L'évolution des bactéries hétérotrophes aérobies est suivie par technique culturale. De plus, plusieurs méthodes de biologie moléculaire sont utilisées pour évaluer la diversité des communautés et faire de la quantification bactérienne (extraction de l'ADN, qPCR, SSCP, clonage, *etc.*). L'épuration des nutriments est quantifiée avec le suivi des formes azotées, du phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et de quelques autres ions à l'aide de la chromatographie anionique et cationique. Toutes ces analyses sont décrites dans les paragraphes suivants.

### 2.1. Caractérisation de la croissance algale et bactérienne

#### 2.1.1. Matières en suspension

Les Matières en suspension (MES) sont communément utilisées pour estimer une concentration en biomasse. Dans le cadre de cette étude, cette mesure est réalisée sur des échantillons, de 30 à 300 mL suivant la quantité disponible, après centrifugation pendant 20 min à 17 700 g. La mesure de ce paramètre se fait par pesée du centrifugat après séchage en étuve à 105 °C pendant 48 h. La balance ayant une précision de 0,01 mg, l'incertitude de la mesure dans le cas le plus défavorable est de l'ordre de 4 % lorsque la concentration en biomasse est de 1 g.L<sup>-1</sup>.

Toutefois, cette mesure ne permet pas de distinguer la fraction de bactéries, d'algues ou encore de matières inertes la composant. Ainsi, cette mesure s'avère largement insuffisante pour une étude précise de la croissance des microalgues en milieu chargé et des interactions avec les

bactéries. Il est alors nécessaire de développer des techniques permettant de mieux distinguer les concentrations spécifiques en algues et en bactéries.

### 2.1.2. Densité optique

La densité optique est souvent utilisée pour estimer la croissance des microalgues. Sa mesure est à la fois pratique, rapide et non destructrice. Cette méthode utilise une proportionnalité entre la densité optique et la concentration en algues. Pour cela, il est toutefois nécessaire de s'assurer que la mesure effectuée est bien dans la zone linéaire de la loi de Beer-Lambert, en diluant l'échantillon si nécessaire. Dans notre cas, ces mesures de densité optique sont obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre UNICAM UV/Vis UV2 dans des cuves en plastique de chemin optique de 1 cm.

La longueur d'onde choisie pour cette mesure est 680 nm, car elle correspond à un maximum d'absorption de la chlorophylle a (Figure 30). Elle est donc particulièrement intéressante pour estimer la croissance des microalgues.

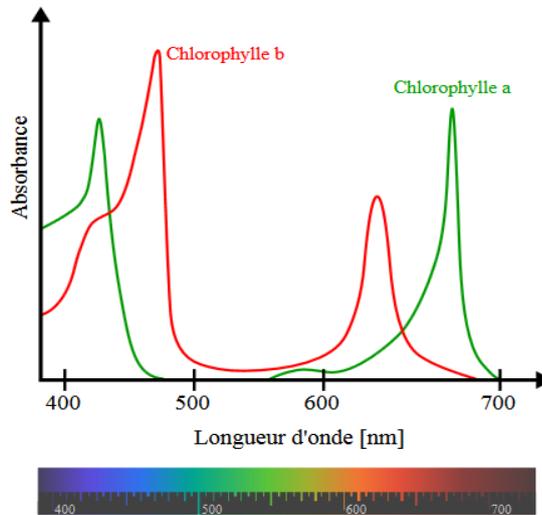


Figure 30 : Spectre d'absorption de la chlorophylle

La pertinence de cette mesure est néanmoins à modérer dans le cas d'une mesure en milieu de culture coloré tel que le digestat. En effet, la densité optique apportée par le digestat peut être largement supérieure à la D.O. propre aux algues. Ainsi, les évolutions du digestat et de la D.O. associée rendent peu précis la quantification des algues par cette méthode notamment en début de croissance en batch. De plus, la concentration en bactérie contribue aussi à la D.O. mesurée.

D'autres techniques sont donc nécessaires pour caractériser la croissance des algues mais également la croissance des autres microorganismes tels que les bactéries hétérotrophes afin de préciser les observations apportées par la D.O.

### 2.1.3. Comptage et observation microscopique

Les techniques précédentes sont utiles pour estimer la quantité de microalgues, mais peuvent être biaisées ou moins sensibles à cause de la coloration de l'effluent (D.O.) ou la présence de bactéries (MES). C'est pourquoi le comptage microscopique sur hémacytomètre ou cellule de Neubauer, est réalisé.

Les cellules algales observées sont principalement *Scenedesmus sp.* et *Chlorella sp.* Elles sont respectivement longiformes et sphériques avec une taille de 5 à 12  $\mu\text{m}$ . Après avoir injecté 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon entre la plaque de Neubauer et la lamelle, la plaque est observée avec un microscope optique Nikon Eclipse 80i au grossissement  $\times 200$ .

Le principe du dénombrement est de compter manuellement les 4 grands carrés aux sommets et le grand carré du centre (voir Figure 31). La plaque étant calibrée, le volume correspondant à ces zones est connu et permet d'étendre ce comptage à la concentration en microalgues. Le nombre de cellules peut être surestimé si des microalgues mortes sont dénombrées.

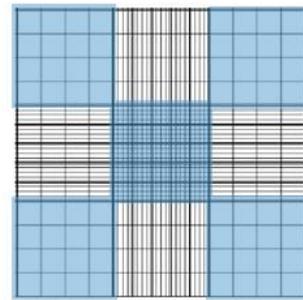


Figure 31 : Plaque de Neubauer

L'observation microscopique permet en outre d'estimer qualitativement les espèces présentes et l'apparition d'autres microorganismes tels des rotifères, etc. Les microorganismes visibles au grossissement sélectionné ont été identifiés à l'aide du livre de Canler *et al.* (2011). Il n'a pas été observé de rotifères dans les cultures en réacteur.

### 2.1.4. Dénombrement des bactéries aérobies cultivables

La revue de littérature montre que les bactéries ont un impact sur l'épuration et, même si les avis divergent, sur la croissance des microalgues. Dans tous les cas, elles sont capables de se développer dans les digestats de méthanisation. Il est donc important de suivre leur évolution en parallèle des microalgues.

La méthode culturale a été choisie pour sa simplicité, elle permet d'observer l'évolution des bactéries hétérotrophes cultivables. Le milieu de culture choisi est un milieu non sélectif, le TSYE

(tryptone 1,7 %, peptone de soja 0.3 %, glucose 0.25 %,  $K_2HPO_4$  0.25 %, NaCl 0.25 %, agar agar 1.1 % et d'extrait de levure 0.6 %). La méthode consiste à réaliser des dilutions en séries des échantillons dans de l'eau peptonée et d'étaler 100  $\mu$ L des différentes dilutions sur boîtes contenant le milieu de culture. Après incubation des colonies à 30°C pendant 2 jours, il est possible de remonter au nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) à partir du dénombrement et de la dilution.

Une incertitude de cette mesure reste cependant présente, quant à l'estimation de la population globale, car toutes les bactéries hétérotrophes aérobies ne poussent pas sur le milieu de culture (bactéries viables non cultivables). Cela permet toutefois d'avoir une tendance de la croissance.

### 2.1.5. Biologie moléculaire

En complément des mesures précédemment réalisées, l'évolution des communautés algales et bactériennes a été caractérisée par des techniques de biologie moléculaire. La SSCP algale couplée au clonage/séquençage est utilisée pour mettre en évidence l'évolution qualitative et semi-quantitative des espèces de microalgues en présence. En complément du dénombrement bactérien hétérotrophe (cultivable), les bactéries totales sont quantifiées en qPCR 16s. En préliminaire à ces analyses, l'ADN a été extrait à l'aide d'un kit.

#### 2.1.5.1. Extraction de l'ADN

Trois kits d'extraction ont été comparés afin de retenir celui permettant d'obtenir, sur la matrice étudiée, le meilleur rendement d'extraction d'ADN: le kit Mobio Power Soil® (MP) et le kit Nucleo Spin for Soil® (NS) à lyse physique et le kit Quiagen Blood and Tissu® (QBT) à lyse thermique. Les échantillons testés, issus d'une même série de manipulation, ont été prélevés au début de l'expérimentation (T0) et après 14 jours de culture (T14).

2 mL d'échantillon ont été centrifugés afin de répondre aux recommandations des kits à lyse physique en termes de masse minimale tout en garantissant une meilleure répétabilité quant à la masse du culot. Après centrifugation, le culot obtenu a été pesé puis repris dans le tampon correspondant au kit testé. Différentes modalités d'extraction ont été testées selon les kits QBT et NS (Tableau 14).

**Tableau 14 : Conditions testées pour les kits QBT et NS**

Kits	Conditions testées	Elution sur colonne
QBT	Incubation à 56°C pendant :	2 éluions successives de 50 $\mu$ L

	10 minutes	
	30 minutes	
	Tampons de lyse :	
NS	SL1	2 éluions successives de 50 µL
	SL2	

L'ADN a ensuite été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% et par spectrophotométrie (Nanodrop®) afin d'estimer la quantité et la qualité d'ADN extrait puis testé en qPCR bactérien sur les bactéries totales.

L'électrophorèse révèle la bande la plus intense et la plus nette pour le kit NS, notamment lorsqu'il est utilisé avec le tampon de lyse SL2 à la première élution. C'est également avec ce kit que l'on observe la plus faible trainée (smear), traduisant une meilleure qualité de l'ADN. L'analyse par spectrophotométrie montre une quantité et une qualité d'ADN extrait comparables pour les kits QBT et NS, néanmoins, seul le kit NS permet une purification satisfaisante vis-à-vis des protéines.

Des qPCR bactériennes ont été réalisées, confirmant les observations précédentes.

Au regard de l'ensemble des résultats, le kit Nucleo Spin for Soil® a été retenu pour extraire l'ADN puisqu'il permet d'extraire une plus grande quantité d'ADN et de meilleure qualité.

#### 2.1.5.2. Quantification des bactéries totales

La PCR quantitative (Polymerase Chain Reaction) est une méthode de quantification ciblée, suivant les amorces utilisées, qui utilise des sondes fluorescentes se fixant sur l'ADN. Le suivi de la fluorescence au cours du temps d'amplification permet de déterminer le Ct (cycle threshold), paramètre utilisé pour quantifier l'ADN. A l'aide d'un étalonnage, il est possible de déterminer la concentration d'ADN ciblé initialement présente dans l'échantillon.

Les amorces utilisées pour la quantification des bactéries totales sont reportées dans le Tableau 15.

**Tableau 15 : Caractéristiques des amorces utilisées**

Cibles	Amorces	Séquences	T <sub>m</sub> (°C)	Taille (Pb)	Références
ADNr 16S Bactérien	GE116(F)	ATGGCTGTCGTCAGCT	55	337	Ferris <i>et al.</i> (1996)
	GE117(R)	ACGGGCGGTGTGTAC			Amann <i>et al.</i> (1995)

F (forward) et R (reverse) se réfèrent à l'orientation des amorces sur la séquence ciblée.

<sup>a</sup> ammoniacque monooxygénase.

Les qPCR sont réalisées avec le thermocycleur Chromo 4<sup>®</sup> (Biorad). Les différents mix de PCR et les programmes sont présentés dans les Tableaux 16 et 17.

**Tableau 16 : Composition du mix utilisé pour la quantification par qPCR**

Cibles	Sybr Green <sup>®</sup> (μL)	Amorces (nM)	Eaux Ppi (μL)	ADN (μL)
ADNr 16S Bactérien	12,5	600	Qsp 25μL	2

Le fluorochrome utilisé est le Sybr Green<sup>®</sup>. C'est un agent intercalant qui émet de la fluorescence lorsqu'il est intégré à de l'ADN bicaténaire (pendant la phase d'élongation des amplicons). Il est fourni par Biorad<sup>®</sup> dans un mélange comprenant également les dNTPs, la Taq Polymérase et du MgCl<sub>2</sub>.

**Tableau 17 : Programmation des qPCR**

Cibles	Activation de la Taq	Dénaturation	Fixation	Elongation
ADNr 16S Bactérien	10 min – 95°C	50 sec – 95°C	30 sec – 55°C	30 sec – 72°C

Les gammes d'étalonnage des qPCR sont réalisées avec des plasmides quantifiés portant une copie du gène d'intérêt. Ils portent une copie de l'ADNr 16S d'*Escherichia coli* pour la qPCR 16S. Les tests sont effectués sur des extraits d'ADN dilués au 1/10<sup>ème</sup> et au 1/100<sup>ème</sup>.

### 2.1.5.3. SSCP et clonage sur les microalgues

Afin d'observer l'évolution des communautés algales et de les identifier, la SSCP (Single-strand conformation polymorphism) et le clonage suivi d'un séquençage ont été sélectionnés.

La SSCP est une méthode permettant de séparer les fragments d'ADN en fonction de la différence de migration de leurs différentes conformations dans un gel non dénaturant. Elle permet d'obtenir des profils de communautés. Pour avoir une bonne taille d'ADN en intrant de la SSCP, une PCR nichée a été choisie pour découper le fragment d'intérêt (Tableau 18). Le principe de la PCR nichée est de réaliser deux PCR successives avec des jeux d'amorces différents, la seconde zone ciblée étant incluse dans le premier amplicon. Un couple d'amorce issu de la littérature a été sélectionné pour amplifier l'ADN de *Chlorophyceae* (Valiente Moro *et al.* 2009), mais la taille de l'amplicon est trop importante pour être utilisé directement en SSCP. La seconde PCR (Eucaryote)

permet de recouper une partie de ce fragment et de le réduire afin de conserver une partie de la région variable de l'ADN en restant spécifique aux *Chlorophyceae*.

**Tableau 18 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la PCR nichée chlorophyceae**

Cibles	Amorces	Séquences	Tm (°C)	Taille (Pb)	Références
<i>Chlorophyceae</i> Eucaryote	Chloro (F)	TGGCCTATCTTGTGGTCTGT	57.5	603	Valiente Moro <i>et al.</i> (2009) Wery <i>et al.</i> (2008)
	Euk (R)	GGGCATCACAGACCTGTT			
Eucaryote	Euk (F)	CTTAATTTGACTCAACACGG	56	246	Godon <i>et al.</i> (1997) Wery <i>et al.</i> (2008)
	Euk (R)	GGGCATCACAGACCTGTT			

F (forward) et R (reverse) se réfèrent à l'orientation des amorces sur la séquence ciblée.

La première PCR a été réalisée avec un mix de 200 nM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U Pfu (Agilent), 500 nM des deux amorces, du tampon Pfu 1X et 1 µL d'extrait d'ADN (dilué 10 fois). Le volume total de réaction était de 25 µL. Les conditions de cette PCR sont les suivantes : une première étape de dénaturation à 94 °C pendant 3 min, suivie de 30 cycles à 94 °C pendant 1 min, puis 1 min à 59°C et 1 min à 72 °C. L'étape d'élongation finale dure 10 min à 72 °C.

La seconde PCR est réalisée avec les produits suivants : 400 nM dNTP, 500 nM de chaque amorce, 2,5 U Pfu (Agilent), le tampon Pfu 1X et 1 µL d'extraits d'ADN dilué au 10<sup>ème</sup> ; le volume de réaction final étant de 50 µL. Après une étape de dénaturation à 94 °C de 2 min, 25 cycles de réactions à 94 °C pendant 1 min ont été réalisés, ont suivi les étapes pendant une minute à 55 puis 72°C, et enfin une étape finale d'élongation à 72 °C pendant 10 min.

Ces réactions d'amplification ont été arrêtées en refroidissant le mélange à 10 °C. La taille des produits d'amplification a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose (TBE 1X 1,5 % agarose (wt/vol)) avec 246 pb.

Les produits de PCR ont été séparés par CE-SSCP au centre de séquençage Biogenouest (CNRS, Roscoff, France) pour la série de manipulation du chapitre 3 et au laboratoire d'Irstea Rennes pour celle du chapitre 4.

Afin d'identifier les pics obtenus en SSCP, un clonage et un séquençage ont été réalisés sur des échantillons d'intérêt pour récupérer séparément l'ADN pur des populations dominantes. Le

clonage consiste à insérer un fragment d'ADN par vecteur (*E. coli*), qui est isolé sur boîte de Petri et va se multiplier, multipliant ainsi le fragment considéré ; chaque colonie comportant le même fragment d'ADN. Après extraction, cet ADN pur peut ensuite être utilisé en SSCP et comparé aux pics de la communauté globale.

Les produits de PCR issus de la PCR *Chlorophyceae-Eukaryote* ont été clonés et transformés en cellules compétentes d'*E. Coli* avec le kit de clonage PCR StrataClone (Stratagene, La Jolla, CA) en suivant les instructions du fabricant. Après croissance, les inserts des cellules d'*E. Coli* ont été extraits avec les amorces ciblant le plasmide, T7 et P13. Un séquençage des clones co-migrants avec les échantillons a ensuite été réalisé. Les séquences ont ainsi été identifiées avec l'outil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) du centre américain pour les informations biotechnologiques (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) et le « Ribosomal Database Project II » (RDPII; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

## 2.2. Caractérisation de l'épuration du milieu

### 2.2.1. Cations & anions

Afin de caractériser l'épuration de l'influent et les interactions entre les différents processus, notamment la croissance des microalgues et la nitrification-dénitrification, les cations et les anions dosés, dans le liquide interstitiel, sont les suivants :

- $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$
- $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$

Les ions contenant de l'azote et les ions phosphates sont assimilés par les microalgues, il est donc particulièrement important de suivre leur concentration. De plus, les microalgues produisent de l'oxygène lors de la photosynthèse, atteignant une concentration en  $\text{O}_2$  suffisante pour favoriser la nitrification, les nitrites et les nitrates sont alors de bons indicateurs de l'activité bactérienne nitrifiante.

En outre, les autres ions sont utilisés par les algues pour croître et ne doivent pas être limitant pour estimer la croissance.

L'analyse de ces cations et anions est réalisée par chromatographie ionique Metrohm 850 Professional IC, avec :

- Pour les cations : une colonne Metrosep C 4 avec pour éluant de l'acide dipicolinique/acide nitrique (0,9 mL/min)

- Pour les anions : une colonne Metrosep A Supp 5 avec pour éluant du carbonate et hydrogénocarbonate de sodium (0,7 mL/min)

### 2.2.2. Demande chimique en oxygène (DCO)

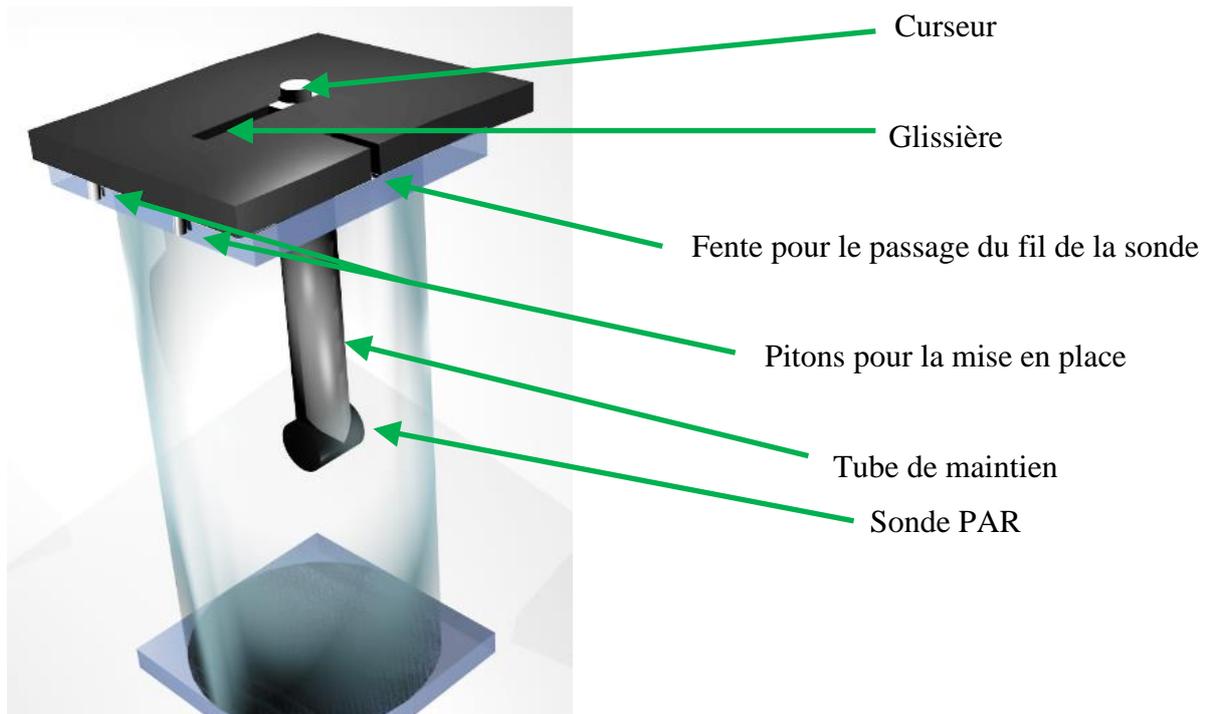
La demande chimique en oxygène (DCO) est réalisée selon la méthode normée, AFNOR NF T 90-101. Elle a principalement été utilisée pour caractériser la matière organique totale et soluble des digestats.

### 2.2.3. Carbone total, inorganique et organique en solution

La concentration en carbone total (TC pour Total Carbon) et la concentration en carbone inorganique total (TIC : Total Inorganic Carbon) sont déterminés à l'aide d'un analyseur TOC-L CPH Shimadzu. Pour la détermination du carbone total, une combustion sèche à haute température (720 °C) transforme la totalité du carbone de l'échantillon en CO<sub>2</sub>. Pour la détermination du carbone inorganique, seules les formes inorganiques (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>2</sub>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) sont transformées en CO<sub>2</sub> à l'aide d'un barbotage dans l'acide. Dans les 2 cas, le CO<sub>2</sub> généré est dosé par spectrométrie infrarouge. La différence « carbone total - carbone inorganique » donne alors accès à la concentration en carbone organique. Les échantillons ont été placés dans des flacons sans ciel gazeux et l'analyse a été effectuée extemporanément pour éviter une consommation de TIC entre le prélèvement et l'analyse.

## 2.3. Mesure du flux de photons photosynthétiques

Afin de mesurer le flux de photons photosynthétiques reçu dans le milieu au cours des expérimentations, un dispositif a été spécifiquement développé (Figure 32). La sonde fixée à son extrémité est une sonde Delta Ohm LP471PAR reliée à un boîtier HD2302.0.



**Figure 32 : Dispositif de mesure du flux de photons photosynthétiques dans la culture algale.**

Le dispositif est calé sur le réacteur avec deux pitons à l'avant et deux pitons à l'intérieur (non visibles sur l'image) pour éviter toute rotation ou translation. La sonde PAR (Photosynthetically Active Radiation) est accrochée à l'extrémité d'un tube en PVC qui est fixé à un curseur. Ce curseur peut être déplacé dans la glissière, la face avant de la sonde se trouvant de 2.35 à 4.8 cm de la paroi recevant la lumière, afin d'avoir 2 mesures de flux différentes à distances fixes. Le fil de la sonde passe par une fente prévue à cet effet pour lire le signal sur le boîtier de conversion.

### **3. Déroulement des expérimentations**

Pour répondre aux problématiques principales, quatre séries d'expérimentations ont été réalisées. Les sujets étudiés sont l'impact de la couleur de l'effluent et de la lumière, l'impact du phosphore, l'impact de l'injection de carbone inorganique et le comportement de l'écosystème face à des stratégies d'extraction des solides différentes en semi-continu.

#### **3.1. Inoculum**

L'écosystème planctonique a été fourni par le Laboratoire de Biotechnologie et de l'Environnement (LBE – INRA Narbonne). Il a été prélevé d'un bassin extérieur de type « raceway » alimenté avec un milieu synthétique et est dominé par *Scenedesmus sp.* (voir Figure 33).



Figure 33 : Image microscopique de l'inoculum

Cet écosystème avait initialement été isolé d'une lagune de traitement des eaux résiduaires urbaines de la ville de Mèze (34) dans le cadre du projet ANR Symbiose.

Lors de l'entretien de cet inoculum au laboratoire, la communauté algale a changé et la communauté dominée par *Scenedesmus sp.* est devenue majoritairement composée de *Chlorella sp.* Par conséquent, l'inoculum utilisé dans les expérimentations suivantes s'en est trouvé impacté. La communauté algale était dominée par *Scenedesmus* pour l'étude de la couleur et de la lumière et dominée par *Chlorella* pour les autres. Les microalgues dominantes sont résumées dans le paragraphe suivant pour chaque série d'expérience.

### 3.2. Déroulement des expérimentations

Avant le lancement, la préparation consiste en un nettoyage complet et une désinfection des tubes en verre et des diffuseurs de gaz, ainsi qu'au calibrage des sondes oxygène et pH. Les rampes de néons sont ensuite allumées pour fournir l'énergie de croissance des microalgues. Il est reconnu dans la littérature, que la forme de l'intensité lumineuse en fonction du temps, à fréquence, fraction éclairée, angle d'incidence de la lumière et accessibilité des algues à la lumière égales, a une influence sur l'efficacité photosynthétique (Brindley *et al.* 2011). Néanmoins, pour des raisons pratiques, la lumière est apportée par cycle 12/12h (sauf pour l'étude du carbone inorganique en 24/24h) sans gradient de lumière. Le mélange du digestat, de l'inoculum (10 % en volume), de l'eau et des éventuels nutriments supplémentaire est réalisé avant introduction dans les réacteurs afin de permettre une bonne homogénéité. Les expériences ont été réalisées dans le dispositif expérimental présenté en 1.1. Le Tableau 19 référence les différents changements de la méthode entre les 4 séries d'expérience.

Le digestat utilisé lors de toutes les expériences a été D1 (Sous-chapitre 3. 1, p 115). Le choix est dû au fait qu'il soit 3 à 10 fois plus coloré que les deux autres digestats échantillonnés,

permettant ainsi de limiter l'apport en digestat pour mieux contrôler les nutriments. Néanmoins, la dilution de ce digestat a été adaptée pour les besoins de chaque étude. La phase liquide de ce digestat a été à nouveau séparée en laboratoire par centrifugation (20 min, 17 700 g) afin d'éliminer un maximum de particules résiduelles.

Enfin, les réacteurs sont remplis en 10 fois successivement afin d'avoir une bonne répartition de la biomasse et des particules. Le cryothermostat est ensuite réglé pour maintenir une température de 25 °C dans les réacteurs et la régulation suivant le pH est actionnée.

**Tableau 19 : Variation de la méthode pour les différentes expériences.**

	Couleur et lumière	Phosphore	CO <sub>2</sub>	Temps de séjour des solides et fréquence
D.O. initiale (à 680 nm)	0,2 à 1,3	0,5	0,2	0,8
Quantité de digestats (%)	0,17 à 1,0	0,67	0,27	1,07
[N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] <sub>initiale</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	100*	190*	60*	104
[P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] <sub>initiale</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	1*	3 à 67*	10*	18
Lumière (μmolE.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	12/12h 40-250	12/12h 250	Continue 250	12h/12h 250
Régulation pH entre 6,95 et 7,05	Injection de CO <sub>2</sub> (100 %)	Injection de CO <sub>2</sub> (100 %)	Injection d'HCl (0,3 N)	Injection de CO <sub>2</sub> (100 %)
Dioxyde de carbone	En fonction du pH 100 % CO <sub>2</sub>	En fonction du pH 100 % CO <sub>2</sub>	De 0 à 0,13 L.min <sup>-1</sup> 0.09% CO <sub>2</sub>	En fonction du pH 100 % CO <sub>2</sub>
Espèce dominante	<i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>
Temps (j)	14	14	5	14 + 22

\* : concentration adaptée avec des sels minéraux

Pour les expérimentations des chapitres 3, 4 et 6, le pH a été régulé entre 6,95 et 7,05 par injection de CO<sub>2</sub> pur remplissant le double rôle d'acide, pour maîtriser le pH, et de source de carbone des autotrophes. Un apport forcé de dioxyde de carbone a aussi été réalisé toutes les 45 min en période éclairée pour fournir des quantités de carbone inorganique suffisantes aux algues. En outre, afin d'éviter l'acidification observée dans des tests préliminaires lorsque la croissance algal

était limitée, le pH a été ajusté avec 1.25 mL de NaOH 1M tous les 2 jours dans tous les réacteurs. Cette quantité a permis de compenser les différences de pH dues à la respiration nocturne et de fournir une quantité importante et maîtrisée de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.1. Chapitre 3 : couleur-lumière

L'étude de l'influence de la couleur du milieu et de la lumière a été réalisée en plan d'expériences. Le plan choisi est un plan factoriel à 2 facteurs en surface de réponse qui a été randomisé et avec des conditions dupliquées. De plus, 6 points au centre ont été ajoutés pour mieux approcher la sensibilité des résultats, ce qui donne un nombre total de 24 expériences. L'analyse statistique a été réalisée avec Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., USA).

La lumière a été fixée à 50, 150 et 250  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  en déplaçant la source lumineuse à différentes distances des réacteurs. La couleur initiale du milieu a été fournie sur la base de la densité optique à 680 nm et est égale à 1,3, 0,9, 0,5 et 0,2. Elle a été fixée en ajoutant différentes quantités de digestat centrifugé (décrit précédemment) correspondant respectivement à 1,0, 0,7, 0,3 et 0,17 %v:v. Le milieu de culture a été adapté d'un digestat « standard » dilué au 10<sup>ème</sup> pour obtenir des concentrations ioniques équivalentes dans toutes les expériences. Les caractéristiques des digestats et des sels utilisés sont récapitulés dans le Tableau 20.

**Tableau 20 : Composition initiale en macronutriments du milieu de culture (chapitre 3)**

Paramètre	Sel	concentration
Cl <sup>-</sup> (mg Cl L <sup>-1</sup> )		390
Na <sup>+</sup> (mg Na L <sup>-1</sup> )		224
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg S L <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28
K <sup>+</sup> (mg K L <sup>-1</sup> )	KCl	516
Mg <sup>2+</sup> (mg Mg L <sup>-1</sup> )	MgCl <sub>2</sub>	67
Ca <sup>2+</sup> (mg Ca L <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub>	52
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> Cl	102
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg P L <sup>-1</sup> )	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1

Les autres nutriments, non listés dans le Tableau 20, ont été ajoutés comme ceux du milieu de culture Z8 (micronutriments de Gaffron), leur ratio étant calculé sur la base de l'azote (Staub 1961; Kotai 1972).

Les manipulations ont ensuite été démarrées comme indiqué plus haut.

L'analyse de l'évolution des communautés a été réalisée sur les temps expérimentaux de 0, 2, 7 et 14 jours. Afin d'identifier les espèces d'algues présentes, 160 clones ont été sélectionnés aléatoirement. Après SSCP, 44 de ces clones ont été séquencés selon leur adéquation avec les profils des échantillons.

### 3.2.2. Chapitre 4 : phosphore

Les essais pour étudier l'impact du ratio N:P sur l'écosystème ont été réalisées dans les photobioréacteurs en triplicats. Le milieu était composé du digestat et de minéraux pour contrôler la composition initiale en nutriments. Les différents ratios N:P ont été imposés avec la concentration en azote fixée et 4 niveaux de concentration en phosphore. Les expériences ont donc été menées en 2 fois puisque 12 expériences ont été suivies.

Les ratios étudiés sont 3, 9, 26, 76 gN-NH<sub>4</sub>.gP-PO<sub>4</sub><sup>-1</sup>, ils ont été nommés respectivement HPC, IPC1, IPC2 et LPC. Puisque la concentration en azote initiale est constante et égale à 190 mg N.L<sup>-1</sup>, les concentrations en phosphore correspondant à ces conditions sont : 67, 23, 8, 3 mgP.L<sup>-1</sup>. Les autres nutriments ont été adaptés pour que leur concentration corresponde à un digestat « standard » dilué au 10<sup>ème</sup> quelle que soit les conditions. Les caractéristiques du digestat et des sels utilisés pour l'ajustement sont résumés dans le Tableau 21. Les micronutriments ont été ajoutés comme dans le 3.2.1 (p 105). Ensuite, des sels de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O ont été ajoutés en solution pour remplir les conditions de concentration en phosphate.

**Tableau 21 : Composition initiale en macronutriments du milieu de culture (chapitre 4)**

Paramètre	Sel	Concentration dans le milieu
Cl <sup>-</sup> (mg Cl L <sup>-1</sup> )		1380 ± 50
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg S L <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.3 ± 0.5
K <sup>+</sup> (mg K L <sup>-1</sup> )	KCl	573 ± 11
Mg <sup>2+</sup> (mg Mg L <sup>-1</sup> )	MgCl <sub>2</sub>	62 ± 15
Ca <sup>2+</sup> (mg Ca L <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub>	65 ± 4
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> Cl	190 ± 9

Les expériences ont enfin été lancées comme décrit précédemment.

Les analyses SSCP des temps initiaux et finaux ont été utilisées sur toutes les conditions afin de caractériser l'évolution des communautés. A l'aide des clones identifiés au chapitre 3 et de 50 clones additionnels les pics co-migrants ont pu être identifiés.

### 3.2.3. Chapitre 5 : carbone

Les expérimentations du chapitre 5 sont de 3 sortes. Tout d'abord, l'étude du transfert gazeux dans les réacteurs a été réalisée. Puis la croissance algale a été étudiée dans ces réacteurs avec différents débits de CO<sub>2</sub>. Enfin, pour déterminer les constantes cinétiques de la croissance algale relatives au carbone inorganique, des manipulations en jar-test ont été conduites. Pour ces deux premiers types d'expérimentations, afin de mieux maîtriser l'injection de CO<sub>2</sub>, il a été nécessaire de modifier le système expérimental et d'adapter le déroulement des expériences en conséquence. Le dispositif expérimental a été modifié en ajoutant des compteurs à gaz (0,016 – 2,5 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>) entre les rotamètres et les diffuseurs afin de mesurer précisément le débit.

#### 3.2.3.1. Etude des transferts gazeux

La méthode dynamique, communément utilisée, a été choisie pour évaluer le k<sub>La</sub>. Cette méthode comprend deux étapes principales, la désoxygénation et la réoxygénation. C'est lors de cette deuxième étape qu'est déterminé le coefficient de transfert.

D'abord, un volume de 2,15 L de milieu est dégazé par bullage d'azote (0,5 L.min<sup>-1</sup>) jusqu'à élimination complète de l'oxygène dissous. Ensuite, à t<sub>0</sub>, le bullage est remplacé par une injection d'air comprimé à 0,5 bar et un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, similaire au débit maximal utilisé lors des expérimentations sur l'étude du CO<sub>2</sub> par la suite. La concentration d'oxygène dissous est alors mesurée par intervalles de 5 secondes jusqu'à saturation du milieu à l'aide de la sonde à oxygène de type Clark. Puisque la mesure est réalisée à la verticale à cause de la configuration des réacteurs, la sonde a été équipée d'un déflecteur pour éviter l'agglomération de bulles proches de l'électrode qui perturberaient la mesure. Enfin, l'exploitation se fait à l'aide du tracé de la partie gauche de l'expression suivante en fonction du temps, le k<sub>La</sub> est égal à la pente dans la partie linéaire.

$$\ln \left( \frac{[O_2]_{sat} - [O_2]}{[O_2]_{sat}} \right) = k_{La}.t$$

L'impact du débit sur le k<sub>La</sub> a été mesuré en duplicats en eau claire, les débits testés sont de 0 ; 0,073 ; 0,187 ; 0,328 ; 0,360 ; 0,516 L.min<sup>-1</sup> dans la gamme de ceux utilisés dans la suite de cette étude.

Après avoir déterminé les  $k_{LA}$  des différents réacteurs dans l'eau distillée, l'impact du milieu en conditions expérimentales a été déterminé. Les coefficients de transfert ont donc été évalués en présence d'algues et de digestat en duplicats. Afin d'éviter que les mesures ne soient faussées par la production d'oxygène des algues, les expérimentations ont été réalisées à l'abri de la lumière. La phase lumineuse de la photosynthèse étant alors impossible, il n'y a pas de production d' $O_2$ . Les concentrations algales choisies pour l'étude du  $k_{LA}$  sont de  $5.10^4$  et  $1.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup>, correspondant à des concentrations intermédiaires et hautes observées en cultures. Deux dilutions de digestat ont été étudiées, au 30<sup>ème</sup> et au 50<sup>ème</sup> afin de représenter des dilutions proches de celles utilisées au cours de la thèse.

### 3.2.3.2. Croissance en photobioréacteurs avec du $CO_2$ gazeux

L'étude de la croissance algale en photobioréacteurs a ensuite été étudiée en fonction de différents débits de dioxyde de carbone.

Le pilote tel qu'utilisé dans les tests précédents n'était pas totalement adapté à cette partie de l'étude, notamment concernant l'injection de  $CO_2$ , initialement conçue pour une régulation du pH. Ce pilote a donc été modifié pour répondre aux besoins de l'étude. Dans cette nouvelle configuration, l'injection de  $CO_2$  est indépendante de la régulation du pH. Le pH est régulé entre 6,95 et 7,05 par l'injection d'HCl nécessaire pour compenser l'augmentation de pH due à l'activité algale. Pour cette régulation du pH, une pompe péristaltique (à huit galets, Ismatec) a été ajoutée à chaque réacteur permettant un ajout d'HCl (0,3 N). L'ajout est commandé indépendamment pour chaque réacteur en fonction du pH à l'aide du programme de commande. L'injection de dioxyde de carbone est commandée par une électrovanne, par cycles de 15 mn d'injection de  $CO_2$  par heure pour chaque réacteur. Le gaz injecté utilisé est peu concentré (0,9 %  $CO_2/N_2$ ) pour permettre une injection à des débits assez importants, permettant ainsi une précision plus importante et une vérification à l'aide des compteurs à gaz. Afin de moduler la quantité de  $CO_2$  apportée à chaque réacteur, le débit du gaz, fixé par les rotamètres, est paramétré pour chaque réacteur.

Le digestat utilisé (voir ci-dessus) a été apporté à hauteur de 0,27% environ, afin de permettre des mesures de différences de concentration observables en nutriments sur un laps de temps d'une semaine. Sa teneur en TIC initiale, de 92 mg.L<sup>-1</sup> après dilution au 50ème, s'est avérée trop élevée pour permettre d'observer des différences de croissance dans nos conditions de culture. Une pré-culture dans le digestat a donc été mise en place, visant à épurer la majeure partie du TIC initial. Au bout de 3 jours, le milieu a été collecté et centrifugé afin d'éliminer la biomasse. Le surnageant a été analysé en chromatographie ionique et la concentration en ions a été réajustée à

leur concentration initiale, sauf pour le phosphore dont la concentration a été augmentée à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  pour ne pas qu'il soit limitant. La teneur en carbone inorganique au terme de ce prétraitement était de  $40 \text{ mg C.L}^{-1}$ . Ce digestat appauvri en TIC a ensuite été ré-inoculé à 10% v:v (soit environ  $2.10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>) comme décrit précédemment.

Les débits de CO<sub>2</sub> étudiés (15 min par h) sont 0,00 ; 0,26 ; 0,71 ; 1,23 ; 1,35 et 1,95 L.h<sup>-1</sup> ; ils ont été appelés dans cette étude Q0, Q1, Q2, Q3, Q4 et Q5 respectivement. Les expériences ont été menées sur 89 heures.

La détermination de la croissance de la biomasse a été réalisée à l'aide du comptage des microalgues, de la mesure de la densité optique et de la mesure des matières en suspension comme décrit en 2 p 93. La productivité algale et le taux de croissance,  $\mu$ , ont été définis entre 17 et 65 h et entre 48 et 72 h respectivement. Le Nitrogen Assimilation Rate (NAR) a été déterminé comme dans le point 2 p 125.

### 3.2.3.3. Jar-test

En parallèle de ces expérimentations utilisant le CO<sub>2</sub> comme source de carbone, des manipulations en jar-test ont été réalisées pour déterminer les constantes cinétiques des microalgues relatives au carbone inorganique en s'affranchissant des transferts gazeux.

Le milieu de culture utilisé est un milieu synthétique, Z8 (Kotai 1972), modifié en remplaçant les ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> par NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et dilué au dixième. Il a ensuite été inoculé comme dans les autres expérimentations, l'agitation à 120 rpm et la lumière à  $216 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  24h/24 ont été actionnés. Le carbone inorganique a été apporté sous forme d'hydrogénocarbonates de sodium.

Une fois l'inoculation réalisée (comme précédemment), le pH ainsi que la teneur en carbone inorganique totale ont été mesurés 2 fois par jour et ajustés manuellement.

### 3.2.4. Chapitre 6 : SRT

Le pilote expérimental, initialement utilisé en réacteurs « batch » a été utilisé pour la conduite d'expérimentations en semi-continu.

Les expériences ont été réalisées afin d'étudier l'influence du temps de séjour des solides (SRT) et de la stratégie d'alimentation (semi-continue) sur l'élimination des nutriments (N et P) et sur les mécanismes mis en jeu. D'un côté, trois SRT ont été étudiés (2,5, 3,5 et 4,5 j) tandis que de l'autre les stratégies d'alimentation ont été examinées via la fréquence d'alimentation (1, 0,5 et 0,33 j<sup>-1</sup>). Le résumé des expériences menées est présenté dans le Tableau 22.

**Tableau 22 : Conception des expériences pour étudier le temps de rétention des solides et la fréquence d'alimentation.**

	S4F1	S3F1	S2F1	S3F1b	S3F0.5	S3F0.3
SRT (j)	4,5	3,5	2,5	3,5	3,5	3,5
Fréquence ( $j^{-1}$ )	1	1	1	1	0,5	0,33
% du volume retiré à chaque alimentation (L)	22	29	40	29	57	86

Tout d'abord, les microalgues ont été cultivées avec le digestat dilué au 30ème en batch pendant 14 jours comme décrit dans la partie 3.2.2 (p 106). Après cette période de croissance initiale, une partie des solides, principalement les microalgues, a été périodiquement retirée en fonction du SRT et de la fréquence d'extraction de la biomasse ( $f_E$ ). La séparation des solides a été réalisée pour chaque réacteur sur une fraction du volume à l'aide de centrifugations (20 min, 17 700 g) ; après séparation, le surnageant a été remis dans le réacteur. Le processus a ainsi été répété pendant 5 jours en fonction de la fréquence d'extraction (soit 1, 2 ou 5 fois) ; tous les 6 jours le surnageant est remplacé par le digestat centrifugé dilué afin de ramener des nutriments dans le milieu. Il a été choisi de remettre le digestat traité pendant 5 jours afin de pouvoir mieux observer l'épuration des nutriments. De plus, au vue de la teneur élevée en nutriments des digestats, il est nécessaire de recirculer le liquide interstitiel, afin d'épurer correctement l'effluent.

Suite à la période initiale en mode « batch », le mode d'alimentation en semi-continu a été appliqué pendant 3 SRT pour atteindre le régime de stabilisation, puis la croissance algale ainsi que l'épuration des nutriments ont été étudiés pendant au moins un temps de séjour des solides (a minima 3 jours).

La productivité a été calculée en fonction de la concentration à stabilisation en algues et de la fraction d'effluent retiré sur le temps considéré.

$$\text{Prod} = [\text{microalgues}] \times (1 - \text{fraction retirée}) \times 1000 / \text{tps}$$

Avec Prod, la productivité en microalgues ( $\text{cells.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ), [microalgues], la concentration en microalgues en  $\text{cells.mL}^{-1}$  et tps, le temps entre deux extractions (j).

L'azote assimilé a été calculé à partir de la productivité algale. Lorsque l'ammoniaque était épuisée, l'assimilation a été attribuée sur les nitrites et nitrates ( $\text{NO}_x$ ). Comme expliqué dans le texte, le défaut de bilan sur l'azote a été intégralement attribué à la dénitrification de l'azote oxydé.

Les barres d'erreur indiquées sur les figures correspondent à l'écart type entre les duplicats (SRT : 3,5 j ; fréquence : 1 j<sup>-1</sup>) ramenés à chaque condition afin d'apprécier les variations et tendances des paramètres. Les expériences S3F1 et S3F1b ont donc été regroupées pour l'analyse des résultats.

#### **4. Calage et simulation**

A partir de modèles biocinétiques, il est possible de simuler la croissance algale et l'épuration associée. Ces modèles utilisent un certain nombre de paramètres qu'il est nécessaire de déterminer avant l'utilisation en simulation. Cette opération de détermination s'appelle le calage, ou data fitting en anglais.

La méthode de calage consiste à simuler les expériences avec un jeu de paramètre (non calé), puis à comparer les valeurs simulées aux valeurs expérimentales et à l'aide d'un algorithme qui cherche à minimiser cet écart (Annexe 4). La comparaison aux valeurs expérimentales se fait avec la méthode des moindres carrés. Cela consiste à sommer le carré des différences entre valeurs expérimentales et simulées, la valeur ainsi obtenue est caractéristique de l'écart aux données expérimentales. Nous avons réalisé le data fitting à l'aide de Scilab 5.3.3 en utilisant un algorithme Nelder-Mead (Nelder and Mead 1965), un algorithme simplex de recherche directe. Cet algorithme va réaliser des itérations en modifiant le jeu de paramètre à chaque fois afin de réduire les moindres carrés au minimum.

La simulation de la croissance et de l'épuration associée consiste à résoudre les équations différentielles comme présenté en 1.2 (p 75). Sous Scilab, la fonction utilisée pour résoudre ces équations est la fonction ODE, solveur d'équations différentielles ordinaires. Elle nécessite une initialisation ( $y_0$ ), une gamme de temps et les équations différentielles et renvoie les solutions pour chaque temps.



**CHAPITRE 3. Etude et modélisation des interactions entre la lumière et la couleur du digestat sur la dynamique d'un écosystème microalgues/bactéries et la dynamique de l'azote associée**

**Avant-propos :**

Ce chapitre est consacré à l'étude de la couleur du digestat et de la lumière sur la croissance algale. Le digestat étant très coloré, il réduit la pénétration de la lumière dans le milieu et donc la quantité de photons disponible. Par conséquent, la croissance des microalgues autotrophes, ayant besoin de lumière pour se multiplier, s'en trouve impactée.

La première partie de ce chapitre contient la caractérisation de 3 digestats en termes d'analyse chimique mais aussi de la couleur.

Ensuite, le deuxième sous-chapitre présente l'étude de lumière et de la couleur de l'influent sur la croissance algale en photobioréacteurs, à l'aide d'un plan d'expériences. Il est présenté sous forme de publication qui est intitulée : "Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem". Cet article a été publié dans *Water Research* (Marcilhac *et al.* 2014).

Cette étude, bien qu'ayant donné des résultats intéressants pour comprendre, a été effectuée en batch, en petit volume de réacteur et avec une configuration spécifique. Afin de transposer ces résultats à un procédé continu avec une grandeur et une configuration différente la modélisation est un outil adapté. Dans le sous-chapitre 3, un modèle a donc été développé à partir des données obtenues lors de ces expériences afin de mieux quantifier les cinétiques et les impacts et les transposer à d'autres conditions plus proches des conditions réelles.

### Sous-chapitre 3. 1. Caractérisation des digestats

Comme mentionné précédemment, un enjeu majeur de cette étude concerne l'influence des caractéristiques spécifiques de l'influent étudié, le digestat, sur la croissance des microalgues et les interactions avec les bactéries. Il est donc important de bien connaître les caractéristiques de digestats de méthanisation issus d'effluent d'élevage mais également leur diversité inter-sites et temporelle. Dans ce cadre, en lien avec d'autres projets de l'unité de recherche, notamment le projet ANR DIVA (Caractérisation des Digestats et de leurs filières de Valorisation Agronomique), les digestats de deux installations de méthanisation agricoles à la ferme (D1 et D2) et d'une installation de méthanisation agricole et territoriale collective (D3) ont été spécifiquement caractérisés sur 1 an.

#### 1. Caractéristiques des unités de méthanisation

Le Tableau 23 montre la composition des différents intrants des 3 sites de méthanisation choisis. Ils traitent en majorité des déchets d'élevage. On retrouve respectivement du fumier bovin, du fumier de bovin/cheval et du lisier de porc pour D1, D2 et D3.

**Tableau 23 : Intrants des unités de méthanisation**

Site	Intrant	Quantité (%)	
<b>D1</b>	Fumier bovin	79-88	
	Temps de séjour : 60 à 67 j.	Céréales Eau/lisier	6-11 6-11
	<b>D2</b>	Fumier bovin/cheval (9:1)	58
Temps de séjour : 30 j.	Ensilage sorgho, oignon, carottes, fruits et légumes, ensilage herbe	4-32	
	Pâte à papier	10-38	
<b>D3</b>	Lisier de porc	35-55	
	Temps de séjour : 56 j. à 5 mois (post digestion)	Boues physico-chimiques d'abattoir Boues grassieuses (IAA) Matières stercoraires	19-34 6-14 11-21

Ces trois unités de méthanisation utilisent la codigestion comme la majorité des sites de méthanisation agricole, c'est-à-dire qu'ils mélangent les intrants de façon à augmenter la production de biogaz. En effet, les déchets d'élevage ont des pouvoirs méthanogènes assez faibles comparés à certains co-substrats, tels que des graisses de flottation de station d'épuration. En revanche la méthanisation de quantités importantes de graisses seules est très difficile à cause des acides gras à longues chaînes et de la production inhibitrice d'acides gras volatils. Suivant les situations géographiques et les activités agricoles, les intrants peuvent être très différents, il est donc important de caractériser les digestats de façon physico-chimique. En fonction des sites, le temps de séjour dans le réacteur de méthanisation varie de 30 à 70 jours.

## 2. Caractérisation chimique

### 2.1. Digestats bruts

Les digestats bruts ont été caractérisés en termes de matières sèches 5 fois sur une période d'un an et 3 fois sur la même période en termes de demande chimique en oxygène (DCO) (Trémier *et al.* 2014). Le Tableau 24 montre les moyennes annuelles avec les écarts types pour ces deux paramètres. On peut voir une certaine constance pour chaque site sur l'année au vu des faibles écarts types. Une différence significative de composition peut être soulignée entre D1 et les deux autres digestats bruts. D1 est environ trois fois plus concentré en matières sèches et en DCO que les autres.

**Tableau 24 : Composition en matières sèches et DCO des 3 digestats bruts considérés, valeurs moyennées sur 1 an**

	Matières sèches (%)	ET	DCO (g O <sub>2</sub> .kg MB <sup>-1</sup> )	ET
D1	17,4	1,7	163,6	8,1
D2	5,7	0,4	56,9	5,5
D3	6,4	1,8	63,0	8,3

Les gammes de valeurs obtenues pour les matières sèches sont similaires à celles synthétisées dans le rapport de l'ADEME de 2011 et la thèse de Cécile Teglia (ADEME 2011; Teglia 2011). De la même manière, la DCO de ces digestats correspond à la littérature pour une

gamme de 20 à 130 g O<sub>2</sub>.kg MB<sup>-1</sup>, excepté la DCO de D1 qui est un peu plus élevée (Girault 2008; Girault *et al.* 2013 ; Quideau and Lagadec 2013 )

## 2.2. Phase liquide du digestat

De manière générale, une séparation de phase est installée sur site après la méthanisation telle qu'une centrifugeuse ou une presse à vis. Il en résulte une phase solide, qui est le plus souvent compostée ou exportée, et une phase liquide soit épandue soit post-traitée.

La matière organique de la phase liquide du digestat des 3 sites, représentée par la composition en matières sèches (MS) et de la demande chimique en oxygène (DCO), est aussi assez constante sur 1 an (voir Figure 34). On peut cependant remarquer que les teneurs sont très différentes selon les sites. Comme pour les digestats bruts, les différences intrasites sont aussi très marquées.

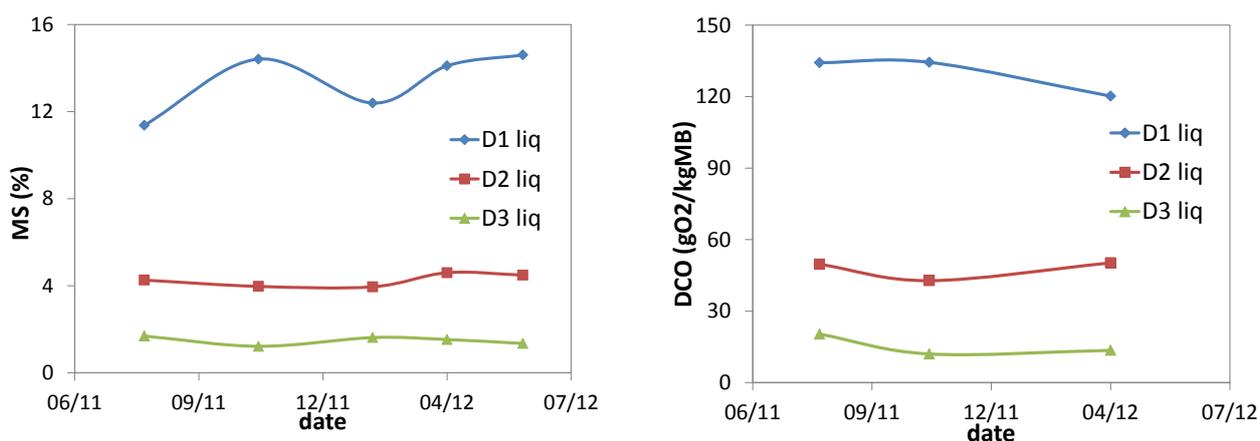


Figure 34 : Evolution du pourcentage de matières sèches (MS) et de la demande chimique en oxygène (DCO) des phases liquides de 3 digestats agricoles sur 1 an

Les abattements de MS et de DCO de la phase liquide par rapport au digestats bruts sont respectivement de 23 et 21 et de 25 et 20 % pour D1 et D2. Ces deux installations sont équipées de presse à vis, ce qui explique les rendements d'abattement équivalents, même si les caractéristiques de l'effluent sont aussi importantes.

L'efficacité de la séparation pour D3 augmente vers 75 et 81 % concernant les MS et la DCO respectivement. La séparation liquide/solide utilisant une centrifugeuse avec ajout de polymère est plus poussée sur cette installation. Pour des caractéristiques globales proches de D2, l'abattement des particules pour D3 est plus important, ce qui montre clairement l'effet de l'équipement.

Les résultats des analyses élémentaires sur la phase liquide sont présentés dans le Tableau 25. On peut relever une très forte hétérogénéité ionique entre les 3 digestats. La forte teneur en ions de D1 est sans doute due à la présence de MES dans la « phase liquide » à cause d'une séparation liquide-solide incomplète. Des particules fines dont certaines minérales (struvite, etc.) ont alors probablement été quantifiées dans la phase liquide.

**Tableau 25 : Composition chimique de la phase liquide de digestats de lisiers agricoles (en mg/L)**

	D1 moyen	D 2 moyen	D3 moyen	
	Phase liquide	Phase liquide	Phase liquide	
P <sub>soluble</sub>	720	57	131	mg P/L
N <sub>soluble</sub>	3510	2450	4547	mg N/L
K <sub>soluble</sub>	2953	1804	1403	mg K/L
Mg	41.9	14.1	< 6.3	g MgO/kg MS
Ca	77.6	44.8	7.0	g CaO/kg MS
Cu	127.8	126.9	24.0	mg Cu/kg MS
Zn	697.4	529.0	142.1	mg Zn/kg MS

Les ratios N/P sur les solubles s'étendent de 4,87 pour D1 à 42,98 g N/g P pour D2 (D3 : 34,71 g N/g P). On retrouve des ratios similaires dans la littérature entre 3 et 30 (Cañizares-Villanueva *et al.* 1994; Park *et al.* 2009; Levine *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Néanmoins, le digestat D2 est légèrement au-dessus de cette gamme.

Dans les lisiers, plus particulièrement dans les lisiers de porc, seulement une faible fraction du phosphore est soluble (4-10 %) alors que la majorité (60-85 %) est précipité (Daumer *et al.* 2004). Une faible variation des quantités précipitées à cause de changements dans la composition ionique ou du pH peut ainsi induire de forts changements des concentrations en P soluble. Cela peut expliquer les hétérogénéités entre les sites de la concentration en phosphore soluble et des ratios N/P. De plus, les co-substrats de la digestion anaérobie peuvent avoir un rôle significatif sur la composition (1.1, p 32).

Le magnésium est en assez faible quantité dans le digestat D3, ce qui peut poser des problèmes quant à l'utilisation dans une culture algale comme ont pu le remarquer Park *et al.* (2010). En revanche, les teneurs en zinc et en cuivre sont élevées pour D1 et D2. De manière générale, le cuivre et le zinc sont fortement liés à la matière organique particulaire, montrant qu'il reste des MES dans la phase liquide de ces digestats.

### 3. Caractérisation optique

La caractérisation optique est importante pour ce type de substrat à cause de leur forte absorption de la lumière et donc de l'accessibilité des microalgues à l'énergie lumineuse. La pénétration de la lumière a été observée par absorbance visible à l'aide d'un spectrophotomètre. La gamme de longueur d'onde scannée s'étend de 475 à 800 nm.

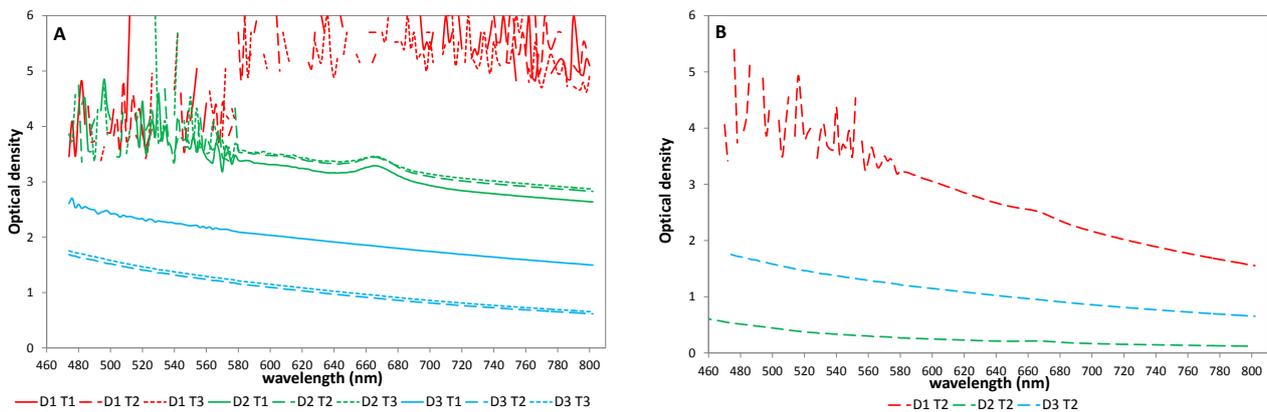


Figure 35 : Spectre d'absorption entre 475 et 800 nm de 3 digestats agricoles centrifugés et dilués 10 fois (D1, D2 et D3) provenant de 3 installations différentes. A montre la phase liquide prélevée sur site et son évolution au cours du temps (T1, T2 et T3), B montre la même phase davantage séparée au laboratoire.

La Figure 35.A représente les spectres d'absorption des phases liquides diluées 10 fois, prélevées sur site, de 3 digestats agricoles à 3 différents temps d'échantillonnages sur une année (2/2012, 5/2012, 7/2012). Tous les digestats absorbent sur l'intégralité du spectre (475-800 nm) avec une prédominance pour les plus faibles longueurs d'onde. L'énergie que captent les microalgues se trouve sur cette gamme de longueur d'ondes. On observe, comme pour la caractérisation chimique, une forte variabilité intra-site avec une faible absorption de la lumière pour D3 et une forte pour D1. Ces différences proviennent principalement de la technique de séparation employée, la séparation étant plus poussée pour D3 que pour D1. L'évolution temporelle des digestats sur chaque site est très faible, excepté pour D3 dont la différence peut être expliquée par le fait que l'installation était en démarrage au moment du prélèvement. La D.O. de D1 sature à cette dilution, mais à plus forte dilution, les spectres correspondant aux 3 temps sont comparables. Cette stabilité temporelle est probablement due au fait que la digestion anaérobie est un procédé fonctionnant à des temps de séjour hydraulique élevés, entre 30 et 65 jours pour D1, D2 et D3.

La séparation liquide/solide est différente suivant les installations. En effet, comme le montre la figure B, représentant les mêmes digestats après une séparation des solides plus poussée,

la densité optique après séparation en laboratoire est plus faible pour D1 et D2 montrant qu'une grosse partie de la D.O. est en fait particulaire. La fraction liquide ne correspond pas forcément à la fraction soluble, la centrifugation en laboratoire supplémentaire nous permet d'approcher de cette fraction soluble. Le cas de D2 est des plus flagrant, car la D.O. est réduite de 94 % après centrifugation au laboratoire. En revanche, la séparation sur site du digestat D3 est plus poussée utilisant du polymère, la séparation additionnelle en laboratoire ne semble pas éliminer plus de particules.

Bien que l'hétérogénéité entre les sites ait été réduite après une séparation additionnelle, elle reste cependant très significative. L'origine des différences vient probablement de l'exploitation des fermes qui utilisent plus ou moins d'eau de lavage, ou encore de l'origine des intrants complémentaires. Au vu de ces données, on ne peut pas espérer traiter ces digestats avec des algues avec la même efficacité, par exemple, la lumière disponible serait alors plus forte pour D2 que pour D1.

La Figure 36 présente l'absorbance de D3 à 474, 680 et 800 nm en fonction de la dilution. L'absorbance n'est pas linéaire en fonction de la dilution pour les digestats sur toute la gamme. En effet, pour une dilution plus faible que 3/100 à 5/100 il n'y a plus de proportionnalité. En revanche, pour de plus fortes dilutions, la loi de Beer-Lambert est applicable. Cette observation est importante pour l'exploitation des bassins de microalgues. Par exemple en tenant compte seulement de la coloration de l'effluent pour D3, entre un effluent non dilué et un effluent dilué par moitié, la diminution de D.O. est d'environ 27 % et non 50% (correspondant à une zone linéaire). Ces observations se retrouvent sur les trois échantillons, la linéarité est obtenue pour des dilutions à 1, 4 et 15 % pour D1, D2 et D3 respectivement.

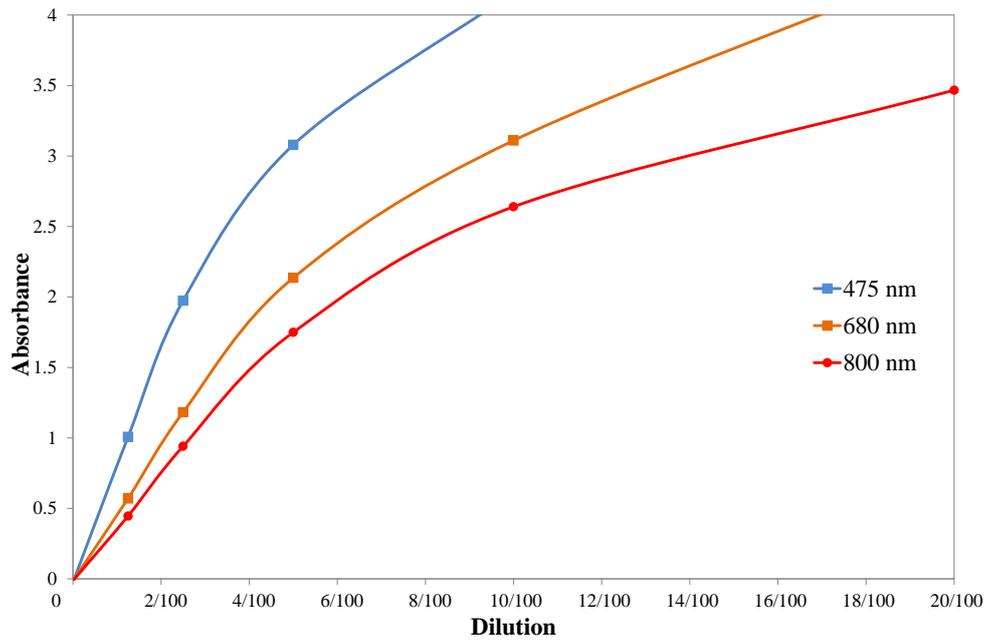


Figure 36 : Vérification de la linéarité en fonction de la dilution sur des phases liquides des digestats agricoles (D2)

### **Sous-chapitre 3. 2. Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem**

Cyril Marcilhac<sup>a,b</sup>, Bruno Sialve<sup>c</sup>, Anne-Marie Pourcher<sup>a,b</sup>, Christine Ziebal<sup>a</sup>, Nicolas Bernet<sup>c</sup>, Fabrice Béline<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Irstea, UR GERE, 17 av. de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France

<sup>b</sup> Université Européenne de Bretagne, F-35044 Rennes, France

<sup>c</sup> INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

#### RÉSUMÉ

Au cours de la digestion anaérobie, les nutriments sont minéralisés et peuvent nécessiter un post-traitement pour une valorisation optimum. La culture autotrophe de microalgues en utilisant le surnageant des digestats comme substrat est une solution promettante, cependant la couleur de l'affluent pose problème. Tout d'abord, la couleur de 3 digestats différents a été étudiée et les résultats obtenus ont montré une forte hétérogénéité intrasite, bien que leur couleur reste plutôt constante dans le temps. Les digestats absorbent la lumière sur le spectre visible complet et restent colorés, même après une dilution au 10<sup>ème</sup>. Ensuite, l'impact de la lumière et de la couleur du milieu a été évalué sur la croissance de *Scenedesmus sp.* et sur l'élimination de l'azote. Le plan d'expériences a mené à la construction d'un modèle pour prédire l'impact de la couleur de l'affluent et de l'intensité de la lumière sur l'assimilation de l'azote. L'élimination maximum de l'azote (8.5 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) a été observée pour une densité optique initiale de 0.221 et une lumière de 244 μmolE.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et le modèle a permis de déterminer une élimination en condition réelle entre 15.9 and 22.7 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> en fonction du niveau de dilution du milieu et de la couleur associée. Les changements des communautés de microalgues ont été suivis et ont révélé l'avantage de *Chlorella* sur *Scenedesmus* lorsque la lumière est limitante. De plus, les expériences ont montré que les microalgues sont de meilleures compétitrices pour les nutriments lorsque le phosphore est limitant. En outre, la nitrification a été limitée par la croissance algale, même lorsque P n'était pas limitant.

## ABSTRACT

During anaerobic digestion, nutrients are mineralized and may require post-treatment for optimum valorization. The cultivation of autotrophic microalgae using the digestate supernatant is a promising solution; however the dark color of the influent poses a serious problem. First, the color of the digestates was studied and the results obtained using three different digestates demonstrated a strong heterogeneity although their color remained rather constant over time. The digestates absorbed light over the whole visible spectrum and remained colored even after a ten-fold dilution. Secondly, the impact of light and of substrate color on the growth of *Scenedesmus sp.* and on nitrogen removal were assessed. These experiments led to the construction of a model for predicting the impact of influent color and light intensity on N removal. Maximum N removal ( $8.5 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) was observed with an initial optical density of 0.221 and  $244 \mu\text{molE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  light and the model allows to determine N removal between 15.9 and  $22.7 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  in real conditions according to the dilution level of the influent and related color. Changes in the microalgae community were monitored and revealed the advantage of *Chlorella* over *Scenedesmus* under light-limitation. Additionally microalgae outcompeted nitrifying bacteria and experiments showed how microalgae become better competitors for nutrients when phosphorus is limiting. Furthermore, nitrification was limited by microalgae growth, even when P was not limiting.

### *Highlights:*

*O.D. of diluted (1/10) supernatant digestate ranged between 0.19 and 2.35 at 680 nm*

*Digestates absorb throughout the visible spectrum*

*Nitrogen removal up to  $8.5 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  in colored media*

*Growth of microalgae limits growth of ammonia-oxidizing bacteria*

*Chlorella is a better competitor for light than Scenedesmus*

*Keywords: digestate, microalgae, color, light, AOB community evolution.*

## 1. Introduction

Within intensive livestock farming systems such as found in Brittany (France), the over-application of manure on agricultural soils leads to nitrogen and phosphorus discharge into the aquatic environment, resulting in serious eutrophication problems and decreasing water quality

(Jongbloed and Lenis 1998). Manures are heterogeneous complex substrates that contain volatile compounds like ammonia. Such substrates are difficult to handle in an environmentally-friendly way and bad management can lead to losses into the atmosphere, increasing environmental impacts and decreasing recycling efficiency. For example, ammonia emissions from pig slurry used as crop fertilizer without prior treatment represent up to 50% loss of total excreted nitrogen (Portejoie *et al.* 2003). Simultaneously, anaerobic digestion of livestock waste is becoming increasingly common in Europe, since it can produce renewable energy and reduce direct and indirect greenhouse gas emissions. However, the nitrogen and phosphorus contents of the waste are not modified by anaerobic digestion, and the increase in pH and ammonia content may further increase potential losses into the atmosphere (Massé *et al.* 2011). Consequently, additional post-treatment is required to improve nutrient recovery through better management either to reduce environmental impacts and/or to allow them to be exported from the intensive livestock breeding region. Accumulating mineralized nutrients in autotrophic microalgal biomass by cultivating microalgae, using the digestate as substrate, was identified as an efficient way to achieve this objective (Lens *et al.* 2001). In addition, the combination of the two treatments allows better use of the energy that is produced in cogeneration by using excess heat for microalgae growth. If the flue gas produced by cogeneration is used as a carbon source for the cultivation of microalgae, thereby reducing the amount of carbon dioxide released into the atmosphere, the global carbon print will also be reduced. After the nutrients have been accumulated in the biomass and harvested, the microalgae could then be exported and used as organic “slow release fertilizer” (Mulbry *et al.* 2005; Patel *et al.* 2012) thus reducing short term ammonia emissions and losses.

Consequently, such a process allowing recycling nutrients from manure or digestate or quite similar effluents by means of cultivating microalgae has previously been studied (de la Noüe and Bassères 1989; Tam and Wong 1994; Sevrin-Reyssac *et al.* 1996; Molinuevo-Salces *et al.* 2010; Park *et al.* 2010; Levine *et al.* 2011). However, the biomass productivity observed in these studies varied greatly from 31 to 332 mg DW.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, with nitrogen removal rate varying from 3.4 to 36.5 mgN.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> considering a N content of 11 % in the microalgae biomass. Additionally, the data based on DW productivity included the heterotrophic biomass growth with the microalgae growth. The heterotrophic biomass could be significant, with such concentrated effluents and the exact microalgae productivity rate is consequently not well-known. In the same way, when data are based on N removal rate, the processes involved including microalgae growth but also NH<sub>3</sub> stripping and nitrification/denitrification are often not well quantified whereas these processes other than microalgae growth could represent more than 50% of N removal in some cases (de Godos *et al.*

2009). Moreover, the impact of the effluent characteristics and the related effect of the cultivating conditions are little documented while one of the main difficulties involved in the use of digestate as substrate for the cultivation of microalgae is the dark color of the influent (Gonzalez-Fernandez *et al.* 2011). The dark color reduces light penetration and hence the amount of light available for the autotrophic growth of microalgae. The growth of microalgae in such a medium requires its dilution, mainly to promote light penetration, but also to reduce the high nutrient content, which could inhibit growth (Azov and Goldman 1982). Light penetration depends not only on the color of the influent but can also be reduced by too high concentrations of microalgae (Fallowfield and Garrett 1985), which in turn, depend on the culture conditions and the initial concentration of microalgae. The amount of water used to dilute the digestate during the process has to be as small as possible not only to ensure the process is economical and ecological but also that it is feasible. In another connection, the intensity of the color not only reduces light penetration, but could also be responsible for a change in species composition (Bartosh and Banks 2007). However, despite the important role of the color of the influent in the efficiency and consequently the feasibility of the recycling process, data on the characteristics of the digestate and their impact on the growth of microalgae are rare.

The aim of this work was thus to characterize the color of digestates and to quantify the effect of their color and light intensity on microalgae growth (quantity and species) in order to be able to predict microalgae growth and nutrient assimilation yields.

## **2. Materials and methods**

The color of digestates from three industrial sites was characterized over the period of a year to observe differences between the three sites as well as any changes the digestates may have undergone with time. The ability of light to penetrate different colored digestates and microalgae concentrations was measured to compare their influence.

To study the effect of the intensity of the light and the color of the digestate on microalgae growth, batch experiments were carried out at laboratory scale according to an experimental design. Different colored influents and light intensity conditions were tested to measure microalgae growth and nutrient removal over a period of 14 days. At the beginning of each experiment, the reactors were seeded with an inoculum mainly composed of microalgae. Microalgae growth and nutrient removal yields were monitored as a function of the light and color conditions, and changes in the microalgae species were measured by comparing initial and final states.

## 2.1. Characterization of digestates

Three digestates originating from farm anaerobic digesters (D1 and D2) and collective anaerobic digester (D3) facilities were monitored over a period of one year. Anaerobic digestion inputs were cattle manure, cereal waste and cattle slurry (D1), cattle manure, vegetable waste and paper paste (D2), and pig slurry and activated and greasy sludge from a slaughterhouse and wastewater treatment plant (D3). The three digestates studied corresponded to a supernatant resulting from decanter centrifuge separation with polymer addition (D3) and screw press (D1 & D2).

Digestates were sampled five times over a period of one year (9/2011, 11/2011, 2/2012, 4/2012, 6/2012). The ammonium content of each sample was measured each time, whereas the phosphate content was measured the two first times. The color of the digestates was also determined.

## 2.2. Inoculum

A complex phytoplanktonic ecosystem, called "inoculum" was used in the experiments. It comes from an open high rate algal pond (INRA Narbonne, France) dedicated to the treatment of synthetic wastewater and was originally sampled from an urban wastewater treatment pond located in Meze (France). The microalgae populations mainly belong to the Chlorophyta taxon and are dominated by *Scenedesmus sp.* However, other algae genera, including *Chlorella sp.*, are present in small amounts, along with bacteria. The green algae *Scenedesmus sp.* was chosen because it has frequently been observed growing on manure and digestate (Sevrin-Reyssac *et al.* 1996; Molinuevo-Salces *et al.* 2010).

## 2.3. Pilot and methods

The study was carried out using an experimental design with two variables: the initial color of the influent and the light provided at the surface of the reactor. The chosen experimental design was a 2-factor factorial surface response, randomized with some duplicated conditions. In addition, six center points were added to better approximate the sensitivity of the results to reach a total of 24 experiments. Statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., USA). A wall was built to separate the reactors into two groups of three to make

it possible to provide two different levels of light during each run. The 14-day period combined with low initial microalgae concentration was chosen after preliminary trials (not shown) to get a good accuracy on microalgae growth while limiting self-shading and nutrient depletion.

The algae were cultivated in six 2.5 L cylindrical reactors. The temperature was maintained at 25 °C and mixing was set at 230 rpm (Figure 37). pH was monitored using gel-filled pH electrodes and regulated between 6.95 and 7.05 every 30 s by the addition of pure carbon dioxide at a flow rate of approximately  $150 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$  for 0.1s. CO<sub>2</sub> was added through solenoid valves activated by a data logger (Agilent 34970) combined with a special software developed using Labview (version 11.0). In addition to the regulation described above, CO<sub>2</sub> was added at 45-min intervals during the day to avoid carbon limitation in the absence of regulation. To avoid acidification, which had been observed during preliminary tests when microalgae growth was limited, the pH was adjusted by adding 1.25 mL of NaOH 1M every second day to each reactor. This made it possible to compensate for any differences due to night respiration and to supply a large amount of carbon dioxide with regulation.

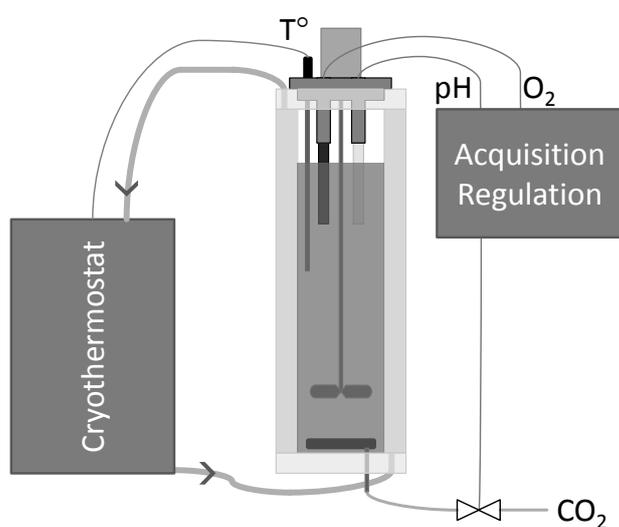


Figure 37 : Schematic diagram of the experimental set up

Light was supplied by fluorescent bulbs (4 Grolux Sylvania 30W 8500K and 4 cool white 30W 4000K) and regulated according to the photosynthetic photon flux at the surface of the reactors. This was set at 50, 150 and 250  $\mu\text{molE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  by shifting the light source to different distances from the reactor. A 12h/12h light/dark regime was used.

The initial color of the influent was provided by the supernatant of centrifuged digestate. The fixed color levels inside the reactor at the beginning of the experiment were set on the basis of

optical density at 680 nm (O.D.) and were equal to 1.3, 0.9, 0.5 and 0.2, respectively. These values were obtained by adding different quantities of digestate (corresponding respectively to 1.0, 0.7, 0.3 and 0.17% v:v) in a growth medium. The digestate used for these experiments came from D1. This digestate was chosen because of its high optical density at 680 nm (O.D.) which made it possible to minimize the quantity added to reach the desired O.D. and hence minimize differences between each run other than the level of O.D. The composition of the growth medium was adapted from a "standard" 1/10 diluted digestate to obtain similar concentrations irrespective of the experimental conditions. Nutrients were equilibrated by adding salts based on the amount of digestate added to achieve the desired color. The characteristics of the digestate and the salts used are listed in Table 26.

**Tableau 26 : Initial composition of macronutrients of the growth medium**

Parameter	Salt	concentration
Cl <sup>-</sup> (mg Cl L <sup>-1</sup> )		390
Na <sup>+</sup> (mg Na L <sup>-1</sup> )		224
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg S L <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28
K <sup>+</sup> (mg K L <sup>-1</sup> )	KCl	516
Mg <sup>2+</sup> (mg Mg L <sup>-1</sup> )	MgCl <sub>2</sub>	67
Ca <sup>2+</sup> (mg Ca L <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub>	52
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> Cl	102
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg P L <sup>-1</sup> )	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1

Nitrogen and phosphorus concentrations were reduced compared to the concentrations of the other compounds to better represent process conditions, when nitrogen and phosphorus are removed by microorganisms. The N:P mass ratio used in the experiments (about 100) was quite high compared to those cited in the literature where the N:P ratio varied between 3 and 30 (Park *et al.* 2009; Levine *et al.* 2011), however it was close to the N:P ratio measured in the D1 used for our experiments. Other nutrients, which are not listed in Table 1, were added as Z8 media (Staub 1961; Kotai 1972), their ratio was calculated on a nitrogen basis. Z8 trace elements were added at a rate of 1% of the total volume of the influent.

Finally, for each run, the reactor was filled with inoculum (approximately 10% v:v to reach about  $8.5 \times 10^3$  microalgae.mL<sup>-1</sup>), digestate and growth media were supplemented with trace

elements to reach the desired conditions, after which the light regime and pH regulation was activated. Each batch experiment lasted 14 days. Based on the methodology described above, all the parameters, except those we wished to study (e.g. color and light), were considered to be identical for each run.

## 2.4. Analytical measurements

### 2.4.1. Color of the digestate and light penetration

The color of the digestate and any changes in color were determined by measuring optical density (OD) on the visible spectrum, with a Unicam UV/Vis UV2 spectrometer. Variability was assessed by monitoring the three digestates at three separate dates (2/2012, 5/2012, 7/2012). To estimate the impact of on-site liquid/solid separation, spectra were measured on raw liquid digestate and on the same phase after separation by centrifugation at 18 000 rpm for 20 min in the laboratory.

The photosynthetic photon flux was monitored during all batch experiments to observe the respective impacts of the concentration of the microalgae and color of the digestate. To this end, two locations were chosen inside the reactors, 2.3 and 4.8 cm from the surface of the culture vessel. The system used for measurement was a Delta Ohm HD2302.0 with a LP471PAR probe. Four dilutions of D1 were compared to reach O.D. values of 0.22, 0.36, 0.89 and 1.36 at 680 nm with different concentrations of microalgae.

### 2.4.2. Nutrient analysis

During the course of each 14-day experiment, cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) and anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) were analyzed, every two days using a Metrohm 850 Professional IC Anion.

The nitrogen assimilation rate (NAR) corresponding to the nitrogen assimilated by the microorganisms, was calculated on a nitrogen balance basis using  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations and considering no loss of nitrogen as gas ( $\text{N}_2$  or  $\text{NH}_3$ ). Due to the amount of oxygen produced by the microalgae and the very low level of biodegradable carbon, denitrification was considered to be negligible. Similarly, due to the pH level (about 7) and the low level of liquid/gas transfer,  $\text{NH}_3$  stripping was also considered as negligible. A nitrogen mass balance made on a few runs confirmed both hypotheses.

The rate of production of NO<sub>x</sub>, nitrite, and nitrate represents the activity of ammonia oxidizing bacteria, and, for the same reason as above, no nitrogen was considered to be lost from the system.

NAR (mg.L<sup>-1</sup>) and NO<sub>x</sub>PR (mg.L<sup>-1</sup>) were calculated as follows:

(eq. 1)  $NAR = (([NH_4^+] + [NO_2^-] + [NO_3^-])_0 - ([NH_4^+] + [NO_2^-] + [NO_3^-])_{14}) / \text{number of days}$

(eq. 2)  $NO_xPR = (([NO_2^-] + [NO_3^-])_{14} - ([NO_2^-] + [NO_3^-])_0) / \text{number of days}$

where day 0 and day 14 were the initial and final days considered. All these concentrations are expressed in mg N.L<sup>-1</sup>.

#### 2.4.3. Determination of biomass growth

To evaluate microalgae growth, the number of cells and optical density (O.D.) at 680 nm were measured every second day using a Unicam UV/Vis UV2 spectrometer. Microalgae cells were also counted manually using a Neubauer cell counting chamber. Microalgae productivity over the 14-day experiment was calculated according to equation 3 using data from the Neubauer cell counting chamber. The O.D. usually used to evaluate microalgae growth could not be applied in the present case due to the color of the digestate and to potential changes during the course of the experiment. However, O.D. data were used to exclude outlier data from cell counting on the basis of the correlation between the increase in OD680 and the number of cells. Data that were outside the ± 20% limits of this correlation were excluded. Indeed, manual counting can be a source of incorrect estimation of the population count due to sampling and homogenization problems. For the calculation of productivity, the integration period began two days after the beginning of the experiment to avoid initial lag phase perturbation or a wrong estimation due to a too small initial cell count.

(eq. 3)  $P_{max} = (C_{14} - C_2) / (t_{14} - t_2)$

where C<sub>14</sub> and C<sub>2</sub> are the number of cells at time t<sub>14</sub> (final time) and t<sub>2</sub> respectively in cells.L<sup>-1</sup>. The maximum productivity is expressed in Cells.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Cultivable heterotrophic bacteria (UFC.mL<sup>-1</sup>) were quantified by counting them in triplicate. Samples were diluted in series in peptone water up to 10<sup>-6</sup>, then 100 μL of the three last dilutions were spread on TSYE, nonselective medium. The boxes were then incubated at 30 ° C for 48 h.

#### 2.4.4. Capillary Electrophoresis-SSCP analysis

Nested PCRs were performed for the Chlorophyceae taxon. The first PCR CE-SSCP targeted Chlorophyceae (F) with 5'-TGGCCTATCTTGTTGGTGTGT-3' primer (Valiente Moro *et al.* 2009), and eukaryotes (R) with 5'-CTTAATTTGACTCAACACGG-3' primer. The reaction mixture consisted of 200 nM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U Pfu (Agilent), 500 nM of each primer Pfu buffer 1X and 1 µL DNA extract (10-fold dilutions). The final reaction volume was 25 µL. PCR conditions were as follows: an initial denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, at 59 °C for 1 min, and at 72 °C for 1 min. Then a final elongation step run for 10 min at 72 °C.

The second PCR was performed for the Eukaryotes with 5'-CTTAATTTGACTCAACACGG-3' and 5'-GGGCATCACAGACCTGTT-3' primers. The reaction mix was 400 nM dNTP, 500 nM each of primer, 2.5U Pfu (Agilent), Pfu buffer 1X and 1 µL DNA extracts (10-fold dilutions). The final reaction volume was 50 µL. After a denaturation step at 94 °C for 2 min, the reactions were carried out by 25 cycles at 94 °C for 1 min, at 55 °C for 1 min and at 72 °C for 1 min plus a final elongation step at 72 °C for 10 min.

Both PCR reactions were stopped by cooling the mixture to 10 °C. The size of the amplification products was confirmed by agarose gel electrophoresis (TBE 1X 1.5% agarose (wt/vol)) with 246 pb. The resulting PCR products were separated by CE-SSCP at the Sequencing Facility of Biogenouest (CNRS, Roscoff, France).

#### 2.4.5. Cloning and sequencing

Cloning was performed on four PCR products selected according to the CE-SSCP profiles (with the most numerous and highest peaks) of *Chlorophyceae-Eukaryote*. The purified PCR products from the *Chlorophyceae-Eukaryote* PCR (with Taq polymerase, unlabelled) were cloned and transformed into competent *E. coli* cells with the StrataClone PCR cloning kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. A total of 160 clones were randomly selected. *E. coli* with inserts of proper size were screened by PCR on colonies using plasmid-targeted primers T7 and P13.

PCR products were analyzed by CE-SSCP PCR for *Eukaryote* at Biogenouest. Inserts yielding a peak that co-migrated with distinguishable peaks from the samples CE-SSCP profiles were sequenced for peak identification.

A total of 44 clones were sequenced at Biogenouest. DNA sequences were identified by comparison with their closest relatives identified in databases using the *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* from the National Center for Biotechnology Information (NCBI;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the Ribosomal Database Project II (RDPII; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

SSCP results are expressed by representing the size of each identified genus as a proportion of the total size of the peaks identified.

### 3. **Results and discussion**

#### 3.1. Characterization of the digestate

The composition and O.D. of the digestates were characterized over the period of a year to assess their variability between each site and with time.

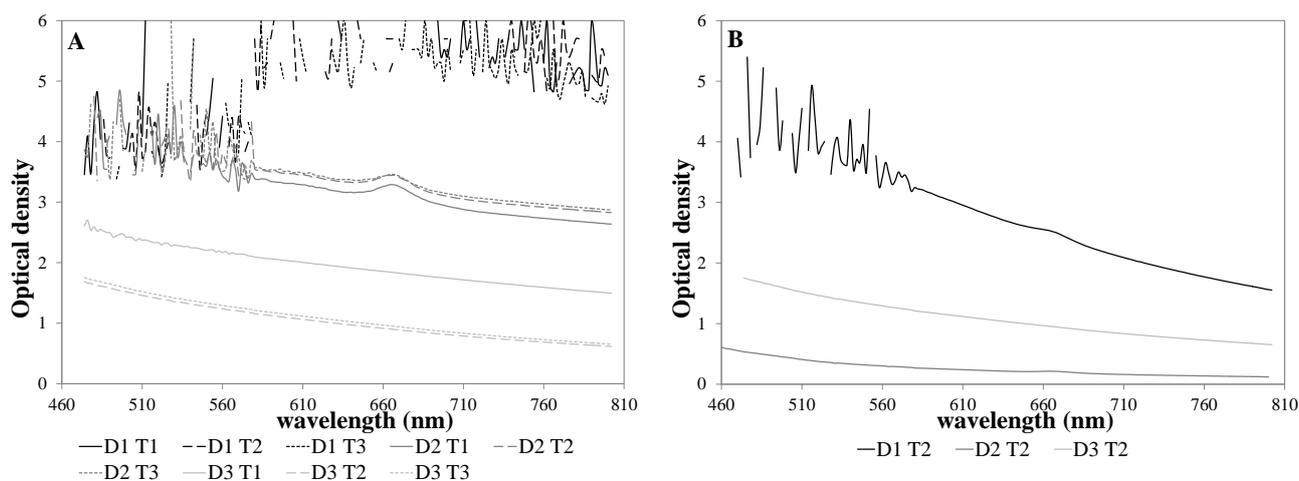
The ammonium and phosphate contents of digestates are listed in Table 27. Ammonium concentrations ranged from 2.4 to 4.6 gN.L<sup>-1</sup>. These differences can be chiefly explained by the origin of the substrates used within the process. Phosphate contents varied from 26 to 121 mgP.L<sup>-1</sup> with a high standard deviation. In manure, particularly pig slurry, only a small proportion of phosphorus is soluble (4 -10%) while the majority (60-85%) is precipitated (Daumer *et al.* 2004). Consequently, a small variation in the precipitated quantity due to a change in ionic composition or in pH could result in major changes in the soluble concentration. This could be the principal explanation for the significant differences observed between sites but also for the important differences observed between sampling dates at the same site. The N:P ratio of these samples ranged from 38 to 135 gNH<sub>4</sub>-N.gPO<sub>4</sub>-P<sup>-1</sup> and results indicated that this ratio could vary greatly, not only from one site to another, but also with time at a given site.

**Table 27 : Mean composition of the liquid phase of the three digestates ( $\pm$  standard deviation)**

	D1	D2	D3
NH <sub>4</sub> -N (g.L <sup>-1</sup> )	3.5 $\pm$ 1	2.4 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.6
PO <sub>4</sub> -P (mg.L <sup>-1</sup> )	26 $\pm$ 24	45 $\pm$ 3	121 $\pm$ 90
N:P (gN.gP <sup>-1</sup> )	135	53	38

The color of the liquid digestate was measured by visible absorbance on ten-fold diluted digestates, over a range of wavelengths from 475 to 800 nm corresponding to the light that can be used by microalgae. Figure 38 shows the spectra of the diluted liquid digestates straight after on-site liquid/solid separation (A) and after further centrifugation at the laboratory (B). All digestates were found to absorb across the entire visible spectrum, with a stronger absorption intensity over the lower half. Marked heterogeneity was observed between the three facilities. The differences can be attributed to both farm management, implying different quantities of water used for washing

operations, and to the origin of the inputs. The digestates cannot be assumed to be processed by microalgae with the same ease and efficiency, as the degree of dilution to allow the development of microalgae differs. Figure 38A illustrates how the digestates remained relatively constant over time, except for one sample from D3, whose difference could be explained by the fact that the sample was collected during the starting-up of the facilities. D1 was shown with the same dilution as the others, but it saturated the signal. When more diluted, D1 remained quite constant over time.



**Figure 38 :** Absorption spectra between 475 and 800 nm of 3 ten-fold diluted liquid phases of digestates (D1, D2 & D3) from the three different facilities. A shows the liquid phases sampled on site and how they evolved over time (T1, T2 & T3), B shows the same phases after further centrifugation at the laboratory.

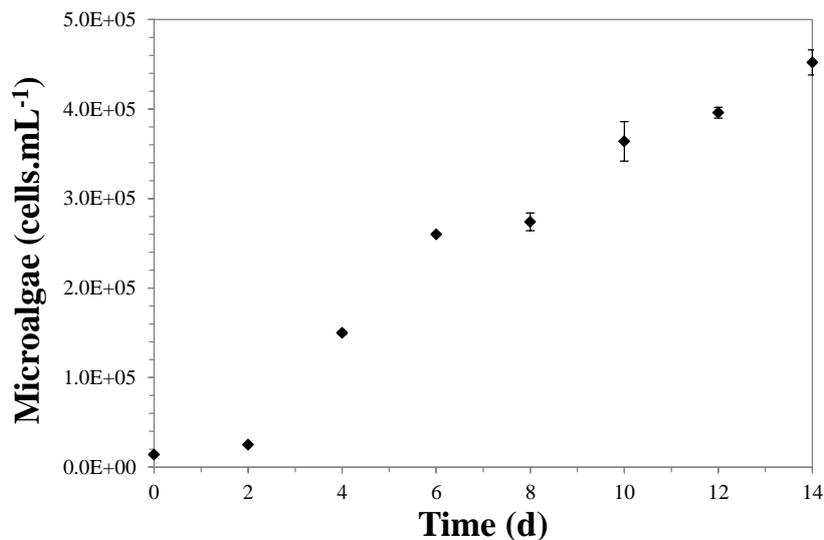
However, variability with time was found to be lower than the differences between sites. The constant color of the digestates over time facilitates nutrient removal by microalgae. This temporal stability can be due to the fact that anaerobic digestion is a process with a long hydraulic retention time, from 30 to 65 days in the present study.

The spectra in Figure 38B show that on-site separation of liquids and solids at D1 and D2 was not optimal and that particles were still present afterwards, digestate 2 being a particularly good example, since the optical density at 680 nm decreased from 3.2 to 0.2 when the digestate underwent further separation at the laboratory. The spectrum of the D3 digestate did not change due to a better on-site separation process and to the addition of a polymer. Although heterogeneity between the three digestates was reduced after further separation at the laboratory, it still remained significant.

### 3.2. Biomass growth and nitrogen removal

The experimental design was analyzed on the basis of microalgae productivity and nitrogen removal rate. Analysis consisted in determining and quantifying the impact of the initial color and available light on the two parameters over the 14 days of the experiment.

The microalgae growth obtained in the best conditions for growth within our trials (O.D. of 0.221 and a light level of  $244 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) is represented in Figure 39.



**Figure 39 : Microalgae growth over time of the optimal condition considered in this study (O.D. of 0.221 and a light level of  $244 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).**

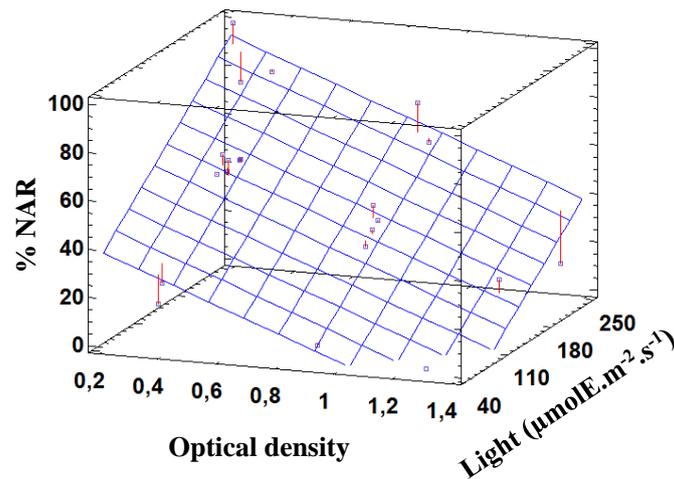
Due to limitation (light/ influent color/self-shading), the growth of the microorganisms did not fit exponential curves and the specific growth rate could thus not be clearly determined. However, in this case, the maximum microalgae growth was reached at the beginning between days 2 and 6 and equal to  $5.88.10^7 \text{ cells.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  and the related maximum dynamic nitrogen assimilation rate is  $8.5 \text{ mg N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . A similar trend has been reported on pig manure in literature between 0.5 and 12  $\text{mgN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (Sevrin-Reyssac *et al.* 1996; Sevrin-Reyssac 1998) and higher nitrogen removal rates in animal sewage were also observed but, as discussed in the introduction, without clear knowledge on the processes involved. The trends of the curves obtained for all conditions are very different and the determination of the maximum growth rate for each case is difficult and not accurate. For this reason, microalgae growth was measured by calculating productivity between day 2 and day 14 by linear regression to compare the conditions.

Considering all trials performed, a good correlation between the nitrogen assimilation rate and microalgae productivity was found ( $R^2 = 0.68$ ). The intercept of the regression line being close to zero indicates that the quantity of nitrogen assimilated by the bacteria can be considered

negligible in comparison to the quantity of nitrogen assimilated by algae. This was verified by the quantification of total bacteria (qPCR) and heterotrophic cultivable bacteria in the reactors. They followed the same trend in all the experiments; bacteria developed from  $8.5 \times 10^4$  to  $1.0 \times 10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> between the first two days and then remained constant until the end of the experiment. For the same reason, no major denitrification occurred in either experiment, because denitrified nitrogen would have been included in the NAR. It can thus be concluded that the majority of nitrogen was consumed by microalgae. Furthermore, with the slope of the regression line the mean quantity of nitrogen required by microalgae cells could be calculated. By forcing the line through zero, the empirical value for microalgae N content was estimated at  $1.44 \times 10^{-7}$  mg N.cells<sup>-1</sup> corresponding to 60.9 mg N.g TSS<sup>-1</sup>. On one hand, Dickinson et al. (2013) found a protein content of 150 to 400 mg protein.g TSS<sup>-1</sup> for *Scenedesmus* sp. grown on municipal wastewater. Based on an N protein content of about 16%, this corresponds to 24 - 64 mg N.g TSS<sup>-1</sup>. The results of the present study are similar to those of Dickinson et al. On another hand, other authors reported higher protein content, i.e. reaching 50% to 70% corresponding to 80 to 112 mg N.g TSS<sup>-1</sup> (Wu and Pond 1981; Olguín *et al.* 2003; Molinuevo-Salces *et al.* 2010). All these data confirmed that, firstly, biomass growth observed in our experiments is mainly carried out by microalgae and, secondly, the observed nitrogen removal is mainly due to microalgae growth.

Nutrient removal was based on nitrogen assimilation, as nitrogen is one of the target elements to be removed and the quantities of phosphorus were too small to obtain accurate results. Since ammonium is partially transformed into nitrite and nitrate by nitrification, the mass balance of the ionic forms of nitrogen was used to calculate the nitrogen assimilation rate. The impact of light and influent color was then considered calculating the decrease (expressed as percentage) according to the data obtained in the optimal condition considered in this study (O.D. of 0.221 and a light level of  $244 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

The impact of light and influent color on nutrient removal was plotted in Figure 40 as the percentage of the maximum Nitrogen Assimilation Rate (NAR, calculated over the duration of the experiment).



**Figure 40 :** Response surface for the reduction of nitrogen assimilation rate (% of maximum NAR) as a function of optical density (O.D.) and light. Blue dots represent experimental points and red lines represent the deviation from the model.

Statistical analysis of the experimental design highlighted the significant influence ( $P < 0.05$ ) of light and of the initial color of the effluent on both productivity and NAR attenuation. Nevertheless, the two quadratic and interaction terms were not significant in the chosen ranges.

As expected, the impact of light was positive, because microalgae are photoautotrophic microorganisms. The linearity of productivity and NAR with light showed no light saturation or inhibition between 50 and 250  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  in this matrix.

The influence of initial optical density (i.e. the parameter that was chosen to represent color), on productivity and NAR was negative. This can be explained by the fact that the increase in O.D. reduced light penetration and therefore the quantity of light in the medium. Theoretically, the quantity of digestate should influence the growth in process as it would increase the quantity of nutrients. However, in this case, nutrients were equilibrated on the same basis in all experiments in order to avoid this coupling. In the chosen range of optical densities and light, the impact of light was equivalent to that of color because it reduced the NAR by 60 %, and the color reduced the productivity by 60 %. Consequently, even in the case of a highly colored effluent, growth is both affected by the light that is available in the prevailing conditions and by the color. It is therefore possible to remove nitrogen even at higher O.D. if there is sufficient light.

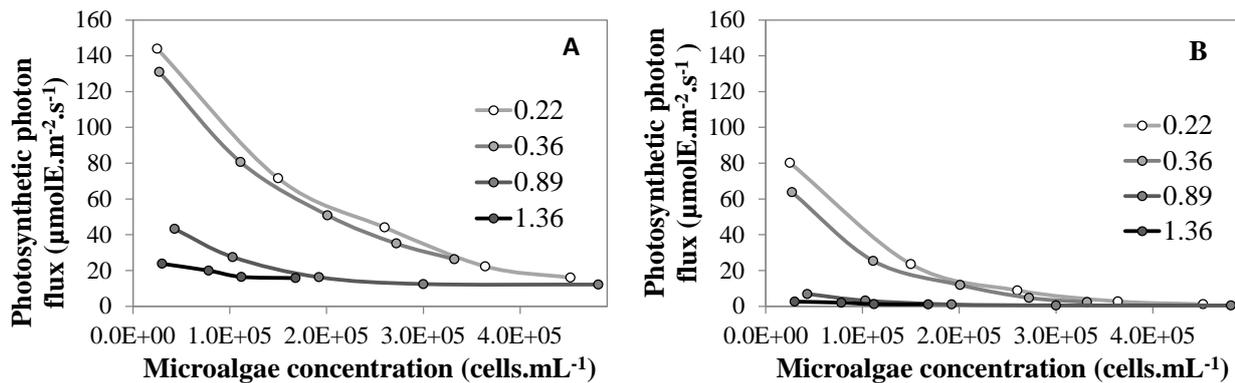
The concentrations of other macronutrients including magnesium and potassium did not change during the course of the experiments. However, potassium and especially magnesium are required for microalgae growth (Becker 1994). Indeed, magnesium is the chelator ion of the chlorophyll complex, which is a major photosynthetic pigment in many algal species, and is also

present in enzymatic cofactors. Park et al. (2010) observed that Mg can be limiting during a continuous process, because it is highly consumed. Bjornsson et al. (2013) reported that Mg is limiting for growth in pig slurry digestate. Our results compared with other results from literature show that Mg and K were not limiting and were even in large excess in this matrix.

For process design, a compromise has to be made between a little diluted digestate (high O.D.) leading to a low N-removal and a higher N-removal (low O.D.) which requires higher prior dilution and thus implies a need for water. In the example of the digestate D2 and considering a light of  $900 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (mean value in Brittany during the day), the undiluted centrifuged digestate would correspond to the maximum N-assimilation of  $15.9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  (based on our previous results and considering an extension of the model) requiring a pond volume of  $150 \text{ m}^3$  per  $\text{m}^3$  digestate input. The same liquid digestate diluted 10-fold (NAR:  $22.7 \text{ mgN.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) would then require a volume of  $106 \text{ m}^3$  per  $\text{m}^3$  digestate input. The needed volume is significant in all cases leading to a hydraulic retention time (HRT) higher than the microalgae residence time considered optimal around 2-4 days. This would require a recirculation of the treated digestate within the pond after microalgae harvesting. However, other means than dilution are possible to increase NAR by reducing the optical density of digestates such as further liquid-solid separation, coagulation-flocculation, etc. to optimize the process. Furthermore, it could be possible to enhance other N-removal mechanisms (nitrification-denitrification) in microalgal culturing with the oxygen production as has been highlighted in literature.

### 3.3. Light penetration

As already shown by the results presented above, the color of the influent (expressed as O.D at 680 nm in the model) restricted the growth of microalgae due to limited light penetration. However, penetration of light was also limited by the concentration of microalgae which increased over the course of the experiments. The relative importance of the color of the medium and of the concentration of microalgae on available light were also studied by measuring the photosynthetic photon flux during the experiments at a distance of 2.3 cm and 4.8 cm from the surface of the reactor (Figure 41). The impact of the concentration of microalgae on available light was higher at low O.D. than at high O.D. Indeed, when the medium is less colored, the effect of self-shading is more important. At 4.8 cm, the photosynthetic photon flux received was close to zero, whatever the concentration of microalgae, for an O.D. of 0.89 and 1.36 and for a microalgae concentration of more than  $3.0 \times 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$  for the lower optical densities.



**Figure 41 :** Photosynthetic photon flux (PPF) measured in the digestate matrix of different optical densities containing *Scenedesmus* sp. The light provided was  $240 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and the PPF was measured at 2.3 (A) and 4.8 cm (B) from the surface. Optical densities ranged from 0.22 to 1.36 at 680 nm.

When the substrate is highly colored, mixing has to be sufficient to allow the microalgae to receive enough light, otherwise light would be only available at the surface. Even in the case of colorless effluents, available light in the lower layers becomes scarce when the microalgae reach a certain concentration. Therefore, the impact of optical density on light availability is less important than the level of light provided because, independently of color, self-shading makes light available at the surface only. Nevertheless, the maximum microalgae concentration remains driven by the initial O.D. since color still reduces light availability.

### 3.4. Interaction of microalgae with nitrifying bacteria

The goal of the process is to accumulate phosphorus and nitrogen in microalgal biomass. Even if *Scenedesmus* and *Chlorella* can grow on nitrite and nitrate, nitrification has to be controlled. Either it has to be restricted as much as possible, to prevent denitrification depleting the ammonia pool when oxygen concentration is low (night) to valorize the nutrients, or on the contrary to be enhanced by produced oxygen to remove nitrogen via denitrification.

During our experiments, microalgae growth was never found to be limited by ammonia depletion thanks to the high initial ammonia concentration and potentially to nitrite and nitrate formed when nitrification occurred. Consequently, as shown by the results presented above, nitrification had no impact on microalgae growth (which was mainly impacted by light and O.D.). On the contrary, the nitrification rate appeared to be influenced by P limitation and also by microalgae growth.

In fact, P-limitation had a strong impact on nitrification, even though microalgae growth did not appear to be limited by phosphorus depletion. The results of productivity and nitrogen assimilation modeling were relatively accurate, even when phosphorus was limited. Phosphorus

was considered limiting when its concentration reached  $0.1 \text{ mg PO}_4\text{-P.L}^{-1}$  or below. In fact, the nitrification rates observed when P was limited are close to zero, whereas these rates are  $2\text{-}3 \text{ mg N-NO}_x\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  on average when P was not limited, revealing that competition for phosphorus between AOB and microalgae favors microalgae, as suggested by Risgaard-Petersen et al. (2004).

In addition to the impact of P on nitrification, our results also reveal an effect of microalgae growth. When plotting the nitrification rate (NO<sub>x</sub>PR) as a function of the nitrogen assimilation rate (NAR) in non-phosphorus-limiting experiments, the NO<sub>x</sub>PR decreased linearly as follows:  $\text{NO}_x\text{PR} = 4.6 - 0.85 \times \text{NAR}$  ( $R^2 = 0.73$ ), with NO<sub>x</sub>PR and NAR in  $\text{mgN.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ . The nitrification rate dropped from  $5 \text{ mg N-NO}_x\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ , when assimilation and consequently microalgae growth was limited, to less than  $1 \text{ mg N-NO}_x\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  when N assimilation reached  $4\text{-}5 \text{ mg N-NH}_4^+\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ . The apparent antagonism between microalgae and nitrifying bacteria thus appears to favor microalgae. The nature of the antagonism is uncertain, but as only non-phosphorus-limiting experiments were considered and initial micronutrients were available in sufficient quantity, the competitive exclusion of N or P, as suggested by Risgaard-Petersen et al. (2004), cannot be assumed. Choi et al. (2010) also observed nitrification reduction and hypothesized that it could be due to competition for a carbon source. Nevertheless, the true mechanisms still need to be demonstrated.

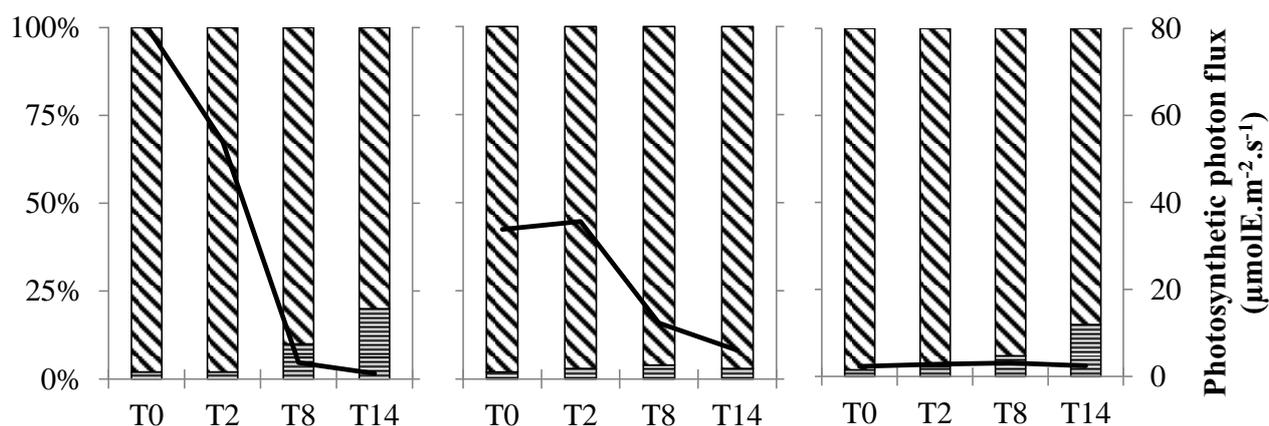
### 3.5. Evolution of communities of microalgae

Initial microalgae populations were mainly composed of *Scenedesmus sp.* (98%) and, to a lesser extent, of *Chlorella sp.* (2%). During the experiments, following the protocol of Nübel *et al.* (1997), no cyanobacteria were found. Each *Chlorophyceae* CE-SSCP profile obtained during the 14-day batch growth showed a series of peaks. By using BLAST, the amplified sequences of the clones that co-migrated with peaks at the beginning of the profiles showed 98-100% homology with a sequence of *Chlorella sp.* (GenBank: KC492074.1). The clones that co-migrated with peaks at the end of the profiles showed 97%-99% homology with sequences of two genera: *Scenedesmus sp.* (GenBank: JQ315579.1) and *Desmodesmus sp.* (GenBank: AB818541.1). Although the genus status has been given to *Desmodesmus*, based on 18S and ITS2 rDNA phylogenies (Kessler *et al.* 1997; An *et al.* 1999; van Hannen *et al.* 2002), *Desmodesmus* is closely related to *Scenedesmus* and has been considered as a subgenus of *Scenedesmus* (Vanormelingen *et al.* 2007). Therefore, the peaks identified as *Desmodesmus* and *Scenedesmus* were considered to be part of the *Scenedesmus* genus.

**A**

**B**

**C**



**Figure 42 : Changes in microalgae communities under different light availability levels. Favorable (A), intermediate (B) and unfavorable (C) light conditions for microalgae were chosen as part of the experimental design. Genera identified were *Scenedesmus* sp. (diagonal lines) and *Chlorella* sp. (horizontal lines). The solid line represents the light measured 4.8 cm from the surface of the culture vessel. T0, T2, T8 and T14 respectively represent the initial, 2nd, 8th and 14th day of the experiment.**

Figure 42 shows changes in the microalgae population analyzed from the CE-SSP profiles under three different light levels. Conditions A, B and C correspond respectively to favorable, intermediate and unfavorable conditions for microalgae growth. In all three cases, the proportion of the two genera was constant between initial time and T2. The relative proportion of *Chlorella* increased from T8 in both favorable and unfavorable conditions whereas in the intermediate condition, it remained almost constant. This led to the hypothesis that *Chlorella* appears when the light is scarce. Indeed, in case C, available light was low both due to the low light provided and to high optical density, resulting in an advantage for *Chlorella* over *Scenedesmus*. In case A, initial available light was high, favoring strong microalgae growth leading to self-shading. In cases A and C, the photosynthetic photon flux measured 2.3 and 4.8 cm from the surface from day 8 to day 14 were lower than in case B. Our hypothesis is in agreement with that of Huisman *et al.* (1999) who found that *Scenedesmus* had a higher critical light intensity than *Chlorella*, inferring that *Chlorella* would be a better light competitor than *Scenedesmus*. These results therefore suggest that it would be a difficult task to maintain *Scenedesmus* in full size reactors if the light supply is not efficient (dead zones, high microalgae concentration, colored media, etc.).

#### 4. Conclusion

The color of the digestate varied greatly between the facilities probably due to the characteristics of the AD inputs. However, temporal variability at each AD site was relatively low. Additionally, the results we obtained revealed a positive impact of the light provided and a negative impact of color on microalgae growth and associated removal of N. These results could be used to

define a design according to light/O.D. parameters. The light provided had the same impact on microalgae growth and nutrient removal as did optical density. The data obtained highlight the tight relationship between nitrifying bacteria and microalgae, the latter limiting the growth of AOB. Moreover, *Chlorella sp.* proved to be a better competitor for light than *Scenedesmus sp.*

### Acknowledgements:

This research was partially funded by the Regional Council of Brittany and the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME).

### References:

- An, S. S., T. Friedl and E. Hegewald, 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biology*. 1(4), 418-428.
- Azov, Y. and J. C. Goldman, 1982. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(4), 735-739.
- Bartosh, Y. and C. J. Banks (2007). Algal growth response and survival in a range of light and temperature conditions: Implications for non-steady-state conditions in waste stabilisation ponds. **55**: 211-218.
- Becker, E. W., 1994. *Microalgae : biotechnology and microbiology*. C. U. Press. Cambridge, 293.
- Bjornsson, W. J., R. W. Nicol, K. E. Dickinson and P. J. McGinn, 2013. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. *Journal of Applied Phycology*. 1-6.
- Choi, O., A. Das, C. P. Yu and Z. Hu, 2010. Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and cyanobacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 107(6), 1004-1011.
- Daumer, M. L., F. Beline and M. Sperandio, 2004. The effect of phytase in pig diet and solid/liquid separation of pig slurry on phosphorus, calcium, and magnesium fractionation. *Transactions of the Asae*. 47(4), 1247-1253.
- de Godos, I., S. Blanco, P. A. García-Encina, E. Becares and R. Muñoz, 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*. 100(19), 4332-4339.
- de la Noüe, J. and A. Bassères, 1989. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biological Wastes*. 29(1), 17-31.
- Dickinson, K. E., C. G. Whitney and P. J. McGinn, 2013. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus sp.* *AMDD. Algal Research*. 2(2), 127-134.
- Fallowfield, H. J. and M. K. Garrett, 1985. The photosynthetic treatment of pig slurry in temperate climatic conditions: A pilot-plant study. *Agricultural Wastes*. 12(2), 111-136.
- Gonzalez-Fernandez, C., B. Riano-Irazabal, B. Molinuevo-Salces, S. Blanco and M. C. Garcia-Gonzalez, 2011. Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae-bacteria consortia when treating swine slurry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(3), 1147-1153.
- Huisman, J., R. R. Jonker, C. Zonneveld and F. J. Weissing, 1999. Competition for light between phytoplankton species: Experimental tests of mechanistic theory. *Ecology*. 80(1), 211-222.

- Jongbloed, A. W. and N. P. Lenis, 1998. Environmental concerns about animal manure. *Journal of Animal Science*. 76(10), 2641.
- Kessler, E., M. Schafer, C. Hummer, A. Kloboucek and V. A. R. Huss, 1997. Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Botanica Acta*. 110(3), 244-250.
- Kotai, J., 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. NIVA. B-11(69).
- Lens, P., G. Zeeman and G. Lettinga, 2001. Decentralised Sanitation and Reuse: Concepts, Systems and Implementation. I. E. T. Series. IWA Publishing.
- Levine, R. B., M. S. Costanza-Robinson and G. A. Spatafora, 2011. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy*. 35(1), 40-49.
- Massé, D. I., G. Talbot and Y. Gilbert, 2011. On farm biogas production: A method to reduce GHG emissions and develop more sustainable livestock operations. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167(0), 436-445.
- Molinuevo-Salces, B., M. C. García-González and C. González-Fernández, 2010. Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresource Technology*. 101(14), 5144-5149.
- Mulbry, W., E. K. Westhead, C. Pizarro and L. Sikora, 2005. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology*. 96(4), 451-458.
- Nubel, U., F. GarciaPichel and G. Muyzer, 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8), 3327-3332.
- Olguín, E. J., S. Galicia, G. Mercado and T. Pérez, 2003. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*. 15(2-3), 249-257.
- Park, J., H.-F. Jin, B.-R. Lim, K.-Y. Park and K. Lee, 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101(22), 8649-8657.
- Park, K. Y., B. R. Lim and K. Lee, 2009. Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*. 59(11), 2111-2116.
- Patel, A., S. Barrington and M. Lefsrud, 2012. Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms. *Global Change Biology Bioenergy*. 4(5), 1757-1707.
- Portejoie, S., J. Martinez, F. Guiziou and C. M. Coste, 2003. Effect of covering pig slurry stores on the ammonia emission processes. *Bioresource Technology*. 87(3), 199-207.
- Risgaard-Petersen, N., M. H. Nicolaisen, N. P. Revsbech and B. A. Lomstein, 2004. Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(9), 5528-5537.
- Sevrin-Reyssac, J., 1998. Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable biomasses. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 68(3), 177-186.
- Sevrin-Reyssac, P. J., R. Blier, A. Dumas and Y. Ouelette, 1996. Intensive microalgae cultures integrated in an experimental lagooning recycling swine manure. *Annee Biologique*. 35(1), 41-68.
- Staub, R., 1961. Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an *Oscillatoria tubescens* D.C. Schweiz. Z. Hydrol. 23, 82-198.
- Tam, N. and Y. Wong, 1994. Feasibility of using *Chlorella pyrenoidosa* in the removal of inorganic nutrients from primary settled sewage. *Algal biotechnology in the Asia-Pacific region*. University of Malaya. 291-9.

- Valiente Moro, C., O. Crouzet, S. Rasconi, A. Thouvenot, G. Coffe, I. Batisson and J. Bohatier, 2009. New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(17), 5729-5733.
- van Hannen, E. J., P. Fink and M. Lurling, 2002. A revised secondary structure model for the internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its implication for the phylogeny of these algae. *European Journal of Phycology*. 37(2), 203-208.
- Vanormelingen, P., E. Hegewald, A. Braband, M. Kitschke, T. Friedl, K. Sabbe and W. Vyverman, 2007. The systematics of a small spineless *desmodesmus* species, *D. Costato-Granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 r DNA sequence analyses and cell wall morphology. *Journal of Phycology*. 43(2), 378-396.
- Wu, J. F. and W. G. Pond, 1981. Amino acid composition and microbial contamination of *Spirulina maxima*, a blue-green alga, grown on the effluent of different fermented animal wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 27(1), 151-159.

### **Sous-chapitre 3. 3. Modélisation de la limitation de la lumière**

L'étude de la couleur a été effectuée dans le sous-chapitre précédent en batch et sur de petits volumes de réacteurs. Les résultats obtenus montrent bien l'importance de la pénétration de la lumière, mais il reste difficile avec ces seuls résultats de les transposer à un procédé continu (ou semi-continu) en grandeur réelle avec une configuration différente. Dans cet objectif, la modélisation biocinétique est un outil adapté et a donc été développée à partir des résultats précédents afin de pouvoir mieux quantifier les cinétiques et les impacts et les transposer à d'autres conditions plus proches des conditions réelles.

La modélisation biocinétique couplée avec les interactions « quantité de lumière » et « couleur de l'influent » a été réalisée dans ce travail de thèse afin d'approcher les phénomènes biologiques et physico-chimiques et être capable d'estimer la croissance des algues et l'élimination des nutriments dans des conditions différentes de celles des expérimentations réalisées. Cette approche numérique reste partielle et nécessiterait des investigations et des validations plus poussées mais permettra toutefois de réaliser des investigations préliminaires sur le procédé envisagé.

#### **1. Les modèles de croissance algale**

Plusieurs modèles biocinétiques peuvent être utilisés pour représenter la croissance en fonction de l'intensité lumineuse considérée comme un substrat tels que Monod (1941), Ramesh (1997), Moser (1958). Le choix a été porté sur des modèles simples. En revanche, l'atténuation de la lumière par les microalgues (self-shading) et la couleur de l'effluent compliquent le calcul de l'intensité lumineuse disponible. Un modèle biocinétique intégrant ces deux variables a été défini à l'aide des résultats présentés ci-dessus.

Les deux modèles choisis, afin d'être comparés, pour représenter la limitation de la croissance des microalgues par la lumière disponible sont les modèles de Monod et de Contois (Pavé 1994). Le modèle de Monod représente une limitation directe par le substrat tandis que le modèle de Contois prend en compte la concentration en biomasse dans le phénomène de limitation.

Afin de comparer ces deux modèles par rapport à nos données expérimentales, ces deux modèles ont été résolus par équation différentielle en fonction de la lumière disponible.

<p>Monod</p> $\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \cdot \frac{S}{K+S}$	<p>Contois</p> $\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \cdot \frac{S}{K' \cdot X + S}$
---	--

X = biomasse algale (cellules.mL<sup>-1</sup>)

S = flux de photons photosynthétiques (μmolE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

μ<sub>max</sub> = taux de croissance spécifique (j)

K = constante de demi-saturation de Monod (μmolE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

K' = constante équivalente dans le modèle de Contois (μmolE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

## 2. Substrat lumière

La lumière disponible moyenne a été choisie comme substrat limitant pour la croissance des microalgues. Le flux de photons photosynthétiques accessible aux microalgues (Lum) dépend de deux variables : le flux de photons fourni par la lumière à la surface du réacteur (PPF) et l'atténuation de la lumière par le milieu traversé (Jb). Cette atténuation peut être décomposée en atténuation due à la coloration de l'influent et en atténuation due à la présence d'algues (self-shading). Ainsi, afin de prendre en compte ces trois paramètres au cours de nos expérimentations, la lumière disponible a été calculée à partir du flux de photons à la surface des réacteurs (fixe pour chaque expérience), de l'atténuation du flux par la coloration de l'influent représenté par la densité optique initiale du milieu et de l'atténuation du flux par les microalgues fonction de la concentration en microalgues qui varie au cours du temps.

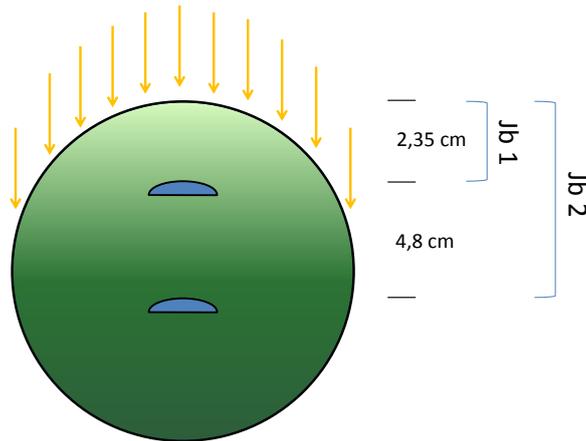
### 2.1. Détermination du coefficient d'atténuation

Le flux de photon à la surface du réacteur a été mesuré à l'aide d'une sonde LP471PAR C2ai, pour chaque expérimentation, sur la face intérieure dans le réacteur vide. De plus, le flux de photons a été mesuré à 2,35 et 4,80 cm de la face avant. La configuration des mesures est représentée Figure 43. Pour calculer le coefficient d'atténuation linéaire, nous avons utilisé la relation simple de Beer-Lambert en considérant que la diffusion de la lumière est faible dans ce milieu coloré et que le coefficient calculé s'applique à toutes les longueurs d'onde du visible et donc globalement au flux de photons photosynthétiques, au regard des précisions de mesure.

$$\text{Flux}_{\text{sortant}} = \text{Flux}_{\text{incident}} \times \exp(-Jb \times L)$$

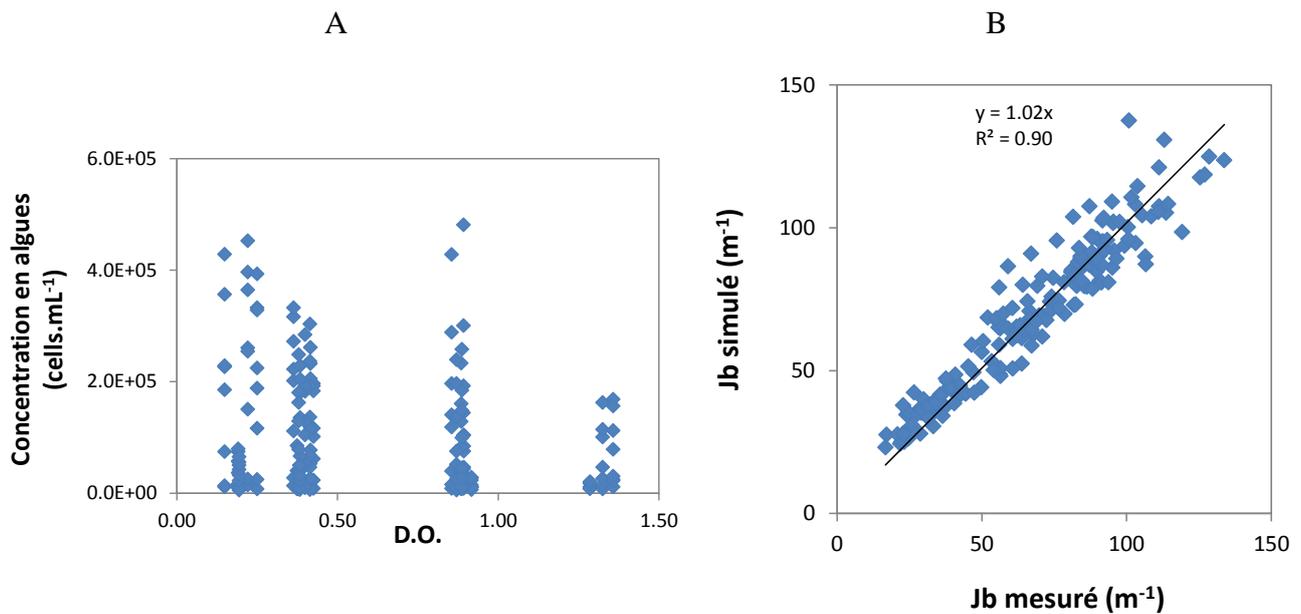
Avec les flux en  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , le coefficient d'atténuation du milieu traversé ( $J_b$ ) en  $\text{m}^{-1}$  et la distance traversée,  $L$ , en m.

Les mesures du flux en surface et des flux dans le liquide à 2 distances différentes ont ainsi permis de calculer un coefficient  $J_b$  moyen à l'aide des 2 valeurs calculées ( $J_b 1$  et  $J_b 2$ ).



**Figure 43 : Schéma de la mesure du flux de photon à l'intérieur des réacteurs**

Les gammes de densité optique (680 nm) et de concentration en algues utilisées pour définir le coefficient d'atténuation se situent de 0,149 à 1,358 et de  $5.10^3$  à  $5.10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> respectivement. La Figure 44.A permet d'apprécier la dispersion de la densité optique et de la concentration en algues, variables utilisées pour calculer le coefficient d'atténuation.



**Figure 44 : Couples de concentration en microalgues et densité optique du milieu utilisés pour le calcul du coefficient d'atténuation (A) ; Représentation graphique du coefficient d'atténuation simulé en fonction du coefficient d'atténuation calculé d'après les mesures (B).**

Dans l'objectif de modéliser la croissance des microalgues et l'épuration associée, il a été nécessaire de modéliser le coefficient d'atténuation linéaire de la lumière ( $J_b$ ). Pour cela, nous avons utilisé toutes les données des expérimentations présentées dans le sous-chapitre précédent afin de relier à partir d'une équation empirique ce coefficient  $J_b$  aux 2 principaux paramètres l'influençant : la concentration en microalgues, mesurée tous les deux jours au cours des expérimentations et la couleur de l'influent, considérée dans ce travail comme la densité optique initiale du milieu à 680 nm, également mesurée pour chaque expérimentation. La formule empirique utilisée pour estimer le coefficient d'atténuation linéaire est la suivante :

$$J_b = g + h \times [\text{microalgues}] + i \times \text{D.O.};$$

$$g = 12.789 \text{ m}^{-1};$$

$$h = 0.000196202 \text{ mL.cells}^{-1}.\text{m}^{-1};$$

$$i = 54.7014 \text{ m}^{-1};$$

avec  $J_b$  en  $\text{m}^{-1}$ , [microalgues] en  $\text{cells.mL}^{-1}$  et D.O. mesurée à 680 nm.

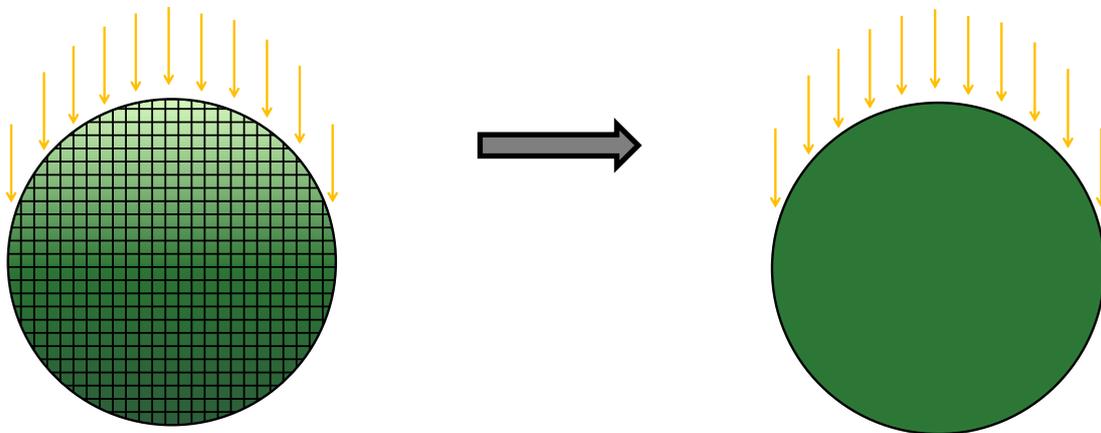
Le coefficient  $h$  est amené à évoluer suivant les types de microalgues utilisées. Pour des microalgues plus grosses, il est évident que ce coefficient sera plus élevé.

La Figure 44.B représente les coefficients d'atténuations simulés en fonction des coefficients d'atténuation calculés à partir des mesures de lumière. On observe une bonne proportionnalité et une assez bonne corrélation ( $R^2 = 0,90$ ) indiquant une bonne approximation du phénomène physique.

## 2.2. Calcul de la lumière disponible

La méthode ensuite utilisée pour calculer la croissance en fonction de la lumière disponible a consisté à calculer un flux de photons moyen reçu sur la section des réacteurs en fonction du coefficient d'atténuation et du PPF en surface puis à calculer la croissance. La section des réacteurs (en 2D) a été virtuellement découpée en petits carrés unitaires, puis le flux de photon reçu pour chacun de ces morceaux a été calculé, à l'aide de la loi de Beer-Lambert (Figure 45). Ensuite, pour calculer le flux de photons disponible dans nos réacteurs afin de calculer la croissance, nous avons intégré le flux reçu sur la section avec la méthode d'Euler dans Matlab, l'intégration directe n'étant pas possible. Le pas choisi est égal à  $10^{-2}$  mm, il a été réduit jusqu'à ce que la valeur de lumière moyenne calculée ne change plus.

Cette méthode a été choisie par souci de simplicité. Il aurait été possible de calculer une croissance pour chacun des carrés, recevant une lumière différente, puis d'homogénéiser les concentrations simulées. La simulation aurait alors été singulièrement compliquée par rapport à la méthode choisie.



**Figure 45 : Représentation de la méthode de calcul de la variable Lum, utilisée comme substrat des microalgues dans le modèle. La partie gauche montre le découpage de la section du réacteur et après le calcul selon la méthode d'Euler avec la relation de Beer-Lambert et le calcul de la moyenne, la partie droite représentée avec la seule variable Light pour toute la surface.**

Enfin, après obtention du flux de photons simulé (Light), il a été mis en relation avec le coefficient d'atténuation linéaire à l'aide d'un polynôme du 5<sup>ème</sup> degré. Les coefficients a à f servent à mettre en relation les variable Light et Jb, mais n'ont pas de signification physique ou biologique directe.

$$\text{Light} = \text{PPF} \cdot (a - b \times \text{Jb} + c \times \text{Jb}^2 - d \times \text{Jb}^3 + e \times \text{Jb}^4 - f \times \text{Jb}^5);$$

$$a = 0,902623;$$

$$b = 0,02971 \text{ m}^{-1};$$

$$c = 0,0005421 \text{ m}^{-2};$$

$$d = 0,00000557133 \text{ m}^{-3};$$

$$e = 0,0000000299771 \text{ m}^{-4};$$

$$f = 0,0000000000653467 \text{ m}^{-5};$$

Avec PPF et Light en  $\mu\text{molE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  et Jb en  $\text{m}^{-1}$ .

La valeur de Light calculée avec ce polynôme rapportée à la lumière fournie (PPF) est représentée en fonction du coefficient d'atténuation linéaire (Jb) sur la Figure 46. Le polynôme représente assez fidèlement les valeurs de Light déterminées par le calcul.

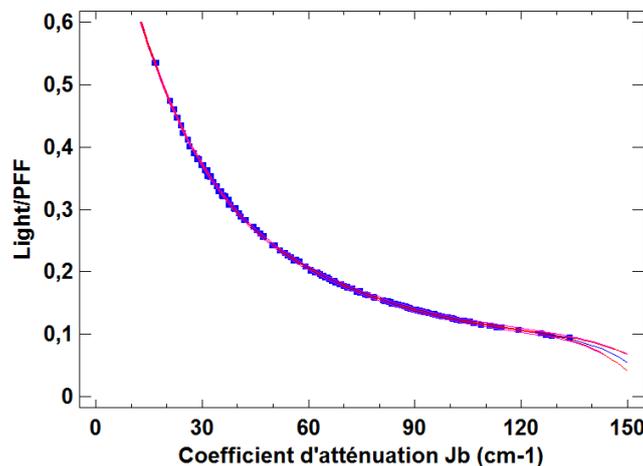


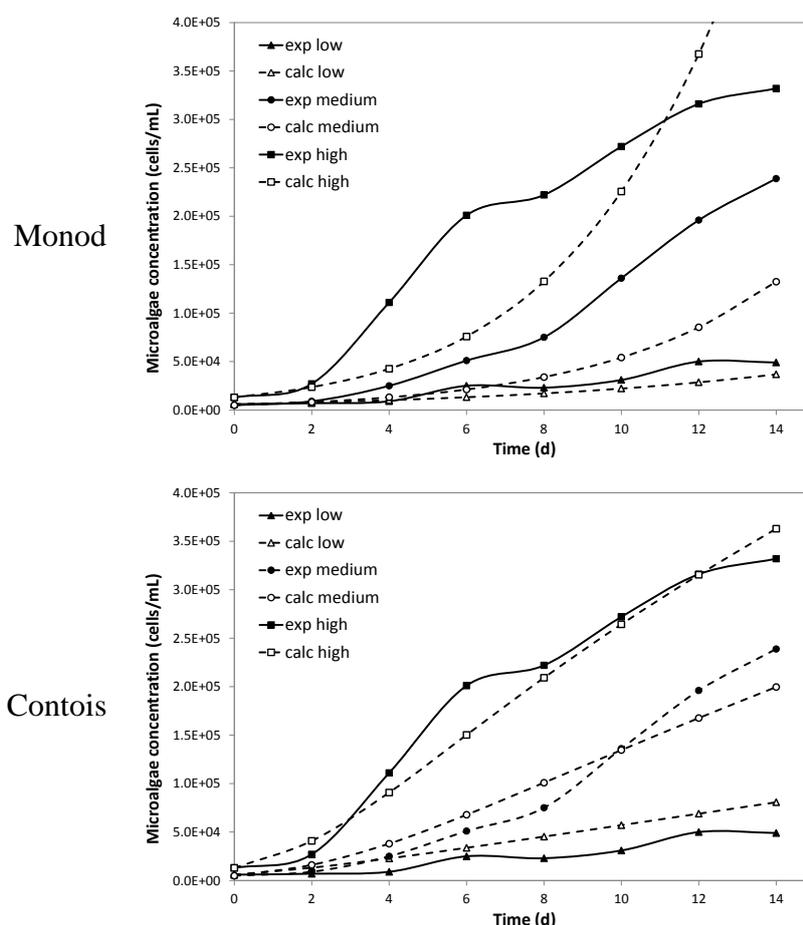
Figure 46 : Flux moyens calculés avec Euler (Light ; carrés bleus) rapportés à la lumière fournie (PPF) et les lignes bleu et roses représentent respectivement la régression polynomiale et les limites de confiance à 95 %.

### 3. Comparaison des modèles (Contois/Monod)

A partir de ces équations empiriques, d'une part liées à la configuration de nos réacteurs et d'autre part déterminée à partir des mesures de flux de photons photosynthétiques, et des modèles biocinétiques existants, nous avons comparé les résultats expérimentaux obtenus en termes de croissance de microalgues aux 2 modèles identifiés : Monod et Contois. Pour cela, nous avons réalisé une calibration (en anglais, data fitting) à l'aide de Scilab 5.3.3 en utilisant un algorithme de recherche (4 p 111). Les deux paramètres à ajuster étaient le taux de croissance,  $\mu$ , et K ou K', la constante de demi-saturation pour la lumière (Monod) et son équivalent dans le modèle de Contois. L'intégralité des données issues des expériences et les données simulées ont permis de calculer des résidus avec la méthode des moindres carrés qui a été utilisée comme fonction de coût dans la

fonction de minimisation. Les paramètres utilisés pour calculer  $J_b$  et  $L_{um}$ , appelés de a à h, ayant été déterminés à partir des données expérimentales n'ont pas fait l'objet du calage. Le terme « b » représentant classiquement le terme cinétique pour le décès de la biomasse étant fortement corrélé au taux de croissance,  $\mu$ , il a été impossible de déterminer la mort des microalgues avec l'aide de ces expérimentations.

La Figure 47 représente 3 cas de croissances différents correspondant à une forte lumière dans un milieu clair (high), une faible lumière dans un milieu coloré (low) et un cas intermédiaire (medium). Le calage a été réalisé sur la totalité des expériences présentées dans le sous-chapitre précédent, mais seulement 3 cas ayant un comportement différent ont été représentés afin de faciliter la lecture.



**Figure 47 : Exemples de calage sur la concentration en microalgues avec les modèles de Monod et de Contois. High, low et medium correspondent respectivement à une forte lumière en milieu clair, une faible lumière en milieu coloré et un cas intermédiaire.**

Les moindres carrés calculés sur la concentration en microalgues obtenus avec le modèle de Monod sont environ deux fois plus élevés ( $8,55 \times 10^{11}$ ) que ceux du modèle de Contois ( $4,79 \times 10^{11}$ )

sur l'ensemble des expériences présentées ci-dessus. Le modèle de Contois représente de façon assez précise la croissance des microalgues en fonction de la lumière disponible pour les 3 cas. Le modèle de Monod, à l'inverse, ne semble pas capable de représenter correctement la croissance algale.

Le modèle de Contois est capable de représenter une croissance alors que le point d'inflexion est inférieur à  $K/2$ . Cette particularité permet ainsi de représenter une grande quantité de comportements (Pavé 1994). Ici, le terme  $K'.X$  peut être interprété par le fait que plus il y a de microalgues, plus il est difficile pour chacune d'accéder à la lumière.

La matrice de Petersen représentant la limitation de la croissance par la lumière avec le modèle de Contois peut donc être représentée comme dans le Tableau 28.

**Tableau 28 : Matrice de Petersen du modèle prenant en compte la lumière et le stockage du phosphore**

		X_A	S_N	Light	Process rate
1	Microalgae growth	1	$-i_{N,X_A}$		$= \mu_{max} \cdot \frac{Light}{Light + K'.X_A} \cdot X_A$
2	Death	$-1$			$= -b \cdot X_A$

Les variables  $X_A$ ,  $S_N$  et  $Light$  représentent respectivement la biomasse algale, la concentration en azote et la lumière moyenne. Le paramètre  $i_{N,X_A}$  représente la teneur en azote de la biomasse.

La calibration des deux paramètres a été réalisée sur la concentration en microalgues et sur la concentration en azote (Tableau 29). En comparant les paramètres calculés, le taux de croissance spécifique est équivalent pour les deux calages alors que le coefficient de saturation change fortement en fonction de la référence sur la calibration. La somme des moindres carrés, représentant l'écart entre la simulation et le modèle, est impossible à comparer directement entre le calage sur la concentration en microalgues et celui sur la concentration en azote car ces valeurs sont non normalisées. Puisque la mesure de la concentration en azote avec la chromatographie ionique est plus précise que le comptage manuel, le calage sur la concentration en azote a été préféré.

**Tableau 29 : Paramètres cinétiques obtenus à partir de la calibration sur la concentration en microalgues et sur la concentration en azote.**

	Calibré sur la concentration en microalgues	Calibré sur la concentration en azote
$\mu_{max} (j^{-1})$	0,732	0,742

$K' (\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{cell}^{-1})$	$8,43 \times 10^{-4}$	$5,04 \times 10^{-4}$
---	-----------------------	-----------------------

Bien que le modèle de Contois semble mieux adapté pour représenter les données expérimentales, sa précision n'est pas parfaite. En comparant les données expérimentales et calculées de l'azote à l'aide d'une boîte à moustache (Figure 48), la dispersion des données reste élevée entre -34 et +22 %. Cela peut partiellement être expliqué par la variabilité expérimentale. De plus, le coefficient utilisé pour calculer l'assimilation de l'azote à partir de la concentration en algues est soumis à l'incertitude du comptage manuel. Néanmoins, la majeure partie des données simulées est proche des données expérimentales avec des premier et troisième quartiles respectivement égaux à -3 et +6 %.

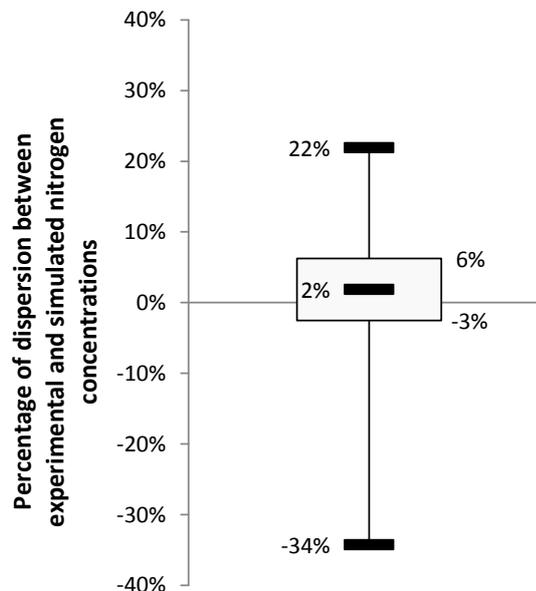


Figure 48 : Boîte à moustaches des comparaisons entre les valeurs expérimentales et calculées de la concentration en azote avec le modèle de Contois (162 valeurs)

En conclusion, un modèle a été développé et calé afin de prendre en compte l'effet lumière et son atténuation liée à la coloration du milieu et à la présence de microalgues, schématisés Figure 49. Ce modèle ne prend cependant pas en compte un certain nombre de facteurs, tels la diffusion de la lumière, la mort de microalgues et les limitations éventuelles par les nutriments. Bien que ce modèle soit perfectible, il a permis de simuler les données expérimentales correctement. Ce modèle calé peut donc être utilisé pour des études plus larges nécessitant seulement le flux de photons, la concentration en microalgues et la D.O. du milieu, le calcul spécifique de la variable Light en fonction de  $J_b$  pouvant être déterminé par la même méthode sur différents types de réacteurs. A

partir de cela, il est possible de simuler la croissance des microalgues et l'épuration azotée associée dans différentes configurations.

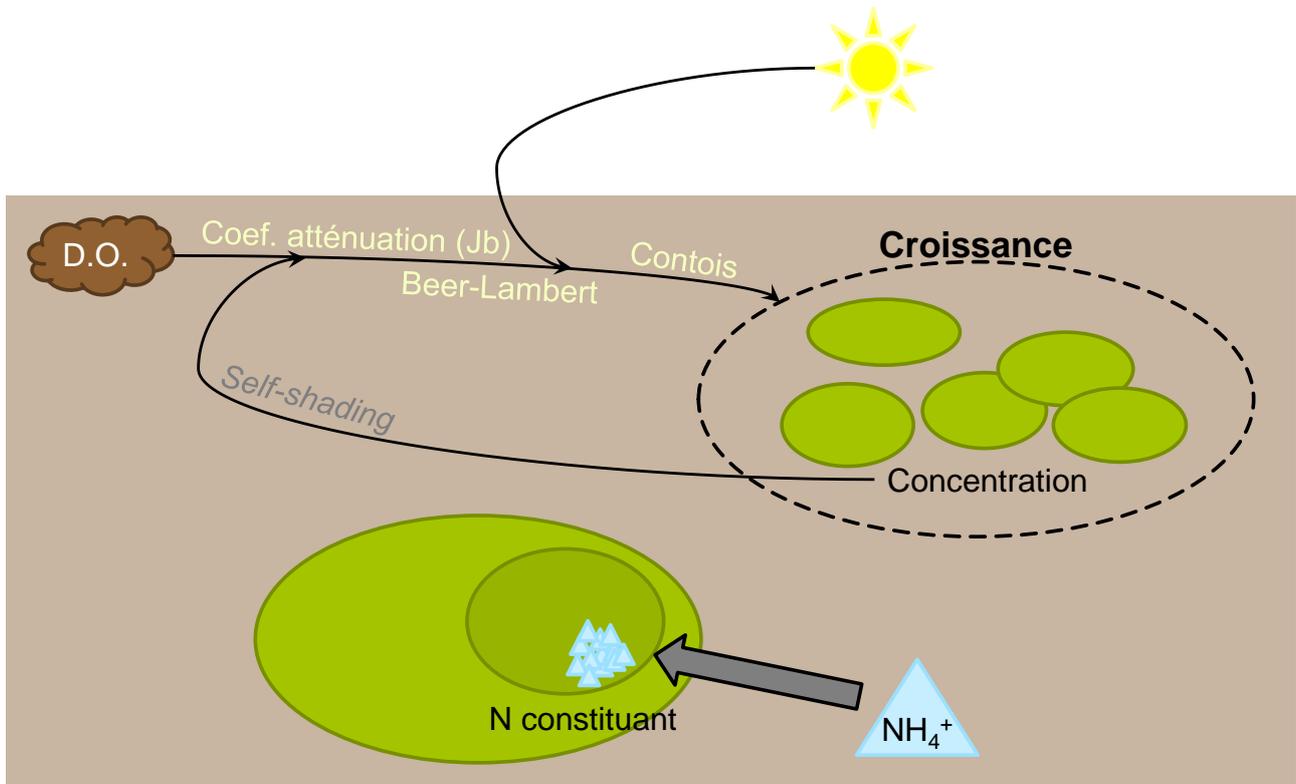


Figure 49 : Représentation du modèle de croissance de microalgues dans un milieu coloré, intégrant l'influence de la lumière

Toutefois, ce modèle ne prend pas en compte d'autres processus tels que la nitrification (et potentiellement la dénitrification) qui a été mise en évidence dans le sous-chapitre précédent et qui est en interaction avec la croissance algale. De même, ce modèle ne prend pas en compte d'autres limitations potentielles telles que celle due au phosphore, qui a déjà été observée et qui est probable au vu des ratios N:P des digestats, et du dioxyde de carbone. Ces points font l'objet d'études spécifiques et sont présentés dans les chapitres suivants.



**CHAPITRE 4. Etude et modélisation de l'influence de la concentration en phosphore et du ratio N/P sur la dynamique d'un écosystème microalgues/bactéries**

**Avant-propos :**

Ce chapitre est dédié à l'étude de l'influence du phosphore sur un écosystème microalgues/bactéries. A cause de nombreux équilibres physico-chimiques dans le méthaniseur, la teneur en phosphore des digestats peut être très variable et pourrait donc impacter le procédé permettant l'extraction des nutriments à l'aide d'algues.

Le premier sous-chapitre fait état des expériences menées pour étudier l'influence du ratio N :P sur cet écosystème. Il est présenté sous forme d'article, accepté à Bioresource Technology, avec le nom suivant : « Control of nitrogen behaviour by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate ». Le stockage du phosphore par les microalgues a notamment été mis en exergue.

L'aspect modélisation du stockage du phosphore est ensuite abordé dans le sous-chapitre 2. Les expérimentations réalisées dans la première partie de ce chapitre ont permis de caler un modèle de Droop capable de représenter la croissance sur le stock de phosphore interne lorsque le phosphore du milieu est épuisé. Le concept de l'avantage lié au phosphore des microalgues sur les bactéries nitrifiantes observé expérimentalement est ensuite simulé de manière théorique.

**Sous-chapitre 4. 1. Control of nitrogen behaviour by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate**

Cyril Marcilhac<sup>a,b</sup>, Bruno Sialve<sup>c</sup>, Anne-Marie Pourcher<sup>a,b</sup>, Christine Ziebal<sup>a</sup>, Nicolas Bernet<sup>c</sup>, Fabrice Béline<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Irstea, UR GERE, 17 av. de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France

<sup>b</sup> Université Européenne de Bretagne, F-35044 Rennes, France

<sup>c</sup> INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

\* Corresponding authors: e-mail: fabrice.beline@irstea.fr

Tel: +33223482121; Fax: +33223482115

RÉSUMÉ

La culture de microalgues avec le surnageant des digestats est un procédé prometteur pour la récupération des nutriments minéralisés en digestion anaérobie (P, N). Cependant, la variabilité de la concentration en phosphore dans l'affluent peut limiter ce procédé. L'impact de ratios N:P initiaux entre 3 et 76 gN.gP<sup>-1</sup> a été étudié et la croissance n'a pas montré de limitation sur les 14 jours de batch, même lorsque P était épuisé. L'assimilation de l'azote n'a pas été affectée par les concentrations en phosphore et a atteint 10,1 mgN.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> alors que l'élimination du phosphore a varié de 0,6 à 2,0 mgP.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Le ratio N:P de la biomasse s'est révélé être fonction du ratio N:P de l'affluent, le stockage du phosphore par les microalgues a ainsi pu être vérifié. Il a été montré que la nitrification était très dépendante de la concentration initiale en phosphore. L'évolution des communautés algales a aussi été suivie et a révélé l'avantage de *Scenedesmus* sur *Chlorella* lorsque le milieu était épuisé en P.

ABSTRACT

The cultivation of microalgae with digestate supernatant is a promising process for the recovery of mineralized nutrients (P, N) from anaerobic digestion. Nevertheless, the variability of phosphorus concentration in the influent could limit this process. The impact of initial N:P ratios between 3 and 76 gN.gP<sup>-1</sup> was studied and proved no growth limitation over 14-day batch experiments even when P was depleted. Nitrogen assimilation was not affected by phosphorus concentrations and reached 10.1 mgN.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> whereas phosphorus removal ranged from 0.6 to 2.0 mgP.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. The biomass N:P ratio was found to be a function of the influent N:P ratio. Phosphorus storage by microalgae was thus confirmed. Nitrification was found to be highly dependent on the initial phosphorus concentration. The evolution of microalgae communities was also monitored and revealed the advantage of *Scenedesmus* over *Chlorella* when the media was phosphorus-depleted.

*Keywords: phosphorus; microalgae; nitrification; digestate; community evolution*

## 1. Introduction

Anaerobic digestion of livestock waste converts organic matter into biogas allowing the production of renewable energy. This process, which is developing fast across Europe, is now well established in Germany. In France, about 115 units of anaerobic digestion were operative at the end of 2013, their development being higher for intensive livestock regions such as Brittany. Nevertheless in these areas, nitrogen and phosphorus release into the environment through landspreading of livestock manure leads to environmental problems such as eutrophication of close-by aquatic environments (Gitton and Hurvois 1999). Even if anaerobic digestion could allow to both increase renewable energy production and decrease greenhouse gas emissions, such a technology in itself, does not facilitate the management of nutrients contained in manure. Indeed, apart for carbon, nutrient contents of digestates are similar to raw manure while the mineralized nutrients and higher pH can favour ammonia volatilization. So, within intensive livestock areas, the large amount of mineralized nutrients (N, P) thus generated has to be treated and valorised. Phosphorus, in particular, is a non-renewable resource that is running out, while the quality of the remaining phosphorus rock is decreasing, leading to an increase in fertilizer production costs (Cordell *et al.* 2009). As for nitrogen, fertilizer production is highly energy-consuming. In some areas, effluent surplus leads to environmental problems. It is therefore appropriate to better recycle nitrogen from the effluents and to export this element where it is needed. Consequently, regarding resource depletion, energetic requirements or environmental impacts, nutrient recovery from livestock effluent appears to be a good alternative. Some processes are already being applied, like

reverse osmosis membrane filtration, ammonia stripping, struvite precipitation, and evapo-concentration but they involve large technical and economic constraints.

Other technologies requiring less energy and chemical additions may be a solution for nutrient recovery, in particular treatment and valorisation of N and P with microalgae (Bjornsson *et al.* 2013). Indeed, digestate can be an interesting culture medium for microalgae cultivation, as for higher plants. Besides, the productivity of microalgae is ten-fold higher than for conventional crops, leading to smaller cultivation surfaces (De Schamphelaire and Verstraete 2009). After liquid-solid separation, biomass containing assimilated nutrients can be exported out of areas with a structural surplus to be used as organic amendment and fertilizer (Mulbry *et al.* 2005), thus limiting the locally applied amounts and reducing N losses by ammonia volatilization.

This approach essentially consists in the assimilation of the major nutrients for metabolism during the growth of microalgae, although other mechanisms such as nitrification-denitrification can also be enhanced with the oxygen production. In fact, as the process cannot be operated easily in axenic conditions, a mixture of microalgae species along with bacteria is involved, leading to complex processes, particularly for nitrogen transformations.

It has been demonstrated that microalgae are able to adapt their internal N:P ratio to the medium ratio (Lundquist *et al.* 2011). However, nitrogen or phosphorus still can limit the recycling of the whole N and P pools. Indeed, most N:P ratios of anaerobic digestate from livestock waste vary from 3 to 30 g N-NH<sub>4</sub>.g P<sup>-1</sup> in literature (Cañizares-Villanueva *et al.* 1994; Park *et al.* 2009; Levine *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). The heterogeneity of N:P ratios in digestate is due to AD inputs for nitrogen and phosphorus, the anaerobic digestion process and its management but also, concerning phosphate, functions of separation processes and chemical properties of digestate during anaerobic digestion. The phosphorus solubility is strongly influenced by pH, since the chemical equilibrium favours PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> over HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> when pH rises, resulting in calcium or magnesium phosphate precipitation. Additionally, dissolved phosphorus can associate with suspended solids and other elements like iron (Möller and Müller 2012). Moreover, struvite crystals (NH<sub>4</sub>MgPO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O) can be formed with mineralized N, P and Mg when the pH reaches higher values (Capdevielle *et al.* 2013). Furthermore, in order to grow microalgae in a digestate, an initial liquid-solid separation is required to eliminate particles, further decreasing the total phosphorus content with the removal of solid organic and mineral P, thus reducing potential crystal solubilization or desorption. All these precipitation and adsorption mechanisms lead to a wide range of N:P ratios in liquid digestate.

The internal ratio of microalgae cells issued from general formulas varies between 5.0 and 7.2 g N.g P<sup>-1</sup> (Grobbelaar 2011; Watson *et al.* 2011). When comparing these values to digestate ratios, in most cases the quantity of phosphorus is insufficient in the digestate for enabling the removal of all the nitrogen. Hence, the aim of this study was to define the impact of the N:P ratio on microalgal growth and biochemical composition, algal diversity as well as nitrogen behaviour.

## 2. Materials and methods

To study the impact of the N:P ratio on microalgae growth and nutrient removal, batch experiments were carried out at laboratory scale under controlled conditions. Analysis of nitrogen and phosphorus in liquid and solid fractions led to the estimation of nutrient removal and assimilation by the biomass.

### 2.1. Inoculum

A complex phytoplanktonic ecosystem, called “inoculum” was used in the experiments. This inoculum comes from an urban wastewater treatment pond located in Meze (France). The microalgae populations mainly belong to the Chlorophyta taxon and are dominated by *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* However, other algae genera are present in small amounts, along with bacteria. The inoculum also contains cyanobacteria dominated by *Synechocystis sp.* Those two green algae have frequently been observed growing on manure and digestate (Sevrin-Reyssac *et al.* 1996; Molinuevo-Salces *et al.* 2010).

### 2.2. Experimental set up and methods

The impact of the N:P ratio was studied in batch under controlled conditions. The experiments were performed in triplicate for all conditions. The effluent was composed of diluted anaerobic digestate and minerals to control the initial composition. The digestate originated from a mesophylic farm anaerobic digester located in Orne (France). The different N:P ratios were set with a fixed nitrogen concentration and four levels of phosphorus concentration.

The experimental set up consists of six 2.5L tubular reactors. The temperature was maintained at 25 °C and agitation set at 230 rpm. Cultures were illuminated during daytime (12h/12h) with fluorescent bulbs at 240 µmolE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Pure carbon dioxide was added to control pH

between 6.95 and 7.05 and was also added every 45 min during the day to provide carbon in sufficient amounts (Marcilhac *et al.* 2014). To avoid acidification, which had been observed during preliminary tests when microalgae growth was limited, pH was adjusted by adding 1.25 mL of NaOH 1M every second day to each reactor. This made it possible to compensate for any differences due to night respiration and to supply a large but regulated amount of carbon dioxide.

The studied N:P ratios are 3, 9, 26 and 76 gN-NH<sub>4</sub>.gP-PO<sub>4</sub><sup>-1</sup>, corresponding to ratios frequently reported in the literature for digestate from livestock waste. They were respectively named HPC, IPC1, IPC2 and LPC for high, intermediate and low phosphorus content. As nitrogen is constant and equal to 190 mg N.L<sup>-1</sup>, the corresponding phosphorus concentrations are 67, 23, 8 and 3 mgP.L<sup>-1</sup>. The design of experiments includes 12 experiments; it was separated in two runs containing the triplicates of HPC and LPC, IPC1 and IPC 2.

The supernatant of centrifuged digestate was used at 0.67% v:v in the growth medium. The colour in the reactor at the beginning of the experiment was thus set at 0.51 on the basis of optical density at 680 nm (O.D.). The digestate used for these experiments was chosen for its high optical density in order to be able to control the nutrient concentration level. For this reason the digestate dilution was very high.

The composition of the growth medium was adapted from a “standard” 1/10 diluted digestate to obtain similar nutrient concentrations (except phosphorus) irrespective of the experimental conditions. Nutrients were equilibrated by adding salts based on the amount of digestate added. The characteristics of the digestate and the salts used are listed in Table 30.

**Table 30 : Initial composition of macronutrients of the growth media.**

Parameter	Salt	Concentration in medium
Cl <sup>-</sup> (mg Cl L <sup>-1</sup> )		1380 ± 50
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg S L <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.3 ± 0.5
K <sup>+</sup> (mg K L <sup>-1</sup> )	KCl	573 ± 11
Mg <sup>2+</sup> (mg Mg L <sup>-1</sup> )	MgCl <sub>2</sub>	62 ± 15
Ca <sup>2+</sup> (mg Ca L <sup>-1</sup> )	CaCl <sub>2</sub>	65 ± 4
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> Cl	190 ± 9

$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  was then added in solution to fulfil initial phosphate conditions. Other nutrients, which are not listed in Table 1, were added as Z8 media (Staub 1961; Kotai 1972; NIVA 1976), their ratio was calculated on a nitrogen basis. Z8 trace elements were added at a rate of 1% of the total volume of the influent.

Finally, for each run, the reactors were filled with inoculum (approximately 10% v:v to reach about  $5.8 \times 10^4$  microalgae. $\text{mL}^{-1}$ ), digestate and growth media supplemented with trace elements to reach the desired conditions, after which the light regime and pH regulation was activated. Each batch experiment lasted 14 days. Based on the methodology described above, all the parameters, except for the one to be monitored (i.e. N:P ratio), were considered to be the same for each run.

### 2.3. Analytical measurement

#### 2.3.1. Determination of biomass growth

To evaluate microalgae growth, cell numbers were measured every second day using a Unicam UV/Vis UV2 spectrometer. Microalgae cells were counted manually using a Neubauer cell counting chamber. The specific growth rate ( $\mu$ ) was calculated on the first four days (equation 1), corresponding to the exponential growth phase, using data from the Neubauer cell counting chamber. The optical density (O.D.) at 680 nm usually used to evaluate microalgae growth was also performed but not used in this case due to the colour of the digestate and any possible changes during the course of the experiment. However, O.D. data were used to exclude outlier data from cell counting on the basis of the correlation between the increase in OD680 and the number of cells. Data that were greater than  $\pm 20\%$  of this correlation were excluded.

$$\mu = \ln(C_4/C_0)/(t_4-t_0) \quad (1)$$

where  $C_4$  and  $C_0$  are the number of cells at time  $t_4$ , corresponding to the end of the exponential growth, and  $t_0$  respectively in cells. $\text{mL}^{-1}$ . The specific growth rate is expressed in  $\text{d}^{-1}$ .

Cultivable heterotrophic bacteria (UFC. $\text{mL}^{-1}$ ) were quantified in triplicate counts. In this view, samples were diluted in series in peptone water up to  $10^{-6}$ , then 100  $\mu\text{L}$  of the three last dilutions were spread on TSYE, nonselective medium. The boxes were then incubated at 30 ° C for 48 h.

#### 2.3.2. Solid analysis

At the end of the experiments (after 14 days), 900 mL from each reactor content was centrifuged and the total suspension solid (TSS) was quantified after drying at 105 °C during 2 days.

The carbon and nitrogen content of biomass was quantified with a Flash 2000 elemental analyser on a part of the dry suspended solids.

The remaining part of solid phase was used to quantify the phosphorus content. It was placed in a furnace at 550 °C during at least 4 hours. Ashes were then solubilized with 5mL of a mix of 0.75 sulfuric (98%) / 0.25 nitric (65%) acid along with 0.5 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Subsequently, the diluted and autoclaved solubilized phosphorus was quantified by a colorimetric method with ammonium molybdate reagent (30 g.L<sup>-1</sup>) on continuous flow, QuickChem FIA+ 8000 series.

### 2.3.3. Nutrient analysis in the liquid phase

During the course of each 14-day experiment, cations (Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) and anions (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were analysed every second day using a Metrohm 850 Professional IC.

Loss of gas phase nitrogen in the system (N<sub>2</sub> or NH<sub>3</sub>) was considered to be nil. Due to the amount of oxygen produced by the microalgae and the very low level of biodegradable carbon, denitrification was considered as negligible. In the same way, due to the pH level (around 7) and the low level of liquid/gas transfer, NH<sub>3</sub> stripping was also considered as negligible. A nitrogen mass balance covering all experiments confirmed both hypotheses (data not shown).

The nitrified nitrogen is calculated from the sum of nitrite and nitrate concentrations, representing the activity of ammonia oxidizing bacteria, and, for the same reason as above, no nitrogen was considered to be lost from the system.

Maximum nitrogen and phosphate assimilation rates were determined, based on ionic concentrations on a two-day interval at the end of the exponential growth of microalgae, when the biomass concentration was high and growth was not too limited, between days 6 and 10.

### 2.3.4. Community analysis

Nested PCRs were performed for Chlorophyceae-Eukaryotes and then for Eukaryotes-Eukaryotes as described in Marcilhac et al. (2014). The resulting PCR products were separated by SSCP capillary electrophoresis using an ABI 310 genetic analyser (Applied Biosystems) with a POP 5.58 % - Glycerol 10 % polymer (Applied Biosystem).

After verification, cloning was performed on two PCR products selected according to the CE-SSCP profiles (with the most numerous and highest peaks) of Chlorophyceae-Eukaryote. A total of 50 clones were further analysed: 25 from each selected sample. The clones were randomly selected, and their inserts were screened by nested PCR followed by CE-SSCP analysis. For inserts yielding a peak that co-migrated with distinguishable peaks from the samples, CE-SSCP profiles were sequenced for peak identification. All clones were sequenced. Sequence reactions were performed at the Ouest Genopole Sequencing Facility (CNRS, Roscoff, France) with primer T7. DNA sequences were identified by comparison with their closest relatives identified in databases using the *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* from the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the Ribosomal Database Project II (RDPII; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

SSCP results are expressed by representing the size of each identified genus as a proportion of the total size of the peaks identified.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Biomass production**

##### **3.1.1. Microalgae growth**

The four conditions resulted in the same growth kinetic ( $P < 0.05$ ; Student's t test) for the course of experiments as presented in Figure 50. The shape of the curves reveals an initial exponential growth followed by a growth slowdown and stagnation. The final maximum microalgae concentration reached is  $1.0 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup>. Nutrients are controlled in this study in order to avoid limitation (except for phosphorus) with micronutrient addition at the beginning and with monitoring of major ions. Statistically, no variability was observed between the different conditions, showing that no phosphorus limitation occurred during experiments. Therefore, the observed growth limitation at the end of experiments for all trials was assumed to be due to light limitation induced by the high microalgae concentration. Indeed the development of cells can reach such an extent that they shade one another, a mechanism called “self-shading”, which reduces the light availability for photosynthesis. During exponential growth, the specific growth rate  $\mu$  was equal to  $0.78 \text{ d}^{-1}$  for all ratios. Other authors found similar growth rates of either *Chlorella* or *Scenedesmus* in livestock manure between  $0.312$  and  $1.2 \text{ d}^{-1}$  (Travieso et al. 2004; Travieso et al. 2006; Kumar et al. 2010; Wang et al. 2012). Due to the initial color, the specific growth rate is less than those which can be

obtained from other studies on synthetic media and which can vary from 1 to 3 d<sup>-1</sup> (Garcia Sánchez et al. 1996; Kitaya et al. 2005; Sforza et al. 2012).

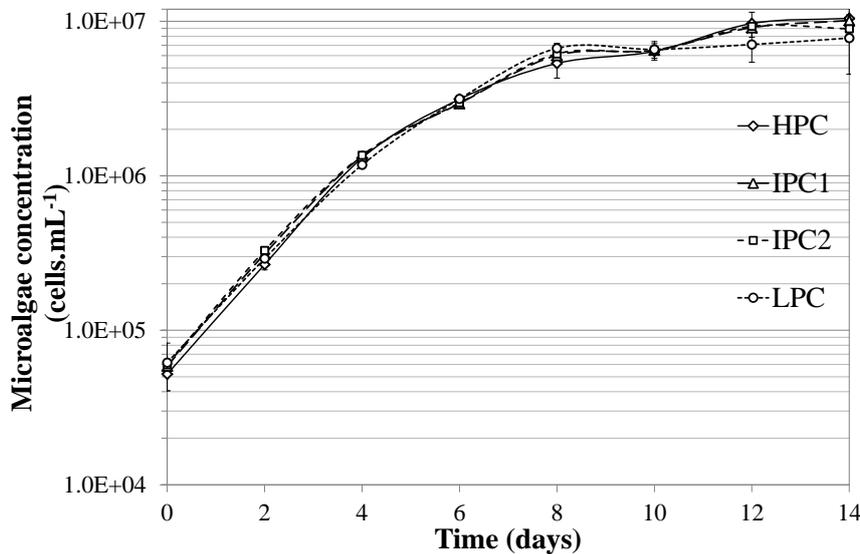


Figure 50 : Evolution of microalgae growth on 14-days for HPC, IPC1, IPC2 and LPC.

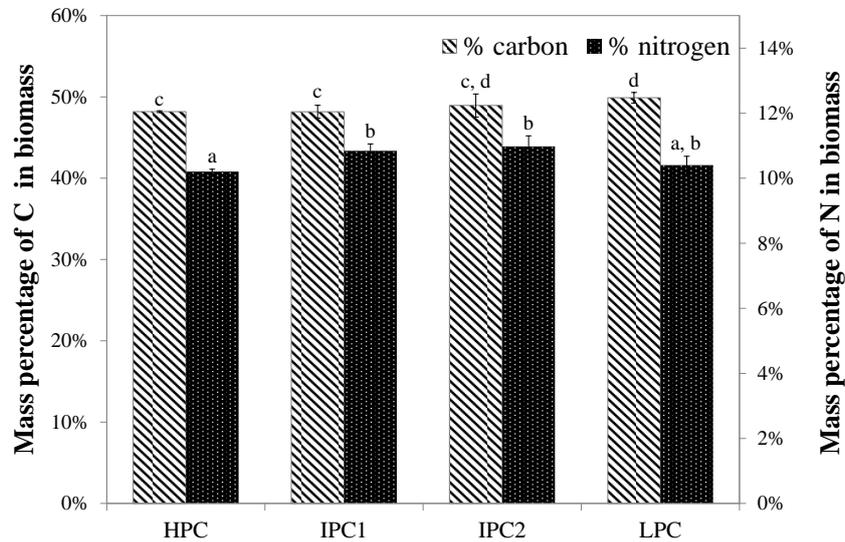
The increase of total suspended solids concentration during the experiments is due to biomass growth, including microalgae as well as bacteria. The produced biomass is found to be equivalent for the four conditions and reaches  $854 \pm 27$  mgTSS.L<sup>-1</sup>.

The concentration of heterotrophic cultivable bacteria, which have been chosen as an indicator of the active bacterial community, rises from an initial  $1.4 \times 10^5$  to about  $3.5 \times 10^6$  colony forming units per mL after two days and remains constant (data not shown). Consequently, as bacterial growth is the same and total produced biomass is equivalent, whatever the conditions, the mass of produced microalgae is assumed to be equivalent in all experiments. The average ratio of cell counting and TSS production is  $1.17 \times 10^7$  cells.gDW<sup>-1</sup>.

### 3.1.2. Biomass composition

Figure 51 represents the carbon and nitrogen contents of biomass for each initial phosphorus concentration, the biomass being composed of microalgae and bacteria. The percentage of C in TSS statistically increases ( $P < 0.05$ ; Student's t test) from 48.4 to 49.4% between HPC and LPC. However, the difference being minor, the overall carbon content is equal to  $48.8 \pm 0.8$  %. This value is in accordance with data reported by Hase *et al.* (2000) who found 46.9 % of carbon in *Chlorophyta sp.* grown in an open raceway. As suspended solids are equivalent from one condition

to another, the inorganic carbon sequestration in these experiments is equal to 417 mg C.L<sup>-1</sup> over the batch.



**Figure 51 : Carbon and nitrogen content of biomass at the end of the experiments. a, b, c and d represents statistically different values ( $P < 0.05$ ; Student's t test).**

N content of biomass is higher for intermediate P concentration IPC1 and IPC2 ( $P < 0.05$ ; Student's t test) with a maximum of 11.0 %, whereas the minimum is equal to 10.3 % for extreme values. This difference between the extremes of N content is small and would not significantly impact a process based on nutrient removal by microalgae or its design.

Contrary to C and N, the P content of the biomass and consequently the N:P ratio in biomass strongly varied between trials. Figure 52 represents the final N:P ratio in biomass according to the initial N:P ratio in medium. The more there is phosphorus in the medium, the higher the phosphorus content within cells. The internal N:P ratio of cells is related to the N:P ratio of the medium or at least to the phosphorus concentration. This observation concurs with Lundquist *et al.* (2011) who found a direct linear correlation. However, the relationship found by this author in the 2.5-60 gN.gP<sup>-1</sup> range is not the same (N:P in cell = 0.98 x N:P in medium – 2.79). For the two highest ratios in the present study, phosphorus was depleted at the end while P was never limiting in the Lundquist study, which partially explains for the differences. Moreover, these authors studied the growth of microalgae during semi-continuous feeding with a 3-day hydraulic retention time, the phosphorus concentration being less constant in batch in this study than in semi-continuous conditions. The biomass N:P ratio in the present study ranges from 10 to 30, which is quite high compared to general formulas in literature, between 5.0-7.2 g N.g P<sup>-1</sup> (Grobbelaar 2011; Watson *et*

*al.* 2011). This difference could be due to the fact that the microalgae in this study were in growth phase while the aforementioned formulas generally stated are associated to stabilised cultures. The N:P range found here is supported by results from Lundquist *et al.* (2011), who observed a range between 5 and 63 g N.g P<sup>-1</sup>.

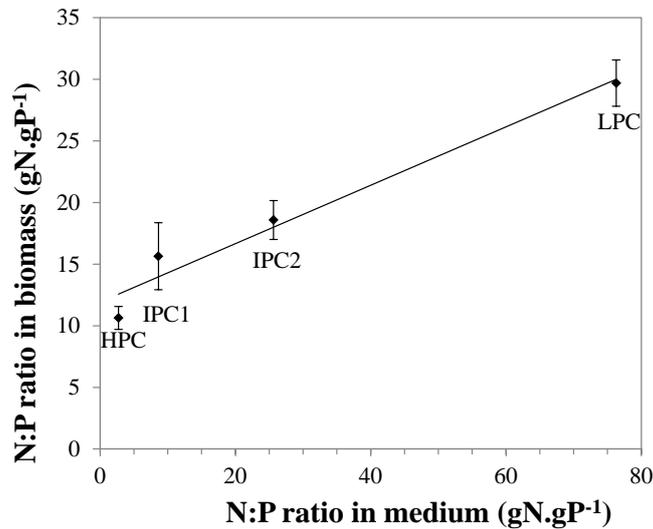


Figure 52 : N:P mass ratio in biomass function of N:P ratio in medium.

### 3.1.3. Evolution of microalgae communities

Figure 53 presents CE-SSCP profiles showing the evolution of microalgae communities, observed for the HPC and LPC extreme conditions between initial and final times. For the condition LPC at T14, the profile yielded two major peaks (C and S) highlighted on figure 4, which were identified as *Chlorella* (C) and *Scenedesmus* (S). Regardless of the condition, these two peaks were consistently preceded by smaller artifactual peaks (C\* and S\* on the profiles) which were also visible with purified clones (data not shown). The areas under the artifactual peaks were always proportional to those of *Chlorella* or *Scenedesmus* peaks to which they are linked. Small peaks on the right of the *Scenedesmus* peak were not identified by cloning but their proportion did not change, whatever the operating conditions of the reactors.

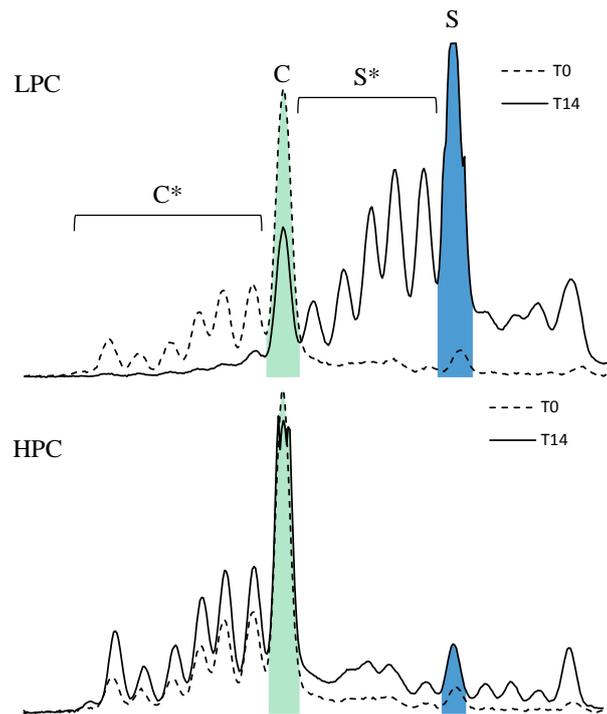


Figure 53 : CE-SSCP of microalgae communities for HPC and LPC, ■ represents *Chlorella* sp. (C) and ■ *Scenedesmus* sp. (S) and C\* & S\* their respective artefacts.

Consequently, considering only the two major peaks, the proportion of *Chlorella* (7 %) and *Scenedesmus* (93 %) was constant in HPC between days 0 and 14 when phosphorus was not limiting. On the contrary, *Scenedesmus* percentage increased and reached 70 % of the microalgae population when phosphorus was in limited quantity (LPC). The shift in the algal population may be explained by a lower capacity of *Chlorella* to uptake phosphorus under the experimental conditions. This is in agreement with Sommer (1986) who found a higher half-saturation constant of P-limited growth for *Chlorella* than for *Scenedesmus*. However, the phosphorus removal of these algae is still unclear as Mohapatra *et al.* (2002) observed that *Scenedesmus* was more P-limited than *Chlorella*.

It is important to note that the change in the proportion of the two species of algae has no or little effect on the quantity of biomass and on the nitrogen content, respectively, and as a consequence has no impact on the N removal. The evolution of the carbon content could be dependent on the evolution of the algal communities; however the difference, although significant, is anecdotic.

The impact of the promoted growth of *Scenedesmus* rather than *Chlorella* on cell numbers and C and N content was not observed. This can be due to two main reasons because of the way experiments were conducted: firstly, the batch operation of reactors tends to reduce the observed

differences; secondly, the duration of the experiment only lasted 14 days. Indeed, such experiments in continuous feeding over a longer period could probably have led to significant differences. In addition, the fact that the microalgae concentrations seem significantly lower at the end of LPC rather than for other conditions cannot be confirmed due to the high standard deviations.

### 3.2. Nutrients behaviours

#### 3.2.1. Microalgae or bacteria assimilation?

Bacterial growth took place during the first two days and then remained constant, while simultaneously, microalgae were at the beginning of an exponential growth phase. It can thus be assumed that the major part of nitrogen and phosphorus assimilated by the bacteria would be consumed at the beginning of the experiment. However, regardless of the experiment, during the first two days, the total assimilated nitrogen ( $< 6 \text{ mg N.L}^{-1}$ ) and phosphorus were low, suggesting that nutrient removal only occurs after the first two days and is mainly due to microalgae.

#### 3.2.2. Phosphorus

The phosphorus final distribution in biomass and in medium is presented on Figure 54.A. It shows that phosphate was depleted at the end of the trials for IPC2 and LPC. The dynamic conditions revealed that the phosphorus concentration dropped below  $0.1 \text{ mg P.L}^{-1}$  at day 6 and 8 for LPC and IPC2 respectively. Nevertheless, the growth of microalgae was not limited at the end of the experiment for those conditions, as their growth rate was comparable with the others. As microalgae require phosphorus to grow, the cell phosphorus storage is clearly observed for these two conditions.

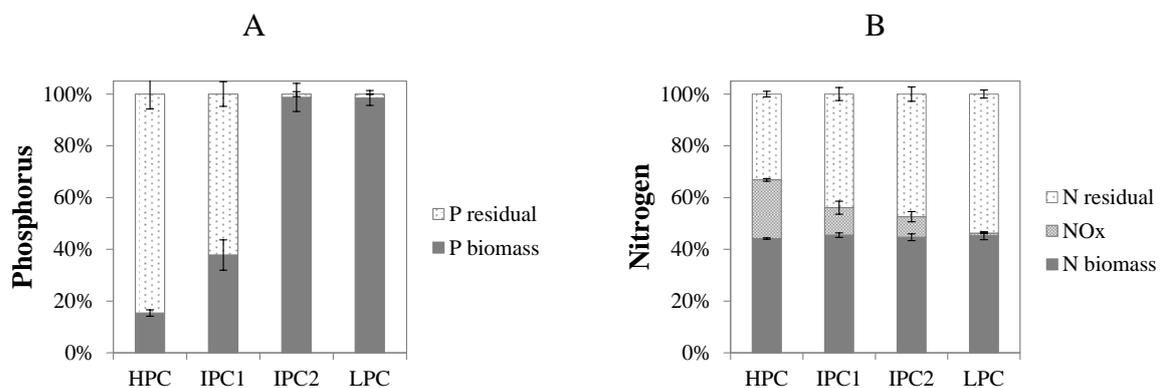


Figure 54 : Phosphorus (A) and nitrogen (B) distribution at the end of the experiment.

The luxury uptake of phosphorus by microalgae has previously been observed in literature (Eixler *et al.* 2006; Powell *et al.* 2011). These authors report that phosphorus is mainly stored as polyphosphate for short or long term use in addition to cellular content (DNA, Protein, RNA, Lipid and intracellular  $\text{PO}_4^{3-}$ ). They also add that P starvation enhances P storage. In this study, the inoculum did not suffer from phosphorus starvation before experiments, implying that no differences in P assimilation rate were induced by the inoculum state. This storage capacity represents a great advantage for the flexibility of the process; microalgae can accumulate phosphorus when P is available and are still able to grow on its stock after phosphorus is depleted, thus continuing to assimilate nitrogen.

Differences in phosphorus removal can be observed between the different conditions. Hence, HPC experiments lead to a P removal rate of  $20 \text{ mg P.L}^{-1}$  over the 14-day periods while the corresponding removal rates for IPC1, IPC2 and LPC were 13, 8 and  $2 \text{ mg P.L}^{-1}$ , respectively. The phosphorus removal rate is therefore positively correlated with the initial P concentration. The maximum daily phosphorus removal rate was obtained for HPC, IPC1, IPC2 and LPC with 2.0, 1.3, 1.3 and  $0.6 \text{ mg P.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  respectively. For the lower initial phosphorus concentration (IPC2 and LPC), the whole pool of phosphate was assimilated, and consequently, even if the removal rates were lower than the IPC1 and HPC rates, the phosphorus removal yields were close to 100%. Due to the high initial concentrations, the P removal yields for HPC and IPC1 were only 15 and 38% in spite of high removal rates. For IPC2 and LPC, phosphorus was depleted whereas nitrogen was still in large quantities at the end of the experiments. Digestate with high N:P ratios would therefore probably not be appropriate as a unique substrate for microalgae growth for complete nitrogen removal. The storage mechanism could be useful on a short term to prevent limitation of microalgae growth in dynamic conditions but not over a long term.

For lower N:P ratios, phosphorus and nitrogen were not depleted, therefore it is hard to determine whether the whole N and P can be removed, especially because nitrogen dynamic conditions are not only dependent on microalgae growth but also on the nitrifying activity. Furthermore, growth limitation by nutrients is here difficult to observe because of the preponderant light limitation at the end of experiments.

### 3.2.3. Nitrogen

The distribution of nitrogen at the end of the experiment is presented in Figure 54.B. The nitrogen removal rate is equal to  $6.3 \text{ mg N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  over the 14-day experiment for all experiments.

The highest removal rate of  $10.1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  is obtained between days 6 and 10 when microalgae are in a sufficient concentration and the growth is not too limited by self-shading. Similar values between 4 and  $12 \text{ mg N.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  were found in literature on pig manure with *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. (Sevrin-Reyssac et al. 1996; Sevrin-Reyssac 1998). Nitrogen assimilation by microalgae is equivalent for the four initial phosphorus concentrations. In our experiments, microalgal growth was not limited by ammonia depletion thanks to the high initial ammonia concentration (about  $200 \text{ mgN.L}^{-1}$ ) even when nitrification occurred. Even if ammonia was limited, *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. are still able to grow on nitrite or nitrate ensuring no nitrogen limitation. Overall, nitrogen removal is equivalent to 43% of nitrogen input during the course of the experiment.

In the case of an unbalanced N:P digestate, nitrogen could be in too high a quantity to be fully removed via microalgae assimilation with respect to the phosphorus concentration. As nitrification occurs in this complex matrix, it could be enhanced to remove nitrogen surplus and therefore to reach high nitrogen and phosphorus removal yields. In addition to assimilation, nitrification and denitrification could then increase the global nutrient removal rate if properly mastered.

Nitrified nitrogen, represented by the sum of nitrite and nitrate concentration ( $\text{NO}_x$ ), is function of the phosphorus concentration as presented in Figure 55. Indeed, for a high initial phosphorus concentration (HPC), the final  $\text{NO}_x$  concentration is high ( $46 \text{ mg N.L}^{-1}$ ), representing 23% of the N pool, while for a low initial phosphorus concentration (LPC), the final  $\text{NO}_x$  concentration tends towards zero. The absence of  $\text{NO}_x$  at the end of the experiment on triplicates for LPC reveals that AOB did not grow. The differences do not result from the oxygen concentration, because not only is oxygen provided by microalgae through photosynthesis, but microalgal growth was also observed to be the same as for other phosphorus concentrations. This can be explained by the limited phosphorus concentration at the beginning. Indeed microalgae consume P, thus preventing the growth of ammonia oxidizing bacteria (AOB). The P concentration in these assays reach zero within six days, yet de Vet et al. (2012) found that nitrification could be limited below 0.1 and stopped below  $0.01 \text{ mg PO}_4\text{-P.L}^{-1}$ , thus confirming this hypothesis. On the contrary, phosphorus was measured in large quantities for HPC and growth of AOB, observed through  $\text{NO}_x$  evolution, did not appear to be limited in kinetic conditions.

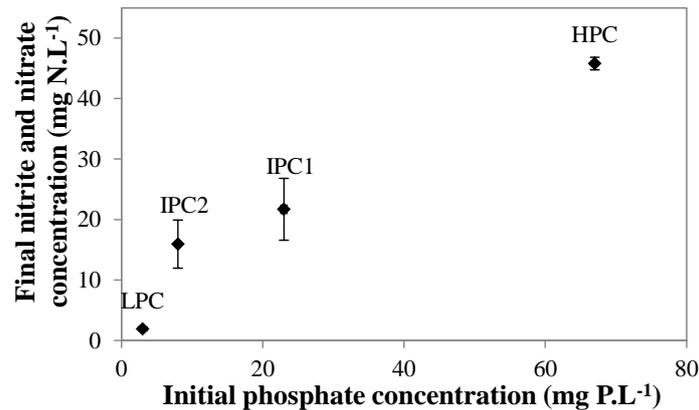


Figure 55 : Impact of initial phosphate concentration on nitrification (represented by NO<sub>x</sub>).

In order to remove nitrogen and phosphorus in an economical manner, the process has to take place at a high input concentration. However, high initial phosphorus concentrations lead to high concentrations of generated NO<sub>x</sub>. Such a process is intended to operate in a semi-continuous feeding mode. Therefore, in order to efficiently remove nitrogen along with phosphorus, either microalgae species should be able to efficiently remove oxidized nitrogen forms, if they possess *nir* and *nar* genes (as *Chlorella* and *Scenedesmus*), or bacterial denitrification should remove the produced NO<sub>x</sub>. In a microalgal-bacterial ecosystem, it seems possible to control the nitrification with nutrient input, but further studies are necessary for the semi-continuous feeding mode.

#### 4. Conclusion

The phosphorus concentration in batch experiments was found to have no impact on microalgal growth which kept on growing even after P was depleted. This observation, along with solid analysis, highlighted the phosphorus storage capacity of microalgae. Nitrogen removal was not much affected by phosphorus concentrations either, whereas phosphorus removal increased with rising P concentration. Community structure analysis during experiments helped to show that *Chlorella* is more P-limited than *Scenedesmus*. The storage supports the robustness of this process towards phosphorus variability. Nitrification was limited by phosphorus, the final NO<sub>x</sub> being then dependent on initial P.

#### **Acknowledgements:**

This research was partially funded by the Regional Council of Brittany and the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME).

## References:

- Bjornsson, W. J., R. W. Nicol, K. E. Dickinson and P. J. McGinn (2013). "Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production." *Journal of Applied Phycology*: 1-6.
- Cañizares-Villanueva, R. O., A. Ramos, A. I. Corona, O. Monroy, M. de la Torre, C. Gomez-Lojero and L. Travieso (1994). "Phormidium treatment of anaerobically treated swine wastewater." *Water Research* 28(9): 1891-1895.
- Capdevielle, A., E. Sýkorová, F. Béline and M.-L. Daumer (2013). "Kinetics of struvite precipitation in synthetic biologically treated swine wastewaters." *Environmental Technology* 35(10): 1250-1262.
- Chen, R., R. Li, L. Deitz, Y. Liu, R. J. Stevenson and W. Liao (2012). "Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production." *Biomass and Bioenergy* 39(0): 128-138.
- Cordell, D., J.-O. Drangert and S. White (2009). "The story of phosphorus: Global food security and food for thought." *Global Environmental Change* 19(2): 292-305.
- De Schampelaire, L. and W. Verstraete (2009). "Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system." *Biotechnology and Bioengineering* 103(2): 296-304.
- de Vet, W. W. J. M., M. C. M. van Loosdrecht and L. C. Rietveld (2012). "Phosphorus limitation in nitrifying groundwater filters." *Water Research* 46(4): 1061-1069.
- Eixler, S., U. Karsten and U. Selig (2006). "Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply." *Phycologia* 45(1): 53-60.
- Garcia Sánchez, J. L., J. A. Sánchez Pérez, F. Garcia Camacho, J. M. Fernández Sevilla and E. Molina Grima (1996). "Optimization of light and temperature for growing *Chlorella* sp. using response surface methodology." *Biotechnology Techniques* 10(5): 329-334.
- Gitton, C. and Y. Hurvois (1999). "La place du traitement dans la gestion des excédents structurels d'effluents d'élevage." *Ingénieries - E A T*(19): p. 31 - p. 41.
- Grobbelaar, J. (2011). "Microalgae mass culture: the constraints of scaling-up." *Journal of Applied Phycology*: 1-4.
- Hase, R., H. Oikawa, C. Sasao, M. Morita and Y. Watanabe (2000). "Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89(2): 157-163.
- Kitaya, Y., H. Azuma and M. Kiyota (2005). "Effects of temperature, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*." *Advances in Space Research* 35(9): 1584-1588.
- Kotai, J. (1972). "Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae." NIVA B-11(69).
- Kumar, M. S., Z. H. Miao and S. K. Wyatt (2010). "Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium." *Bioresource Technology* 101(15): 6012-6018.
- Levine, R. B., M. S. Costanza-Robinson and G. A. Spatafora (2011). "Neochloris oleoabundans grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production." *Biomass and Bioenergy* 35(1): 40-49.
- Lundquist, T., I. Woertz and J. R. Benemann (2011). *Algal High Rate Ponds with CO<sub>2</sub> Addition for Energy Efficient Nutrient Recovery*. Nutrient Recovery and Management, Miami, Florida.

- Marcilhac, C., B. Sialve, A.-M. Pourcher, C. Ziebal, N. Bernet and F. Béline (2014). "Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem." *Water Research* 64(0): 278-287.
- Molinuevo-Salces, B., M. C. García-González and C. González-Fernández (2010). "Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry." *Bioresource Technology* 101(14): 5144-5149.
- Möller, K. and T. Müller (2012). "Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review." *Engineering in Life Sciences* 12(3): 242-257.
- Mulbry, W., E. K. Westhead, C. Pizarro and L. Sikora (2005). "Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer." *Bioresource Technology* 96(4): 451-458.
- NIVA (1976). "Estimation of algal growth potential." Norwegian Inst. for Water Research, Publ. D2(25).
- Park, K. Y., B. R. Lim and K. Lee (2009). "Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant." *Water Science and Technology* 59(11): 2111-2116.
- Powell, N., A. Shilton, S. Pratt and Y. Chisti (2011). "Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds." *Water Science and Technology* 63(4): 704-709.
- Sevrin-Reyssac, J. (1998). "Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable biomasses." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 68(3): 177-186.
- Sevrin-Reyssac, P. J., R. Blier, A. Dumas and Y. Ouelette (1996). "Intensive microalgae cultures integrated in an expérimental lagooning recycling swine manure." *Annee Biologique* 35(1): 41-68.
- Sforza, E., R. Cipriani, T. Morosinotto, A. Bertucco and G. M. Giacometti (2012). "Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*." *Bioresource Technology* 104: 523-529.
- Staub, R. (1961). "Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an *Oscillatoria tubescens* D.C." *Schweiz. Z. Hydrol.* 23: 82-198.
- Travieso, L., F. Benítez, E. Sánchez, R. Borja, A. Martín and M. F. Colmenarejo (2006). "Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste." *Ecological Engineering* 28(2): 158-165.
- Travieso, L., E. Sánchez, R. Borja, F. Benítez, M. León and M. F. Colmenarejo (2004). "Evaluation of a laboratory and full-scale microalgae pond for tertiary treatment of piggery wastes." *Environmental Technology* 25(5): 565-576.
- Wang, H., H. Xiong, Z. Hui and X. Zeng (2012). "Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids." *Bioresource Technology* 104: 215-220.
- Watson, S., T. Halfhide and J. T. Trimmer (2011). Reducing the nutrient impacts of aquaculture through the use of an algal photobioreactor production system. Nutrient Recovery and Management, Miami, Florida.

## **Sous-chapitre 4. 2. Modélisation de l'influence du phosphore sur la dynamique d'un écosystème microalgues/bactéries**

Les résultats présentés au début de ce chapitre ont mis en exergue le stockage du phosphore par les microalgues, ainsi que la limitation de la croissance des bactéries nitrifiantes et le développement de communautés algales différentes en fonction de la teneur en phosphore. Le résultat concernant la dynamique des communautés est un premier résultat à confirmer, le résultat majeur étant le stockage du phosphore par les microalgues. L'impact sur les bactéries nitrifiantes est probablement une résultante du stockage.

Il est possible de modéliser la croissance en utilisant un stockage à l'aide du modèle de Droop (Droop 1973). Le modèle présenté précédemment intégrant la lumière peut ainsi être complété.

### **1. Le modèle de Droop**

Le modèle de Droop a initialement été développé sur *Monochrysis lutheri* avec la vitamine B12 comme substrat et transposé dans cette étude pour le phosphore. Il est constitué de 3 équations différentielles représentant la croissance de la biomasse X (cellules.mL<sup>-1</sup>), la consommation du phosphore S du milieu et la concentration en phosphore intracellulaire Q (mgP.cellule<sup>-1</sup>). Il est alors possible de modéliser des situations dans lesquelles un nutriment est stocké dans la biomasse pour un usage ultérieur.

$$\text{Biomasse : } \frac{dX}{dt} = \bar{\mu} \left(1 - \frac{k_Q}{Q}\right) X$$

$$\text{Substrat : } \frac{dS}{dt} = -\rho_m \frac{S}{S+k_S} X$$

$$\text{Concentration intracellulaire : } \frac{dQ}{dt} = \rho_m \frac{S}{S+k_S} - \bar{\mu}(Q - k_Q)$$

Les paramètres de ce modèle sont  $\bar{\mu}$ ,  $k_Q$ ,  $\rho_m$  et  $k_S$ .  $\bar{\mu}$  (j) représente le taux de croissance lorsque Q tend vers l'infini, il est supérieur au  $\mu_{\text{max}}$  de Contois ou Monod.  $k_Q$  (mgP.cellule<sup>-1</sup>) est le quota minimum en dessous duquel la croissance cellulaire devient impossible.  $\rho_m$  (j) est la vitesse

d'absorption maximale du substrat et  $k_S$  ( $\text{mgP.L}^{-1}$ ) la constante de demi-saturation de la consommation du substrat.

Dans ce modèle prenant en compte la concentration en phosphore, on introduit une variable supplémentaire par rapport au modèle de Monod ou de Contois, la concentration intracellulaire en substrat, que l'on note  $Q$ . Le Tableau 31 représente la matrice de Petersen du modèle prenant en compte la lumière et le stockage du phosphore.

**Tableau 31 : Matrice de Petersen du modèle prenant en compte la lumière et le stockage du phosphore**

	X_A	X_P_stor	S_N	S_P	Light	Process rate
1	Microalgae growth	1	-1/Q	$-i_{N,X_A}$		$= \mu_m \cdot \left(1 - \frac{kQ}{Q}\right) \cdot \frac{\text{Light}}{\text{Light} + K'} \cdot X_A$
2	P storage		1		-1	$= \rho_m \cdot \frac{S_P}{S_P + K_{S_P}} \cdot \frac{K_{P_Q}}{Q + K_{P_Q}} \cdot X_A$
3	Death					$= -b \cdot X_A$

avec  $X_{P\_stor} = Q * X_A$ ,  $Q$  étant la concentration intracellulaire,  $S_P$  est la concentration en phosphore soluble.

Dans le modèle de Droop, la constante de demi-saturation pour la consommation ( $k_s$ ) est différente de la constante de demi-saturation pour la croissance ( $K_s$  dans Monod). En effet, ces 2 paramètres sont nécessairement inégaux puisque la croissance est découplée de la concentration en substrat du milieu grâce aux réserves (Droop 2003).

## 2. Simulation du stockage du phosphore

### 2.1. Détermination des paramètres du modèle

Pour mieux comprendre et pouvoir modéliser l'influence du phosphore, qui a un rôle important comme on l'a vu au niveau des processus mais aussi au vu de sa concentration qui peut être limitante dans les digestats, une première calibration d'un modèle basé sur ces concepts a été réalisée à partir des données présentées précédemment.

Le modèle de Contois précédemment adapté a été utilisé comme base à laquelle ont été ajoutées les particularités du modèle de Droop.  $\bar{\mu}$  représente ainsi un taux de croissance lorsque  $Q$  tend vers l'infini pour la condition de lumière et la concentration en algues donnée. Pour intégrer

l'influence de la lumière dans le modèle de Droop, le paramètre  $\bar{\mu}$  a été substitué par la variable

$$\bar{\mu} = \mu_{-m} \cdot \frac{Flux}{Flux + K' \cdot X}$$

Cette variable représente le taux de croissance global en prenant en compte la réduction de la croissance suivant la lumière disponible, la densité optique du milieu et la quantité d'algues, comme détaillé Sous-chapitre 3. 3 (p144).

Puisque la communauté algale a changé entre l'étude de la couleur/lumière et du ratio N:P, les paramètres  $K'$  et  $h$  (Contois) utilisés précédemment ont dû être adaptés. Les autres paramètres sont spécifiques au système et restent donc inchangés, excepté  $\mu_{-m}$  qui est redéfini. Le paramètre  $K'$  est l'équivalent dans le modèle de Contois de la constante de demi-saturation de la lumière et le paramètre  $h$  traduit l'effet de la concentration en microalgues sur l'atténuation de la lumière ( $J_b$ ). Ils ont donc été calés manuellement sur les expériences du sous-chapitre précédent où les phosphates ne sont jamais épuisés (ratio N/P = 3 et 10  $gN.gP^{-1}$ ) en utilisant les données de concentration algale et de concentration en phosphore. L'indicateur utilisé est le produit de la somme des moindres carrés obtenue pour chacun de ces types de données. Les valeurs ainsi obtenues pour ces paramètres sont :  $K' = 1,55 \times 10^{-5} \mu molE.m^{-2}.s^{-1}.cell^{-1}$  ;  $h=0,0000111 cells.mL^{-1}$ .

D'après les simulations, le modèle de Droop est bien capable de simuler un stockage du phosphore permettant la croissance des microalgues, même lorsque les phosphates sont épuisés. Néanmoins, dans les cas où la quantité de phosphore est largement suffisante, le stockage simulé (Q) augmente jusqu'à épuisement des phosphates du milieu (Figure 56).

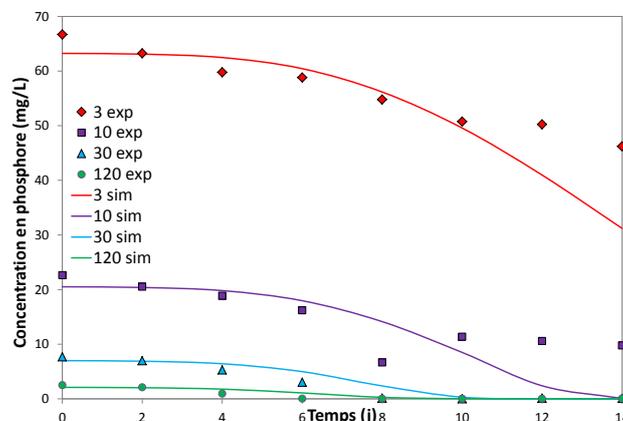


Figure 56 : Evolution du phosphore avec le modèle de Droop non modifié

Or ce phénomène n'est pas observé en pratique, puisque la consommation du phosphore semble se réduire après 10 jours. La quantité intracellulaire minimum est définie par le paramètre  $k_Q$ , mais il existe aussi une borne supérieure correspondant à la vitesse de croissance maximale (Bougaran *et al.* 2010). Ces deux paramètres sont définis comme des limites physiologiques (Elrifi and Turpin 1985).

Il a donc été ajouté une saturation à la concentration intracellulaire en P du modèle de Droop afin de pouvoir représenter le fait que la concentration en phosphore dans la cellule n'est pas infinie. Cette limitation a été représentée à l'aide d'une inhibition type Monod sans compétition.

Ainsi les équations concernant la disparition et le stockage du phosphore deviennent :

$$\frac{dP}{dt} = -\rho_m \frac{P}{P + k_{S_P}} \frac{k_{P_Q}}{Q + k_{P_Q}} X$$

$$\frac{dQ}{dt} = \rho_m \frac{P}{P + k_{S_P}} \frac{k_{P_Q}}{Q + k_{P_Q}} - \bar{\mu}(Q - k_Q)$$

Au vu du nombre de paramètres et de résultats expérimentaux, il n'est pas possible de caler les paramètres précisément en utilisant un calage comme au chapitre précédent (minimisation avec fonction de coût). Un calage manuel, tel que défini ci-dessus, a cependant permis de représenter la croissance et la dynamique du phosphore assez fidèlement (Figure 57) avec les valeurs des paramètres représentés dans le Tableau 32.

**Tableau 32 : Paramètres du modèle représentant le stockage du phosphore (basé sur Droop) calés manuellement sur la concentration en phosphore et en microalgues.**

Paramètre	$\mu_m$	$k_Q$	$\rho_m$	$k_{S_P}$	$k_{P_Q}$
Valeur	1.75	$4.10^{-8}$	$1.10^{-6}$	2.2	$3.10^{-6}$
Unité	$j^{-1}$	$mgP.cell^{-1}$	$mgP.cell^{-1}$	$mgP.L^{-1}$	$mgP.cell^{-1}$

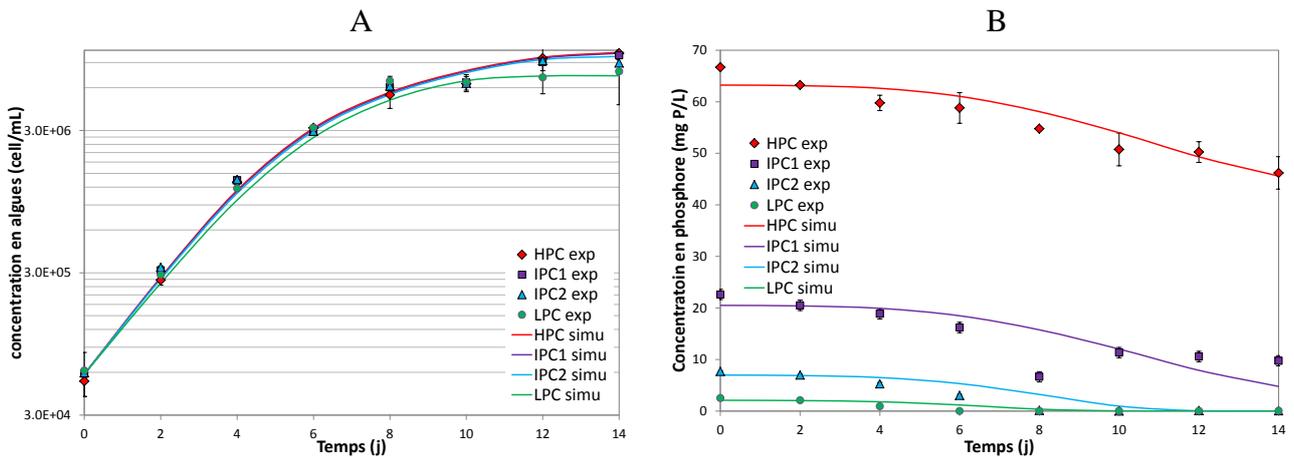


Figure 57 : Croissance des microalgues (A) et évolution de la concentration en phosphore (B) expérimentales et simulées pour différentes concentrations initiales en P.

Ces figures révèlent une bonne adéquation entre les comportements observés et simulés. Par exemple, la croissance simulée continue sur les réserves comme la croissance observée après que le phosphore du milieu soit totalement consommé (Figure 57.A). La concentration maximum en microalgues est en outre assez bien représentée par ce modèle. De plus, la deuxième inflexion de la courbe représentant la concentration en P indique la saturation de la concentration intracellulaire comme observé sur les résultats expérimentaux (Figure 57.B).

## 2.2. Analyse de sensibilité

Afin d'évaluer l'impact de la variabilité des facteurs d'entrée sur les variables de sortie, une analyse de sensibilité a été réalisée pour les cas HPC et LPC sur les paramètres affectant l'impact de la lumière et le stockage du phosphore. Ces paramètres ont été augmentés de 10 % et la variation après 14 jours de la concentration en microalgues et de la concentration en phosphore ont servi de comparaison. En revanche, puisque la concentration finale en phosphore est très faible dans le cas LPC, cette comparaison n'a pas été utilisée.

Tableau 33 : Analyse de sensibilité des paramètres du modèle

Paramètre	HPC		LPC
	[ $\mu$ ]	[P]	[ $\mu$ ]
$\mu$	1 %	0 %	4 %
$K'$	-2 %	0 %	-2 %
$\rho_m$	0 %	-3 %	-4 %
$k_Q$	0 %	0 %	-1 %
$K_{S_P}$	0 %	0 %	3 %
$K_{P_Q}$	0 %	-10 %	-90 %

Globalement les paramètres sont assez peu sensibles, néanmoins  $K_s\_Q$  a une forte influence sur la concentration en algues pour LPC et une influence moyenne sur la teneur finale en P pour HPC. La forte sensibilité de ce paramètre provient du fait qu'il limite le stockage. Dans le modèle, seul le phosphore stocké est utilisé pour la croissance, hors pour la condition étudiée LPC, la concentration en phosphore étant déjà faible ce paramètre diminue plus encore la concentration disponible pour les microalgues. Pour les conditions avec beaucoup de phosphore (HPC), ce paramètre permet d'éviter un stockage « infini » du phosphore. Il est donc très impactant sur la concentration en phosphore.

Le modèle prenant en compte l'effet de la concentration en phosphore et le stockage intracellulaire dans la biomasse algale a pu être complété et calé en intégrant l'effet de la lumière et son atténuation développé Sous-chapitre 3. 3 (p 144). Ce modèle est schématisé Figure 58. Bien qu'il n'intègre toujours pas certains facteurs dont la mort des microalgues, il a permis de reproduire les comportements observés de la biomasse algale et de la consommation du phosphore associée.

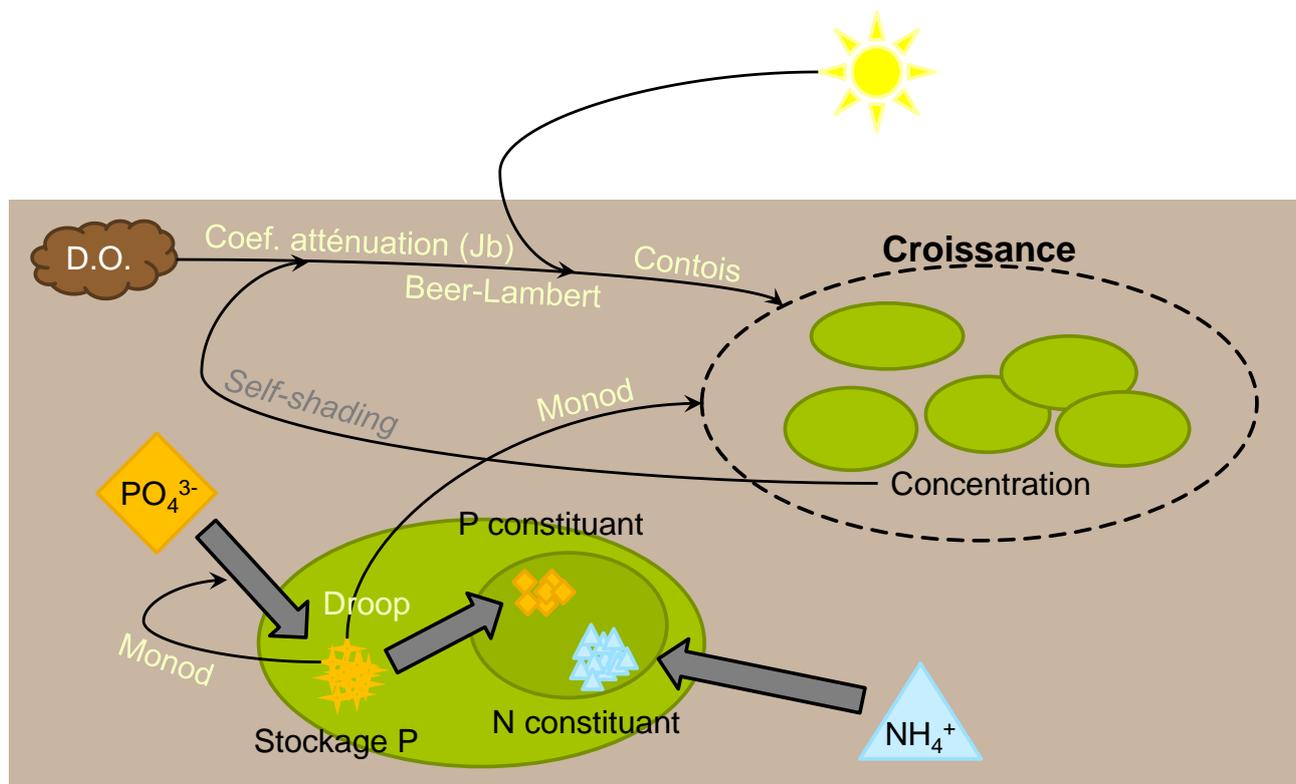


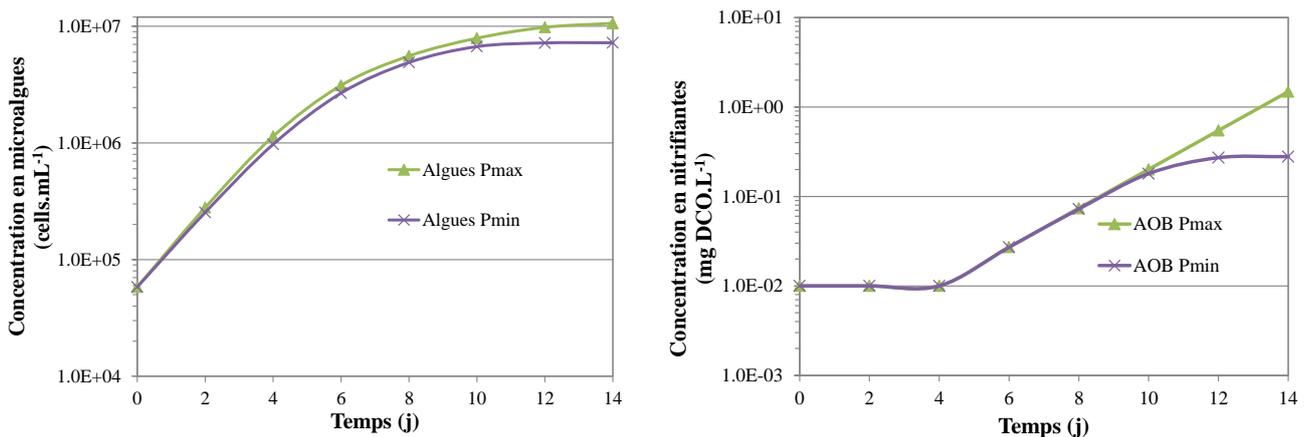
Figure 58 : Représentation schématique du modèle intégrant la limitation de croissance par la lumière dans un milieu coloré et le stockage du phosphore.

### 3. Modélisation des interactions microalgues/nitrification liées au phosphore

A l'aide du modèle développé et de l'ajout d'un processus de croissance de bactéries nitrifiantes telle que définie dans ASM1, le concept de la modélisation des interactions microalgues-nitrifiantes a été observé. La croissance des nitrifiantes (AOB) n'a été limitée que par le terme de Monod représentant la limitation en phosphore. En revanche, la concentration en oxygène qui est un paramètre important pour la croissance de ces microorganismes n'a pas été prise en compte directement par manque de données précises sur ce point. Cependant, pour représenter le décalage de croissance des AOB par rapport aux microalgues qui leur fournissent de l'oxygène, la croissance a été artificiellement décalée de 4 jours.

Les deux conditions extrêmes précédentes ont été simulées, soit des concentrations en phosphore initiales de 2,5 et 66,7 mg P.L<sup>-1</sup>. En l'absence d'information concernant leur concentration, la teneur en AOB initiale a été fixée arbitrairement à 0,01 mg DCO.L<sup>-1</sup>. De plus, la constante de demi-saturation de cette biomasse ( $K_{PO_4,ANO}$ ) a été imposée selon les paramètres par défaut du modèle ASM2d (Henze *et al.* 2000). Le taux de croissance maximum ( $\mu_{ANO,Max}$ ) a été subjectivement fixé à 0,5 j au lieu de 1 pour réduire la croissance à cause du niveau d'oxygène non optimal.

La Figure 59 représente les concentrations en microalgues et en nitrifiantes simulées pour des concentrations en phosphore de 2,5 et 66,7 mg P.L<sup>-1</sup>.



**Figure 59 : Concentrations en microalgues et en bactéries nitrifiantes (AOB) simulées pour des concentrations initiales en phosphore de 2,5 (min) et 66,7 (max) mg.L<sup>-1</sup>.**

La réduction de croissance observée pour les microalgues est de 32 % environ à 14 jours, alors qu'elle est à 80 % pour les bactéries nitrifiantes entre les conditions extrêmes en P. Ces résultats valident le concept avancé précédemment. Cependant, les paramètres calés du modèle

développé et les paramètres relatifs à la croissance des bactéries nitrifiantes d'ASM1 n'expliquent pas la réduction de la nitrification à hauteur de 96 % (Sous-chapitre 4. 1, p 157) entre ces deux conditions.

Deux hypothèses majeures peuvent être avancées. D'une part, la constante de demi-saturation du P pour les AOB peut être plus élevée que le  $0,01 \text{ mg P-PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$  du modèle ASM1, ce qui conduirait à une plus forte limitation de la condition avec peu de phosphore. D'autre part, il est possible que la relation entre les algues et les AOB à travers l'oxygène induise systématiquement un retard de croissance des bactéries nitrifiantes en faveur des microalgues, les avantageant dans un milieu pauvre en phosphore. Ce mécanisme ne peut être simulé qu'avec des données précises de la production d'oxygène par les microalgues.

**CHAPITRE 5. Etude et modélisation de l'influence du carbone inorganique et des transferts dans un écosystème microalgues/bactéries**

## 1. Introduction

La culture de microalgues peut être utilisée afin d'épurer les effluents d'élevage et de valoriser les nutriments (N, P) présents (Marcilhac *et al.* 2014). Dans le cadre d'une filière de méthanisation, ce type de procédé apparaît d'autant plus pertinent que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) issu de la combustion du biogaz dans les turbines de cogénération peut être utilisé pour la croissance des microalgues, diminuant ainsi l'impact carbone de la filière tout en favorisant la croissance algale. En effet, le carbone inorganique présent dans les digestats par rapport aux teneurs en azote, de l'ordre de 1,5 g C inorg.g N<sup>-1</sup> est insuffisant pour éliminer tout l'azote sous forme de biomasse algale dont les ratios C/N sont de l'ordre de 5 g C.g N<sup>-1</sup>. Ainsi, les gaz de combustions semblent être appropriés pour apporter le surplus de carbone inorganique nécessaire à la croissance algale. En effet, cette croissance et l'épuration de l'azote, du phosphore et du carbone associée semblent identiques avec l'utilisation des gaz de combustion et l'utilisation de CO<sub>2</sub> pur (Doucha *et al.* 2005 ; de Godos *et al.* 2010). De plus, les composés nuisibles (Cd, Pb, Hg, benzo[a]pyren, HAP) présents dans ces gaz ne sont pas retrouvés dans la biomasse (Kaštánek *et al.* 2010).

Un certain nombre d'enjeux techniques freinent néanmoins cette technologie. Les microalgues étant des microorganismes autotrophes nécessitant du carbone inorganique, l'enjeu sur le CO<sub>2</sub> est important pour la croissance. Plus particulièrement, le digestat peut limiter le transfert nécessaire des gaz de combustion limitant la quantité de carbone inorganique disponible pour la biomasse autotrophe. Les problématiques portent autant sur la quantité optimale de carbone inorganique nécessaire à la croissance algale que sur les notions de transferts gaz-liquide qui peuvent être fonctions de la teneur en algues et de la dilution du digestat.

L'impact du milieu sur les transferts gazeux a été étudié par Kantarci *et al.* (2005). Tout d'abord, les algues et la viscosité du digestat sont susceptibles de provoquer une augmentation du phénomène de coalescence des bulles et agiraient donc en augmentant leur taille, ce qui joue en défaveur des transferts gazeux (diminution de l'aire interfaciale et augmentation de la vitesse de remontée de la bulle). De même, la phase liquide du digestat peut contenir des matières en suspension résiduelles suite à la séparation liquide/solide. Celles-ci sont susceptibles de s'adsorber aux interfaces gaz/liquide, provoquant selon 2 théories soit un effet barrière (la monocouche provoque une résistance au transfert des molécules de gaz de la bulle au milieu), soit un effet hydrodynamique (la stabilisation de l'interface rend le transfert plus difficile). Les algues peuvent de même affecter la solubilité du CO<sub>2</sub> en modifiant la tension de surface du milieu (Molina Grima *et al.* 1993). A l'inverse, la sécrétion d'anhydrases carboniques peut améliorer l'hydratation du CO<sub>2</sub> (Collett *et al.* 2011). Kantarci *et al.* (2005) reportent de même que le coefficient de transfert (k<sub>LA</sub>)

peut être augmenté par la présence de particules solides en faible concentration. En raison de ces différents impacts possibles sur le transfert, il est important de mieux comprendre l'impact des conditions opératoires du procédé sur les transferts, notamment à travers une mesure des coefficients de transfert.

En outre, la littérature converge vers la conclusion qu'il existe une quantité de CO<sub>2</sub> optimale à fournir pour une croissance optimale des algues. Au-delà de cette quantité optimale, le taux de croissance de la culture diminue (Sung *et al.* 1999 ; De Morais and Costa 2007). Dans ces études, le pH est souvent non régulé. L'inhibition des algues par les forts ajouts de CO<sub>2</sub> pourrait donc être plutôt due à l'acidification du milieu selon Soletto *et al.* (2008) et Olaizola (2003). La valeur optimale est cependant très différente d'une étude à l'autre, les conditions opératoires et les souches étant variables.

L'objectif de cette étude est donc d'étudier les transferts du CO<sub>2</sub> dans les cultures algales, de déterminer une quantité optimale à fournir et de définir l'impact du carbone inorganique sur la croissance algale.

## **2. Rappel sur les notions de transfert**

L'injection directe d'un gaz contenant du CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture reste la méthode privilégiée pour fournir du carbone inorganique aux microalgues. Elle implique cependant une dissolution du CO<sub>2</sub> gazeux en carbone inorganique dissous utilisable par les microalgues. Le coefficient volumique de transfert d'un gaz dans un liquide est appelé  $k_L a$ . Ce coefficient permet de caractériser la qualité du transfert dans un milieu donné. Le modèle utilisé pour représenter l'accès au CO<sub>2</sub> pour les algues est celui du transfert de masse au travers de 3 couches tel que représenté par la Figure 60. Ce modèle décrit les transferts depuis le gaz à la couche limite côté gazeux puis l'échange entre cette dernière et la couche limite côté liquide, et enfin le transfert de cette couche au liquide

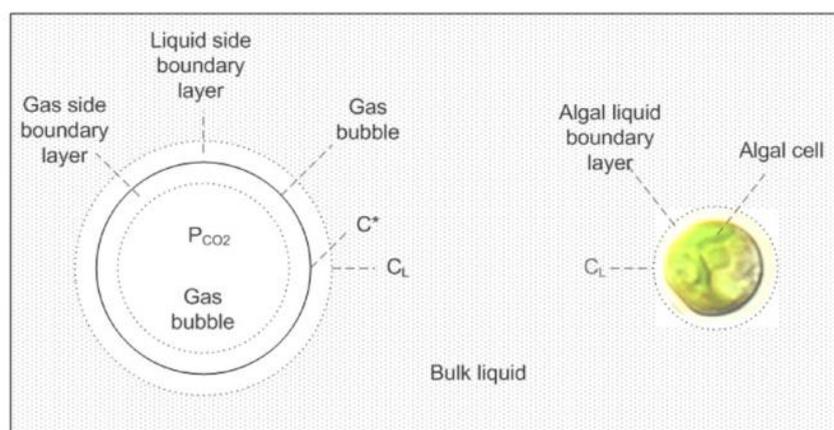


Figure 60 : Modèle des couches limites (pas à l'échelle) selon Langley *et al.* (2012)

Hors, il est largement accepté que le CO<sub>2</sub> diffuse sans contrainte au travers de la membrane cellulaire (Amoroso *et al.* 1998 ; Badger and Price 2003 ; Giordano *et al.* 2005). Ce modèle peut alors se limiter à la théorie des 2 couches limites telle que décrite par Markl *et al.* (1977). La vitesse de diffusion limitante se situe alors au niveau de la résistance gaz/liquide de la bulle gazeuse.

Pour des raisons pratiques, le  $k_L a(O_2)$  est plus aisé à évaluer que le  $k_L a(CO_2)$ . Il est donc courant (Talbot *et al.* 1991; Langley *et al.* 2012) d'évaluer le  $k_L a(O_2)$  et d'en extrapoler le  $k_L a(CO_2)$  à l'aide de la formule suivante tirée du modèle de pénétration de Higbie (1935) :

$$k_L a(CO_2) = k_L a(O_2) \times \sqrt{\frac{D_{CO_2}}{D_{O_2}}}$$

Avec  $D_{CO_2}$  et  $D_{O_2}$  : coefficient de diffusivité respectifs du CO<sub>2</sub> et de l'O<sub>2</sub> (dans les mêmes conditions). Le Perry's chemical engineers' handbook (6th edition) indique dans l'eau à 25°C :

$$D_{CO_2} = 1,96 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$D_{O_2} = 2,50 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\text{Soit : } k_L a(CO_2) = k_L a(O_2) \times 0,885 \text{ à } 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

Il est courant en épuration d'évaluer l'impact du milieu par le calcul du coefficient  $\alpha$  à cause des différences du transfert gazeux dues à la matrice :

$$\alpha = \frac{k_L a'}{k_L a}$$

Avec :  $k_L a'$  :  $k_L a$  estimé sur le milieu

$k_L a$  :  $k_L a$  estimé sur eau claire dans les mêmes conditions de température

Des valeurs de coefficient  $\alpha$  en digestat dilué n'ont pas pu être trouvées dans la littérature. Cependant, selon Boursier (2003), le coefficient  $\alpha$  du lisier non dilué est compris entre 0,28 et 0,33. Pour comparaison, le coefficient  $\alpha$  des boues de station d'épuration urbaine est compris entre 0,65 et 0,90 selon leur teneur en MES (Duran *et al.* 2013).

### **3. Résultats et discussions de l'étude en bioréacteurs**

L'étude du transfert du CO<sub>2</sub> dans les photobioréacteurs avec une matrice digestat contenant des algues a été tout d'abord réalisée. Ensuite, le suivi de la croissance des microalgues à plusieurs débits d'injection a permis de quantifier le transfert en condition de culture et de déterminer l'effet du débit sur la croissance algale.

#### 3.1. Etude du transfert du CO<sub>2</sub>

##### 3.1.1. Etude en eau claire

Avant d'étudier les transferts en matrice digestat et algue, le système a été caractérisé en eau claire sur une gamme de débits.

Comme indiqué précédemment, le transfert du dioxyde de carbone a été estimé à partir du transfert d'oxygène en prenant en compte les différences de diffusivité. La Figure 61 représente l'évolution de la concentration en oxygène dissous lors d'une injection d'air en fonction du temps et sa représentation logarithmique. La partie linéaire de la représentation logarithmique s'étend d'environ 0 à 6 min. Les essais ont donc été conduits durant ce temps, avec le relevé de la concentration en oxygène dissous par intervalles de 5 secondes. Les  $k_{La}$  ont été estimés sur cette partie linéaire pour toutes les conditions. Pour chaque détermination, le  $R^2$  a de même été calculé afin de s'assurer de la précision des résultats. Celui-ci a été supérieur à 0,95 pour toutes les mesures.

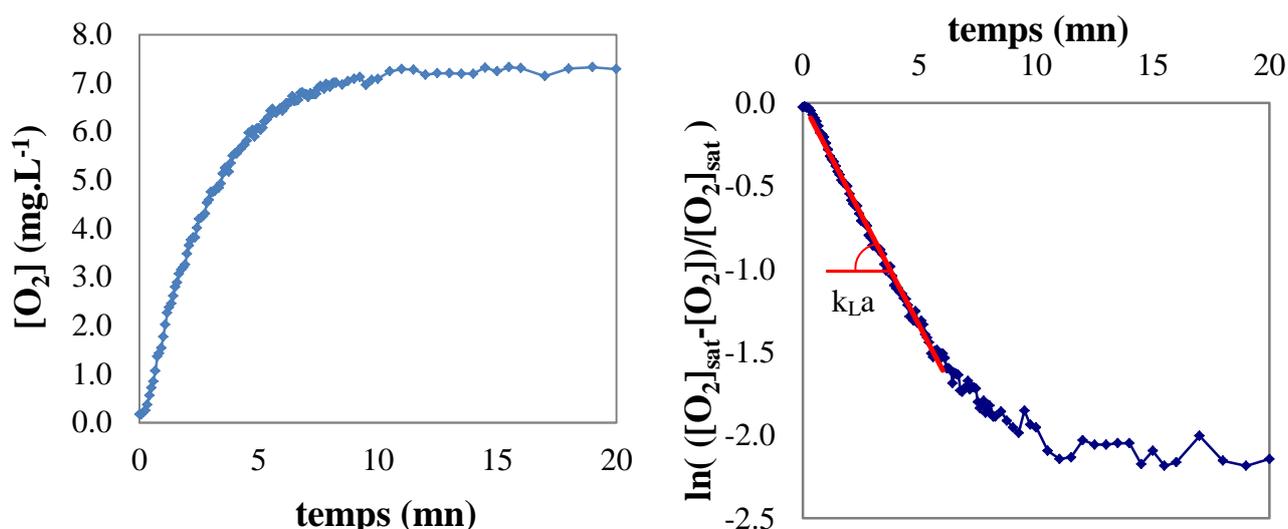


Figure 61 : Cinétique de dissolution de l'O<sub>2</sub> en eau claire et sa représentation en logarithme népérien pour déterminer le k<sub>La</sub>.

Le coefficient de transfert est, de manière générale, fortement influencé par le débit d'injection du gaz (Painmanakul 2005). Sur la gamme de débits 0 à 0,52 L.min<sup>-1</sup>, un k<sub>La</sub> CO<sub>2</sub> maximum de 2.6.10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> a été obtenu, pour le débit d'air maximum (Figure 62). Ce coefficient de transfert est dans la moyenne de ce qui peut être observé dans la littérature pour une colonne de bulles, entre 2.10<sup>-3</sup> et 4.10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> (Ugwu *et al.* 2008). Le k<sub>La</sub> mesuré est proportionnel au débit d'injection dans cette gamme, ce qui mène à la relation suivante : k<sub>La</sub>CO<sub>2</sub> (s<sup>-1</sup>) = 4,7.10<sup>-3</sup> x débit (L.mn<sup>-1</sup>) + 0,27.10<sup>-3</sup>. La variabilité peut être appréciée par les barres d'erreur représentant l'écart type entre les duplicats.

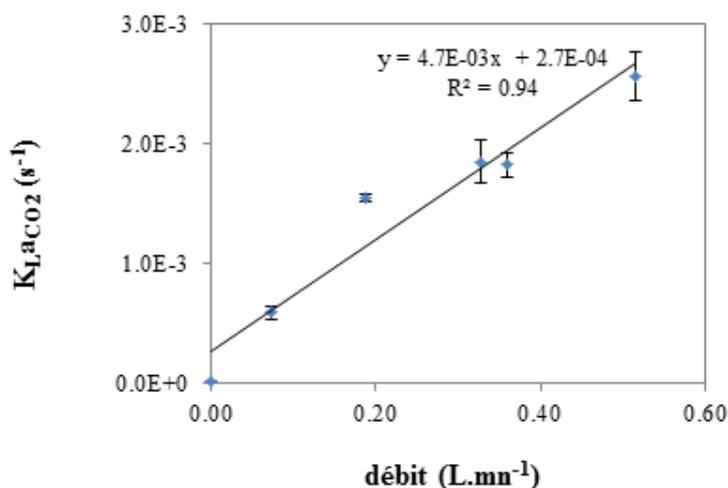


Figure 62 : Influence du débit d'injection sur le coefficient de transfert.

### 3.1.2. Etude en conditions process

Afin d'étudier l'impact du procédé sur ce transfert, nous nous sommes tout d'abord intéressé à l'impact de l'influent, le digestat, sur ce transfert. Comme indiqué précédemment, cet impact est évalué en comparant le transfert obtenu dans les mêmes conditions en eau claire et en présence de digestats (2 dilutions étudiées). Le rapport de ces 2 valeurs étant le coefficient Alpha ( $\alpha$ ). Les différentes mesures concernant l'impact du digestat, réalisées en duplicats avec un débit de  $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , ont mené à des moyennes respectives sur le coefficient  $\alpha$  de  $0,98 \pm 0,10$  et  $0,93 \pm 0,07$  respectivement pour les dilutions  $1/50$  et  $1/30^{\text{ème}}$ . Le test d'égalité des espérances démontre qu'étant données les incertitudes de mesure et pour les dilutions de cette étude, l'impact du digestat n'est pas significatif au risque de 5%.

Par la suite, l'impact des microalgues sur ce transfert a également été étudié. Les résultats sont présentés Figure 63. Les mesures, réalisées en duplicats avec un débit de  $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , ont mené à des moyennes de coefficient  $\alpha$  de  $1,15 \pm 0,08$  et  $1,16 \pm 0,07$  respectivement pour les concentrations  $6,7 \cdot 10^4$  et  $1,2 \cdot 10^5$ . Les tests statistiques sur les valeurs obtenues montrent que le transfert gazeux est significativement amélioré par la présence d'algues (t-Student, 5 %), et ce de manière équivalente pour les deux concentrations étudiées. Puisque les réacteurs étaient placés à l'obscurité et que la production d'oxygène se déroule durant la phase lumineuse de la photosynthèse, une augmentation artificielle de la vitesse de transfert gazeux n'est pas à suspecter.

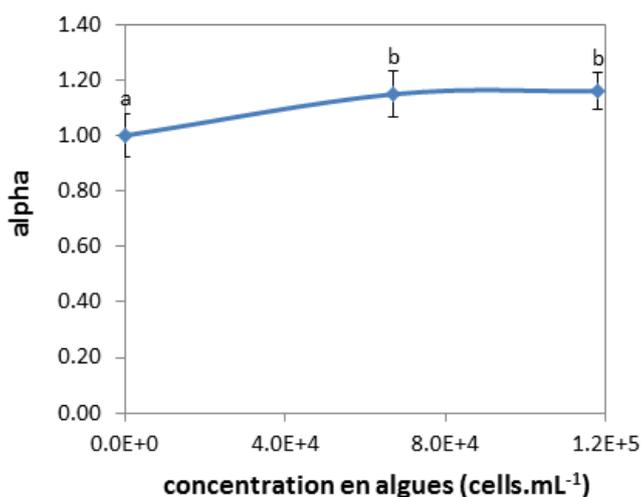


Figure 63 : Evolution du coefficient  $\alpha$  en fonction de la concentration en algues dans le milieu du transfert

Cette augmentation du  $k_{La}$  est en accord avec le cas de particules solides en faible concentration décrit par Kantarci *et al.* (2005). De manière similaire, l'augmentation du  $k_{La}$  avec la concentration en micro-organismes a déjà été observée en culture de levure par Ni *et al.* (1995) qui rapportent une augmentation du  $k_{La}$  de  $1,8 \cdot 10^{-2}$  à  $2,4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  pour un passage de 1,2 à 4,1 mg MS.mL<sup>-1</sup> de biomasse, soit un coefficient alpha de 1,3.

### 3.2. Influence de la concentration en carbone inorganique

Les débits étudiés s'étendent de 0 à 0,52 L.min<sup>-1</sup> en injection 15 min par heure et sont appelés de Q0 à Q5 respectivement (3.2.3.2, p 108).

#### 3.2.1. Croissance algale

La cinétique de croissance algale pour les différents débits étudiés est représentée Figure 64. Le débit Q4 n'a pas montré une évolution cohérente avec les autres débits, il n'est donc pas intégré à la suite de l'analyse des résultats. La concentration algale la plus élevée ( $6 \cdot 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ ) est atteinte pour le débit Q5. Après 72 heures, la croissance est limitée par la lumière pour cette condition comme cela a déjà été observé précédemment (Marcilhac *et al.* 2014). Lorsqu'aucun CO<sub>2</sub> n'est introduit (Q0), les microalgues parviennent à se développer sur le reste de carbone inorganique initialement présent dans le digestat malgré le fait qu'il ait été épuré en amont. Cependant, la croissance stagne après 48 h de culture, indiquant l'épuisement de ce TIC résiduel.

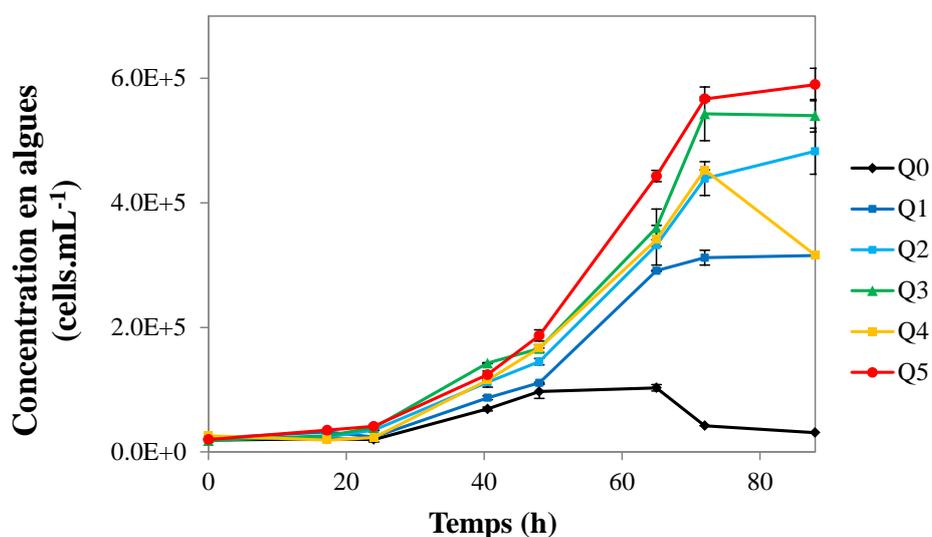


Figure 64 : Evolution de la concentration en microalgues en fonction du temps pour les différents débits d'injection.

Les taux de croissance ( $\mu$ ) calculés entre 17 et 65 h sont compris entre 0,22 et 0,54  $\text{j}^{-1}$  pour les débits de Q0 et Q5 respectivement. Néanmoins, le taux de croissance pour le débit nul est surestimé à cause du reste de carbone inorganique dissous au début de l'expérience.

La productivité moyenne de la biomasse algale (entre 48 et 72 h) est plus représentative du phénomène de limitation du carbone inorganique, c'est pourquoi elle a été représentée en fonction du débit d'injection de gaz sur la Figure 65. Des différences significatives peuvent être observées en fonction du débit d'injection. Pour un débit de gaz nul (Q0), la productivité calculée est négative à cause de la mort de la biomasse. La productivité augmente avec le débit d'injection de  $\text{CO}_2$  et atteint une valeur maximum de  $160 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour le débit le plus élevé. Cette productivité en fonction du débit semble tendre vers une limite d'environ  $180 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Dans la littérature, on retrouve des valeurs de productivité similaires de 31 à  $332 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  sur des digestats (de la Noüe and Bassères 1989 ; Molinuevo-Salces *et al.* 2010).

Bien que l'influence du débit sur la culture algale soit probante, on remarque que le débit maximum (Q5) ne mène qu'à une augmentation de la productivité de 1,7 par rapport à Q1, alors qu'il est environ 7 fois plus élevé. Cela implique que le débit de  $\text{CO}_2$  fourni à la biomasse autotrophe a certes un impact conséquent, en comparant la présence et l'absence, mais que son effet reste modéré au vu des quantités fournies.

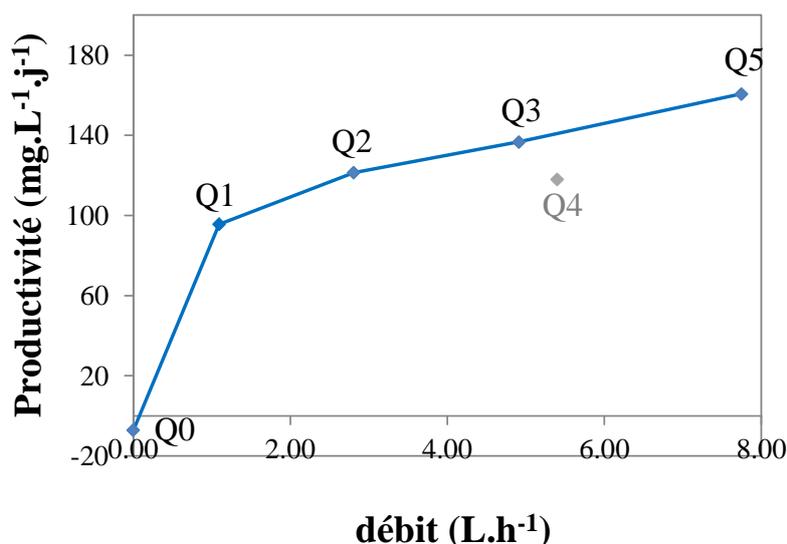


Figure 65 : Productivité en biomasse selon le débit.

### 3.2.2. Evolution du carbone inorganique

L'évolution de la concentration en carbone inorganique dans chaque réacteur (TIC) est représentée Figure 66. La concentration en TIC correspondant au débit Q0 chute de 40 à 0 mg C.L<sup>-1</sup> en 60h environ, tandis que la concentration des débits Q2 à Q5 ne diminue que jusqu'à environ 20 mg C.L<sup>-1</sup>, le débit Q1 provoquant un comportement intermédiaire. En comparant ces résultats avec ceux présentés précédemment concernant la croissance algale (Figure 64), en parallèle de cette chute de concentration pour Q0, on observe également une limitation de la croissance algale à partir de 48 h. Puisque toutes les autres conditions sont identiques dans les réacteurs, cette limitation peut être imputée à la concentration en carbone inorganique dissous qui semble être limitante en dessous de 10 mg C.L<sup>-1</sup> environ.

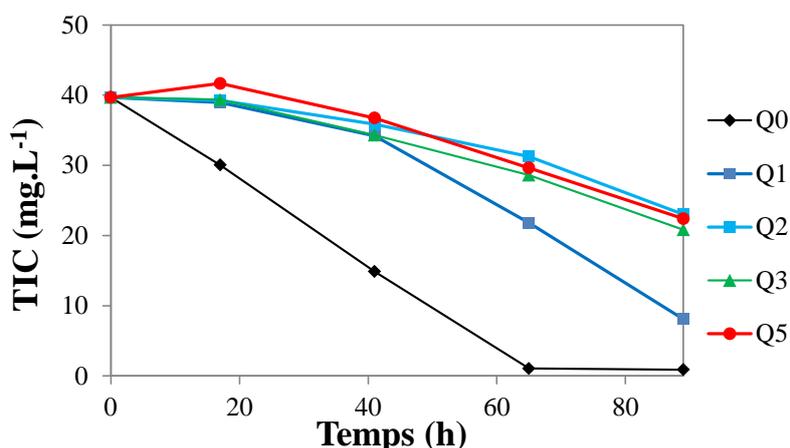


Figure 66 : Evolution du carbone inorganique du milieu durant la culture pour les différents débits d'injection.

Afin de mieux comprendre les transferts, il faut s'intéresser aux différents compartiments du carbone (Figure 67). Le carbone inorganique est apporté par le dioxyde de carbone et transféré au milieu suivant les transferts gaz-liquide discutés en 3.1 (p 187,  $k_{La}$ ) ; une partie du gaz injecté est ainsi perdue directement à l'injection. En outre, les microalgues utilisent le carbone inorganique dissous présent dans le milieu pour leur croissance. Dans cette étude, l'injection séquentielle du dioxyde de carbone rend la comparaison entre le transfert observé et le transfert réel compliquée. Néanmoins, outre le fait de contrôler plus précisément le débit, cette stratégie permet de consommer le carbone inorganique dissous pendant la phase de non injection augmentant de ce fait le transfert à la reprise de l'injection de gaz.

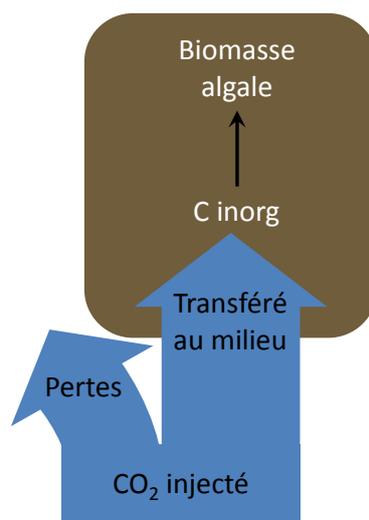


Figure 67 : Schéma des transferts du carbone dans une culture algale.

Le COT mesuré sur les échantillons prélevés dans les réacteurs à différents temps expérimentaux présente une forte corrélation avec le comptage algal ( $R^2 = 0.92$ ) et la D.O. ( $R^2 = 0.97$ ) réalisée sur ces mêmes échantillons (Figure 68). Ces résultats indiquent que l'évolution du COT est principalement liée à la croissance de la biomasse algale. La biomasse bactérienne est soit négligeable vis-à-vis de la biomasse algale, soit elle est très fortement corrélée à cette dernière.

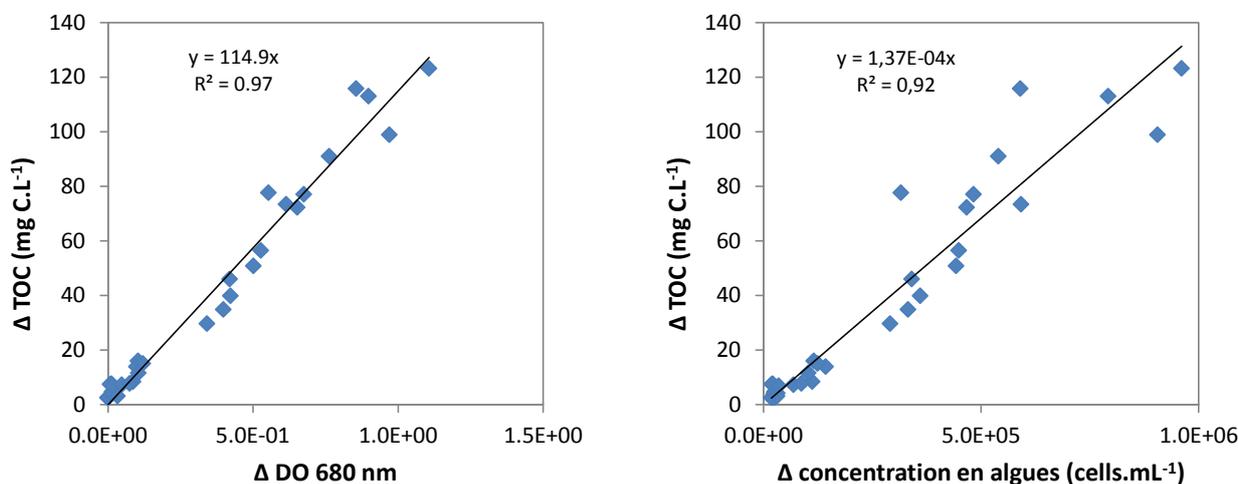


Figure 68 : Corrélations de l'évolution du carbone organique dissous en fonction de la densité optique à 680 nm et de la concentration en algues.

Il semble alors possible de déterminer la teneur en carbone de la biomasse algale en considérant que les valeurs de TOC obtenues correspondent au carbone contenu dans les algues et les MES correspondant à la quantité d'algues. A partir de ces données, la biomasse serait ainsi composée de 29,6 % de carbone organique. Ce pourcentage est éloigné des 50 % de carbone

communément observés et des 48.8 % obtenus précédemment dans les expérimentations sur le phosphore (Sous-chapitre 4. 1, p 157). Ces valeurs faibles pourraient indiquer que le carbone organique a été sous-estimé ou bien qu'il a été consommé par les bactéries hétérotrophes en présence.

La raison analytique pourrait être un brassage insuffisant par le barreau aimanté sur le passeur d'échantillons créant une hétérogénéité avant le prélèvement automatique. Néanmoins, au vu des bonnes corrélations précédentes, si l'échantillon a décanté, il semble avoir décanté de façon proportionnelle dans tous les échantillons. La consommation du COT par les bactéries hétérotrophes ne peut cependant pas être écartée, puisque le carbone organique dissous initial est d'environ  $190 \text{ mg C.L}^{-1}$  et la croissance algale apporte l'oxygène nécessaire à leur croissance. Ne pouvant déterminer les raisons exactes, ce pourcentage de 29,6 % est donc conservé pour l'exploitation des résultats.

Le taux de transfert, c'est-à-dire le pourcentage de  $\text{CO}_2$  transféré dans le milieu par rapport à la quantité injectée, est calculé à l'aide de l'évolution des concentrations en carbone organique et inorganique du milieu. Il inclut le carbone intégré dans la biomasse algale. La Figure 69 représente l'évolution du taux de transfert en fonction du temps pour le débit intermédiaire, Q2. Ce taux de transfert augmente au cours du temps pour tous les débits non nuls, Q1 à Q5. Le taux de transfert est faible au début du batch ( $< 5\%$ ) et augmente progressivement jusqu'à environ 60 % après 65 h.

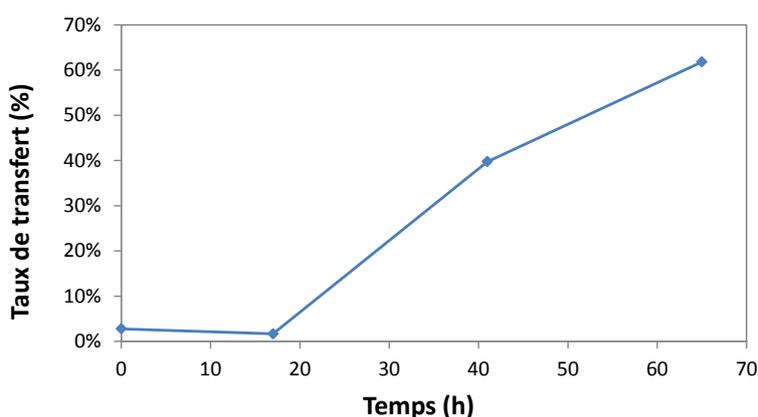


Figure 69 : Evolution du taux de transfert en fonction du temps dans la culture en batch pour le débit Q2.

La concentration en microalgues variant au maximum entre  $2.10^4$  et  $6.10^5$ , il est peu probable que l'évolution du transfert soit due au milieu, puisque le coefficient alpha (1,13) n'est pas significativement différent entre des concentrations de  $6,7.10^4$  et de  $1,2.10^5$ . Durant la croissance, le paramètre influençant le transfert et qui évolue est le carbone inorganique dissous. La Figure 70

représente le taux de transfert en fonction de la concentration en carbone inorganique dissous. Le taux de transfert passe ainsi d'environ 5 % pour une concentration en carbone inorganique de 40 mg.L<sup>-1</sup> à 65 % lorsque le TIC chute à 15 mg.L<sup>-1</sup>.

L'augmentation du transfert à partir de 30-40 h est donc due à 2 phénomènes associés à la plus forte productivité. D'une part la productivité augmentant, la biomasse stocke du carbone inorganique, sous forme de carbone organique, qui est pris en compte dans le transfert. D'autre part, la productivité plus élevée provoque une diminution du carbone inorganique dissous favorisant le transfert gaz liquide.

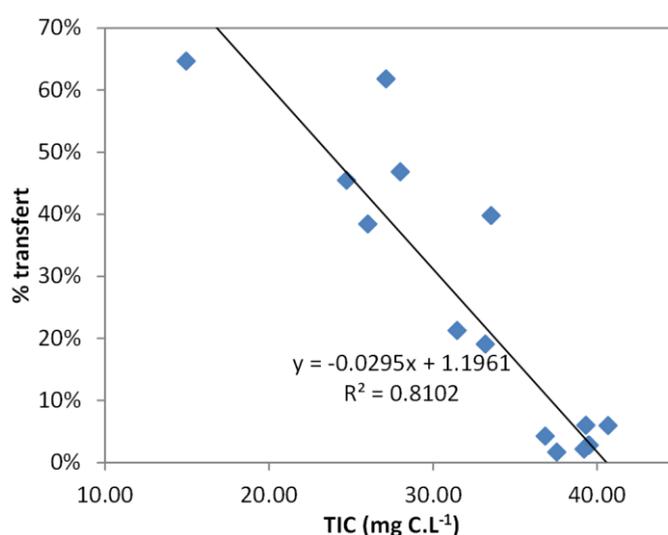


Figure 70 : Taux de transfert (%) en fonction de la teneur en carbone inorganique dissous du milieu.

La Figure 71 représente le carbone transféré depuis l'injection de dioxyde de carbone jusqu'à la biomasse algale entre 40 et 65 h de culture. Il est d'une part exprimé en valeur absolue et d'autre part en pourcentage de la quantité injectée. Le carbone inorganique transféré à la biomasse augmente en fonction du débit de 10 à 45 mg C.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour les débits Q1 et Q5 respectivement. Il est fortement lié à la productivité algale comme statué précédemment. En revanche, le pourcentage de carbone inorganique transféré diminue avec le débit de 56 à 29 % entre les débits Q1 et Q5.

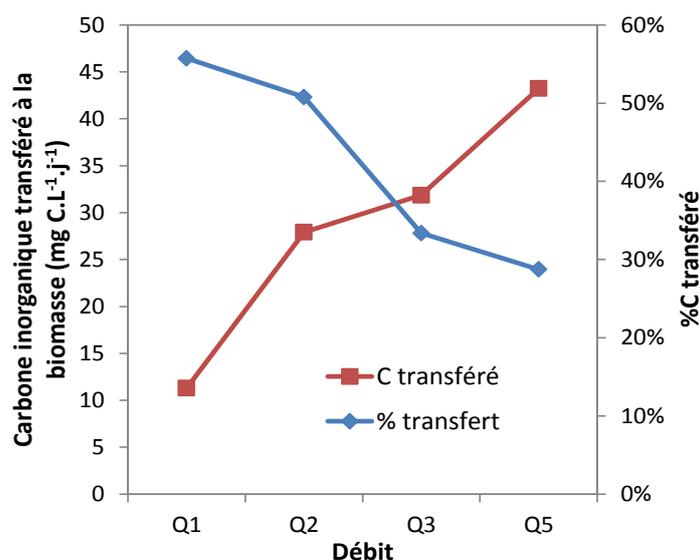


Figure 71 : Carbone transféré entre l'injection de CO<sub>2</sub> et la biomasse entre 40 et 65 h de culture en fonction du débit, exprimé en pourcentage et en valeur absolue.

L'efficacité du dioxyde de carbone est donc maximale pour des débits faibles, mais c'est aussi pour ces débits que la productivité est la plus faible. A l'inverse, lorsque la productivité algale est maximale (Q5), le transfert est réduit d'environ 50 % par rapport au débit Q1.

Cette observation a des conséquences en termes de procédé en fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> injectable à la culture. Si le gaz de combustion peut fournir des quantités excédentaires de CO<sub>2</sub> pour épurer tout l'azote, la productivité pourra être maximisée au détriment du transfert et donc de l'impact carbone du procédé. En revanche, si le carbone inorganique à fournir est limitant, il sera nécessaire d'optimiser le transfert et de faire des concessions sur la productivité pour globalement valoriser les nutriments du milieu.

### 3.2.3. Nutriments

Le suivi des concentrations des formes ioniques azotées et des phosphates a permis d'évaluer l'élimination de N et P. L'évolution des concentrations en azote et en phosphore est représentée Figure 72. L'ammonium varie au maximum entre 60 et 40 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup>, tandis que les phosphates passent de 10 à 5 mg P.L<sup>-1</sup>, montrant ainsi que ni l'azote, ni le phosphore (Sous-chapitre 4. 1, p 157) ne sont limitants.

L'épuration de l'azote (Nitrogen Assimilation Rate : NAR) suit la même tendance que la productivité algale et est donc maximale pour les débits de CO<sub>2</sub> maximums à 10.1 mg N.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle rapportée par Shi *et al.* (2007) qui ont obtenu 6,3 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>.

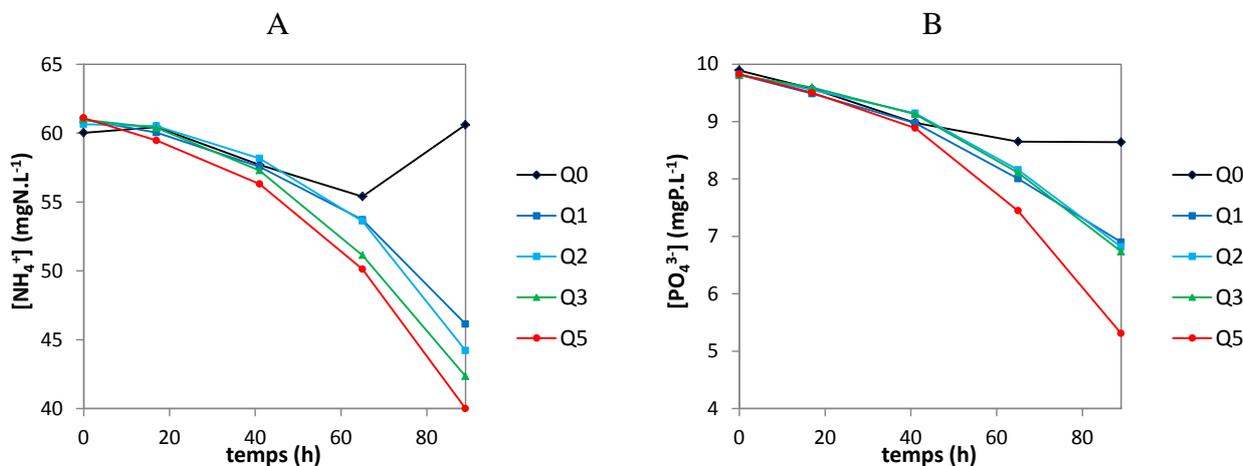


Figure 72 : Evolution de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> au cours de la culture algale à différents débits de CO<sub>2</sub>.

La bonne adéquation entre le NAR, défini à l'aide des concentrations en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, et la productivité ( $R^2 = 0.99$ ) permet de montrer que l'épuration de l'azote est principalement réalisée par assimilation algale dans cette étude. De plus, puisque la photosynthèse a lieu en continu (lumière en continue), la concentration en oxygène inhibe la dénitrification, évitant de ce fait une perte sous forme N<sub>2</sub>. Ainsi, en comparant la productivité algale et l'élimination de l'azote, il a été possible de déterminer que la biomasse contient environ 6,5% massique en azote. Cette valeur est comparable aux taux d'azote mesurés par d'autres auteurs pour *Chlorella vulgaris*, de 3,6 à environ 10 % (Griffing *et al.* 2007; Åkerström *et al.* 2014). Avec la teneur en carbone déterminée, le ratio C/N calculé est de 4,6 g C.g N<sup>-1</sup>. Ce ratio est cohérent avec les résultats obtenus pour l'étude du phosphore qui sont compris entre 4,4 et 4,8 g C.g N<sup>-1</sup> (Sous-chapitre 4. 1, p 157).

Comme pour l'azote, l'épuration du phosphore augmente avec le débit d'injection de CO<sub>2</sub>. Le maximum d'épuration est obtenu à 2,1 mg P.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour 0,52 L.min<sup>-1</sup>. L'équation de la vitesse d'épuration du phosphore montre une corrélation correcte avec la productivité (données non montrées). Néanmoins, le lien avec la productivité est moins marqué que pour le NAR avec un coefficient de corrélation de 0,85. Bien qu'il ait été reconnu dans la littérature que la quantité de phosphore intracellulaire soit soumise à variation (Powell *et al.* 2011), la concentration moyenne dans cette étude semble être de 0,9 %.

En outre, la nitrification s'est révélée très faible sur le temps de l'expérience, probablement à cause du manque de temps pour que les communautés de nitrifiantes (AOB) s'établissent. Une faible augmentation de NO<sub>x</sub> est néanmoins observée après 2 jours avec une augmentation

maximum de 0,25 mg N-NOx.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour les débits de 0,07 et 0,19 L.min<sup>-1</sup>. La nitrification est maximum pour des débits faibles, alors que les AOB ont besoin de carbone inorganique comme source de carbone au même titre que les algues. Cependant, il peut être supposé que de trop forts débits éliminent l'oxygène du milieu, ne permettant pas aux AOB d'accéder à leur accepteur final d'électron (O<sub>2</sub>) et limitant ainsi leur croissance.

#### 4. Modélisation de l'impact du carbone inorganique sur la croissance algale en jar-test

L'impact de la concentration en carbone inorganique seule a ensuite été étudié en système plus simple pour s'affranchir des transferts. Le système utilisé est un jar-test, dont le milieu synthétique est supplémenté en hydrogénocarbonate de sodium (solide) afin de pouvoir déterminer les constantes cinétiques relatives au C<sub>inorg</sub>.

##### 4.1. Modèle

La modélisation a été réalisée suivant le modèle développé précédemment dans le Sous-chapitre 3.3 (p 144), intégrant la limitation de la croissance par la lumière, la couleur du milieu et la concentration en biomasse. Afin d'ajouter le phénomène de limitation de la croissance en fonction du carbone inorganique, un terme de Monod a été utilisé :

$$\frac{S_{C_i}}{S_{C_i} + K_C}$$

L'impact du phosphore n'a pas été considéré, puisque la concentration en P a été fixée à une valeur suffisante pour éviter l'épuisement. Le modèle utilisé pour les simulations est ainsi défini dans le Tableau 34. Comme pour les modèles précédents, il n'a pas été possible de déterminer la mort de la biomasse puisque les paramètres  $\mu_{max}$  et  $b$  sont fortement corrélés dans nos expérimentations.

**Tableau 34 : Matrice de Petersen représentant l'influence de la lumière et du carbone inorganique sur la croissance algale.**

	X <sub>A</sub>	S <sub>N</sub>	S <sub>C<sub>i</sub></sub>	Lumière	Process rate
1 Microalgae growth	1	-i <sub>N,X<sub>A</sub></sub>	-1/Y <sub>A</sub>		$= \mu_{max} \cdot \frac{\text{Light}}{\text{Light} + K' \cdot X_A} \cdot \frac{S_{C_i}}{S_{C_i} + K_C} \cdot X_A$
2 Death	-1				$= -b \cdot X_A$

Avec Y<sub>A</sub> le rendement de croissance de X<sub>A</sub> (g X<sub>A</sub>.g S<sub>C<sub>i</sub></sub><sup>-1</sup>)

La Figure 73 représente l'évolution du carbone inorganique en fonction du temps de culture. Les variations sont dues d'une part à la consommation du carbone inorganique par la biomasse et les pertes sous forme gazeuse et d'autre part à l'ajout de  $\text{NaHCO}_3$  réalisé manuellement pour maintenir des niveaux de carbone inorganique en solution différents.

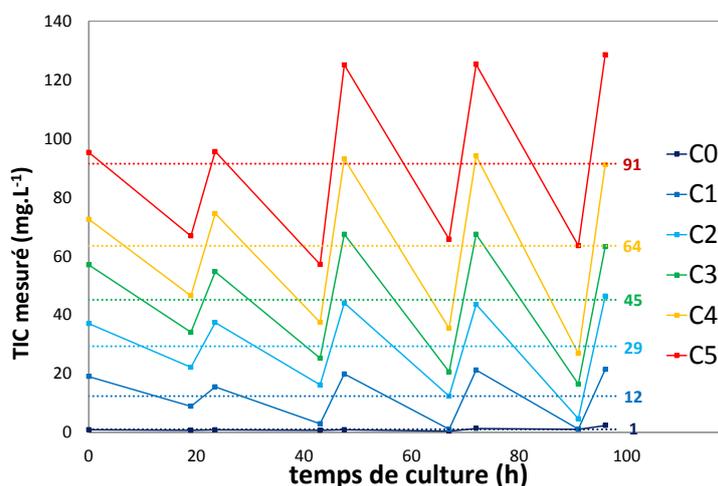


Figure 73 : Evolution du carbone inorganique total en jar-test. Les concentrations sont ajustées manuellement pour fixer 6 niveaux de concentration (C0 à C6).

La concentration en carbone inorganique étant variable pour chaque condition, une extrapolation linéaire entre les points de mesure a été utilisée pour servir d'entrée de simulation.

#### 4.2. Calage et simulation

Comme les expérimentations précédentes ont pu le montrer, la croissance algale est fonction de la quantité de carbone inorganique fournie. Puisque la communauté algale est la même que pour les expérimentations sur le phosphore (*Chlorella* dominant), les paramètres  $h$  et  $K'$ , représentant respectivement la modulation du coefficient d'atténuation de la lumière en fonction de la concentration algale et l'équivalent de la constante de demi-saturation du modèle de Contois, ont été conservés. Seuls le taux de croissance maximum,  $\mu_{\text{max}}$ , et la constante de demi-saturation  $K_C$  ont été calés avec les données expérimentales.

Le calage a été réalisé sur la concentration en microalgues, la concentration en carbone inorganique étant soumise à des variations indépendantes de la biomasse (pertes gazeuses de  $\text{CO}_2$ ) à l'aide d'un algorithme Nelder-Mead (Nelder and Mead 1965). Ce data fitting n'a été réalisé que sur les conditions C1 à C5, puisque malgré l'absence de carbone inorganique dans C0, les microalgues ont poussé. Cela peut être expliqué par la configuration rustique du système qui présentait une forte

surface d'échange gaz-liquide au vu du volume, permettant aux algues d'accéder au dioxyde de carbone atmosphérique.

Les paramètres  $\mu_{\max}$  et  $K_C$  ainsi obtenus sont respectivement égaux à 1.06 j et 5.34 mg C-inorg.L<sup>-1</sup>. La Figure 74 représente les concentrations en microalgues expérimentales et simulées pour les conditions C0 à C5.

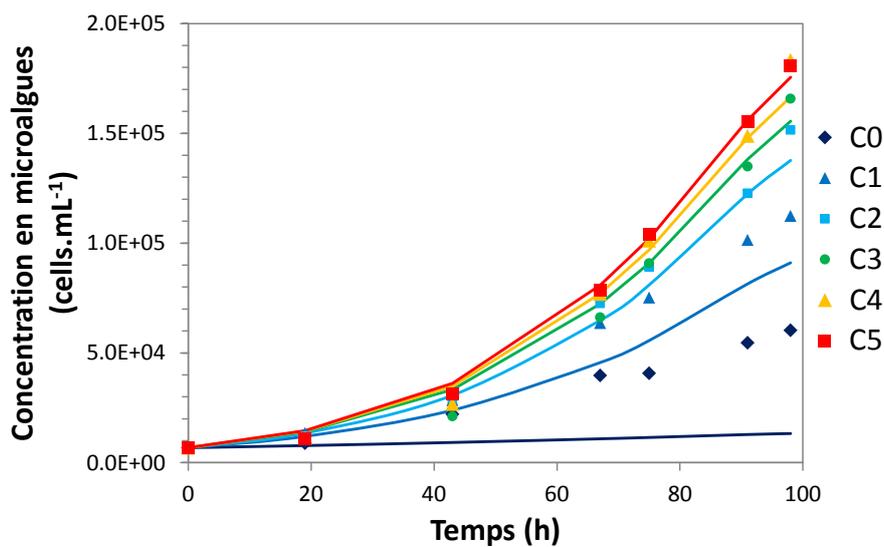


Figure 74 : Concentrations en microalgues expérimentales et simulées pour les conditions C0 à C5.

Les valeurs simulées sont assez proches des données expérimentales pour les conditions C2 à C5. En revanche, les concentrations simulées pour C0 et C1 sont éloignées des conditions expérimentales. Comme expliqué précédemment, les échanges gazeux avec l'atmosphère peuvent conduire à des quantités totales de carbone disponible supérieures aux concentrations mesurées.

Il a donc été possible d'accéder à un ordre de grandeur de la constante de demi-saturation pour le TIC, mais il serait nécessaire de concevoir des expérimentations plus appropriées pour déterminer précisément cette constante et déterminer l'impact des différentes formes du carbone inorganique (CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

## 5. Conclusions

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montrés que les transferts gazeux ne sont pas impactés par le digestat dilué (de 1/30 à 1/50) mais que la suspension algale a permis d'augmenter sensiblement les transferts par rapport à l'eau claire ( $\alpha = 1,16$ ). Par ailleurs, la quantité de carbone inorganique fournie au milieu de culture impacte directement la croissance de la biomasse algale.

Ainsi, une croissance maximale de  $160 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  a été observée pour le débit maximal de  $\text{CO}_2$ , ce qui correspond à une assimilation de l'azote et du phosphore de l'ordre de  $10,1 \text{ mg N.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et  $2,1 \text{ mg P.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  respectivement. Ces données de croissance semblent assez proches de l'optimum atteignable dans ces conditions de culture, d'environ  $180 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , au vu de la productivité en fonction du débit de  $\text{CO}_2$ . Le transfert maximum du  $\text{CO}_2$  jusqu'à la biomasse obtenu est de 65 %. En outre, l'efficacité du transfert de dioxyde de carbone diminue lorsque le débit est augmenté. En fonction des quantités de gaz d'échappement disponibles, un compromis peut donc être nécessaire pour éliminer la majeure partie de l'azote du milieu. De plus, la modélisation de la croissance algale en fonction du carbone inorganique a permis d'approcher la constante de demi-saturation du TIC, qui est égale à  $5.34 \text{ mg TIC.L}^{-1}$ .



**CHAPITRE 6. Influence du temps de séjour des solides sur les mécanismes d'épuration dans un écosystème algues-bactéries**

## 1. Introduction

La digestion anaérobie, procédé qui permet de convertir la matière organique en biogaz afin de produire de l'énergie, est en plein essor en France pour le traitement et la valorisation des déchets et effluents organiques et plus particulièrement dans le cas de la méthanisation agricole (115 unités en fonctionnement fin 2013). Les nutriments présents dans les effluents traités sont minéralisés, ce qui les rend plus biodisponibles mais aussi, dans le cas de l'azote, plus volatils et donc parfois plus difficile à conserver. Ils peuvent être valorisés par épandage direct du digestat ou, dans le cas de zones en excédent structurel, peuvent être en partie traités ou exportés pour réduire la pression azotée et phosphorée sur les sols. Plusieurs solutions existent pour épurer ou valoriser les nutriments des digestats de méthanisation telles que la nitrification-dénitrification, le traitement membranaire, le stripping de l'ammoniac, le séchage ou la précipitation sous forme de struvite. Bien que développée pour les lisiers de porcs, la technologie de nitrification-dénitrification n'apporte une solution que pour l'azote et, de plus, il s'agit d'un procédé d'élimination sans valorisation avec des coûts énergétiques importants, notamment liés à l'apport d'oxygène pour la nitrification. En France, environ 2110 kt d'engrais de synthèse sont utilisés chaque année, alors que les quantités mises en jeu dans les effluents d'élevage représentent environ 1820 kt/an. Il serait donc dommage d'éliminer totalement l'azote des effluents en consommant de l'énergie pour faire plus d'engrais de synthèse. De même, le phosphore est un élément indispensable à la vie et une ressource limitée qui doit être recyclée au maximum (Cordell *et al.* 2009).

Au contraire, les procédés de stripping de l'ammoniac avec récupération sous forme de sulfate d'ammonium par exemple et de précipitation de struvite sont des technologies permettant un recyclage des produits obtenus et donc des nutriments. Cependant, chacun de ces procédés n'apporte qu'une solution d'élimination incomplète des nutriments et ils nécessitent donc d'être couplés pour un recyclage de l'azote et du phosphore. De plus, ils nécessitent l'utilisation d'additifs (acides, bases, etc...), ce qui implique des coûts de fonctionnement importants et des difficultés techniques. Les technologies membranaires et de séchage permettent une concentration des nutriments et donc un recyclage plus facile. Toutefois, l'application de ces technologies sur des effluents concentrés et complexes tels que les digestats nécessitent des besoins énergétiques et/ou technologiques rendant leur application complexe et coûteuse. Ainsi, la culture de microalgues apparaît potentiellement comme une solution plus rustique et plus économique pour le traitement des digestats et permettant un recyclage combiné de l'azote et du phosphore et/ou une baisse des

coûts de fonctionnement pour une élimination de l'azote à travers une synergie microalgues/bactéries.

La technologie qui semble la plus adaptée pour traiter ces effluents et y cultiver des microalgues est le lagunage à haut rendement (HRAP : high rate algal pond) (Oswald 1988). Les HRAP sont plus avantageux que le lagunage classique pour des raisons financières (coût initial et opérationnel) et pour les plus fort taux d'épuration (Craggs *et al.* 2012). Ce type de procédé est généralement conduit en continu ou en semi-continu.

Néanmoins, l'épuration à l'aide de microalgues doit se mesurer à un certain nombre de critères technico-économiques afin de pouvoir être transposée dans l'industrie. Pour ce faire, il est important de maîtriser les paramètres du procédé et notamment, un des plus importants, le temps de séjour des solides, en anglais « solid retention time » (SRT) (Valigore *et al.* 2012). Ce paramètre opérationnel pilote le flux de nutriments retirés, il est donc un paramètre de dimensionnement important. L'extraction étant réalisée en discontinue, la dynamique de l'extraction des solides est pilotée par la fréquence d'extraction de la biomasse.

En outre, d'autres processus biologiques peuvent avoir lieu en même temps que la croissance algale, comme la croissance bactérienne, la nitrification, la dénitrification, etc. (González-Fernández *et al.* 2011). Le SRT et la fréquence d'extraction de la biomasse ont un impact direct sur ces processus et sur les liens avec la biomasse algale. La compréhension de l'influence de ces paramètres apparaît donc primordiale pour une maîtrise des processus et donc du procédé. Ces paramètres ont donc été étudiés avec le pilote développé lors de ce travail afin d'approcher l'impact sur les processus mis en jeu.

## **2. Résultats et discussion**

Le temps de séjour des solides (SRT) correspond au temps moyen que passe la biomasse en contact avec l'effluent à traiter. Dans ce type de procédé, les nutriments sont éliminés du système lors de l'extraction des solides puisqu'ils sont assimilés par les microalgues et donc contenus dans la phase solide. Plus on réduit le SRT, dans une certaine mesure, plus on augmente l'extraction des nutriments et donc l'épuration du système. A l'inverse, dans des procédés tels que la nitrification-dénitrification, on va chercher à maximiser le temps de séjour des solides pour augmenter la concentration en microorganismes et donc la capacité épuratoire du procédé.

Un autre paramètre important qui est fixé ici dans toutes les expériences est le temps de séjour hydraulique, en anglais « hydraulic retention time » (HRT), correspondant au temps moyen

que passe l'affluent dans le système. Le HRT est plus long que le SRT pour la culture algale à partir de digestat, car il est nécessaire de réaliser plusieurs bâchées avec la même phase liquide pour éliminer les nutriments du digestat. A l'inverse, dans un procédé de nitrification-dénitrification, le temps de séjour hydraulique est plus faible que le SRT.

Les conditions testées représentent une gamme de SRT de 2.5 à 4.5 j (S2F1 à S4F1) et une gamme de fréquence d'extraction de 1 à  $0.33 \text{ j}^{-1}$  (S3F1 à S3F0.33) comme décrit 3.2.4 (p 109).

### 2.1. Batch initial

Afin d'établir la communauté algale, les réacteurs ont été initialement conduits en batch pendant 14 jours. Les concentrations en microalgues mesurées sont représentées Figure 75 et passent de  $3,3 \cdot 10^3$  à  $2,9 \pm 0,4 \cdot 10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$  durant le temps du batch. Cette croissance initiale permet en outre de vérifier la répétabilité des réacteurs.

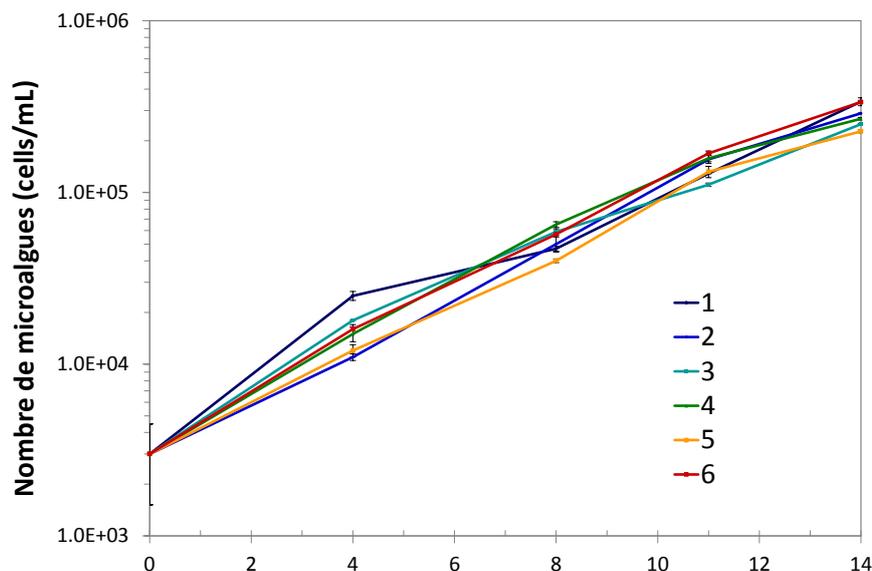
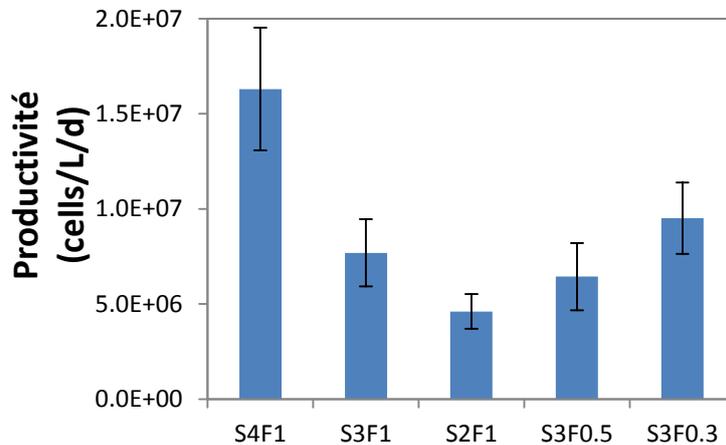


Figure 75 : Concentration en microalgues dans les 6 réacteurs durant le batch précédent l'étude du temps de séjour des solides.

### 2.2. Croissance des microalgues

La croissance des microalgues dans un écosystème complexe sur la gamme de temps de séjour des solides (SRT) étudié a été observée. Pour des SRT de 2,5, 3,5 et 4,5 j et pour les 3 fréquences testées ( $1, 0,5$  et  $0,33 \text{ j}^{-1}$ ), la concentration de stabilisation atteinte reste très faible entre  $1,5$  et  $4 \cdot 10^4 \text{ cells.mL}^{-1}$ , correspondant approximativement à des concentrations matière sèche de 15-

39 mg.L<sup>-1</sup>. Cela peut s'expliquer par la couleur de l'effluent qui est très forte, laissant peu de lumière aux microalgues pour croître. Toutefois, cette concentration pourra être augmentée en abaissant la D.O. du milieu (Marcilhac *et al.* 2014) et/ou en augmentant le SRT.



**Figure 76 : Productivité des microalgues pour les différentes stratégies de temps de séjour des solides. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j<sup>-1</sup> respectivement.**

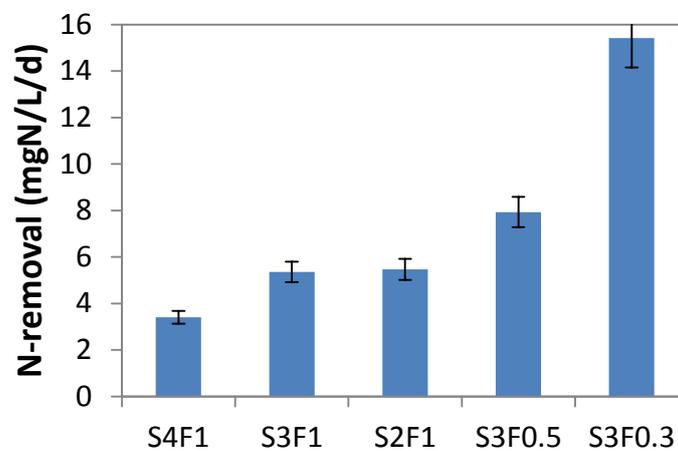
Au-delà de la concentration à l'équilibre, la productivité des microalgues est un paramètre majeur. Ainsi, la Figure 76 montre cette productivité algale à stabilisation en fonction du temps de séjour des solides et de la fréquence d'extraction de la biomasse. La productivité maximum est de  $1,63.10^7$  cellules.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> soit environ 16 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Cette valeur est plus faible que les productivités observées, de 20 à 40 mg.L<sup>-1</sup>, de *Chlorella* sur des effluents urbains et agricoles en lagunage à haut rendement (Fouilland *et al.* 2014).

La productivité des microalgues diminue avec le SRT comme on peut s'y attendre, car une plus grosse proportion de la biomasse est retirée pour 2,5 j que pour 4,5 j laissant un inoculum plus faible pour la croissance de la bâchée. La stratégie d'extraction n'a pas d'influence significative sur la productivité pour les fréquences de 1 et 0,5 j<sup>-1</sup> alors que la fréquence de 0,33 j<sup>-1</sup> conduit à une plus faible productivité. Pour cette condition, bien que le temps soit plus long entre deux bâchées, la quantité d'algues restantes au début doit être trop faible pour atteindre des productivités similaires aux deux autres conditions.

### 2.3. Dynamiques de l'azote

La Figure 77 représente l'azote épuré du milieu liquide en fonction des conditions étudiées. L'influence du temps de séjour ne révèle qu'un faible effet sur l'épuration de l'azote. Les

productivités algales pour S3F1 et S2F1 atteignent  $7,7.10^6$  et  $4,6.10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> respectivement alors que l'élimination de l'azote est identique statistiquement. De plus, pour le temps de séjour de 4,5 j (S4F1), l'épuration est plus faible alors que la productivité algale y est la plus forte que les deux autres temps de séjour. De la même manière, les productivités de S3F0.3 et S3F0.5 sont égales à  $9,5.10^6$  et  $3,9.10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, alors que l'azote épuré est de 7,92 et 15,42 mg N.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> respectivement. L'assimilation par les algues n'est donc probablement pas le seul phénomène expliquant la disparition de l'azote, d'autres mécanismes sont probablement en jeu (assimilation par bactéries, nitrification-dénitrification, stripping).



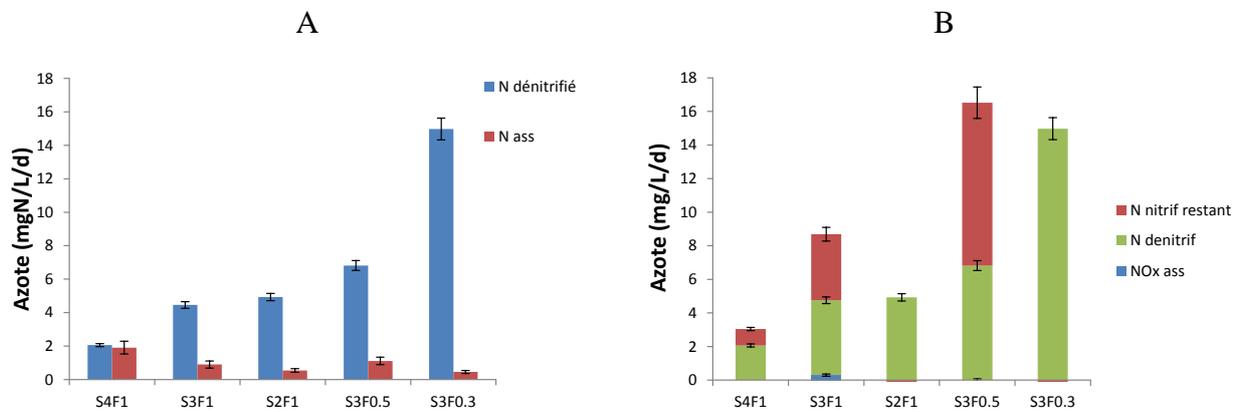
**Figure 77 : Elimination de l'azote en fonction du temps de séjour des solides et de la fréquence d'extraction. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j<sup>-1</sup> respectivement.**

La teneur en azote de la biomasse algale trouvée dans une précédente étude, réalisée avec le même dispositif expérimental et le même inoculum, est de  $1,17 \times 10^{-7}$  mgN/cell (CHAPITRE 4, p 155). A partir de ce chiffre, on peut estimer la fraction de l'azote épuré par assimilation par les algues. L'hypothèse de la teneur en azote identique est forte, puisque la teneur en azote des microalgues peut varier en fonction des conditions opératoires, or la composition du milieu de culture n'est pas identique à l'étude sur le phosphore. De plus, Dickinson *et al.* (2013) ont montré que la teneur en protéines était dépendante du temps de séjour des solides, non dissocié du temps de séjour hydraulique dans leur étude. Ces auteurs ont trouvé une teneur en protéines variant d'environ 20 % à 29 % pour des temps de séjour hydraulique respectifs de 4 et 2 jours.

Le stripping de l'ammoniac est ici considéré négligeable au vu du pH (régulé à 7) et du faible transfert liquide/gaz lié au faible volume de gaz parcourant le liquide. D'autre part, dans cet écosystème, on peut émettre l'hypothèse que l'assimilation par les bactéries est négligeable vis-à-vis de l'assimilation algale au vu de la faible teneur en matière organique et des observations

réalisées dans les expériences précédentes. En effet, pour être significative, elle serait principalement réalisée par des bactéries hétérotrophes qui sont assez défavorisées dans un milieu pauvre en matière organique biodégradable. En outre, leur impact sur l'épuration s'est révélé assez faible dans ce système dans une étude précédente en batch (Marcilhac *et al.* 2014). Pour le traitement des données, il a donc été considéré qu'il ne se passait que deux mécanismes principaux d'élimination de l'azote : l'assimilation par les microalgues et la nitrification-dénitrification. Le défaut de bilan sur l'azote a donc été attribué à la dénitrification.

La Figure 78.A représente les proportions estimées de l'azote assimilé et de l'azote dénitrifié en fonction des conditions étudiées.



**Figure 78 : Mécanismes d'élimination de l'azote estimés pour différentes stratégies d'extraction et temps de séjour hydraulique (A). Devenir de l'azote nitrifié (B). Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 0,5, 0,33 j<sup>-1</sup> respectivement.**

Dans le cas S4F1, environ 50 % de l'azote épuré est assimilé par algues. D'après les hypothèses que nous avons faites, les 50 % restants sont éliminés par nitrification-dénitrification. Pour les temps de séjour plus faibles, l'assimilation calculée est plus faible à cause d'une moindre productivité algale et inversement l'élimination par nitrification-dénitrification est plus élevée. L'impact de la fréquence d'extraction apparaît également très important sur les mécanismes d'élimination mis en jeu. Lorsque la fréquence diminue, la nitrification-dénitrification est favorisée atteignant une épuration jusqu'à 15 mg N/L/j pour S3F0.3. L'azote éliminé est alors majoritairement éliminé par dénitrification (97 %). Afin de mieux comprendre ces mécanismes de nitrification-dénitrification, nous avons essayé de dissocier ces 2 mécanismes et d'estimer les quantités nitrifiées et le devenir de cet azote nitrifié pour chaque expérimentation.

Lorsque l'ammonium était totalement consommé, il n'a pas été observé de limitation de la croissance des microalgues. Elles ont donc été capables d'utiliser les nitrates comme source d'azote comme cela a déjà été reporté dans la littérature (Converti *et al.* 2009) même si dans notre cas les quantités de nitrites et nitrates assimilées sont très faibles du fait de la présence de  $\text{NH}_4^+$  la plupart du temps. L'azote nitrifié a donc été considéré en tenant compte de la production observée de  $\text{NO}_x$ , du défaut de bilan attribué à la dénitrification et de l'azote assimilé sous forme de  $\text{NO}_x$  lorsque  $\text{NH}_4^+$  était totalement consommé.

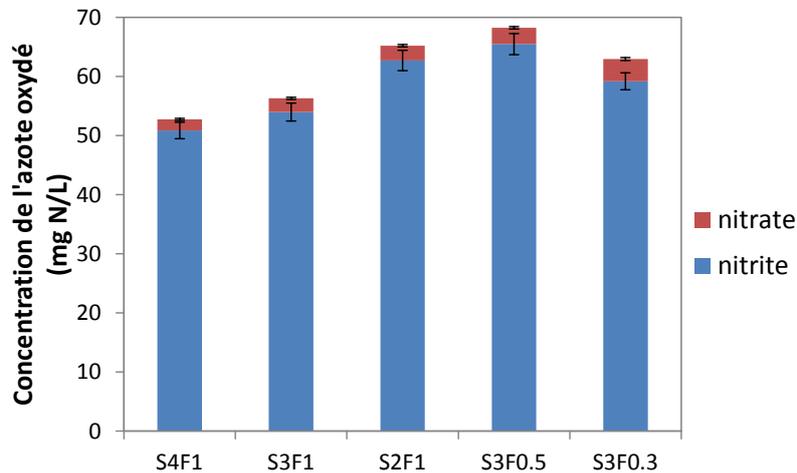
La Figure 78.B représente ainsi les quantités estimées d'azote nitrifié et le devenir de cet azote nitrifié en fonction des conditions. D'après ces résultats, les quantités d'azote nitrifié apparaissent très différentes d'une condition à l'autre allant de 3 à 17  $\text{mg N.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . L'azote nitrifié est plus important pour S3F0.5, atteignant 16,5  $\text{mg N.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . L'ordre contre-intuitif de la nitrification pour les 3 SRT peut être dû à deux effets simultanés. D'une part, l'effet antagoniste ou la compétition sur le carbone inorganique avec les microalgues limite le développement des AOB réduisant la nitrification (Marcilhac *et al.* 2014), pour les temps de séjours les plus longs. Pour les temps de séjours les plus courts, la production algale étant trop faible, l'oxygène produit n'est probablement pas suffisant pour permettre une bonne nitrification. De plus, les AOB sont partiellement lessivés au même titre que les microalgues pour les plus faibles temps de séjour. Pour ce qui est des fréquences d'extraction, l'azote nitrifié est équivalent pour S3F0.5 et S3F0.3, alors que la nitrification est plus faible pour la fréquence de 1  $\text{j}^{-1}$ .

La quantité d'azote dénitrifié semble être plus élevée pour les conditions où il y a moins de microalgues. Plus les temps de séjours des solides sont courts, moins les algues croissent et produisent de l'oxygène et donc plus la dénitrification est favorisée. Lorsque les solides sont retirés pour une fréquence de 0,33  $\text{j}^{-1}$ , une faible concentration en algues et la faible quantité d'oxygène résiduelle permettent la dénitrification, puis la croissance des microalgues favorise la nitrification. Cette succession permet une transformation de l'azote en  $\text{N}_2$ , sur le même principe que les bassins à aération séquentielle de certaines stations d'épuration.

Les pools d'azote éliminables, si la dénitrification est complète, sont les plus élevés pour le temps de séjour des solides de 3,5 j et pour les fréquences d'extraction faibles (0,5-0,33  $\text{j}^{-1}$ ). Il est possible d'envisager une post-dénitrification afin d'atteindre des niveaux d'épuration plus élevés.

Il a été observé, comme González-Fernández *et al.* (2011), que le principal mécanisme d'élimination de l'azote dans ce procédé en semi-continu est la nitrification-dénitrification. Ces auteurs ont trouvé dans leur système qu'environ 80 % de l'azote éliminé était nitrifié-dénitrifié.

Suivant l'objectif du procédé, il est ainsi possible de valoriser la majorité de l'azote avec un faible rendement d'épuration ou plutôt de chercher un rendement d'épuration maximum en favorisant la nitrification-dénitrification.



**Figure 79 : Répartition de l'azote oxydé. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j<sup>-1</sup> respectivement.**

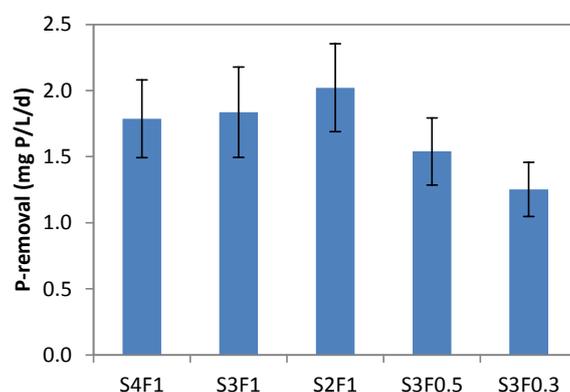
La Figure 79 représente la répartition de l'azote oxydé sous forme de nitrite et de nitrate. La grande majorité des NO<sub>x</sub> est constituée de nitrites, les nitrates restant en faible concentration. Cela peut s'expliquer à cause du niveau d'oxygène, car la nitratisation nécessite plus d'oxygène que la nitritation et que séquentiellement, l'oxygène est d'abord utilisé pour faire des nitrites. De plus, les bactéries nitritantes (AOB) ont une plus forte affinité avec l'oxygène que les bactéries nitratantes (NOB) (Blackburne *et al.* 2008). La nitrification étant partielle, suivie d'une dénitrification, le système dénitrifie en shuntant les nitrates. La dénitrification à partir des nitrites est possible en présence de faibles concentrations en oxygène, ce qui n'est pas le cas pour la réduction des nitrates en nitrites (Hernandez and Rowe 1987).

De plus, le shunt des nitrates est assez avantageux par rapport à la matière organique pour ce système relativement pauvre en MO facilement biodégradable, car il utilise moins de carbone exogène (1,71 g DCO/g N) que la nitrification-dénitrification en passant par les nitrates (2,86 g DCO/g N) d'environ 40 %. Par ailleurs, il a été remarqué une vitesse de dénitrification 1,5 à 2 fois supérieure en passant par les nitrites qu'en passant par les nitrates (Abeling and Seyfried 1992). Il serait intéressant dans ce système de mesurer les émissions de protoxyde d'azote, car nous avons considéré que l'azote était exclusivement converti en N<sub>2</sub>, mais les conditions sont assez favorables à la production de N<sub>2</sub>O (peu de matière organique, peu d'oxygène, beaucoup de nitrites). Le N<sub>2</sub>O

étant un gaz à effet de serre très délétère pour la couche d'ozone, cela poserait de forts problèmes environnementaux.

#### 2.4. Elimination du phosphore

La Figure 80 représente la quantité de phosphore éliminée par jour en fonction des conditions. En moyenne, il n'y a pas de différence significative (t-student, 5 %) entre les conditions de SRT d'une part et de fréquence d'autre part, car les variations entre les réplicats sont importantes (16 %), mais la dynamique du phosphore est complexe (assimilation pour métabolisme, stockage, précipitation).



**Figure 80 : Elimination du phosphore en fonction du temps de séjour des solides et de la fréquence d'extraction. Les conditions S4F1, S3F1, S2F1, S3F0.5, S3F0.3 correspondent à des temps de séjour des solides de 4,5, 3,5, 2,5, 3,5 et 3,5 j et à des fréquences d'extraction de 1, 1, 1, 0,5, 0,33 j<sup>-1</sup> respectivement.**

Bien que la disparition du phosphore du milieu ne soit pas statistiquement corrélée aux conditions de SRT et de fréquence d'extraction, la productivité algale est différente suivant les conditions (Figure 76). Cela signifie que la teneur en phosphore des solides change en fonction de la stratégie d'extraction des solides.

En comparant les conditions S4F1 et S2F1, l'élimination du phosphore du milieu est similaire tandis que la productivité est 4,5 fois plus forte dans ce premier cas que dans le second. On peut émettre l'hypothèse que pour les faibles temps de séjour les microalgues font un stockage du P conduisant à une suraccumulation, tandis que pour le temps de séjour le plus long (4,5 j), elles font moins de réserves car la population est plus stable et moins renouvelée. Cette hypothèse est en accord avec Powell *et al.* (2011) qui ont observé successivement un stockage du phosphore et une forte croissance sans que ces deux phénomènes soient simultanés.

Pour les fréquences d'extraction, la productivité et l'élimination du phosphore sont assez proches pour ces 3 conditions ne permettant pas la mise en évidence de différences.

**Tableau 35 : Ratio N :P éliminé en fonction des conditions de temps de séjour des solides et de fréquence d'extraction.**

	S4F1	S3F1	S2F1	S3F0.5	S3F0.3
Ratio					
$N_{\text{éliminé}}/P_{\text{éliminé}}$ (g N/g P)	$2,3 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,6$	$4,6 \pm 1,3$	$10,7 \pm 3,0$
Ratio					
$N_{\text{assimilé}}/P_{\text{éliminé}}$ (g N/g P)	$1,1 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$

Le Tableau 35 représente le ratio azote/phosphore éliminé dans les réacteurs en fonction des conditions. Globalement, les ratios sont très faibles comparés aux ratios de la biomasse algale de 11/1 ou 16/1 g N/g P (Grobbelaar 2011 ; Watson *et al.* 2011) surtout quand on considère l'épuration par la dénitrification qui ne consomme pas de phosphore (excepté pour le développement de la biomasse bactérienne). Les variations du contenu en azote observées par Dickinson *et al.* (2013) en fonction du temps de séjour étant de l'ordre de 30% sur une gamme proche de celle étudiée (2 à 4 j), cette approximation n'explique pas à elle seule les faibles ratios observés. Le stockage peut mener à des ratios intracellulaires similaires à celui du milieu d'après Lundquist *et al.* (2011). Cependant, les ratios observés sont très faibles au vu des ratios N/P du milieu qui sont de l'ordre de 4 g N.g P<sup>-1</sup>.

De plus, le phosphore peut être éliminé de 3 façons : assimilation, précipitation minérale ou association avec les solides en suspension. Cette dernière option est peu probable en raison de la faible teneur en solides en suspensions due à la centrifugation du digestat en amont. S'il ne s'agissait principalement que d'assimilation bactérienne, le ratio serait de 5 pour 1 environ, ce qui n'explique pas ces faibles ratios. Il est probable que des précipités de phosphore minéral tel du phosphate calcique ou de la struvite se forment dans ces conditions, ce qui expliquerait ces faibles ratios.

Tous ces résultats sont néanmoins à modérer quelque peu à cause de « l'effet de bord ». En effet, un biofilm s'est formé sur les parois de tous les réacteurs. Il a eu pour conséquence de diminuer l'accès à la lumière. De plus, bien que ce phénomène se retrouve aussi dans les sédiments en lagunes, il favorise la conservation des bactéries et de la matière organique (biomasse morte). En outre, on peut relever que les duplicats expérimentaux ont des comportements très proches, indiquant la répétabilité de l'expérience.

### **3. Conclusion**

Au vu des résultats obtenus, il apparaît qu'en mode semi-continu le mécanisme principal d'élimination de l'azote est la nitrification-dénitrification. Cependant, en fonction des conditions opératoires, il est possible de favoriser l'assimilation algale au dépend de l'épuration globale. On peut ainsi moduler la valorisation et l'élimination de l'azote avec les paramètres temps de séjour des solides et fréquence d'extraction de la biomasse. Dans ce système, la nitrification-dénitrification est réalisée via le shunt des nitrates, ce qui est avantageux au vu de la faible quantité de matière organique biodégradable disponible, mais présente le risque potentiel de fortes émissions de  $N_2O$ . Contrairement à l'azote, l'épuration du phosphore est assez déconnectée de la stratégie de gestion, cela peut être dû à la précipitation de sels de phosphates.

**CHAPITRE 7. Premiers éléments de dimensionnement et étude de faisabilité d'un procédé de culture de microalgues pour l'extraction et la valorisation des nutriments contenus dans les digestats agricoles**

A la suite des travaux scientifiques présentés dans les chapitres précédents, ce chapitre technique vise, à partir des éléments obtenus précédemment et d'éléments techniques et scientifiques additionnels, à étudier la faisabilité d'un procédé de culture de microalgues pour l'extraction et la valorisation des nutriments contenus dans les digestats agricoles. Cette étude technique se concentre sur la partie « culture » des microalgues qui est l'objet principal de ce travail de thèse en s'affranchissant dans un premier temps des problématiques de collecte/extraction des microalgues ou en les simplifiant au maximum. Pour cette étude de faisabilité et l'alimentation de la réflexion associée, une étude de cas a été réalisée en considérant les effluents issus d'un élevage de porcs de type « naisseur-engraisseur » de 200 truies localisé en Bretagne. Ainsi, un premier dimensionnement a été réalisé sur le procédé envisagé à la suite de la méthanisation de ces effluents : une culture algale pour traiter les digestats et produire un engrais. Ce dimensionnement est basé sur des résultats de simulation obtenus avec le modèle intégrant la limitation de la lumière décrit au Sous-chapitre 3. 3 (p 144). Il n'a pas vocation à être très précis, particulièrement au vu du peu de connaissances de la culture algale disponible, mais vise à déterminer les paramètres de dimensionnement pertinents pour de telles cultures (surface, SRT, etc.) ainsi que les ordres de grandeur des rendements associés.

### **1. Définition du système considéré**

#### 1.1. Caractéristique de l'élevage et du système de méthanisation

L'élevage considéré est de type « naisseur-engraisseur » avec 200 truies et leurs suites, le volume d'effluent liquide produit est ainsi d'environ  $3000 \text{ m}^3 \cdot \text{an}^{-1}$ . Cet effluent est ensuite méthanisé avec des co-substrats, puis le digestat est centrifugé pour éliminer la fraction solide et traiter la fraction liquide avec la culture algale. La concentration en azote de ces digestats liquides est d'environ  $3.5 \text{ g N} \cdot \text{L}^{-1}$  (Sous-chapitre 3. 1). Dans le cadre du procédé global envisagé, il est difficile d'estimer la quantité d'électricité produite puisqu'elle est fonction de la quantité de biogaz produite et donc des co-substrats ajoutés. Pour estimer cette quantité, nous nous sommes basés sur l'installation produisant le digestat D3 (Sous-chapitre 3. 1), puisqu'elle méthanise principalement du lisier de porc en terme d'effluents d'élevage. La puissance a donc été calculée en appliquant à la puissance de cette installation un ratio du volume de lisier produit dans l'élevage considéré sur le volume produit par l'installation de D3. La puissance électrique ainsi calculée est égale à environ 125 kW.

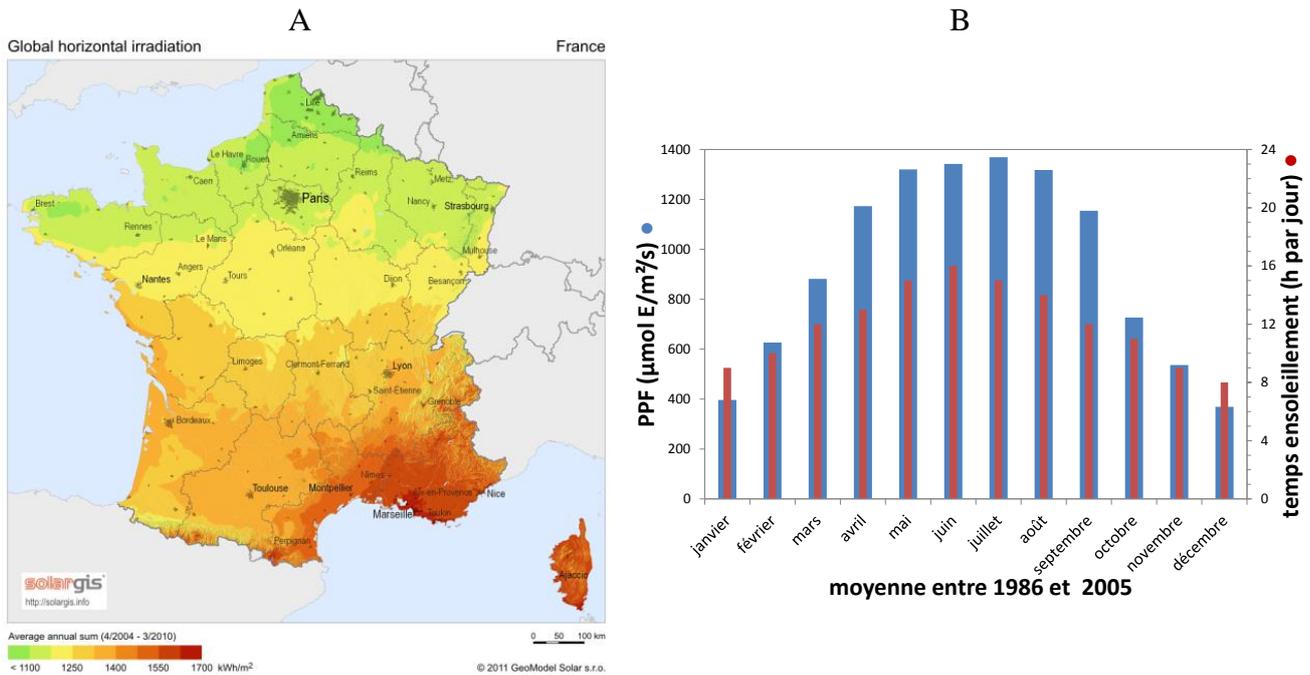
### 1.2. Description du procédé de culture de microalgues étudié

Dans le but de s'approcher d'un dimensionnement adapté à la culture algale à partir de digestat, plusieurs scénarii ont été simulés. Cette culture peut être conduite en semi-continu, mode qui semble le mieux adapté autant aux microorganismes épurateurs qu'au substrat. Le temps de séjour des solides, régissant la quantité de biomasse extraite et la concentration du milieu, a été testé entre 2,5 et 6,5 j à la fréquence d'extraction de  $1 \text{ j}^{-1}$ .

Sur une telle installation avec des effluents très chargés, on peut se fixer un objectif raisonnable d'élimination de l'azote d'environ 90 %. C'est la valeur qui a été utilisée dans les simulations.

### 1.3. Flux de lumière disponible

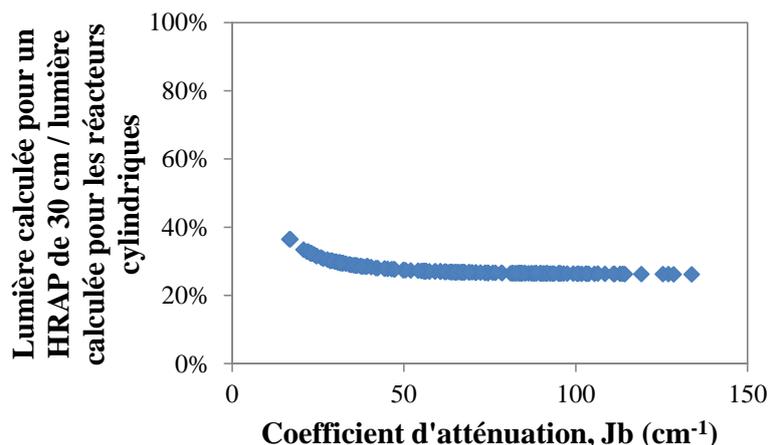
La répartition de l'irradiation solaire en France représentée sur la Figure 81.A est très variable suivant la zone géographique. Les plus fortes énergies solaires reçues sont d'environ 1700 kWh/m<sup>2</sup> annuels pour le bassin méditerranéen contre 1100 kWh/m<sup>2</sup> pour la partie nord de la France. Bien que les zones d'élevage intensif reçoivent globalement une irradiation plus faible, sur Rennes par exemple, le flux de photon moyen annuel est d'environ 930  $\mu\text{molE}/\text{m}^2/\text{s}$  en journée ce qui est comparable voir supérieur aux flux généralement étudiés pour la croissance des microalgues (Tableau 8 et Tableau 9).



**Figure 81 : Carte de l'irradiation solaire en France (A). Flux de photons photosynthétiques et temps d'ensoleillement moyens mensuels à Rennes (B).**

La Figure 81.B représente le flux de photons photosynthétiques moyen reçu au sol à Rennes (PPF) et la durée d'ensoleillement. Le PPF s'étend de 400 à 1370  $\mu\text{mol E}/\text{m}^2/\text{s}$  entre l'hiver et l'été. La conversion entre  $\text{kWh}\cdot\text{m}^{-2}$  et photons photosynthétiques a été faite sur la base d'une énergie moyenne de  $3,92\cdot 10^{-19}$  J par photon (entre 2,88 et  $4,96\cdot 10^{-19}$  J entre 400 et 700 nm), ce qui correspond à l'énergie moyenne sur la zone visible du spectre solaire en l'absence de nuages. De plus, la durée d'ensoleillement est variable de 8 à 12 h par jour. Ces deux données vont influencer la croissance algale et donc l'épuration. En outre, les mécanismes d'élimination de l'azote seront aussi influencés, la nitrification étant liée à la production d'oxygène par les algues.

En utilisant la méthode décrite en Sous-chapitre 3. 3 (p144), le flux de lumière disponible moyen calculé dans un HRAP de 30 cm de profondeur a été calculé et est équivalent à 27-36% de celui calculé dans nos photobioréacteurs selon le coefficient d'atténuation (Figure 82). Pour les simulations, deux valeurs de flux de photon ont ainsi été utilisées pour représenter les conditions en HRAP et en photobioréacteur comme ceux utilisés. Pour le HRAP, le flux de photons de  $930 \mu\text{mol E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  correspondant à la moyenne annuelle à Rennes a été réduit de 70 % pour les simulations, soit  $280 \mu\text{mol E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les valeurs de flux utilisées pour les simulations sont donc supérieures aux bornes de définition du modèle (40 à  $250 \mu\text{mol E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Il a été considéré que l'extrapolation du modèle est valable.



**Figure 82 : Rapport de la lumière calculée pour un HRAP de 30 cm sur la lumière calculée pour les photobioréacteurs cylindriques de 10 cm en fonction du coefficient d'atténuation.**

#### 1.4. Gaz d'échappement comme source de carbone

La combustion du biogaz afin de produire de l'électricité résulte en l'émission d'un gaz d'échappement contenant principalement du dioxyde de carbone (1.3 p 37). Or les microalgues ont besoin de  $\text{CO}_2$  comme source de carbone pour se développer. Le carbone inorganique qui peut être utilisé pour la croissance des microalgues est d'une part présent dans le digestat sous forme de carbonates et d'hydrogénocarbonates et d'autre part dans les gaz d'échappement résultants de la cogénération. Dans un but d'épuration des nutriments, il est important de savoir quelle quantité de  $\text{CO}_2$  il va falloir apporter pour assimiler tout l'azote mais aussi la quantité disponible sur site.

A partir de la caractérisation des digestats, il est possible de calculer la quantité de  $\text{CO}_2$  émise dans les gaz d'échappement par g d'azote à traiter. Les calculs réalisés à partir des BMP, de la qualité du biogaz et de la composition chimique de l'influent (matières volatiles, MV, et azote) sont détaillés dans le Tableau 36. Les rendements de méthanisation et de cogénération mènent ainsi à une production de  $\text{CO}_2$ , gazeux d'environ 3,9 g de carbone inorganique généré par gramme d'azote présent dans le digestat. Cette valeur est approximative car très dépendante de l'unité et des intrants de méthanisation.

**Tableau 36 : Calculs de la quantité de  $\text{CO}_2$  mobilisable pour la croissance des algues par gramme d'azote des digestats.**

Paramètre	Valeur	Unité	Gamme
BMP	250	NL/kg MV	250 à 350
% $\text{CH}_4$	55	%	55 à 70
Vol $\text{CO}_2$	454.5	NL $\text{CO}_2$ .kg MV <sup>-1</sup>	
m $\text{CO}_2$	892.3	g $\text{CO}_2$ .kg MV <sup>-1</sup>	

MV	50	kg.m <sup>-3</sup>	50 à 60
N	3.5	kg.m <sup>-3</sup>	2.5 à 5
MV/N	14.3	kg MV.kg N <sup>-1</sup>	
mCO <sub>2</sub> /N	3.9	g C.g N <sup>-1</sup>	

Le dioxyde de carbone a une solubilité élevée et est en équilibre avec l'acide carbonique et ses bases conjuguées. Lorsque le dioxyde de carbone est produit par les microorganismes en anaérobie, une partie du carbone inorganique reste dans la phase liquide et est ainsi conservée dans les digestats. Les concentrations en carbone inorganique soluble mesurées dans le digestat donnent un rapport  $C_{I, soluble}/N$  de 1,5 (3.2.3, p 107).

Afin d'étudier la viabilité du procédé, il est nécessaire de confronter les quantités nécessaires avec les quantités de CO<sub>2</sub> qui peuvent être fournies dans le procédé envisagé. Pour cela, des ordres de grandeur des rapports carbone / azote à différentes étapes du procédé ont été résumés Figure 83.

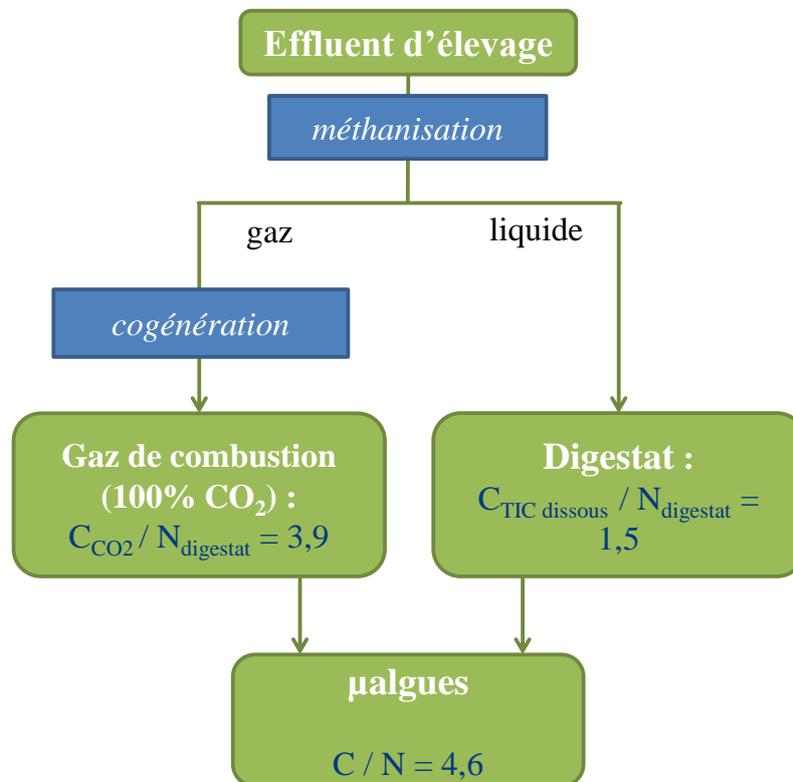


Figure 83 : Schéma des pools de carbone inorganique disponibles rapportés à l'azote à traiter.

Les résultats de nos essais mènent à un rapport C/N de 4,6 dans la biomasse algale (CHAPITRE 4, p155). Ainsi, un rapport C/N de 4,6 est à fournir à la biomasse et il est disponible sur site environ 5,4 g de carbone inorganique par g d'azote à épurer. Bien que la fraction dissoute soit directement disponible pour les microalgues, le gaz de combustion nécessite d'être transféré à la culture pour pouvoir être utilisé.

Concernant le transfert, le bilan d'utilisation du CO<sub>2</sub> dans nos essais (3.2.2, p 192) montre que le transfert du gaz, dans le milieu et dans la biomasse, varie de 0 à 65 % suivant la concentration en carbone inorganique du milieu et le débit. Avec un transfert optimiste de 65 %, il est possible de fournir 4,0 g C.g N<sup>-1</sup>. Si l'objectif d'abattement de l'azote est de 90 %, la quantité de carbone inorganique que l'on peut fournir est très proche de la quantité requise (4,1 g C.g N<sup>-1</sup>).

En termes de transfert sur une installation réelle, il serait intéressant de se placer dans des conditions non limitantes pour la croissance algale en carbone inorganique, par exemple vers 15-20 mg C.L<sup>-1</sup> dans le milieu, mais sans monter jusqu'à des concentrations trop élevées (> 30 mg C.L<sup>-1</sup>) qui limiteraient fortement le transfert. En outre, il a été montré que l'augmentation du débit a une influence négative sur le rendement de transfert, mais l'utilisation de gaz d'échappement plus concentré que dans l'étude du CO<sub>2</sub> de ce travail (1.3, p 37) permettrait d'utiliser un débit d'injection beaucoup plus faible. L'optimisation du transfert du CO<sub>2</sub> est donc un point clé si l'on désire utiliser le CO<sub>2</sub> de la cogénération pour éliminer les nutriments de la culture algale.

Parallèlement, la culture en lagune offre une forte surface d'échange avec l'air ambiant, ce qui peut soit favoriser l'utilisation par les algues du CO<sub>2</sub> présent dans l'air si le carbone inorganique dissous est faible, soit, au contraire, réduire le transfert réel à cause de pertes. De plus, les microorganismes hétérotrophes aérobies peuvent utiliser la faible quantité résiduelle de matières organiques du digestat pour croître, fournissant ainsi du CO<sub>2</sub> aux algues. Il a été observé dans la littérature (González-Fernández *et al.* 2011) et au cours du chapitre précédent que l'assimilation algale n'est pas le seul mécanisme d'épuration en procédé à taille réelle (alimentation semi-continue). En effet, ces auteurs ont conclu que dans ces conditions, le principal mécanisme d'épuration pouvait être la nitrification / dénitrification, jusqu'à 80 % de l'azote épuré. Selon les conditions, la croissance algale peut alors avoir principalement un rôle de fournisseur d'oxygène aux microorganismes nitrifiants. Ce rôle est non négligeable puisqu'il permet de s'affranchir d'une supplémentation en oxygène coûteuse. Sur les cultures, un écosystème complexe se met alors en place, permettant l'épuration de l'azote qui n'a pas été utilisé par les microalgues. Cependant, les bactéries nitrifiantes sont des microorganismes autotrophes, qui ont aussi besoin de carbone inorganique pour leur croissance. La quantité de CO<sub>2</sub> fournie à la culture algale dans le procédé envisagé pourrait être suffisante, mais l'écosystème nécessite d'être étudié en lagunage extérieur.

1.5. Thermique des bassins et réutilisation de la chaleur excédentaire

Les températures à Rennes entre 2000 et 2009 ont globalement varié en moyenne mensuelle de 6 à 18°C avec une moyenne de 12,1 °C. La température de développement optimale des microalgues semble se situer vers 25 à 35 °C (1.3 p 56), la température à Rennes semble donc trop faible pour faire croître efficacement des microalgues en extérieur toute l’année.

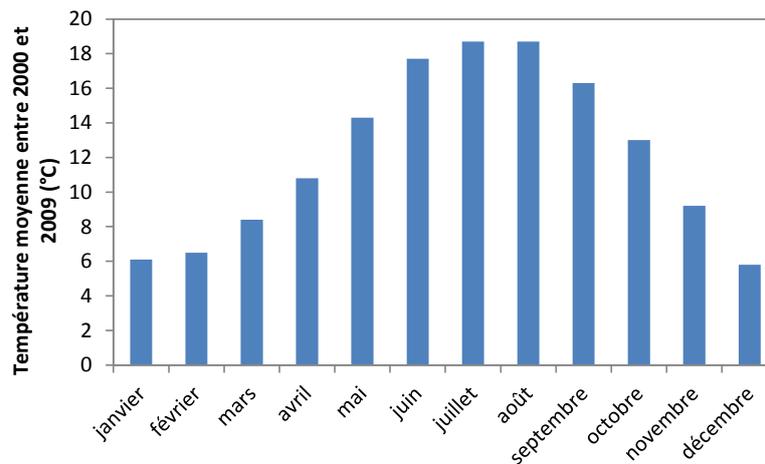


Figure 84 : Température moyennes mensuelles à Rennes entre 2000 et 2009

D’autre part, la méthanisation avec cogénération produit de l’énergie thermique partiellement utilisée pour chauffer le méthaniseur et les locaux de la ferme, mais un excédent d’énergie reste souvent inutilisé. Cette chaleur peut être utilisée pour chauffer des lagunages à haut rendement ou l’effluent afin d’approcher l’optimum de croissance des algues.

La cogénération a un rendement électrique d’environ 35 à 38 %, une conversion de l’énergie en chaleur entre 45 et 50% et des pertes énergétiques de 12 à 20 % dans les installations de biogaz agricoles (ADEME 2011). Il est estimé qu’environ un quart de la puissance thermique est utilisée pour maintenir le digesteur dans des conditions mésophiles vers 30-40 °C. La puissance thermique disponible sur site est ainsi d’environ 36 % et ce sans compter l’éventuelle utilisation de cette chaleur pour réchauffer les locaux. Le détail des calculs est résumé dans le Tableau 37 en prenant pour exemple le site dont le digestat D2 est originaire (Sous-chapitre 3. 1, p 115).

**Tableau 37 : Calculs de la puissance thermique excédentaire sur site (cas de D2)**

Paramètre	Valeur	Commentaire
Rendement cogénération sous forme de chaleur récupérable	45 %	45 à 50%
Dont X% utilisés pour chauffer le méthaniseur	25 %	
Soit environ	37 %	35 à 40 %
Puissance thermique disponible	125 kWt	sans prendre le chauffage des hangars en compte

La puissance thermique nécessaire pour amener et maintenir la masse d'effluent d'un lagunage est constituée de deux composantes principales : la puissance servant à chauffer la masse d'eau et la puissance servant à compenser les pertes thermiques. La température cible pour cette étude thermique est de 25 °C.

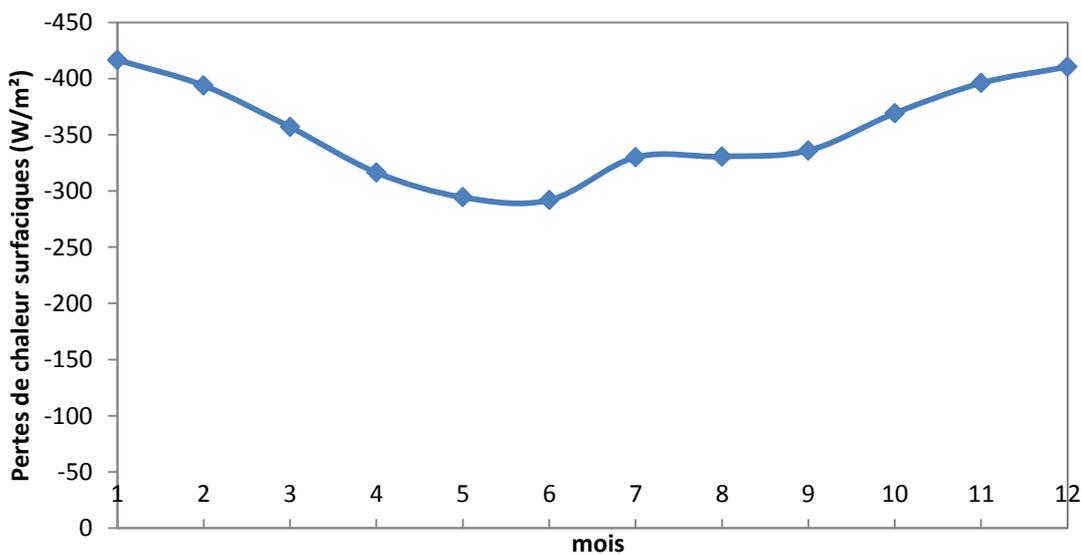
Les pertes thermiques ont été considérées telles que pour les piscines, c'est-à-dire composées des pertes par évaporation, par rayonnement et par convection (Tableau 38). De plus, la puissance apportée par l'ensoleillement a été prise en compte. Les pertes par conduction ont été, ainsi que dans la plupart des dimensionnements de piscines, considérées comme négligeables. Les pertes thermiques ainsi que l'ensoleillement ont été considérées par unité de surface en tenant compte des données météorologiques prises pour Rennes moyennées par mois (meteonorm v7.0.22.8). Les trois types de données sont l'ensoleillement (entre 1986 à 2005), la température et la vitesse du vent (entre 2000-2009). Les valeurs des différents paramètres utilisés pour ces calculs sont référencées en annexe 5 pour le cas du mois de juin.

**Tableau 38 : Calculs de la puissance dissipée par m<sup>2</sup> de bassin, cas du mois de juin.**

Nature	Valeur	Unité	Formule
Pertes par évaporations			
P evap =	<u>-381,8</u>	W.m <sup>-2</sup>	formule empirique : $\Phi = (25+19.V_v).S.(X-X').Lv$
Pertes par rayonnement			
P ray =	<u>-42,3</u>	W.m <sup>-2</sup>	$\Phi = \epsilon.\sigma.S.(T_s^4 - T_a^4)$ cas le plus défavorable avec facteur d'émission =1
Pertes par convection			
P conv =	<u>-55,5</u>	W.m <sup>-2</sup>	$\Phi = h.S.(T_s - T_\infty)$

Pertes par conduction			
P cond =	<u>0</u>	W.m <sup>-2</sup>	considéré négligeable
Ajout par ensoleillement			
P soleil =	<u>187,8</u>	W.m <sup>-2</sup>	$\Phi = P_{\text{soleil}} \cdot S \cdot c_A$
<b>Total</b>	<b>-291,8</b>	W.m <sup>-2</sup>	

La Figure 85 représente l'évolution de ces pertes surfaciques par mois. La perte globale surfacique calculée avec ces différentes pertes varie de - 290 W/m<sup>2</sup> en été à - 410 W/m<sup>2</sup> en hiver.



**Figure 85 : Pertes de surface calculée comprenant la puissance dissipée par évaporation, rayonnement et convection ainsi que la puissance apportée par l'ensoleillement.**

La seconde composante nécessaire pour effectuer un bilan thermique est la puissance apportée ou perdue par l'ajout d'effluent dans le système. Elle est totalement dépendante du dimensionnement et plus particulièrement de l'éventuelle dilution du digestat et du temps de séjour hydraulique. En effet, puisque le digestat est à 35 °C en sortie du méthaniseur mésophile, la dilution appliquée va directement impacter la température. Pour une production annuelle de 3000 m<sup>3</sup> de digestat, s'il n'est pas dilué, il va apporter de la chaleur (4,0 kW annuel) tandis que s'il est dilué au 10<sup>ème</sup> il faudra fournir environ 38 kW annuels pour compenser la différence de température. L'objectif étant bien sûr de tendre vers le premier cas de figure autant d'un point de vue énergétique que pour la consommation d'eau. Cela montre, outre la consommation en eau irréalisable économiquement et écologiquement, l'intérêt de la séparation des digestats afin de réduire au maximum la densité optique pour les traiter sans dilution. Sur une telle installation, si le digestat

n'est pas dilué, il serait alors possible de maintenir à 25 °C environ 310 m<sup>2</sup> en hiver et jusqu'à 440 m<sup>2</sup> en été sans fournir d'énergie additionnelle.

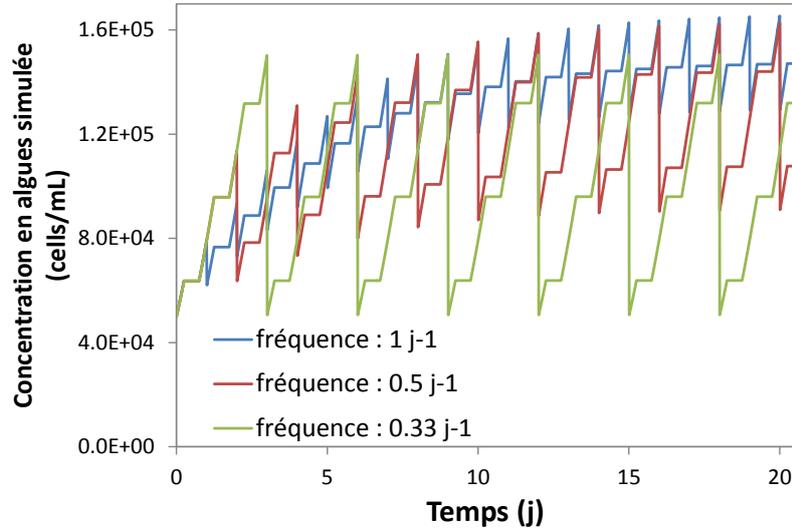
Faute de pouvoir déterminer précisément la température des bassins, puisqu'elle est dépendante de la surface que l'on cherche à déterminer, la température a été fixée arbitrairement à 25 °C dans les simulations suivantes.

### 1.6. Densité optique du milieu

Afin de réduire la surface de la culture, il faut réduire la densité optique de l'affluent au maximum. Un enjeu important se situe donc en amont de la culture algale sur la séparation liquide-solide des digestats. Avec une séparation poussée on peut envisager de façon raisonnable, pour les simulations, une couleur d'effluent de 0,2 (D.O. à 680 nm). Elle est proche du digestat D2 dilué au 10<sup>ème</sup> (Sous-chapitre 3. 1, p115).

## 2. Simulation numérique de la croissance algale et de l'épuration associée

La simulation de la croissance algale a été menée pour chaque condition de temps de séjour des solides, et différentes densités optique jusqu'à stabilisation de la population algale. Il a été montré que la fréquence d'extraction influence la croissance algale (CHAPITRE 6, p203). La Figure 86 représente l'évolution de la biomasse simulée pour 3 fréquences d'extraction différentes à un temps de séjour de 4,5 j<sup>-1</sup>. Puisque le modèle utilisé pour la croissance algale est le même que précédemment (Sous-chapitre 3. 3, p 144), les hypothèses associées sont les mêmes, notamment l'absence de mort de la biomasse. De plus, les éventuelles limitations en phosphore et en carbone inorganique n'ont pas été considérées par hypothèse simplificatrice, puisque ces paramètres peuvent être très variables suivant les installations de méthanisations.



**Figure 86 : Evolution de la concentration en biomasse simulée pour un SRT de 4,5 j et 3 fréquences d'extractions (1, 0,5 et 0,33 j<sup>-1</sup>) pour une D.O. de 0.2 et une lumière de 280  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .**

La croissance a été simulée pendant la journée, phase éclairée, et il a été considéré qu'il n'y avait ni croissance ni mort la nuit, ce qui donne des concentrations algales constantes en ces périodes nocturnes. L'extraction a été fixée en milieu de journée, c'est pour cela que la concentration chute drastiquement de façon périodique au milieu de la phase de croissance. On peut voir sur cette figure que pour un même temps de séjour des solides, l'impact de la fréquence est important. Pour une fréquence d'extraction de 0,33 j<sup>-1</sup>, la concentration chute à un niveau faible ( $7,4.10^4 \text{ cells.mL}^{-1}$ ), alors que pour une fréquence plus élevée, elle se stabilise à un niveau 1,6 fois supérieur ( $1,2.10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ ). Pour tous les SRT de 2,5 à 6,5 j simulés, une fréquence d'extraction de 1 j<sup>-1</sup> conduit à des vitesses d'assimilation par les algues plus élevées qu'à des fréquences inférieures. Au vu de la précision du modèle et des implications sur les mécanismes d'épuration, les simulations suivantes ont été réalisées avec une fréquence d'extraction des solides de 1 j<sup>-1</sup>.

La Figure 87 représente l'assimilation de l'azote par les microalgues simulé (A) et la concentration en microalgues à stabilisation (B) en fonction du temps de séjour des solides (SRT) entre 2,5 et 6,5 j aux flux de photons de 280 et 930  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Les simulations montrent que la quantité d'azote assimilée en fonction du SRT augmente jusqu'à une asymptote, puis diminue. Cette valeur maximale est de 5,3 et 11,4  $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , pour les couples flux et SRT suivants : 280  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 4,5 j, 930  $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 4 j.

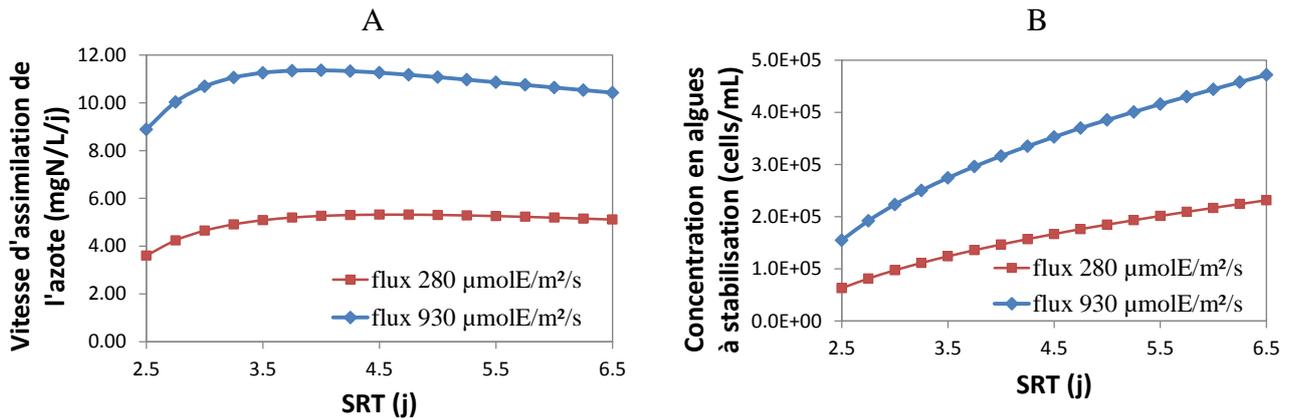


Figure 87 : Epuration de l'azote simulé (A,  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) et concentration en algues à stabilisation (B,  $\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) avec une D.O. de 0,2 et un flux de photons de 280 et de 930  $\mu\text{molE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

La concentration en algues à stabilisation augmente avec le temps de séjour et est en moyenne 2,2 fois plus élevée pour le flux de 930 que pour le flux de 2820  $\mu\text{molE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bien que la concentration à stabilisation augmente avec le temps de séjour, la vitesse d'assimilation calculée est réduite à cause de baisse de productivité pour les plus forts temps de séjour. Cependant, il faut garder à l'esprit que le modèle utilisé ne prend pas en compte la mort de la biomasse dont l'impact est plus important pour les temps de séjours les plus longs.

L'assimilation algale peut être simulée, mais il est difficile de donner l'optimum d'épuration dans ce type de système lagunaire, puisque l'assimilation algale n'est pas le seul processus mis en jeu. D'autres phénomènes ont lieu comme la nitrification-dénitrification qui peut être un phénomène majeur d'élimination de l'azote dans ces systèmes.

Les simulations numériques de ce modèle ne permettant d'accéder qu'à la fraction de l'azote assimilé par les microalgues, la nitrification-dénitrification a été basée sur les résultats obtenus dans le CHAPITRE 6 (p203). N'ayant pas toutes les informations nécessaires pour simuler la nitrification-dénitrification, il a été fait l'hypothèse forte que la nitrification-dénitrification était proportionnelle à l'assimilation algale. Cette hypothèse est discutable, mais elle est nécessaire dans l'état de nos connaissances afin d'approcher un dimensionnement. Selon ce principe, le cas le plus défavorable à l'épuration a été utilisé. Ce cas correspond à 52 % d'élimination de l'azote par nitrification-dénitrification et 48 % par assimilation.

### 3. Dimensionnement de la filière

Le schéma de la filière envisagée est représenté Figure 88. Il comprend l'injection du digestat dans une lagune de culture algale à haut rendement (HRAP), une séparation liquide-solide

pour d'une part extraire la biomasse et d'autre part récupérer le liquide interstitiel. Une partie de la phase liquide est ensuite rejetée (irrigation, ...) et l'autre partie est recirculée afin d'atteindre le rendement d'épuration souhaité.

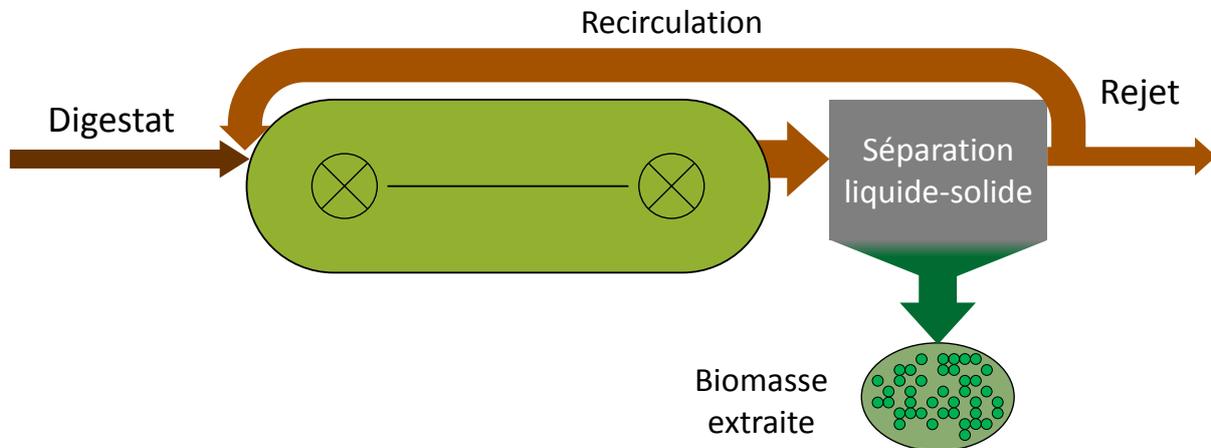


Figure 88 : Schéma de la culture de microalgues.

La comparaison des différentes simulations est réalisée sur plusieurs variables à incidence technico-économiques (surface, volume à séparer, recirculation).

A partir des données présentés ci-dessus et des données de modélisation associées, un dimensionnement des principaux paramètres de culture a été réalisé pour les différentes situations étudiées afin d'initier une discussion sur la faisabilité technico-économiques d'un tel système.

La surface est calculée à l'aide du flux d'azote à assimiler (propre à l'effluent) et de la quantité d'azote consommée par unité de volume obtenue en simulation (assimilation et nitrification-dénitrification) rapportée pour une hauteur de 30 cm.

$$\text{Surface (ha)} = \text{Volume (m}^3\text{)} / (\text{hauteur de la lagune (m)} \times 10\,000)$$

$$\text{Volume (m}^3\text{)} = \text{quantité à éliminer par jour} / (\text{quantité éliminée par L et par jour} \times 1000)$$

Le volume à séparer par jour est fonction de la concentration en microalgues, de la productivité et du volume total de la lagune :  $\text{Volume à séparer par jour} = \text{Productivité} * \text{Volume total} / [\text{microalgues}]$ .

La recirculation est calculée à l'aide du volume séparé par jour et du débit d'entrée comme suit :  $\text{Recirculation} = \text{volume à séparer par jour} / \text{volume entrant par jour}$ .

Le Tableau 39 décrit les résultats du dimensionnement pour le flux de photons de  $280 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et les trois SRT (2,5, 4,5 et 6,5). La surface de lagunage minimum nécessaire pour traiter les effluents de l'installation type pour une D.O. de 0,2 est de 0,78 ha et correspond au temps

de séjour 4.5 j. En revanche, la recirculation minimum et le volume à séparer sont obtenus pour le temps de séjour le plus élevé, le volume à séparer représente  $374 \text{ m}^3.\text{j}^{-1}$  soit 45 fois le débit d'entrée pour le SRT de 6,5 j à une densité optique de 0,2 à 680 nm.

**Tableau 39 : Dimensionnement d'une installation basé sur le temps de séjour des solides et sur la lumière pour une densité optique de 0,2 et un flux de photons de  $280 \mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .**

SRT (j)		2,5	4,5	6,5
Flux de lumière ( $\mu\text{molE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )		280	280	280
Concentration en algues à stabilisation	$\times 10^5 \text{ cells.mL}$	0,63	1,66	2,31
Assimilation calculée	$\text{mgN.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$	3,6	5,3	5,1
Nitrification-dénitrification, basé sur l'assimilation	$(\text{mgN.L}^{-1}.\text{j}^{-1})$	3,9	5,8	5,5
Surface	ha	1,15	0,78	0,81
Volume à séparer	$\text{m}^3.\text{j}^{-1}$	1381	519	374
Recirculation	x débit entrée	168	63	45

#### 4. Discussions

Le temps de séjour des solides est imposé par la quantité de biomasse extraite du système. Plus le temps de séjour est élevé, plus la concentration en algue est élevée en simulation, puisque la mort n'est pas considérée. En pratique, ces résultats sont probablement valables dans la mesure où la mort ne prend pas le pas sur la croissance. Cela signifie que pour des temps de séjour des solides élevés, le volume à séparer et donc la recirculation seront plus faibles. Cependant, séparer des quantités de  $400 \text{ à } 1400 \text{ m}^3.\text{j}^{-1}$  sur une exploitation agricole avec une centrifugeuse est irréalisable surtout compte tenu de la teneur en matières sèches faible (environ  $550 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mais il peut être envisageable de concentrer la biomasse à l'aide d'un clarificateur avant de la séparer. La décantabilité des microalgues doit cependant être vérifiée en préambule. En revanche, la recirculation du liquide interstitiel bien que très élevée, ne semble pas irréalisable sur une ferme. Pour réduire les volumes à séparer et donc la recirculation, il peut être intéressant d'atteindre une concentration en biomasse élevée, et donc un SRT long.

La diminution de la recirculation avec le SRT n'est pas vraie pour le dimensionnement de la surface, puisque des plus fortes concentrations en algues vont conduire à du self-shading et donc à une réduction de la productivité. La surface minimum est ainsi obtenue pour un SRT intermédiaire (4.5 j). Elle est assez élevée, mais la surface nécessaire pourrait être plus faible si la nitrification-dénitrification est plus importante, comme cela a été observé dans le CHAPITRE 6, jusqu'à 32 fois l'assimilation algale.

Au regard de la surface, il est inconcevable de maintenir la température à 25 °C avec la puissance thermique disponible sur site et la chaleur apportée par le digestat pour une installation située proche de Rennes. Cependant, si la nitrification-dénitrification atteint 97 % de l'assimilation algale, il serait possible de maintenir cette température toute l'année avec l'assimilation simulée.

La biomasse produite est équivalente dans tous les cas puisqu'elle est directement proportionnelle à la quantité d'azote à éliminer du système, selon l'hypothèse énoncée. La quantité de biomasse est ainsi égale à 74 tonnes par an pour cette unité type avec le ratio assimilation/nitrification-dénitrification appliqué.

Le flux de photons photosynthétiques utilisé dans les simulations est un flux de photons moyen, la lumière reçue et la croissance associée serait donc plus importante en été qu'en hiver. Un stockage des digestats serait donc nécessaire pour traiter le surplus d'effluents d'hiver en été.

En comparant une lagune à haut rendement avec un réacteur tubulaire recevant la même lumière en surface, le volume nécessaire pour traiter les effluents de l'installation seraient réduits d'un facteur de 2,1 environ et le volume à séparer ainsi que la recirculation seraient réduits d'un facteur 2 pour le SRT de 4,5. Le choix de photobioréacteurs peut être fait pour cette raison et dans le but d'extraire des produits à haute valeur ajoutée, au détriment d'un coût plus élevé. La société LDC Algae (Algae 2014) a fait ce choix et est en développement dans les Côtes d'Armor afin de cultiver des microalgues avec du lisier.

La surface nécessaire à l'épandage de la quantité d'azote assimilée par les algues est d'environ 31 ha (170 kg N/ha). On peut remarquer que le rendement d'utilisation de l'azote rapporté à la surface est donc environ 40 fois plus important pour les microalgues que pour les plantes supérieures. D'après Elser et al. (2000), les microalgues contiennent 3 fois plus de nutriments que les plantes terrestres ce qui reviendrait à un rendement massique d'environ 13 fois supérieur.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse a consisté à étudier un post-traitement et la faisabilité de son utilisation en complément de la digestion anaérobie pour mieux valoriser les digestats : la culture de microalgues. A l'aide d'expérimentations à l'échelle du laboratoire et de la modélisation biocinétique de la croissance algale prenant en compte les principaux paramètres de culture, un premier dimensionnement a pu être défini.

Les digestats de méthanisation agricole sont des effluents très chargés en nutriment et très colorés. Parmi les 3 digestats échantillonnés sur des exploitations agricoles, les teneurs en azote varient de 2,4 à 4,6 gN.L<sup>-1</sup> et les rapports azote/phosphore observés dans la phase liquide varient fortement de 38 à 135 gN-NH<sub>4</sub>.gP-PO<sub>4</sub><sup>-1</sup>, principalement à cause des équilibres physico-chimiques du phosphore. En outre, la couleur de la phase centrifugée de ces digestats est intense allant de 0,19 à 2,35 exprimée en DO à 680 nm et pour une dilution au 1/10. Pour chaque digestat, cette coloration est relativement constante dans le temps et, au-delà de cette valeur à 680 nm, ils absorbent sur l'intégralité du spectre visible. Par contre, la variabilité intra-site de la couleur de la phase liquide est très élevée, à cause principalement de la technique de séparation sur site, mais aussi de l'exploitation (lavages, intrants de méthanisation, etc.).

Un pilote d'expérimentations composé de 6 réacteurs indépendants de 2 L, développé pour ce projet, a été utilisé afin d'étudier les paramètres clés de la croissance des microalgues et de l'épuration du digestat. Ainsi, quatre séries d'expérimentations ont été réalisées pour quantifier l'impact (1) de la pénétration de la lumière (source d'énergie des algues), (2) du rapport azote/phosphore du milieu, (3) du carbone inorganique fourni et (4) d'un paramètre procédé, le temps de séjour des solides, sur la production de microalgues et l'assimilation de l'azote et du phosphore.

Puisque les microalgues autotrophes ont besoin de lumière pour se développer, l'enjeu de la couleur est très important car les digestats sont très colorés et que cette coloration limite la pénétration de la lumière. La lumière biodisponible est fonction de la lumière en surface et de la capacité du milieu à la laisser passer. Les résultats obtenus ont permis de mieux quantifier l'impact négatif de la couleur et celui positif de la lumière. Ainsi, ces expérimentations ont permis de déterminer le poids de la densité optique initiale (D.O. à 680 nm) et du flux de photons fourni sur la productivité algale et sur la vitesse de consommation de l'azote. L'effet de l'auto-ombrage (en anglais, self-shading) est plus important sur la pénétration de la lumière que la densité optique pour des D.O. faibles, alors que pour des D.O. élevées (0,89-1,36) la lumière qui pénètre le milieu est

très faible car elle est absorbée par la couleur. Au vu de ces résultats, il semble acceptable de cultiver des microalgues dans un milieu ayant une D.O. (à 680 nm) allant jusqu'à 0,6.

Afin d'optimiser le procédé de culture des microalgues, des pistes d'amélioration de la séparation solide/liquide en aval de la méthanisation doivent être étudiées afin d'atteindre cette coloration tout en minimisant la dilution.

D'autre part, en culture, l'agitation doit être suffisante et l'hydrodynamique du système adaptée pour permettre aux algues une bonne accessibilité à la lumière.

Concernant l'impact du ratio azote/phosphore, la croissance des microalgues n'a pas été statistiquement impactée par les différents rapports N/P étudiés allant de 3 à 76 gN.gP<sup>-1</sup>. En effet, les microalgues ont continué à pousser même lorsque le phosphore du milieu était épuisé et cette observation, conjointe avec les analyses des solides a permis de mettre en évidence le stockage du P par les microalgues. Concernant l'épuration des nutriments, l'azote n'a pas été affecté par les rapports N/P mais, en revanche, la vitesse d'épuration du phosphore augmente avec la concentration du milieu en phosphore allant de 0,6 à 2,0 mgP.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>.

Le stockage du phosphore par les microalgues met en avant la robustesse d'un tel procédé vis-à-vis de la variabilité en phosphore de l'intrant. Cependant, ce ratio ne doit pas être trop déséquilibré car le phosphore finirait par manquer sur le long terme et il serait alors impossible d'éliminer tout l'azote du système.

Dans le procédé de culture, il est envisagé de réutiliser le dioxyde de carbone contenu dans les gaz d'échappement de la cogénération comme source de carbone pour les microalgues. Afin de vérifier l'applicabilité de cette réutilisation, les quantités optimales de CO<sub>2</sub> pour la croissance et les quantités transférables ont été déterminées. D'une part, la quantité de CO<sub>2</sub> fournie à la culture impacte directement la croissance algale. Le CO<sub>2</sub> diffusant depuis la surface est insuffisant pour permettre la croissance dans les photobioréacteurs et conduit à une productivité nulle. L'augmentation du débit de CO<sub>2</sub> entraîne une augmentation de la productivité, proportionnelle aux débits d'injection de CO<sub>2</sub>.

D'autre part, l'utilisation de digestat n'a pas impacté le coefficient de transfert du CO<sub>2</sub> dans le milieu par rapport à l'eau claire. Par contre, la suspension algale a permis d'augmenter sensiblement ce coefficient de transfert par rapport à l'eau claire ( $\alpha = 1,16$ ). En condition de culture, l'efficacité maximum de transfert obtenue (CO<sub>2</sub> assimilé/CO<sub>2</sub> injecté) est de 65 %, lorsque la teneur en carbone inorganique de la phase liquide est réduite du fait d'une forte croissance algale et d'un débit de CO<sub>2</sub> limité. Bien que le coefficient de transfert augmente avec le débit, l'efficacité du

transfert diminue lorsque le débit est augmenté du fait d'une augmentation des pertes. Les transferts méritent d'être étudiés dans une matrice digestat centrifugée et non diluée avec une séparation liquide-solide plus poussée, pour se rapprocher des conditions vers lesquelles il est préférable de tendre d'un point de vue économique.

La modélisation du transfert du carbone n'a pas été possible dans cette étude, à cause des conditions de pression et de concentration en CO<sub>2</sub> de la phase gaz (headspace) qui n'étaient pas suffisamment maîtrisées pour calculer les équilibres. Cependant, ce type de modèle intégrant les différents équilibres physico-chimiques a déjà été développé dans d'autres études (Pegallapati and Nirmalakhandan 2012 ; Concas *et al.* 2013).

D'après les premiers calculs réalisés dans le cadre de ce travail, les quantités de CO<sub>2</sub> issus des gaz d'échappement produites par la cogénération (combustion du CH<sub>4</sub> produit lors de la méthanisation) apparaissent proches des quantités nécessaires pour éliminer tout l'azote du milieu. Cependant, la croissance observée est meilleure avec des flux de CO<sub>2</sub> plus important alors que l'efficacité du transfert se trouve amoindrie dans ces conditions. Un compromis peut donc être nécessaire pour éliminer la majeure partie de l'azote du milieu en favorisant une bonne croissance algale. Toutefois, l'écosystème utilisé comporte aussi des bactéries qui produisent du CO<sub>2</sub> en dégradant la matière organique (hétérotrophes) et d'autres qui le consomment (nitrifiantes). L'impact de ces processus sur les flux de CO<sub>2</sub> nécessite donc des études complémentaires.

L'étude du temps de séjour des solides et de la fréquence d'extraction a permis d'estimer la productivité algale en régime semi-continu et de mettre en évidence les mécanismes d'élimination de l'azote dans ces conditions.

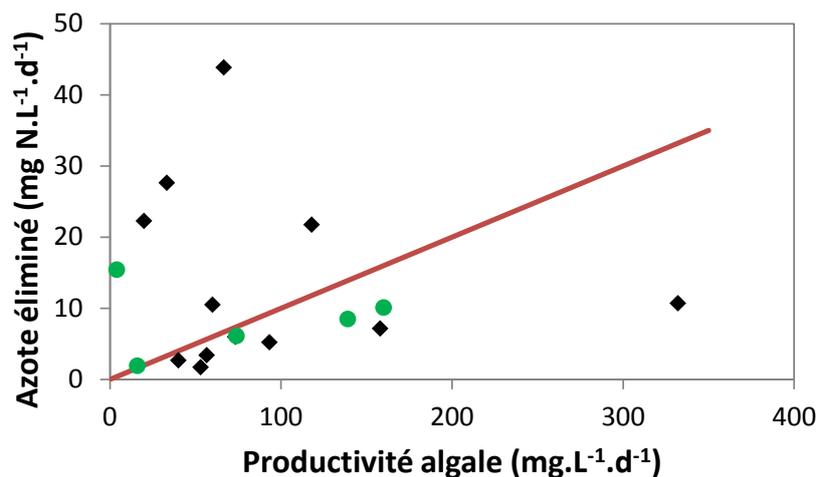
La productivité algale observée est assez faible comparée aux productivités maximum obtenues en batch (de l'ordre de  $2.10^7$  versus  $8.10^8$  cellules.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), du fait des temps de séjour limités et de la coloration du milieu utilisé (DO = 0,85). Dans ces conditions, nous avons mis en évidence que le principal mécanisme d'élimination de l'azote est la nitrification-dénitrification (NDN), avec shunt des nitrates ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$ ). Les proportions relatives entre ce mécanisme et l'épuration associée à l'assimilation par les microalgues (de 50 à 97 % et de 3 à 50 %, respectivement) sont apparues dépendantes des 2 paramètres du procédé étudié (temps de séjour des solides et fréquence d'extraction) ouvrant la voie à des paramètres de contrôle dont l'étude mériterait d'être approfondie.

D'un point de vue mécanisme, l'avantage des microalgues sur les bactéries nitrifiantes (AOB) en milieu limité en phosphore a été mis en exergue. Il a été montré que la quantité de nitrites et nitrates produits est fonction de la concentration initiale en phosphore. La nitrification est ainsi

inhibée à cause de l'exclusion compétitive des AOB par les microalgues sur le phosphore. En outre, un antagonisme a été observé en milieu non carencé en phosphore entre les AOB et les microalgues en faveur des microalgues. Bien que son origine ne soit pas connue, une hypothèse pourrait être une compétition sur la source de carbone.

Les interactions entre algues et nitrifiantes méritent d'être étudiées plus en profondeur afin de comprendre s'il existe un réel antagonisme ou s'il s'agit de compétition sur les nutriments. L'interaction forte entre les communautés algales et les bactéries nitrifiantes est sur l'oxygène, puisque les microalgues le produisent tandis que les AOB le consomment. Des expérimentations durant lesquelles une concentration minimum en oxygène est maintenue permettraient de déconnecter la croissance des AOB de celle des microalgues. Cependant, cette concentration ne doit pas être trop élevée puisque la croissance algale est limitée par la pression partielle en oxygène du milieu (Mouget *et al.* 1995).

Les productivités algales et l'azote éliminé obtenus au cours de ce travail ont été représentés avec les données de la littérature sur la Figure 89. Les productivités observées sont équivalentes à celles observées dans la littérature, en revanche, l'azote éliminé dans ce travail est globalement plus faible que dans la littérature à cause d'une moindre nitrification-dénitrification. L'antagonisme entre les microalgues et la nitrification-dénitrification observé dans cette étude semble aussi présent dans les données bibliographiques, puisque l'azote éliminé est plus important, du fait de la NDN, pour les faibles productivités algales que pour les fortes.



**Figure 89 : Représentation de l'azote éliminé en fonction de la productivité algale de la littérature (losange) et des expérimentations de cette étude (rond). La ligne rouge représente 10 % d'azote massique dans la biomasse.**

Au vu de ces résultats et notamment de l'importance des mécanismes de NDN, il serait également nécessaire d'étudier les émissions de protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) de ce procédé, gaz à effet

de serre ayant un potentiel de réchauffement global d'environ 300 fois plus important que le CO<sub>2</sub>. En effet, l'émission de N<sub>2</sub>O a été observée dans des procédés réalisant la nitrification et dénitrification simultanée en conditions limitantes en oxygène (Jia *et al.* 2013) et la culture algale en lagunage algale à haut rendement (HRAP) pourrait donc être une source importante de ce gaz.

Les essais en photobioréacteurs ont permis de tester facilement et de manière contrôlée l'influence de la stratégie d'extraction, mais les valeurs de croissance et d'épuration ainsi que la contribution des mécanismes associés méritent d'être appréciés en lagunage à haut rendement pour se placer dans des conditions proches de la réalité de mise en place de ce procédé. Ainsi, cela permettrait d'estimer les hétérogénéités spatiales, faibles dans les photobioréacteurs, mais qui pourraient être plus importantes en HRAP. Des effets de bord dans les lagunes pourraient ainsi générer des gradients de température et influencer la diffusion de la lumière ; le transfert du CO<sub>2</sub> pourrait aussi être moins efficace qu'attendu ; enfin, la décantation de la biomasse pourrait être plus rapide à cause d'un brassage moins efficace. L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude à l'échelle laboratoire permettent ainsi un dimensionnement du procédé qu'il apparaît nécessaire d'étudier à présent à l'échelle préindustrielle.

Les données acquises dans les essais ont permis de mettre en place un modèle biocinétique capable de simuler la croissance algale en fonction de la lumière disponible dans le milieu. Cette lumière est fonction de la quantité de microalgues, de la D.O. initiale et de la lumière en surface. Ensuite, ce modèle capable de représenter le self-shading de la biomasse et la croissance en milieu coloré a été complété par un modèle de Droop (1973) pour intégrer la croissance dans un milieu pauvre en phosphore et son stockage dans la biomasse algale. Enfin, sans prendre en compte le phosphore non limitant, l'impact cinétique de la quantité de carbone inorganique a été déterminé. Le modèle global intégrant la lumière disponible, le phosphore et son stockage et le carbone inorganique peut être représenté comme dans le Tableau 40.

Le taux de décès ( $b$ ), représentant la vitesse de mort des microalgues, étant trop lié au taux de croissance spécifique,  $\mu_m$ , n'a pas été déterminé dans les essais. Cependant, pour simuler un système avec des temps de séjours moyens ou longs, il sera nécessaire de pouvoir représenter la mort de la biomasse. Ce paramètre pourrait être déterminé en suivant le nombre d'algues vivantes en fonction du temps après passage d'un environnement éclairé à l'obscurité. Les méthodes utilisées peuvent être la méthode live-dead avec comptage des cellules au microscope ou le suivi du nombre de copies d'ADN par qPCR après l'utilisation de PMA (Propidium MonoAzide).

**Tableau 40 : Matrice de Petersen du modèle global.**

	X <sub>A</sub>	X <sub>P_stor</sub>	S <sub>N</sub>	S <sub>Ci</sub>	S <sub>P</sub>	Light	Process rate
1	Microalgae growth	1	-1/Q	-i <sub>N_X_A</sub>	-1/Y <sub>A</sub>		V1
2	P storage		1			-1	V2
3	Death	-1					V3

V1	$= \mu_m \cdot \left(1 - \frac{kQ}{Q}\right) \cdot \frac{\text{Light}}{\text{Light} + K'} \cdot \frac{S_{Ci}}{K_C + S_{Ci}} \cdot X_A$
V2	$= \rho_m \cdot \frac{S_P}{S_P + K_{S_P}} \cdot \frac{K_{P_Q}}{Q + K_{P_Q}} \cdot X_A$
V3	$= -b \cdot X_A$

De plus, ce modèle nécessiterait d'être validé sur un HRAP pour confirmer que les hypothèses valables pour un photobioréacteur le sont aussi pour un HRAP, notamment sur le calcul de la lumière disponible. Au regard de la littérature, des modèles modulant la croissance en fonction de la température ont été développés et pourraient être utilisés pour représenter assez finement la croissance algale en fonction de la période de l'année.

En outre, il faudrait réaliser une analyse de sensibilité du modèle global pour vérifier les paramètres les plus critiques et ainsi affiner le calage de ceux-ci.

Dans un objectif d'épuration, il est important de travailler sur l'association des processus de croissance algale et de nitrification. Un moyen pouvant se révéler efficace est la modélisation, en associant des modèles existants de croissance bactérienne comme « Activated Sludge Model » (Henze *et al.* 2000), ASM, et des processus de croissance de microalgues. Il serait ainsi possible de modéliser la concentration en oxygène du milieu en fonction de la productivité algale et de la concentration en biomasse bactérienne autotrophe et hétérotrophe. L'expression de la concentration en O<sub>2</sub> peut être représentée comme ci-après :

$$\frac{dO_2}{dt} = \text{production photosynthétique (jour)} - \text{consommation par les bactéries hétérotrophes et}$$

autotrophes - respiration des algues - pertes en sursaturation

La production d'oxygène par les algues est directement liée à la production de biomasse par l'équation de la photosynthèse :  $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$ . L'autre constituante liée à la biologie, non prise en compte dans ASM, qu'il faudrait modéliser est la consommation de l'oxygène par les microalgues due à leur respiration. Leur respiration peut être de deux types : la respiration « classique » et la photo-respiration. La photo-respiration peut cependant être négligée lorsque la teneur en oxygène n'est pas très élevée ou lorsque la concentration en CO<sub>2</sub> n'est pas trop faible (Kliphuis *et al.* 2011). La respiration est réalisée par les microalgues à la lumière et à

l'obscurité. Pour les bactéries hétérotrophes, il serait nécessaire de faire un fractionnement de la matière organique du digestat centrifugé afin de l'utiliser dans le modèle. En combinant ces informations avec les processus physiques tels les transferts et les pertes en sursaturation, il semble possible de simuler la croissance des microalgues, des AOB et des bactéries hétérotrophes dans le même environnement afin d'accéder à des taux d'épuration représentatifs des lagunes à haut rendement. Une telle diversité de communautés pourrait cependant rendre le calage des paramètres très complexe.

Si la nitrification est favorisée, la dénitrification pourrait être limitée dans ce système où la matière organique biodégradable soluble est en faible quantité. Il est possible d'envisager une post-dénitrification en réutilisant une partie de la phase initialement séparée comme source de carbone organique ou les jus issus de cette phase comme source de MO.

L'inoculum utilisé lors des expérimentations contient plusieurs genres d'algues ainsi que des bactéries. L'évolution de ces communautés et le lien entre microalgues et bactéries nitrifiantes ont été suivis afin de caractériser les interactions et l'impact des conditions sur leur évolution.

Le suivi des communautés de microalgues présentes a permis de montrer que la croissance de *Chlorella* sp. est moins limitée par le manque de lumière que *Scenedesmus* sp. *Chlorella* est donc un meilleur compétiteur pour la lumière que *Scenedesmus*. En revanche, quand le substrat limitant est le phosphore, *Scenedesmus* sp. apparaît avantagé.

Ainsi, ces résultats montrent qu'il pourrait être difficile de maintenir une communauté dominée par *Scenedesmus* dans un lagunage à haut rendement à cause d'une limitation de la lumière disponible en raison de zones mortes, du milieu coloré, de la concentration en algues etc.

A partir de toutes les données issues de ce travail de thèse, un dimensionnement a pu être réalisé. Ainsi, pour un élevage de 200 truies et leurs suites, la simulation de croissance algale en prenant en compte la nitrification-dénitrification (52 %) a mené à une surface minimum nécessaire pour la culture de microalgues et l'épuration de la phase liquide du digestat de l'ordre de 0,78 ha. Cette surface est obtenue pour un temps de séjour des solides intermédiaire d'environ 4,5 jours, un temps de séjour plus élevé réduisant la productivité à cause du self-shading. Au vu de la concentration en microalgues assez faible (de l'ordre de  $10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup>), les volumes de biomasse à séparer sont très importants et ne sont pas envisageables sur une installation agricole. Il serait cependant réalisable de concentrer cette biomasse dans un clarificateur avant une séparation plus poussée, en centrifugeuse par exemple. Dans ce cadre, des études sur la décantabilité des microalgues apparaissent nécessaires. Le volume à séparer est plus faible pour les temps de séjours

les plus élevés, car c'est avec cette stratégie que la concentration en algues simulée est la plus élevée. Le volume de liquide séparé, bien qu'assez élevé, peut raisonnablement être recirculé.

Le rendement d'épuration, fixé à 90 % pour le dimensionnement, induit des concentrations en azote jusqu'à 500 mg.L<sup>-1</sup> dans le liquide de sortie. Les concentrations en azote testées n'ont jamais excédé 200 mg.L<sup>-1</sup>, il serait donc intéressant de vérifier qu'une concentration plus élevée dans la lagune n'inhibe pas la croissance algale et/ou la nitrification-dénitrification. De plus, les ions majoritairement consommés pour la croissance algale sont l'ammonium et les phosphates, mais la concentration des autres ions reste proche de leur concentration en entrée du procédé. Ces teneurs élevées dans le lagunage pourraient aussi inhiber la croissance, c'est pourquoi ils méritent d'être étudiés.

Les résultats de ces expériences devraient permettre de mieux appréhender la faisabilité d'un tel procédé et d'approcher des critères d'aide au dimensionnement (taille des bassins, dilution initiale, *etc.*), afin d'obtenir une bonne épuration avec une croissance des microalgues élevée. La synergie entre la digestion anaérobie et la culture de microalgue mérite d'être considérée, même si les surfaces, recirculations et volumes à séparer simulés restent importants. Cependant, les premiers chiffres du dimensionnement ne sont pas directement transposables sur le terrain et nécessitent des études en grandeur réelle. La culture algale appliquée au traitement d'effluents d'élevage est un procédé non mature, mais qui a une marge de progression importante. De plus, l'association entre les microalgues et les bactéries nitrifiantes est une piste à explorer pour augmenter l'épuration des systèmes lagunaires.



## **Références bibliographiques**

- Abeling, U. and F. Seyfried (1992). "Anaerobic-Aerobic Treatment of High-Strength Ammonium Wastewater - Nitrogen Removal via Nitrite." Water Science & Technology **26**(5-6): 1007-1015.
- ADEME (2006). La méthanisation à la ferme.
- ADEME (2011). Méthanisation à la ferme - guide pratique.
- ADEME (2011). Qualité agronomique et sanitaire des digestats: 250 p.
- Ahlgren, G. (1987). "Temperature Functions in Biology and Their Application to Algal Growth Constants." Oikos **49**(2): 177-190.
- Åkerström, A. M., L. M. Mortensen, B. Rusten and H. R. Gislerød (2014). "Biomass production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration." Journal of Environmental Management **144**(0): 118-124.
- Algae, L. (2014). "LDC Algae, cultivons l'avenir - <http://www ldc-algae.com/>." Retrieved 29-09, 2014.
- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol Rev **59**: 143-169.
- Amoroso, G., D. Sultemeyer, C. Thyssen and H. P. Fock (1998). "Uptake of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>2</sub> in cells and chloroplasts from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella tertiolecta*." Plant Physiology **116**(1): 193-201.
- An, S. S., T. Friedl and E. Hegewald (1999). "Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons." Plant Biology **1**(4): 418-428.
- Azov, Y. and J. C. Goldman (1982). "Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures." Applied and Environmental Microbiology **43**(4): 735-739.
- Badger, M. R. and G. D. Price (2003). "CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution." Journal of Experimental Botany **54**(383): 609-622.
- Bai, A., L. Stündl, P. Bársony, M. Fehér, P. Jobbágy, Z. Herpergel and G. Vaszkó (2011). "Algae production on pig sludge." Agronomy for Sustainable Development: 1-8.
- Barlow, E. W. R., L. Boersma, H. K. Phinney and J. R. Miner (1975). "Algal growth in diluted pig waste." Agriculture and Environment **2**(4): 339-355.
- Bartosh, Y. and C. J. Banks (2007). Algal growth response and survival in a range of light and temperature conditions: Implications for non-steady-state conditions in waste stabilisation ponds. **55**: 211-218.
- Baumgarten, E., M. Nagel and R. Tischner (1999). "Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria." Applied Microbiology and Biotechnology **52**(2): 281-284.
- Béchet, Q., A. Shilton and B. Guieysse (2013). "Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation." Biotechnology Advances **31**(8): 1648-1663.
- Becker, E. W. (1994). "Microalgae." Biotechnology and microbiology, Cambridge University Press
- Becker, E. W. (1994). Microalgae : biotechnology and microbiology. C. U. Press. Cambridge: 293.
- Ben-Amotz, A. (2011). Algae application for power generation and CO<sub>2</sub> recycling. ISES Annual Meeting, Tel-Aviv, Seambiotic.
- Benemann, J. R. and W. J. Oswald (1993). Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO<sub>2</sub> to biomass, Department of Energy Pittsburgh Energy Technology Center.
- Bernard, O. and J. L. Guoze (1995). "Transient behavior of biological loop models with application to the Droop model." Math Biosci **127**(1): 19-43.
- Bernard, O. and B. Rémond (2012). "Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth." Bioresource Technology **123**(0): 520-527.
- Biomasse-Normandie (2002). Évaluations des quantités actuelles et futures de boues, déchets, résidus, ... valorisés en agriculture et provenant des activités industrielles – lot 3. - Étude relative aux quantités d'effluents d'élevage épandus sur les sols agricoles., Ministère de l'Écologie et du Développement Durable - MEDD
- Bitaubé Pérez, E., I. Caro Pina and L. Pérez Rodríguez (2008). "Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricorutum* in intensive culture photobioreactor." Biochemical Engineering Journal **40**(3): 520-525.

- Bjornsson, W. J., R. W. Nicol, K. E. Dickinson and P. J. McGinn (2013). "Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production." Journal of Applied Phycology: 1-6.
- Blackburne, R., Z. Yuan and J. Keller (2008). "Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor." Biodegradation **19**(2): 303-312.
- Boseret, J.-P. "La Photosynthèse." Retrieved 22-09-14, 2014.
- Bougaran, G., O. Bernard and A. Sciandra (2010). "Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus." Journal of Theoretical Biology **265**(3): 443-454.
- Boursier, H. (2003). Etude et modélisation des processus biologiques au cours du traitement aérobie du lisier de porcs en vue d'une optimisation du procédé. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Brindley, C., F. G. Acien Fernández and J. M. Fernández-Sevilla (2011). "Analysis of light regime in continuous light distributions in photobioreactors." Bioresource Technology **102**(3): 3138-3148.
- Burton, C. H. and C. Turner (2003). Manure management : Treatment strategies for sustainable agriculture, Silsoe Research Institute.
- Camarillo, M. K., W. T. Stringfellow, C. L. Spier, J. S. Hanlon and J. K. Domen (2013). "Impact of co-digestion on existing salt and nutrient mass balances for a full-scale dairy energy project." Journal of Environmental Management **128**: 233-242.
- Cañizares-Villanueva, R. O., A. Ramos, A. I. Corona, O. Monroy, M. de la Torre, C. Gomez-Lojero and L. Travieso (1994). "Phormidium treatment of anaerobically treated swine wastewater." Water Research **28**(9): 1891-1895.
- Canler, J.-P., J.-M. Perret, P. Duchène and E. Cotteux (2011). Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées. Nouvelle édition Quae.
- Canovas, S., B. Picot, C. Casellas, H. Zulkifi, A. Dubois and J. Bontoux (1996). "Seasonal development of phytoplankton and zooplankton in a high-rate algal pond." Water Science and Technology **33**(7): 199-206.
- Capdevielle, A., E. Sýkorová, F. Béline and M.-L. Daumer (2013). "Kinetics of struvite precipitation in synthetic biologically treated swine wastewaters." Environmental Technology **35**(10): 1250-1262.
- Carlozzi, P., B. Pushparaj, A. Degl'innocenti and A. Capperucci (2006). Growth characteristics of Rhodospseudomonas palustris cultured outdoors, in an underwater tubular photobioreactor, and investigation on photosynthetic efficiency. Heidelberg, ALLEMAGNE, Springer.
- Chae, S. R., E. J. Hwang and H. S. Shin (2006). "Single cell protein production of Euglena gracilis and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor." Bioresource Technology **97**(2): 322-329.
- Chang, E. H. and S. S. Yang (2003). "Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide." Botanical Bulletin of Academia Sinica **44**(1): 43-52.
- Chen, R., R. Li, L. Deitz, Y. Liu, R. J. Stevenson and W. Liao (2012). "Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production." Biomass and Bioenergy **39**(0): 128-138.
- Cheng, L., L. Zhang, H. Chen and C. Gao (2006). "Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor." Separation and Purification Technology **50**(3): 324-329.
- Cheung, Y. H. and M. H. Wong (1981). "Properties of animal manures and sewage sludges and their utilisation for algal growth." Agricultural Wastes **3**(2): 109-122.
- Chiu, S.-Y., C.-Y. Kao, T.-T. Huang, C.-J. Lin, S.-C. Ong, C.-D. Chen, J.-S. Chang and C.-S. Lin (2011). "Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using Chlorella sp. cultures." Bioresource Technology **102**(19): 9135-9142.
- Chiu, S.-Y., C.-Y. Kao, M.-T. Tsai, S.-C. Ong, C.-H. Chen and C.-S. Lin (2009). "Lipid accumulation and CO2 utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO2 aeration." Bioresource Technology **100**(2): 833-838.
- Chiu, S. Y., C. Y. Kao, C. H. Chen, T. C. Kuan, S. C. Ong and C. S. Lin (2008). "Reduction of CO2 by a high-density culture of Chlorella sp. in a semicontinuous photobioreactor." Bioresource Technology **99**(9): 3389-3396.
- Choi, O., A. Das, C. P. Yu and Z. Hu (2010). "Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and cyanobacteria." Biotechnology and Bioengineering **107**(6): 1004-1011.
- Chojnacka, K. and A. Noworyta (2004). "Evaluation of Spirulina sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures." Enzyme and Microbial Technology **34**(5): 461-465.

- Chu, F.-F., P.-N. Chu, P.-J. Cai, W.-W. Li, P. K. S. Lam and R. J. Zeng (2013). "Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency." Bioresource Technology **134**(0): 341-346.
- Collett, J. R., R. W. Heck and A. J. Zwoster (2011). Dissolved carbonic anhydrase for enhancing post-combustion carbon dioxide hydration in aqueous ammonia.
- Concas, A., M. Pisu and C. Giacomo (2013). "Mathematical Modelling of *Chlorella Vulgaris* Growth in Semi-Batch Photobioreactors Fed with Pure CO<sub>2</sub>." chemical engineering transactions **32**: 1021-1026.
- Conseil de l'Union Européenne (2007). Règlement (CE) n° 834/2007 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques et abrogeant le règlement (CEE) n° 2092/91 834/2007. journal officiel de l'Union Européenne L 189.
- Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego and M. Del Borghi (2009). "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production." Chemical Engineering and Processing: Process Intensification **48**(6): 1146-1151.
- Cordell, D., J.-O. Drangert and S. White (2009). "The story of phosphorus: Global food security and food for thought." Global Environmental Change **19**(2): 292-305.
- Cornet, J. F., C. G. Dussap, J. B. Gros, C. Binois and C. Lasseur (1995). "A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors." Chemical Engineering Science **50**(9): 1489-1500.
- Corominas, L. L., L. Rieger, I. Takacs, G. Ekama, H. Hauduc, P. A. Vanrolleghem, A. Oehmen, K. V. Gernaey, M. C. van Loosdrecht and Y. Comeau (2010). "New framework for standardized notation in wastewater treatment modelling." Water Sci Technol **61**(4): 841-857.
- Craggs, R., D. Sutherland and H. Campbell (2012). "Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production." Journal of Applied Phycology **24**(3): 329-337.
- Cuaresma Franco, M., M. Buffing, M. Janssen, C. Vílchez Lobato and R. Wijffels (2011). "Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions." Journal of Applied Phycology: 1-7.
- Dabbadie, L. (1992). Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc : performances, contraintes, utilisation des biomasses, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier: 125.
- Dabbadie, L. (1994). "Results and knowledge obtained from intensive cultures of microalgae with pig manure." Annales De Limnologie-International Journal of Limnology **30**(3): 233-245.
- Dakhama, A., J. Noüe and M. Lavoie (1993). "Isolation and identification of anti-algal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Applied Phycology **5**(3): 297-306.
- Daumer, M. L., F. Beline and M. Sperandio (2004). "The effect of phytase in pig diet and solid/liquid separation of pig slurry on phosphorus, calcium, and magnesium fractionation." Transactions of the Asae **47**(4): 1247-1253.
- de Godos, I., S. Blanco, P. A. García-Encina, E. Becares and R. Muñoz (2009). "Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates." Bioresource Technology **100**(19): 4332-4339.
- de Godos, I., S. Blanco, P. A. García-Encina, E. Becares and R. Muñoz (2010). "Influence of flue gas sparging on the performance of high rate algae ponds treating agro-industrial wastewaters." Journal of Hazardous Materials **179**(1-3): 1049-1054.
- de Godos, I., C. González, E. Becares, P. García-Encina and R. Muñoz (2009). "Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor." Applied Microbiology and Biotechnology **82**(1): 187-194.
- de Godos, I., V. A. Vargas, S. Blanco, M. C. G. González, R. Soto, P. A. García-Encina, E. Becares and R. Muñoz (2010). "A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation." Bioresource Technology **101**(14): 5150-5158.
- De Jesus Raposo, M. F. and R. M. S. C. De Morais (2011). "*Chlorella vulgaris* as soil amendment: Influence of encapsulation and enrichment with rhizobacteria." International Journal of Agriculture and Biology **13**(5): 719-724.
- de la Noüe, J. and A. Bassères (1989). "Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae." Biological Wastes **29**(1): 17-31.

- de la Noüe, J., J. Sevrin-Reyssac, C. Mariojous, J. Marcel and S. Sylvestre (1994). "Biotreatment of swine manure by intensive lagooning during winter." Bioresource Technology **50**(3): 213-219.
- de Morais, M. G. and J. A. V. Costa (2007). "Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor." Journal of Biotechnology **129**(3): 439-445.
- De Morais, M. G. and J. A. V. Costa (2007). "Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors." Biotechnology Letters **29**(9): 1349-1352.
- de Pauw, N., H. Verlet and L. de Leenheer Jr (1980). "Heated and unheated outdoor cultures of marine algae with animal manure." Algae Biomass: 315-341.
- de Reviers, B. (2002). Biologie et phylogénie des algues T1. Saint-Etienne, Belin.
- De Schampelaire, L. and W. Verstraete (2009). "Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system." Biotechnology and Bioengineering **103**(2): 296-304.
- de Vet, W. W. J. M., M. C. M. van Loosdrecht and L. C. Rietveld (2012). "Phosphorus limitation in nitrifying groundwater filters." Water Research **46**(4): 1061-1069.
- Debelius, B., J. M. Forja, Á. DelValls and L. M. Lubián (2009). "Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(5): 1503-1513.
- Debroy, L. H. and H. B. Ward (1979). Antibacterial activity of freshwater green algae.
- Delrue, F. (2012). Micro-algues et biocarburants de troisième génération, CEA.
- DETEC-OFEN (2009). Etat de l'art des méthodes (rentables) pour l'élimination, la concentration ou la transformation de l'azote pour les installations de biogaz agricoles de taille petite/moyenne. CH - Berne, Office fédéral de l'énergie.
- Dickinson, K. E., C. G. Whitney and P. J. McGinn (2013). "Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD." Algal Research **2**(2): 127-134.
- Doucha, J., F. Straka and K. Lívansky (2005). "Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor." Journal of Applied Phycology **17**: 403-412.
- Droop, M. R. (1973). "Some thoughts on nutrient limitation in algae." Journal of Phycology **9**(3): 264-272.
- Droop, M. R. (2003). "In defence of the Cell Quota model of micro-algal growth." Journal of Plankton Research **25**(1): 103-107.
- Duran, C., Y. Fayolle, Y. Péchaud, A. Cockx and S. Gillot (2013). "Impact des propriétés des boues activées sur leur comportement rhéologique et sur le transfert d'oxygène dans les bioréacteurs aérés " Récents Progrès en Génie des Procédés **104**.
- Edelmann, W., K. Schleiss, H. Engeli and U. Baier (2001). "Ökobilanz der Stromgewinnung aus landwirtschaftlichem Biogas." Arbi Bioenergy GmbH, Baar, Baar.
- Eixler, S., U. Karsten and U. Selig (2006). "Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply." Phycologia **45**(1): 53-60.
- Elrifi, I. R. and D. H. Turpin (1985). "Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios: a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta)." Journal of Phycology **21**(4): 592-602.
- Elser, J. J., W. F. Fagan, R. F. Denno, D. R. Dobberfuhl, A. Folarin, A. Huberty, S. Interlandi, S. S. Kilham, E. McCauley, K. L. Schulz, E. H. Siemann and R. W. Sterner (2000). "Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs." Nature **408**(6812): 578-580.
- Eriksen, N. T. (2008). "The technology of microalgal culturing." Biotechnology Letters **30**(9): 1525-1536.
- Fachverband-Biogas (2013). "Branchenzahlen 2012 und Prognose der Branchenentwicklung 2013 ".
- Falkner, G., F. Horner and W. Simonis (1980). "The regulation of the energy-dependent phosphate uptake by the blue-green alga <i>Anacystis nidulans</i>." Planta **149**(2): 138-143.
- Fallowfield, H. J. and M. K. Garrett (1985). "The photosynthetic treatment of pig slurry in temperate climatic conditions: A pilot-plant study." Agricultural Wastes **12**(2): 111-136.
- Fan, L. H., Y. T. Zhang, L. H. Cheng, L. Zhang, D. S. Tang and H. L. Chen (2007). "Optimization of Carbon Dioxide Fixation by *Chlorella vulgaris* Cultivated in a Membrane-Photobioreactor." Chemical Engineering & Technology **30**(8): 1094-1099.
- Fawley, M. W. (1984). "Effects of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)." Journal of Phycology **20**(1): 67-72.

- Ferrero, E. M. (2012). "Molecular characterization of bacterial communities in algal–bacterial photobioreactors treating piggery wastewaters." *Ecological Engineering* **40**: 121-130.
- Ferris, M. J., G. Muyzer and D. Ward (1996). "Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-Defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community." *Appl Environ Microbiol* **62**: 340-346.
- Filali, R. (2012). Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO<sub>2</sub>, Centrale Paris. **PhD**.
- Fouilland, E., C. Vasseur, C. Leboulanger, E. Le Floch, C. Carré, B. Marty, J.-P. Steyer and B. Sialve (2014). "Coupling algal biomass production and anaerobic digestion: Production assessment of some native temperate and tropical microalgae." *Biomass and Bioenergy*(0).
- Francisco, É. C., D. B. Neves, E. Jacob-Lopes and T. T. Franco (2010). "Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **85**(3): 395-403.
- Fulton (2009). Nutrient Removal by Algae Grown in CO<sub>2</sub>-Enriched Wastewater over a Range of Nitrogen:Phosphorus Ratios. *Civil and Environmental Engineering Department*, . California Polytechnic State University, San Luis Obispo. **Masters thesis**.
- Gantar, M., Z. Obrecht and B. Dalmacija (1991). "Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater." *Bioresource Technology* **36**(2): 167-171.
- García, J., B. F. Green, T. Lundquist, R. Mujeriego, M. Hernández-Mariné and W. J. Oswald (2006). "Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater." *Bioresource Technology* **97**(14): 1709-1715.
- Garcia Sánchez, J. L., J. A. Sánchez Pérez, F. Garcia Camacho, J. M. Fernández Sevilla and E. Molina Grima (1996). "Optimization of light and temperature for growing *Chlorella* sp. using response surface methodology." *Biotechnology Techniques* **10**(5): 329-334.
- Geider, R. and J. La Roche (2002). "Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis." *European Journal of Phycology* **37**(1): 1-17.
- Giordano, M., J. Beardall and J. A. Raven (2005). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. **56**: 99-131.
- Girault, R. (2008). Optimisation numérique d'une filière de traitement des effluents d'élevage couplant la digestion anaérobie et le traitement biologique de l'azote. *ULP Strasbourg*.
- Girault, R. (2011). Etude des cinétiques de dégradation anaérobie et des interactions entre substrats organiques : impact sur les filières de co-digestion. *Université de Rennes 1*, Ecole doctorale Sciences De La Matière. **PhD**.
- Girault, R., F. Béline and A. Damiano (2010). "Méthanisation : Les premiers pas de la filière dans le secteur agricole." *Environnement et Technique* **300**: 38-42.
- Girault, R., T. Lendormi, S. Guillaume, P. Peu and F. Béline (2013). "Caractéristiques des substrats et interactions dans les filières de co-digestion : cas particulier des co-substrats d'origine agro-industrielle." *Sciences Eaux et Territoires* **12**: 44-53.
- Gitton, C. and Y. Hurvois (1999). "La place du traitement dans la gestion des excédents structurels d'effluents d'élevage." *Ingénieries - E A T*(19): p. 31 - p. 41.
- Godet, S. (2008). Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue marine *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae, Haptophyta). *Biophysologie des Organismes et des Populations*. Laval, France, Université du Maine: 235.
- Godon, J.-J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit and R. Moletta (1997). "Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis." *Appl Environ Microbiol* **63**(7).
- Goh, A. (1984). *Production of microalgae using pig waste as a substrate*. Algal Biomass Workshop, University of Colorado, Boulder, USA.
- Goldman, J. C. and E. J. Carpenter (1974). "A Kinetic Approach to the Effect of Temperature on Algal Growth." *Limnology and Oceanography* **19**(5): 756-766.
- Goldman, J. C., W. J. Oswald and D. Jenkins (1974). "The Kinetics of Inorganic Carbon Limited Algal Growth." *Journal (Water Pollution Control Federation)* **46**(3): 554-574.

- González-Fernández, C., B. Molinuevo-Salces and M. C. García-González (2011). "Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry." Bioresource Technology **102**(2): 960-966.
- Gonzalez-Fernandez, C., B. Riano-Irazabal, B. Molinuevo-Salces, S. Blanco and M. C. Garcia-Gonzalez (2011). "Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae-bacteria consortia when treating swine slurry." Applied Microbiology and Biotechnology **90**(3): 1147-1153.
- González, C., J. Marciniak, S. Villaverde, P. A. García-Encina and R. Muñoz (2008). "Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters." Applied Microbiology and Biotechnology **80**(5): 891-898.
- González, C., J. Marciniak, S. Villaverde, C. León, P. A. García and R. Muñoz (2008). "Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia." Water Science and Technology **58**: 95-102.
- González, L. E., R. O. Cañizares and S. Baena (1997). "Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*." Bioresource Technology **60**(3): 259-262.
- Griffing, E. M., M. Overcash and P. Westerman (2007). "A review of gaseous ammonia emissions from slurry pits in pig production systems." Biosystems Engineering **97**(3): 295-312.
- Grima, E. M., J. M. F. Sevilla, J. A. S. Pérez and F. G. Camacho (1996). "A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances." Journal of Biotechnology **45**(1): 59-69.
- Grobbelaar, J. (2011). "Microalgae mass culture: the constraints of scaling-up." Journal of Applied Phycology: 1-4.
- Groeneweg, J. (1980). "Treatment of wastewater from live-stock production units with high-rate-algal-ponds." Inst. Biotechnol. No. 4: 165-170.
- Gudin, C. and D. Chaumont (1991). "Cell fragility - The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors." Bioresource Technology **38**(2-3): 145-151.
- Hackett, J. D., H. S. Yoon, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, T. Nosenko and D. Bhattacharya (2004). "Migration of the Plastid Genome to the Nucleus in a Peridinin Dinoflagellate." Current Biology **14**(3): 213-218.
- Hanagata, N., T. Takeuchi, Y. Fukuju, D. J. Barnes and I. Karube (1992). "Tolerance of microalgae to high CO<sub>2</sub> and high temperature." Phytochemistry **31**(10): 3345-3348.
- Hase, R., H. Oikawa, C. Sasao, M. Morita and Y. Watanabe (2000). "Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city." Journal of Bioscience and Bioengineering **89**(2): 157-163.
- Heck, T. (2003). "Wärme-Kraft-Kopplung. In: Sachbilanzen von Energiesystemen: Grundlagen für den ökologischen Vergleich von Energiesystemen und den Einbezug von Energiesystemen in Ökobilanzen für die Schweiz (Ed. Dones R.). Final report ecoinvent 2000 No. 6, Paul Scherrer Institut Villigen, Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Duebendorf."
- Heduit, M. (1987). "Methanization of Animal Excrement. Pollution Control and Energy Generation." Revue generale de thermique **26**(303): 228-235.
- Henze, M., C. Grady Jr, W. Gujer, G. v. R. Marais and T. Matsuo (1987). Activated sludge model No. 1. Science and Technical Report No. 1. IAWPRC. London.
- Henze, M., W. Gujer, T. Mino and M. Loosdrecht (2000). "Activated Sludge Models - ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3." IWA, London. Science and Technical Report No. 9.
- Henze, M., W. Gujer, T. Mino, T. Matsuo, M. C. Wentzel, G. v. R. Marais and M. C. M. Van Loosdrecht (2000). Activated Sludge Model No.1 - Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3, London, UK, IWA Publishing.
- Hernandez, D. and J. J. Rowe (1987). "Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **53**(4): 745-750.
- Hillebrand, H. and U. Sommer (1999). "The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal." Limnol. Oceanogr. **44**(2): 440-446.

- Hu, H. and K. Gaol (2003). "Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources." *Biotechnology Letters* **25**(5): 421-425.
- Huisman, J., R. R. Jonker, C. Zonneveld and F. J. Weissing (1999). "Competition for light between phytoplankton species: Experimental tests of mechanistic theory." *Ecology* **80**(1): 211-222.
- ISO Norme NF en ISO 11734 Qualité de l'eau, Evaluation de la biodégradabilité anaérobie ultime des composés organiques dans les boues de digesteurs - Méthode par mesurage de la production de biogas.
- Jacob-Lopes, E., C. H. Gimenes Scoparo, M. I. Queiroz and T. T. Franco (2010). "Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors." *Energy Conversion and Management* **51**(5): 894-900.
- Jensen, S. and G. Knutsen (1993). "Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*." *Journal of Applied Phycology* **5**(5): 495-504.
- Jia, W., S. Liang, J. Zhang, H. H. Ngo, W. Guo, Y. Yan and Y. Zou (2013). "Nitrous oxide emission in low-oxygen simultaneous nitrification and denitrification process: sources and mechanisms." *Bioresour Technol* **136**: 444-451.
- Jongbloed, A. W. and N. P. Lenis (1998). "Environmental concerns about animal manure." *Journal of Animal Science* **76**(10): 2641.
- Källqvist, T. and A. Svenson (2003). "Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta." *Water Research* **37**(3): 477-484.
- Kantarci, N., F. Borak and K. O. Ulgen (2005). "Bubble column reactors." *Process Biochemistry* **40**(7): 2263-2283.
- Kaštánek, F., S. Šabata, O. Šolcová, Y. Maléterová, P. Kaštánek, I. Brányiková, K. Kuthan and V. Zachleder (2010). "In-field experimental verification of cultivation of microalgae *Chlorella* sp. using the flue gas from a cogeneration unit as a source of carbon dioxide." *Waste Management and Research* **28**(11): 961-966.
- Kessler, E., M. Schafer, C. Hummer, A. Kloboucek and V. A. R. Huss (1997). "Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta)." *Botanica Acta* **110**(3): 244-250.
- Kim, M. H., W. T. Chung, M. K. Lee, J. Y. Lee, S. J. Ohh, J. H. Lee, D. H. Park, D. J. Kim and H. Y. Lee (2000). "Kinetics of removing nitrogenous and phosphorus compounds from swine waste by growth of microalga, *Spirulina platensis*." *Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**(4): 455-461.
- King, D. L. (1970). "The Role of Carbon in Eutrophication." *Journal (Water Pollution Control Federation)* **42**(12): 2035-2051.
- Kitaya, Y., H. Azuma and M. Kiyota (2005). "Effects of temperature, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*." *Advances in Space Research* **35**(9): 1584-1588.
- Klausmeier, C. A., E. Litchman and S. A. Levin (2007). "A model of flexible uptake of two essential resources." *Journal of Theoretical Biology* **246**(2): 278-289.
- Kliphuis, A. M. J., M. Janssen, E. J. van den End, D. E. Martens and R. H. Wijffels (2011). "Light respiration in *Chlorella sorokiniana*." *Journal of Applied Phycology* **23**(6): 935-947.
- Kong, W., H. Song, Y. Cao, H. Yang, S. Hua and C. Xia (2011). "The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation." *African Journal of Biotechnology* **10**(55): 11620-11630.
- Koopman, B. and E. P. Lincoln (1983). "Autoflotation harvesting of algae from high-rate pond effluents." *Agricultural Wastes* **5**(4): 231-246.
- Kotai, J. (1972). "Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae." *NIVA B-11*(69).
- Kumar, M. S., Z. H. Miao and S. K. Wyatt (2010). "Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium." *Bioresour Technol* **101**(15): 6012-6018.
- Kurano, N., H. Ikemoto, H. Miyashita, T. Hasegawa, H. Hata and S. Miyachi (1995). "Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis." *Energy Conversion and Management* **36**(6-9): 689-692.
- Langley, N. M., S. T. L. Harrison and R. P. van Hille (2012). "A critical evaluation of CO<sub>2</sub> supplementation to algal systems by direct injection." *Biochemical Engineering Journal* **68**(0): 70-75.

- Laski, W. and D. Schwartz. "Algae Industry Magazine." Retrieved 23/05, 2014, from <http://www.algaeindustrymagazine.com/>.
- Lee, J. S., D. K. Kim, J. P. Lee, S. C. Park, J. H. Koh, H. S. Cho and S. W. Kim (2002). "Effects of SO<sub>2</sub> and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1." *Bioresource Technology* **82**(1): 1-4.
- Lemesle, V. and L. Mailleret (2008). "A mechanistic investigation of the algae growth "Droop" model." *Acta Biotheor* **56**(1-2): 87-102.
- Lens, P., G. Zeeman and G. Lettinga (2001). *Decentralised Sanitation and Reuse: Concepts, Systems and Implementation*. I. E. T. Series, IWA Publishing.
- Levine, R. B., M. S. Costanza-Robinson and G. A. Spatafora (2011). "Neochloris oleoabundans grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production." *Biomass and Bioenergy* **35**(1): 40-49.
- Li, F. F., Z. H. Yang, R. Zeng, G. Yang, X. Chang, J. B. Yan and Y. L. Hou (2011). "Microalgae capture of CO<sub>2</sub> from actual flue gas discharged from a combustion chamber." *Industrial and Engineering Chemistry Research* **50**(10): 6496-6502.
- Li, S., T. Nosenko, J. D. Hackett and D. Bhattacharya (2006). "Phylogenomic analysis identifies red algal genes of endosymbiotic origin in the chromalveolates." *Molecular and Biological Evolution* **23**(3): 663.
- Lundquist, T., I. Woertz and J. R. Benemann (2011). *Algal High Rate Ponds with CO<sub>2</sub> Addition for Energy Efficient Nutrient Recovery*. Nutrient Recovery and Management, Miami, Florida.
- Maeda, K., M. Owada, N. Kimura, K. Omata and I. Karube (1995). "CO<sub>2</sub> fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae." *Energy Conversion and Management* **36**(6-9): 717-720.
- Marcato, C. E., E. Pinelli, P. Pouech, P. Winterton and M. Guisresse (2008). "Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry." *Bioresour Technol* **99**(7): 2340-2348.
- Marcilhac, C., B. Sialve, A.-M. Pourcher, C. Ziebal, N. Bernet and F. Beline (2014). "Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem." *Water Research*.
- Marcilhac, C., B. Sialve, A.-M. Pourcher, C. Ziebal, N. Bernet and F. Béline (2014). "Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem." *Water Research* **64**(0): 278-287.
- Markl, H. (1977). "CO<sub>2</sub> transport and photosynthetic productivity of a continuous culture of algae." *Biotechnology and Bioengineering* **19**(12): 1851-1862.
- Markou, G. and D. Georgakakis (2011). "Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review." *Applied Energy* **88**(10): 3389-3401.
- Markou, G., D. Vandamme and K. Muylaert (2014). "Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients." *Water Research* **65**(0): 186-202.
- Martin, C. (2011).
- Martínez Sancho, M., J. M. Jiménez Castillo and F. El Yousfi (1999). "Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity." *Process Biochemistry* **34**(8): 811-818.
- Massé, D. I., G. Talbot and Y. Gilbert (2011). "On farm biogas production: A method to reduce GHG emissions and develop more sustainable livestock operations." *Animal Feed Science and Technology* **166-167**(0): 436-445.
- Mezzomo, N., A. G. Saggiorato, R. Siebert, P. O. Tatsch, M. C. Lago, M. Hemkemeier, J. A. V. Costa, T. E. Bertolin and L. M. Colla (2010). "Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater." *Cultivo da microalga Spirulina platensis (Arthrospira platensis) a partir de tratamento biológico de efluente suíno* **30**(1): 173-178.
- Miles, B. (2003). *Photosystems I and II*.
- Ministère français de l'écologie du développement durable et de l'énergie. (2010, 22-07-2010). "Nitrates, algues vertes en Bretagne." from <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Les-nitrates-et-les-algues-vertes,17843.html>.
- Moletta, R. (2008). *La méthanisation*, Tec & Doc, Lavoisier, 532p.
- Molina Grima, E., J. A. Sanchez Perez, F. Garcia Camacho and A. Robles Medina (1993). "Gas-liquid transfer of atmospheric CO<sub>2</sub> in microalgal cultures." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **56**(4): 329-337.

- Molinuevo-Salces, B., M. C. García-González and C. González-Fernández (2010). "Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry." Bioresource Technology **101**(14): 5144-5149.
- Möller, K. and T. Müller (2012). "Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review." Engineering in Life Sciences **12**(3): 242-257.
- Monod, J. (1941). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Sciences naturelles, Université de Paris : 1941.
- Moser, H. (1985). The dynamic of the bacterial populations maintained in the chemostat, Carnegie Institution of Washington, Washington DC.
- Motte, J. C., R. Escudie, N. Bernet, J. P. Delgenes, J. P. Steyer and C. Dumas (2013). "Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion." Bioresour Technol **144**: 141-148.
- Mouget, J. L., A. Dakhama, M. C. Lavoie and J. De La Noüe (1995). "Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?" FEMS Microbiology Ecology **18**(1): 35-44.
- Mulbry, W., E. K. Westhead, C. Pizarro and L. Sikora (2005). "Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer." Bioresource Technology **96**(4): 451-458.
- Nelder, J. A. and R. Mead (1965). "A Simplex Method for Function Minimization." The Computer Journal **7**(4): 308-313.
- Ni, X., S. Gao, R. H. Cumming and D. W. Pritchard (1995). "A comparative study of mass transfer in yeast for a batch pulsed baffled bioreactor and a stirred tank fermenter." Chemical Engineering Science **50**(13): 2127-2136.
- NIVA (1976). "Estimation of algal growth potential." Norwegian Inst. for Water Research, Publ. **D2**(25).
- Nouals, S. (2000). Modélisation d'un photobioréacteur pour le pilotage de microalgues. **PhD**: 1 vol. (277 p.).
- Novak, J. T. and D. E. Brune (1985). "Inorganic carbon limited growth kinetics of some freshwater algae." Water Research **19**(2): 215-225.
- Nubel, U., F. GarciaPichel and G. Muyzer (1997). "PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria." Applied and Environmental Microbiology **63**(8): 3327-3332.
- Ogbonna, J. C., H. Yada and H. Tanaka (1995). "Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells." Journal of Fermentation and Bioengineering **80**(3): 259-264.
- Olaizola, M. (2003). "Microalgal removal of CO<sub>2</sub> from flue gases: Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures." Biotechnology and Bioprocess Engineering **8**(6): 360-367.
- Olguín, E. J., S. Galicia, O. Angulo-Guerrero and E. Hernández (2001). "The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste." Bioresource Technology **77**(1): 19-24.
- Olguín, E. J., S. Galicia, G. Mercado and T. Pérez (2003). "Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions." Journal of Applied Phycology **15**(2-3): 249-257.
- Oswald, W. J. (1988). Microalgae and wastewater treatment, Cambridge University Press.
- Paavola, T. and J. Rintala (2008). "Effects of storage on characteristics and hygienic quality of digestates from four co-digestion concepts of manure and biowaste." Bioresource Technology **99**(15): 7041-7050.
- Painmanakul, P. (2005). Analyse locale du transfert de matière associé à la formation de bulles générées par différents types d'orifices dans différentes phases liquides Newtoniennes : étude expérimentale et modélisation. INSA Toulouse.
- Park, J., H.-F. Jin, B.-R. Lim, K.-Y. Park and K. Lee (2010). "Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp." Bioresource Technology **101**(22): 8649-8657.
- Park, K. Y., B. R. Lim and K. Lee (2009). "Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant." Water Science and Technology **59**(11): 2111-2116.
- Patel, A., S. Barrington and M. Lefsrud (2012). "Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms." Global Change Biology Bioenergy **4**(5): 1757-1707.

- Pavé, A. (1994). Modélisation en biologie et en écologie. Lyon, Aléas Editeurs.
- Pegallapati, A. K. and N. Nirmalakhandan (2012). "Modeling algal growth in bubble columns under sparging with CO<sub>2</sub>-enriched air." Bioresource Technology **124**(0): 137-145.
- Pellerin, S., L. Bamière, D. Angers, F. Béline, M. Benoît, J. P. Butault, C. Chenu, C. Colnenne-David, S. De Cara, N. Delame, M. Doreau, P. Dupraz, P. Faverdin, F. Garcia-Launay, M. Hassouna, C. Hénault, M. H. Jeuffroy, K. Klumpp, A. Metay, D. Moran, S. Recous, E. Samson, I. Savini and L. Pardon (2013). Quelle contribution de l'agriculture française à la réduction des émissions de gaz à effet de serre ? Potentiel d'atténuation et coût de dix actions techniques. Synthèse du rapport d'étude, INRA (France): 92.
- Perez-Garcia, O., L. E. de-Bashan, J. Hernandez and Y. Bashan (2010). "Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*." Journal of Phycology **46**(4): 800-812.
- Peu, P. (2011). La gestion des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré, cas particulier de la méthanisation, Université de Rennes 1-SDLM. **PhD**: 173.
- Peyraud, J.-L., P. Cellier, (coord.), F. Aarts, F. Béline, C. Bockstaller, M. Bourblanc, L. Delaby, C. Donnars, J. Y. Dourmad, P. Dupraz, P. Durand, P. Faverdin, J. L. Fiorelli, C. Gaigné, A. Girard, F. Guillaume, P. Kuikman, A. Langlais, P. Le Goffe, S. Le Perchec, P. Lescoat, T. Morvan, C. Nicourt, V. Parnaudeau, J. L. Peyraud, O. Réchauchère, P. Rochette, F. Vertes and P. Veysset (2012). Les flux d'azote liés aux élevages, réduire les pertes, rétablir les équilibres. rapport Inra (France). Expertise scientifique collective: 527 pages.
- Peyraud, J. L., P. Cellier, C. Donnars and O. Réchauchère (2012). "Les flux d'azote liés aux élevages, réduire les pertes, rétablir les équilibres. Synthèse du rapport d'Expertise scientifique collective." INRA: 68 pages.
- Portejoie, S., J. Martinez, F. Guiziou and C. M. Coste (2003). "Effect of covering pig slurry stores on the ammonia emission processes." Bioresource Technology **87**(3): 199-207.
- Pouliot, Y., G. Buelna and J. de la Noüe (1986). Caractérisation de différentes microalgues pour la valorisation d'effluents polluants. Renewable energy conference, Winnipeg, Manitoba.
- Pouliot, Y., P. Talbot and J. De la Noue (1986). Biotreatment of swine manure by the production of Spirulina biomass. Valorisation Energ et Biomassique des Dechets et Deriv de l'Agro-Aliment et de la For, Tours, France.
- Powell, N., A. Shilton, Y. Chisti and S. Pratt (2009). "Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics." Water Research **43**(17): 4207-4213.
- Powell, N., A. Shilton, S. Pratt and Y. Chisti (2011). "Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds." Water Science and Technology **63**(4): 704-709.
- Powell, N., A. N. Shilton, S. Pratt and Y. Chisti (2008). "Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds." Environmental Science and Technology **42**(16): 5958-5962.
- Quideau, P. and S. Lagadec (2013). Effets conjugués d'une évacuation rapide des déjections porcines et de leur méthanisation sur le devenir de la matière organique et les émissions de méthane. Journées Recherche Porcine.
- Ramesh, N. (1997). Factors affecting growth rates of *Scrippsiella* Sp. : light spectral quality, level and agitation.
- Ramesh, N. (1997). Factors affecting growth rates of *Scrippsiella* sp. : light spectral quality, level and agitation. University of Rhode Island.
- Ray, B., E. Poultreniez and D. Vandenberghe. (2006). "Les liens entre la photosynthèse et le photovoltaïsme." Retrieved 22-09-14, 2014.
- Redfield, A. C. (1958). "The biological control of chemical factors in the environment." American Scientist **46**(3): 205-221.
- Rigby, C. H., S. R. Craig and K. Budd (1980). "Phosphate uptake by *Synechococcus leopliensis* (cyanophyceae): enhancement by calcium ion1" Journal of Phycology **16**(3): 389-393.
- Risgaard-Petersen, N., M. H. Nicolaisen, N. P. Revsbech and B. A. Lomstein (2004). "Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae." Applied and Environmental Microbiology **70**(9): 5528-5537.

- Rousseau, P., J. P. Steyer, E. I. Volcke, N. Bernet and F. Beline (2008). "Combined anaerobic digestion and biological nitrogen removal for piggery wastewater treatment: a modelling approach." Water Sci Technol **58**(1): 133-141.
- Rusten, B. and K. S. Ashish (2011). "Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy." Water Science & Technology **64**(6): 1195-1201.
- Ryu, H. J., K. K. Oh and Y. S. Kim (2009). "Optimization of the influential factors for the improvement of CO<sub>2</sub> utilization efficiency and CO<sub>2</sub> mass transfer rate." Journal of Industrial and Engineering Chemistry **15**(4): 471-475.
- Sadava, D., D. M. Hillis, H. C. Heller and M. Berenbaum (2011). Life: The Science of Biology.
- Sandnes, J. M., T. Källqvist, D. Wenner and H. R. Gislerød (2005). "Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: Linking cellular responses to large-scale biomass production." Journal of Applied Phycology **17**(6): 515-525.
- Santiago, D. E. O., H.-F. Jin and K. Lee (2010). "The influence of ferrous-complexed EDTA as a solubilization agent and its auto-regeneration on the removal of nitric oxide gas through the culture of green alga *Scenedesmus* sp." Process Biochemistry **45**(12): 1949-1953.
- Schievano, A., G. D'Imporzano, S. Salati and F. Adani (2011). "On-field study of anaerobic digestion full-scale plants (Part I): An on-field methodology to determine mass, carbon and nutrients balance." Bioresource Technology **102**(17): 7737-7744.
- Sevrin-Reyssac, J. (1998). "Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable biomasses." Agriculture, Ecosystems & Environment **68**(3): 177-186.
- Sevrin-Reyssac, P. J., R. Blier, A. Dumas and Y. Ouelette (1996). "Intensive microalgae cultures integrated in an experimental lagooning recycling swine manure." Annee Biologique **35**(1): 41-68.
- Sforza, E., R. Cipriani, T. Morosinotto, A. Bertuccio and G. M. Giacometti (2012). "Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*." Bioresource Technology **104**: 523-529.
- Shi, J., B. Podola and M. Melkonian (2007). "Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study." Journal of Applied Phycology **19**(5): 417-423.
- Silva, H. J. and S. J. Pirt (1984). Carbon dioxide inhibition of photosynthetic growth of chlorella. London, ROYAUME-UNI, Cambridge University Press.
- Sim, T. S. and A. Goh (1988). "Ecology of microalgae in a high rate pond for piggery effluent purification in Singapore." MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology **4**(3): 285-297.
- Soletto, D., L. Binaghi, L. Ferrari, A. Lodi, J. C. M. Carvalho, M. Zilli and A. Converti (2008). "Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor." Biochemical Engineering Journal **39**(2): 369-375.
- Sousa, C., A. Compadre, M. H. Vermuë and R. H. Wijffels (2013). "Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*." Algal Research **2**(2): 122-126.
- Staub, R. (1961). "Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an *Oscillatoria tubescens* D.C." Schweiz. Z. Hydrol. **23**: 82-198.
- Sung, K. D., J. S. Lee, C. S. Shin, S. C. Park and M. J. Choi (1999). "CO<sub>2</sub> fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics." Bioresource Technology **68**(3): 269-273.
- Svoboda, I. F. and H. J. Fallowfield (1989). "An aerobic piggery slurry treatment system with integrated heat recovery and high-rate algal ponds." Water Science and Technology **21**(4-5 -5 pt 1): 277-287.
- Sydney, E. B., W. Sturm, J. C. de Carvalho, V. Thomaz-Soccol, C. Larroche, A. Pandey and C. R. Soccol (2010). "Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae." Bioresource Technology **101**(15): 5892-5896.
- Talbot, P., M. P. Gortares, R. W. Lencki and J. De la Noue (1991). "Absorption of CO<sub>2</sub> in algal mass culture systems: A different characterization approach." Biotechnology and Bioengineering **37**(9): 834-842.
- Tam, N. and Y. Wong (1994). Feasibility of using *Chlorella pyrenoidosa* in the removal of inorganic nutrients from primary settled sewage. Algal biotechnology in the Asia-Pacific region. University of Malaya, 291-9.
- Tamiya, H., E. Hase, K. Shibata, A. Iwamura and Y. Morimura (1953). "Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and temperature." Algal culture: From Laboratory to Pilot Plant, Burlew Carnegie Institute, Washington Publ. **600**: 76-84.

- Tang, D., W. Han, P. Li, X. Miao and J. Zhong (2011). "CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels." Bioresource Technology **102**(3): 3071-3076.
- Teglia, C. (2011). Valorisation par compostage de résidus solides de digestion anaérobie des déchets organiques, Ecole doctorale sciences de la matière - Chimie: 294 p.
- Titica, M. (2012). Valorisation des microorganismes photosynthétiques : de la capture biologique de CO<sub>2</sub> à la production de vecteurs énergétiques., GEPEA.
- Toerien, D. F., T. E. Cloete and A. J. H. Pieterse (1984). "Potential bacterial-algal interactions of a pond system for the treatment of cattle feedlot effluent." Agricultural Wastes **9**(3): 159-173.
- Travieso, L., F. Benítez, E. Sánchez, R. Borja, A. Martín and M. F. Colmenarejo (2006). "Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste." Ecological Engineering **28**(2): 158-165.
- Travieso, L., E. Sánchez, R. Borja, F. Benítez, M. León and M. F. Colmenarejo (2004). "Evaluation of a laboratory and full-scale microalgae pond for tertiary treatment of piggery wastes." Environmental Technology **25**(5): 565-576.
- Trémier, A., J. Buffet, S. Picard and P. Saint-Cast (2014). DIVA - Tâche 3.2 Caractérisation des digestats - Tâche 3.3 Biodégradabilité résiduelle.
- Ugwu, C. U., H. Aoyagi and H. Uchiyama (2008). "Photobioreactors for mass cultivation of algae." Bioresource Technology **99**(10): 4021-4028.
- Valiente Moro, C., O. Crouzet, S. Rasconi, A. Thouvenot, G. Coffe, I. Batisson and J. Bohatier (2009). "New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in Environmental Samples." Applied and Environmental Microbiology **75**(17): 5729-5733.
- Valigore, J. M., P. A. Gostomski, D. G. Wareham and A. D. O'Sullivan (2012). "Effects of hydraulic and solids retention times on productivity and settleability of microbial (microalgal-bacterial) biomass grown on primary treated wastewater as a biofuel feedstock." Water Research **46**(9): 2957-2964.
- Van Den Hende, S., H. Vervaeren and N. Boon (2012). "Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities." Biotechnology Advances **30**(6): 1405-1424.
- Van Den Hende, S., H. Vervaeren, S. Desmet and N. Boon (2011). "Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment." New Biotechnology **29**(1): 23-31.
- Van Den Hende, S., H. Vervaeren, H. Saveyn, G. Maes and N. Boon (2010). "Microalgal bacterial floc properties are improved by a balanced inorganic/organic carbon ratio." Biotechnology and Bioengineering **108**(3): 549-558.
- van Hannen, E. J., P. Fink and M. Lurling (2002). "A revised secondary structure model for the internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its implication for the phylogeny of these algae." European Journal of Phycology **37**(2): 203-208.
- Van Oorschot, J. L. P. (1955). "Medelel Landbouwhogesschool te Wageningen." **55**: 225.
- Vanormelingen, P., E. Hegewald, A. Braband, M. Kitschke, T. Friedl, K. Sabbe and W. Vyverman (2007). "The systematics of a small spineless *desmodesmus* species, *D. Costato-Granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 r DNA sequence analyses and cell wall morphology." Journal of Phycology **43**(2): 378-396.
- Verstraete, W., D. de Beer, M. Pena, G. Lettinga and P. Lens (1996). "Anaerobic bioprocessing of organic wastes." World Journal of Microbiology and Biotechnology **12**(3): 221-238.
- Wang, B., Y. Li, N. Wu and C. Lan (2008). "CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae." Applied Microbiology and Biotechnology **79**(5): 707-718.
- Wang, B., Y. Li, N. Wu and C. Q. Lan (2008). "CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae." Applied Microbiology and Biotechnology **79**(5): 707-718.
- Wang, H., H. Xiong, Z. Hui and X. Zeng (2012). "Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids." Bioresource Technology **104**: 215-220.
- Watson, M. K. (2009). Determination and modeling of growth and biomass production rate of freshwater algae as a function of media carbon content. Clemson University, USA. **PhD**.
- Watson, S., T. Halfhide and J. T. Trimmer (2011). Reducing the nutrient impacts of aquaculture through the use of an algal photobioreactor production system. Nutrient Recovery and Management, Miami, Florida.

- Waygood, E. R., A. Hussain, H. R. Godavari, Y. C. Tai and S. S. Badour (1980). "Purification and reclamation of farm and urban wastes by *Euglena Gracilis*: Photosynthetic capacity, effect of pH, temperature, acetate and whey." Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological **23**(3): 179-215.
- Weiland, P. (2013). "Production de biogaz par les exploitations agricoles en Allemagne." Revue SET **12**: 14-23.
- Wellinger, A. and A. Linberg (2000). *Biogaz Upgrading and Utilization*, International Energy Association ed, Paris, France.
- WERY, N., V. BRU-ADAN, C. MINERVINI, J.-P. DELGENES, L. GARRELLY and J.-J. GODON (2008). Dynamics of *Legionella* spp. and Bacterial Populations during the Proliferation of *L. pneumophila* in a Cooling Tower Facility. Washington, DC, ETATS-UNIS, American Society for Microbiology.
- Wu, J. F. and W. G. Pond (1981). "Amino acid composition and microbial contamination of *Spirulina maxima*, a blue-green alga, grown on the effluent of different fermented animal wastes." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **27**(1): 151-159.
- Xin, L., H. Hong-ying, G. Ke and Y. Jia (2010). "Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources." Ecological Engineering **36**(4): 379-381.
- Yun, Y. S., S. B. Lee, J. M. Park, C. I. Lee and J. W. Yang (1997). "Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **69**(4): 451-455.
- Zhang, H., A. Itakura and T. Matsuto (2012). "Carbon and nutrient distributions between gas, solid, and liquid in anaerobic digestion facilities for various types of organic waste." Biosystems Engineering **113**(1): 11-21.



## Sommaire des annexes

<i>Annexe 1 : Revue bibliographique sur l'épuration du CO<sub>2</sub> à l'aide d'une culture algale.....</i>	<i>256</i>
<i>Annexe 2 : vue de l'interface de régulation et d'acquisition.....</i>	<i>260</i>
<i>Annexe 3 : Schéma de régulation et d'acquisition (stratégie 2).....</i>	<i>261</i>
<i>Annexe 4 : Code Scilab pour le calage des paramètres relatifs à la lumière.....</i>	<i>262</i>
<i>Annexe 5 : Paramètres pour le calcul de la puissance perdue, cas du mois de juin.....</i>	<i>265</i>

## Annexe 1 : Revue bibliographique sur l'épuration du CO<sub>2</sub> à l'aide d'une culture algale

Le tableau suivant présente un bilan bibliographique de plusieurs études selon les paramètres :

- PPF<sub>D</sub> : Photosynthetic Photon Flux Density : rend compte de l'intensité de l'éclairage
- Charge en gaz (vvm) : volume de gaz fourni par unité de volume du réacteur par minute
- concentration en CO<sub>2</sub> : pourcentage volumique en CO<sub>2</sub> du gaz intrant
- efficacité de retrait du CO<sub>2</sub> : quantité de carbone enlevée du gaz
- Méthode : méthode utilisée pour mesurer l'intégration du CO<sub>2</sub> :
  - Gaz in – out : différence de quantité de CO<sub>2</sub> entre le gaz sortant et entrant, mesurée par des senseurs
  - BP x %C : estimation basée sur le produit de la productivité en biomasse et de la quantité de carbone contenue dans un g de biomasse
  - TIC : mesure du carbone inorganique total dissous dans le milieu

\* : Valeurs déterminées à partir de figures

Référence	Souche	PPFD ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	pH régulé	Milieu	Volume réacteur (L)	Charge en gaz (vvm)	concentration en CO <sub>2</sub> (%v)	Epuration du CO <sub>2</sub> (%)	Epuration du CO <sub>2</sub> ( $\text{g.C.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ )	Méthode	Taux de croissance (j-1)	Productivité en biomasse ( $\text{g.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ )	Remarque
(Jacob-Lopes <i>et al.</i> 2010)	Aphanothece microscopica N.	150	Non	synthétique	2.0	1.00	15%	3.9%	6.3	Gaz in – out	nd	0.270	
									6.7			0.303	
	6.9												
	11.00								0.754				
(Francisco <i>et al.</i> 2010)	Chlorella	150	Non	synthétique	3.0	1.00	15%	nd	7.0	Gaz in – out	nd	0.482	
	Dundiella								5.9			0.367	
	Phaeodactylum								0.6			0.072	
	Phormidium								7.4			0.415	
	Scenedesmus								4.6			0.655	
(Tang <i>et al.</i> 2011)	Chlorella pyrenoidosa SJTU-2	180	Non	synthétique	0.80	0.25	0.03%	nd	0.037	BP x %C	0.909	0.065	
							5%		0.067			0.133	
							10%		0.071			0.144	
							20%		0.061			0.121	
							30%		0.041			0.075	
	50%						0.029		0.054				
	Scenedesmus obliquus SJTU-3						180		Non			synthétique	0.80
						5%		0.078			0.158		

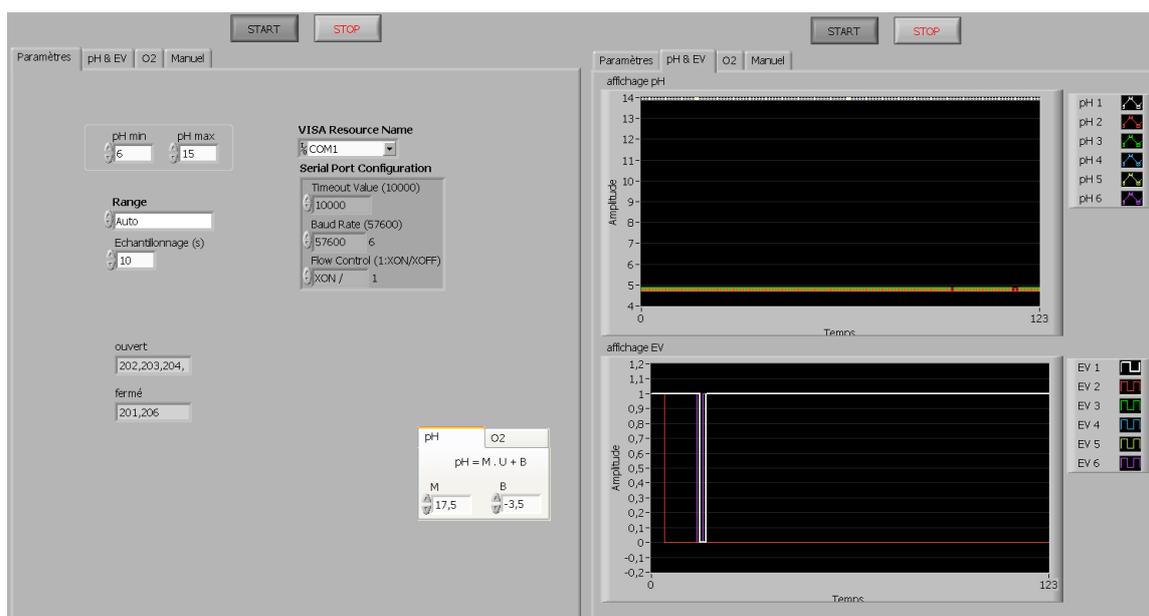
							10%		0.079			0.155	
							20%		0.067			0.134	
							30%		0.041			0.081	
							50%		0.029			0.056	
						0.2	0.5%	nd	0.091			0.191	
						0.2	1.0%	nd	0.123			0.255	
						0.2	2.0%	nd	0.141			0.295	
<b>(Ryu et al. 2009)</b>	Chlorella sp.	100	Non	synthétique	0.60	0.2	5.0%	0.20%*	0.159	BP x %C	nd	0.335	
						0.06	5%	0.52%*	nd			0.253*	
						0.1	5%	0.32%*	nd			0.260*	
						0.4	5%	0.10%*	nd			0.346*	
							15%	16%	4.69			0.002*	
							10%	20%	3.81		nd	0.002*	
<b>(Chiu et al. 2008)</b>	Chlorella sp. (marine)	300	Non	synthétique	0.8	0.25	5%	27%	2.59	Gaz in – out + TIC	0.127	0.010*	
							2%	58%	2.14		0.492	0.202*	
							Air	Nd	nd		0.230	0.090*	
												0.780	Utilisation de gaz
<b>(Lee et al. 2002)</b>	Chlorella sp. KR-1	450	Non	synthétique	0.05	0.5	15%	Nd	nd	nd	nd	0.124	d'échappement et
												0.710	différentes c° en Cox
												1.660	et NOx
<b>(Doucha et al. 2005)</b>	Chlorella sp. P12	solaire	Non	synthétique	400	0.38-1.45	5-7%	7.3 à 38.7%	nd	Gaz in – out	nd	2.700	
							Air					3.100	
							10%					0.114*	
<b>(Maeda et al. 1995)</b>	Chlorella sp. T-1	110	Non	synthétique	0.6	0.83	30%	Nd	nd	nd	nd	0.374*	souche adaptée au
							50%					0.354*	CO <sub>2</sub>
							80%					0.294*	
							100%					0.174*	
												0.074*	
							0.04%*	27%	0.03*			nd	
							0.1%*	55%	0.16*			nd	
<b>(Cheng et al. 2006)</b>	Chlorella vulgaris	158	Non	synthétique	10	0.3	0.25%*	38%	0.18*	nd	nd	nd	
							0.4%*	30%	0.21*			nd	
							0.9%*	15%	0.31*			nd	
							1.25%*	7%	0.29*			nd	
							2.7%*	2%	0.05			nd	
									0.84			nd	
<b>(Fan et al. 2007)</b>	Chlorella vulgaris	130	nd	synthétique	5.6	0.22	1%	Nd	0.92	Gaz in – out	nd	nd	Commentaires sur
									0.28			nd	l'impact du débit sur
									1.80			nd	les transferts gazeux
	Aphanothece											0.754	
	Chlorella vulgaris											0.482	
	Dunaliella								0.6			0.367	
<b>(Francisco et al. 2010)</b>	Phaeodactylum	150	Non	synthétique	3.0	1.0	15%	Nd	à	Electrode à CO2	nd	0.007	
	Phormidium								11.0			0.415	
	Scenedesmus											0.655	
	Synechococcus nidulans												

(Sydney <i>et al.</i> 2010)	Chlorella vulgaris LEB-104								0.069		0.29	0.31	
	B. braunii SAG-30.81								0.136		0.24	0.61	
	Spirulina platensis LEB-52	42	Oui	synthétique	8.0	nd	5%	Nd	0.087	Gaz in – out	0.22	0.73	
	Dunaliella tertiolecta SAD-13.86								0.074		0.21	0.42	
(Kurano <i>et al.</i> 1995)	Chlorococcum littorale	250	Non	synthétique	0.01	100			1.091		1.87	2.50	
					4	0.25	20%	Nd	0.177	BP x %C	1.87	0.40	
					20	0.05			0.232		1.80	0.53	
(Chae <i>et al.</i> 2006)	Euglena gracilis	480	Non	synthétique	1000	0.03	11%	Nd	nd	BP x %C	1.44	0.114*	
(Van Den Hende <i>et al.</i> 2011)	Microalgal bacterial flocs	100	Non	Eaux usées	4	0.0025	12%	49%	0.099	Gaz in – out + TIC		0.181	
						0.1	6%	58%					
						0.1	10%	65%					
						0.1	12%	66%					
						0.1	14%	64%					
						0.1	17%	57%					
(Li <i>et al.</i> 2011)	Scenedesmus obliquus WUST4	160	nd	synthétique	100	0.1	18%	40%	nd	Gaz in – out	nd	nd	nd
						0.05	12%	66%					
						0.1	12%	67%					
						0.15	12%	65%					
						0.2	12%	61%					
						0.3	12%	46%					
0.5	12%	19%											
(Santiago <i>et al.</i> 2010)	Scenedesmus sp.	200	nd	synthétique	1.0	0.30	15%	Nd	nd	/	nd	0.350	
(Yun <i>et al.</i> 1997)	Chlorella vulgaris	110	Non	Eaux usées	0.25	1.6	Air		Nd			0.317	
							5%		Nd	BP x %C	nd	0.413	Adaptation à 5% CO2
							15%		0.170			0.358	
(Wang <i>et al.</i> 2008)	Chlorococcum littorale			Nd			40%		0.273			Nd	
	Chlorella kessleri			Nd			18%		0.044			0.087	
	Chlorella sp. UK001			Nd			15%		>0,273			Nd	
	Chlorella vulgaris			Nd			15%		0,170			Nd	
	Chlorella vulgaris			synthétique			Air		0,020			0.040	
	Chlorella vulgaris			synthétique			Air		0,012			0.024	
	Chlorella sp.			synthétique			40%		0,273			Nd	
	Dunaliella	nd	nd	nd	nd	nd	3%	nd	0,085	nd	nd	0.170	
	Haematococcus pluvialis			nd			16-34%		0,039			0.076	
	Scenedesmus obliquus			nd			Air		0,004			0.009	
	Scenedesmus obliquus			eaux usées			Air		0,008			0.016	
	Botryococcus			eaux usées			-		>0,273			1.100	
	Scenedesmus obliquus			nd			18%		0,071			0.140	
Spirulina sp.			nd			12%		0,113			0.220		
(de Morais and Costa 2007)	Spirulina sp	43		synthétique	1.8		0.04%	96.8				0.39	
					1.8	0.3	6%	9.30			0.38		
					1.8	15mn/h	12%	5.46	nd	BP x %C	0.36		
					1.8		18%	2.48			0.26		

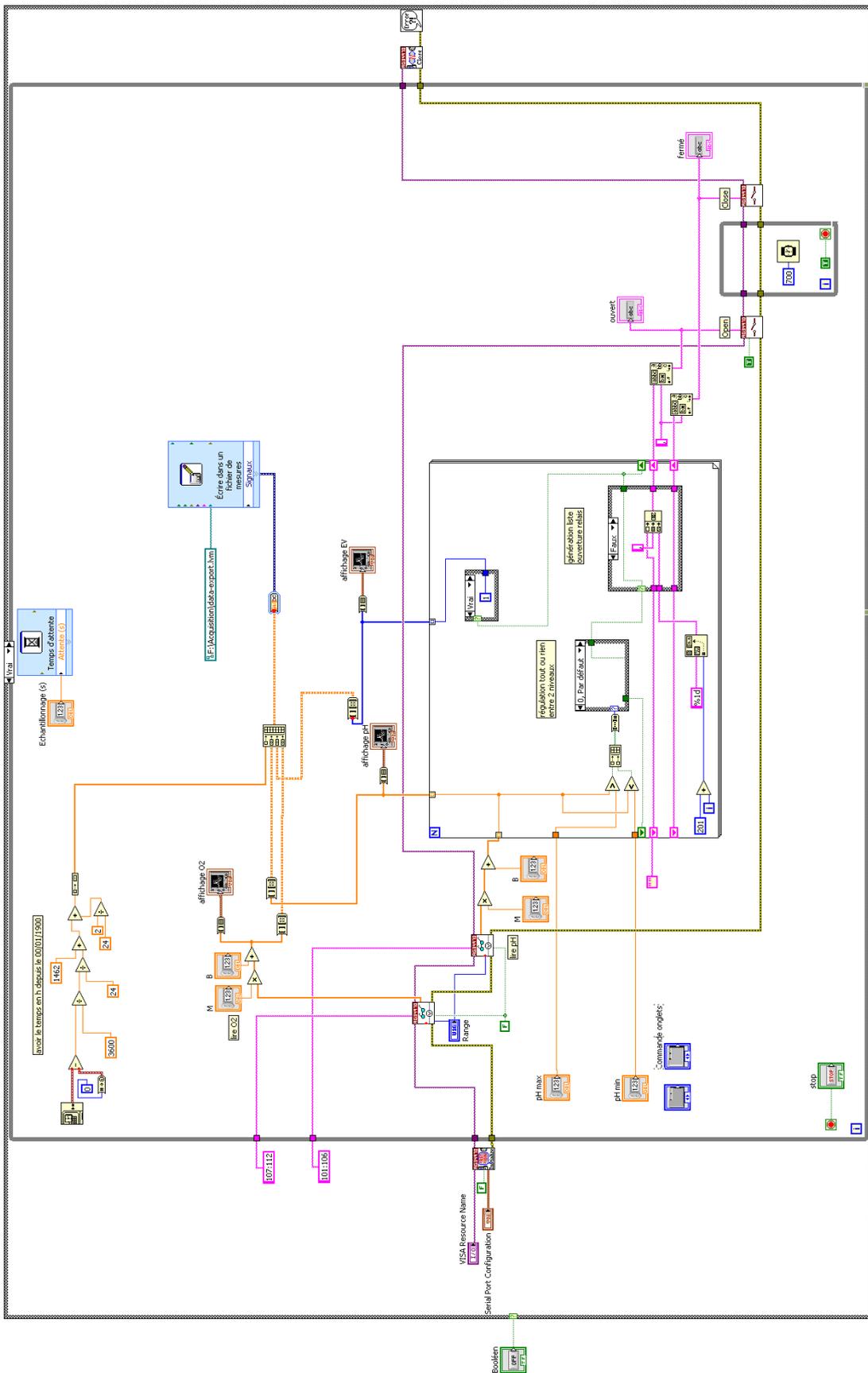
	3.5	0.04%	99.9	0.38	
	3.5	6%	9.15	0.42	
	3.5	12%	5.44	0.33	
	3.5	18%	3.48	0.18	
Scenedesmus obliquus	1.8	0.04%	80.5	0.29	
	1.8	6%	4.96	0.33	
	1.8	12%	2.58	0.33	
	1.8	18%	0.98	0.28	
	3.5	0.04%	88.8	0.18	
	3.5	6%	5.87	0.22	0.160
	3.5	12%	2.09	0.24	
	3.5	18%	1.53	0.33	
Chlorella vulgaris	1.8	0.04%	83.5	0.19	
	1.8	6%	6.25	0.26	
	1.8	12%	3	0.25	
	1.8	18%	0.6	0.21	
	3.5	0.04%	60.1	0.25	
	3.5	6%	1.36	0.31	
	3.5	12%	1.52	0.20	
	3.5	18%	0.31	0.12	0.140
Chlorella kessleri	1.8	0.04%	56.5	0.19	
	1.8	6%	5.52	0.25	
	1.8	12%	2.24	0.25	
	1.8	18%	2.51	0.39	0.180
	3.5	0.04%	89.7	0.35	
	3.5	6%	5.3	0.38	
	3.5	12%	2.78	0.39	
	3.5	18%	1.69	0.38	

---

## Annexe 2 : vue de l'interface de régulation et d'acquisition



## Annexe 3 : Schéma de régulation et d'acquisition (stratégie 2)



## Annexe 4 : Code Scilab pour le calage des paramètres relatifs à la lumière

```
clc
clear
funcprot(0)

// Concentration en microalgues (cells/mL)
// data from 25-02-13
y_exp(:,1) = [8000 23000 61000 101000 116000 192000 183000 196000]';
y_exp(:,2) = [13000 9000 53000 77000 116000 205000 232000 261000]';
y_exp(:,3) = [6000 26000 46000 67000 136000 192000 236000 303000]';
y_exp(:,4) = [8000 19000 8000 11000 8000 9000 17000 20000]';
y_exp(:,5) = [7000 16000 8000 20000 33000 40000 32000 85000]';
y_exp(:,6) = [9000 16000 15000 16000 36000 74000 57000 79000]';
// data from 12-03-13
y_exp(:,7) = [11000 9000 51000 104000 128000 182000 192000 284000]';
y_exp(:,8) = [9000 7000 14000 26000 46000 100000 114000 162000]';
y_exp(:,9) = [11000 13000 74000 185000 226000 356000 228000 428000]';
y_exp(:,10) = [11000 24000 22000 30000 78000 112000 168000 156000]';
y_exp(:,11) = [13000 27000 111000 201000 222000 272000 316000 332000]';
y_exp(:,12) = [14000 25000 150000 260000 254000 364000 396000 452000]';
// data from 27-03-13
y_exp(:,13) = [10000 10000 16000 33000 46000 84000 75000 104000]';
y_exp(:,14) = [7000 8000 40000 66000 135000 228000 180000 204000]';
y_exp(:,15) = [8000 12000 38000 78000 129000 180000 162000 248000]';
y_exp(:,16) = [6000 10000 11000 14000 11000 28000 23000 27000]';
y_exp(:,17) = [6000 7000 9000 25000 23000 31000 50000 49000]';
y_exp(:,18) = [5000 7000 22000 32000 42000 50000 55000 65000]';
// data from 11-04-13
y_exp(:,19) = [7000 24000 116000 188000 224000 332000 328000 392857]';
y_exp(:,20) = [8000 15000 39000 118000 140000 196000 288000 427429]';
y_exp(:,21) = [8000 12000 43000 103000 144000 192000 300000 480857]';
y_exp(:,22) = [7000 9000 30000 39000 82000 128000 160000 232571]';
y_exp(:,23) = [5000 9000 25000 51000 75000 136000 196000 238857]';
y_exp(:,24) = [8000 11000 27000 45000 99000 148000 184000 257714]';

// Concentration en N (assimilé, basé sur NH4, calc : [N]=[N-NH4]i-[N]disparue du système/assimilé)
// data from 25-02-13
z_exp(:,1) = [111.702 110.428 105.1765 95.256 86.654 80.112 71.0615 64.991]';
z_exp(:,2) = [110.222 112.593 106.114 95.7075 85.467 78.866 70.1525 63.809]';
z_exp(:,3) = [114.346 114.2135 103.252 97.298 87.9755 81.3565 72.6225 66.1225]';
z_exp(:,4) = [81.0525 77.5505 77.581 79.571 77.284 82.36 82.0385 81.813]';
z_exp(:,5) = [117.3215 121.549 114.4805 109.453 106.732 106.906 101.818 97.567]';
z_exp(:,6) = [118.227 123.528 113.161 109.992 108.0515 103.2425 98.4335 78.6705]';
// data from 12-03-13
z_exp(:,7) = [78.501 78.7015 83.516 81.672 64.3175 66.249 0 0]';
z_exp(:,8) = [117.632 115.758 110.0795 103.051 81.9815 79.7995 76.2505 70.2835]';
z_exp(:,9) = [119.6165 116.907 106.125 98.1235 71.1505 64.4005 58.359 56.4635]';
z_exp(:,10) = [69.7045 69.7045 66.6025 59.2755 52.0155 45.6445 0 0]';
z_exp(:,11) = [110.7045 110.936 97.851 86.8045 70.584 54.3635 47.6795 43.4015]';
z_exp(:,12) = [120.549 115.5895 100.0865 86.234 57.9745 52.5235 43.065 39.056]';
// data from 27-03-13
z_exp(:,13) = [117.102 112.127 104.6265 93.823 86.0625 77.374 71.6495 67.844]';
z_exp(:,14) = [61.961 63.0225 60.1885 55.876 48.604 41.332 0 0]';
z_exp(:,15) = [114.015 110.7825 102.806 92.163 83.395 74.627 69.366 70.1435]';
z_exp(:,16) = [123.0385 117.0465 114.794 111.481 106.279 101.077 98.353 99.59]';
z_exp(:,17) = [68.4395 66.577 68.016 67.3395 76.687 67.86 62.4715 63.3575]';
z_exp(:,18) = [114.021 112.726 110.439 110.279 108.263 104.0295 97.469 99.544]';
```

```

// data from 11-04-13
z_exp(:,19) = [96.085 89.9025 80.752 69.72 59.496 50.4195 45.778 38.318];
z_exp(:,20) = [115.8695 105.8495 93.105 80.3605 69.1115 61.4355 61.342 56.792];
z_exp(:,21) = [95.5175 91.4715 86.1915 74.4395 65.992 57.1625 53.884 50.09];
z_exp(:,22) = [96.3955 94.1795 95.9615 86.3765 84.0145 73.5695 70.7615 72.2735];
z_exp(:,23) = [93.5955 93.009 88.7515 80.731 74.5025 68.901 64.4215 58.3295];
z_exp(:,24) = [94.6 91.784 92.486 82.856 74.9645 70.269 66.577 64.375];

Fluxi = [148.27 148.71 140.59 51.65 54.36 52.76 148.27 148.71 140.59 233.60 238.9 244.0 148.27 148.71 140.59
51.65 47.12 43.29 241.30 241.80 242.50 ...
141.93 160.74 159.9]; // Flux de lumière incident (en  $\mu\text{molE}/\text{m}^2/\text{s}$ )

DOi = [0.425 0.416 0.414 1.286 0.374 0.191 1.325 0.399 0.149 1.358 0.363 0.221 0.384 0.893 0.379 0.194 0.917
0.382 0.855 0.25 0.892 0.885 0.87 0.887]; // Densité optique initiale

//Jb, coefficient d'atténuation (cm-1)
function [v]=Jb(t, y, k, j, DOi, Fluxi)
    g=12.789;
    h=0.000196202;
    i=54.7014;
    v = g + h*y + i*DOi(j);
endfunction

//Flux moyen (en  $\mu\text{molE}/\text{m}^2/\text{s}$ )
function [z]=Flux(t, y, k, j, DOi, Fluxi)
    a=0.902623;
    b=0.02971;
    c=0.0005421;
    d=0.00000557133;
    e=0.0000000299771;
    f=0.000000000653467;
    v=Jb(t, y, k, j, DOi, Fluxi);
    z=Fluxi(j)*(a-b.*v+c.*v.^2-d.*v.^3+e.*v.^4-f.*v.^5);
endfunction

// Model de Contois pour la lumière
function [ydot]=mymodel(t, y, k, j, DOi, Fluxi)
    z = Flux(t, y, k, j, DOi, Fluxi);
    ydot = k(1).*y.*(z./(k(2).*y+z));
endfunction

// starting guess
u = 0.8; //  $\mu$ 
K = 0.0001; //  $K'$ 
k = [u;K];
// -----
function [val]=L_Squares(k)
    val=[];
    u = k(1);
    K = k(2);
    pas=0.01
    time = [0:pas:7]
    t = time;
    q=0.00000014377*1000;
for j=1:24;
    y0 = y_exp(1,j);
    z0 = z_exp(1,j);
    y=ode(y0,0,t,mymodel);
    for m=1:8;
        n=((m-1)/pas+1);

```

```

    y_trans(:,m)=y(:,n);
end
y_calc(:,j)=y_trans';
z_calc(:,j)=z0-y_calc(:,j)*q
resid = (z_calc(:,j) - z_exp(:,j)).*(z_calc(:,j) - z_exp(:,j)); // Matrice des résidus
resid = sum(sum(resid))// Résidus pour l'expérimentation j
Residus(1,j)=resid(1,1)
end
    val = sum(sum(Residus));// Résidus totaux
endfunction
//-----
tic
options = optimset("TolFun",1D-04,"TolX",1.D-04,"MaxFunEvals",1.0D+07,"MaxIter",1.0D+07);
[param,L_Squares,flag,details] = fminsearch(L_Squares,k,options); // Algorithme de minimisation
elapsed_time = toc();
parametres = param'
u = parametres(1); K = parametres(2);
// Affichage
parametres
if flag == 1 then
printf('Le système converge\n\n');
else
printf('Le système ne converge pas\n\n');
end;
printf('nombre d itération ----- %g\n',details.iterations);
printf('Somme des carrés ----- %g \n',L_Squares);
printf('Nombre d appels du modèle ----- %g\n',details.funcCount);
printf('Algorithme de minimisation----- %s\n',details.algorithm);
printf('μ ');
write(%io(2),u)
printf('K :');
write(%io(2),K)
if elapsed_time<60 then
printf('Temps écoulé ----- %g s \n\n',elapsed_time);
else
printf('Temps écoulé ----- %g min \n\n',elapsed_time);
end;

```

## Annexe 5 : Paramètres pour le calcul de la puissance perdue, cas du mois de juin

Paramètre	Valeur	Unité
T° eau visée	25.0	°C
T° ambiante	17.7	°C
p sat (T eau)	2024	Pa
X' = humidité spécifique de l'air ambiant à la T de l'eau	6.3	g eau/ kg air
X = humidité spécifique de l'air saturé à la T de l'eau	12.7	g eau/ kg air
V du vent	3.3	m/s
h	7.6	W/m <sup>2</sup> .K
Puissance solaire	234.7	W/m <sup>2</sup>
S	1	m <sup>2</sup>
coeff absorption lum solaire océans	0.9	à 600 nm
coeff absorption lum solaire végétation (c <sub>A</sub> )	0.8	à 600 nm
V digestat	6000	m <sup>3</sup> (5800 pour les Manets)
dilution	10	
T° digestat	35	°C
T° eau nappe	12	°C



## Résumé

Les conditions de culture de microalgues autotrophes en système ouvert associant microalgues/bactéries ont été étudiées au cours de ce travail de thèse. L'objectif était de développer un procédé de valorisation des nutriments (N, P) contenus dans la phase liquide des digestats issus de méthanisation agricole. Dans un premier temps, une synthèse sur les filières de méthanisation suivi d'un état de l'art sur les microalgues et leurs conditions de culture ont permis de mettre en évidence les principaux paramètres d'influence spécifiques à l'influent étudié, tels que la coloration, et les interactions avec les processus de nitrification/dénitrification.

Ainsi, dans le but de mieux comprendre les mécanismes et d'évaluer les impacts des paramètres principaux, un pilote de laboratoire composé de 6 réacteurs de 2,5 litres a été conçu et des analyses spécifiques ont été développées au laboratoire. A partir de ces outils, l'effet de la couleur et de la lumière sur la pénétration de la lumière et sur la croissance algale a été quantifié. L'impact positif de la lumière s'est révélé d'importance équivalente à l'impact négatif de la couleur sur la croissance. Au cours de la culture, la concentration en algues augmente jusqu'à rendre la pénétration de la lumière dans le milieu faible, exacerbant le poids de la lumière. Ensuite, l'influence du ratio N/P du milieu a été testée, ce qui a permis de mettre en exergue le stockage du phosphore par les microalgues, leur permettant de continuer leur croissance lorsque le phosphore du milieu est épuisé. En outre, le taux et la vitesse d'élimination de l'azote ne sont pas impactés, tandis que celle celui du phosphore augmente avec la concentration en P du milieu. Par la suite, le transfert du dioxyde de carbone et son impact sur la croissance des microalgues ont été étudiés. La productivité algale est fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> fournie à la culture et chute à 0 sans injection. Le transfert en condition de culture est optimal lorsque la croissance des microalgues est forte, c'est-à-dire lorsque la concentration en carbone inorganique du milieu est plus faible et que la consommation algale est élevée. Enfin, l'étude du temps de séjour des solides et de leur fréquence d'extraction a révélé que la nitrification-dénitrification est un mécanisme important d'élimination de l'azote dans une culture algale en continu et en système ouvert. Il peut même s'avérer prédominant par rapport à l'assimilation de l'azote par les microalgues dans certaines conditions. La proportion de chacun de ces processus peut néanmoins être contrôlée par ces paramètres.

Ces expérimentations ont par ailleurs permis de mieux comprendre les interactions entre microalgues et bactéries nitrifiantes ainsi que la prédominance des genres d'algues en fonction des conditions de culture. Les microalgues sont de meilleures compétitrices sur le phosphore que les bactéries nitrifiantes. De plus, lorsque le phosphore n'est pas limitant, la nitrification est réduite en proportion de la productivité algale. En cas de limitation en phosphore et avec une faible lumière disponible, les genres d'algues qui se sont montrés dominants sont *Scenedesmus* sp. et *Chlorella* sp. respectivement.

Les essais expérimentaux ont été complétés par le développement ou l'adaptation de modèles biocinétiques capables de représenter la croissance algale et l'épuration assez fidèlement. A partir de cette modélisation, différentes configurations ont été simulées pour dimensionner un lagunage algal à haut rendement et ainsi mieux comprendre et apprécier la faisabilité d'une culture algale pour extraire les nutriments des digestats.

**Mots clefs :** *microalgues, bactéries, digestat, couleur, lumière, ratio N/P, CO<sub>2</sub>, SRT, modélisation, dimensionnement.*

VU :

**Le Directeur de Thèse**

VU :

**Le Responsable de l'Ecole Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINÉAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le président de jury,**