Table des matières

Avant-Propos iii

Remerciements iv

Résumé vi

Table des matières viii

Liste des figures xi

Liste des tableaux xiv

Liste des acronymes, des symboles et des sigles xv

Chapitre I - Introduction 1

1.1 La biomasse, une source d'énergie alternative aux ressources fossiles 1

1.2 Mise en contexte 5

1.2.1 Le Projet RTA 6

1.2.2 Le Projet VERTECH I 7

Chapitre II - Problématique et objectifs 8

2.1 Problématique 8

2.1.1 But et objectifs 8

Chapitre III - Revue de littérature 11

3.1 Généralités sur les microalgues 11

3.1.1 Qu'est-ce qu'une microalgue ? 11

3.1.2 Métabolisme algal 11

3.1.3 Le choix des microalgues pour produire des biocarburants 12

3.1.4 Les lipides chez les algues 14

3.1.5 Les techniques de culture de la biomasse algale 16

3.2 Le choix du mode culture en deux étapes : Mixotrophie – Phototrophie 19

3.2.1 Une définition des modes trophiques pas toujours claire 19

3.2.2 Des divergences sur le mode trophique à choisir 20

3.2.3 Le choix de la mixotrophie pour favoriser le développement de la biomasse 22

3.2.4 Le choix de la phototrophie pour stimuler l'accumulation en lipides 23

3.3 L'intensité lumineuse 24

3.4 Les sources de carbone organiques : glucose et alternatives 25

Chapitre IV - Matériels et méthodes 26

4.1 Souches 26

4.1.1 Projet RTA 26

4.1.2 Projet VERTECH I 26

4.2 Méthodes de culture 26

4.2.1 Projet RTA 26

4.2.2 Projet VERTECH I 27

4.3 Le milieu de culture 28

4.3.1 Projet RTA 28

4.3.2 Projet VERTECH 29

4.4 Plan d'expériences 29

4.4.1 Expériences projet RTA 29

4.4.2 Expériences en lien avec le projet VERTECH I : 33

4.4 Paramètres mesurés quotidiennement 34

4.4.1 Concentration en biomasse algale 34

4.4.2 Mesure du pH 36

4.5 Récolte des algues, extraction et transestérification des lipides 36

4.5.1 Récolte 36

4.5.2 Extraction des lipides 37

4.5.3 Transestérification 37

4.6 Méthodes d'analyses 38

4.6.1 Chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS) 38

4.6.2 Chromatographie ionique 38

4.6.3 Analyse du glucose, du COT et de l'azote total 38

4.6.4 Analyses statistiques 39

Chapitre V - Résultats et discussion 40

5.1 Projet RTA 40

5.1.1 Objectif 1 40

5.1.2 Objectif 2 47

5.1.3 Objectif 3 54

5.1.4 Objectif 4 58

5.2 Projet VERTECH 63

5.2.1 Objectif 5 63

5.2.2 Objectif 6 68

5.2.3 Objectif 7 74

Chapitre VI - Conclusion 78

Références Bibliographique 80

Annexe 1 : Milieu de culture RTA 86

Annexe 2 : Milieu de culture VERTECH 87

Annexe 3 : Liste des acides gras 88

Liste des figures

Figure I-1 : Sources d'énergie mondiale 1
Figure I-2 : Stades de production de biodiesel à partir de biomasse algale 3
Figure I-3: Schéma global du Projet RTA 6
Figure I-4: Schéma global du projet VERTECH 7
Figure III-1 : Quelques microalgues 11
Figure III-2 : Comparaison des sources de biodiesel 13
Figure III-3 : Un phospholipide 14
Figure III-4 : Un triglycéride 14
Figure III-5 : Réaction générale de la transesterification 15
Figure III-6 : Réaction de la transestérification d'un triglycéride 15
Figure III-7: "open race ponds" 16
Figure III-8: Illustration d'un photo-bioréacteur 17
Figure III-9: Fermenteur 18
Figure III-10 : Pilot Algafuel™ 18
Figure III-11 : Voies métabloiques simplifiées de la synthèse des TAG 19
Figure III-12: Graphique comparant la concentration en biomasse et le taux en lipides en fonction du mode trophique 21
Figure III-13: Teneur en lipide en fonction des conditions de culture 23
Figure IV-1 : Filtration de l'eau RTA contenant le SCP macéré 28
Figure IV-2: Macération du SCP 28
Figure IV-3: Montage utilisé pour les expériences 1 et 2 30
Figure IV-4 : Présentation des conditions de la deuxième étape de culture 32
Figure IV-5 : Photobioréacteur utilisé pour les expériences 4 et 5 32
Figure IV-6: Filtres contenant la biomasse sèche 35
Figure IV-7: Aperçue de la souche RTA au microscope optique x400 36
Figure IV-8: Speed Vac système (évaporateur centrifuge) 37
Figure V-1 : Évolution de la productivité en biomasse en fonction des conditions opératoire 40
Figure V-2 : Évolution de la densité cellulaire au cours du temps et en fonction des conditions de culture 41

Figure V-3 : Évolution de la concentration en nutriment au cours du temps 43
Figure V-4 : Évolution de la concentration en glucose au cours du temps 45
Figure V-5 : Teneur et productivité en lipides en fonction des conditions expérimentales 46
Figure V-6 : Productivité en biomasse selon les conditions de la seconde étape de culture 48
Figure V-7 : Densité cellulaire en fonction des conditions de la seconde étape de culture 49
Figure V-8 : Évolution de la concentration en nutriments au cour du temps 50
Figure V-9 : Évolution de la concentration en glucose au cours du temps 51
Figure V-10 : Évolution de la teneur et la productivité en lipides en fonction de la deuxième étape de culture 52
Figure V-11 : Évolution de la biomasse sèche et de la concentration en nutriments au cours du temps 54
Figure V-12 : Évolution de la densité cellulaire au cours du temps 55
Figure V-13 : Évolution de la concentration en glucose au cours du temps 56
Figure V-14 : Teneur et productivité en lipide aux jours 0, 4 et 8 de culture 57
Figure V-15 : Proportions en acides gras en fonction des conditions de la 2nd étape de culture 59
Figure V-16 : Proportions en acides gras en fonction des conditions de culture 60
Figure V-17 : Proportions en acides gras en fonction des jours de culture 61
Figure V-18 : Évolution de la densité cellulaire au cours du temps 64
Figure V-19 : Évolution de la biomasse sèche et de la concentration en nutriment au cours du temps 64
Figure V-20 : Évolution de la concentration en glucose au cours du temps 66
Figure V-21: Évolution de la teneur en lipides en fonction des jours de cultures 67
Figure V-22 : Productivité en biomasse selon les conditions opératoires 69
Figure V-23 : Évolution de la densité cellulaire au cours du temps 69
Figure V-24 : Évolution de la biomasse sèche au cours du temps 70
Figure V-25 : Variation de la teneur et de la productivité en lipides en fonction des conditions opératoires 72

Figure V-26 : Proportions des acides gras en fonction des jours de culture 73
Figure V-27 : Proportions en acide gras en fonction des conditions de culture 71

Liste des tableaux

Tableau III-1: Les différents modes trophiques pouvant être utilisés par les microalgues 12
Tableau III-2 : Détails des modes trophiques en fonction de la nature des composés assimilés 12
Tableau III-3 : Résultats de Yeng et Chang 22
Tableau IV-1 : Traitements appliqués pour l'expérience 1 29
Tableau IV-2 : Traitements appliqués pour l'expérience 2 30
Tableau IV-3 : Traitements de l'expérience 6 33
Tableau IV-4 : Proportions des différents effluents utilisés..... 34
Tableau V-1: Différences de profil d'acide gras entre la culture en fioles et celle en PBR 63
Tableau V-2 : Concentration en N_T et COT ($mg.L^{-1}$) 70
Tableau V-3 : Différences de profil d'acide gras entre la culture en fioles et celle en... PBR 75
Tableau Annexe 1-1: Milieu de culture RTA 86
Tableau Annexe 2-1: Milieux de culture VERTECH 87
Tableau Annexe 2-2: Proportion des effluents industriels 87

Rapport-Gratuit.com

Liste des acronymes, des symboles et des sigles

AG	Acides Gras
AN	Avec Nutriments
COT	Carbone Organique Total
CRIEB	Chaire de Recherche Industrielle en Environnement et Biotechnologie
CRML	Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
M	Mixotrophie sans ajout de CO_2
M1	Mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1%
M2	Mixotrophie avec ajout de CO_2 à 2%
P1	Phototrophie avec ajout de CO_2 à 1%
P2	Phototrophie avec ajout de CO_2 à 2%
MM	Même Milieu
NA	Nutriments Alternatifs
N_T	Azote Kjeldahl Total
RTA	Rio Tinto Alcan
SCP	Sous-Produit Carboné
SN	Sans Nutriments
TAG	Triacylglycérols
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
Wf	Biomasse finale
Wi	Biomasse initiale
Δt	Temps de culture en jours

Chapitre I - Introduction

1.1 La biomasse, une source d'énergie alternative aux ressources fossiles

A l'heure actuelle les ressources fossiles que sont le pétrole, le charbon et le gaz représentent la majorité de l'énergie utilisée dans le monde. Elles sont principalement utilisées dans des domaines comme le transport, l'industrie ou encore l'alimentation. En termes de chiffres, les énergies fossiles représentent 81 % de l'énergie mondiale dont 33 % pour le pétrole (Figure I.1)[1]. Remarquons que l'utilisation de la biomasse ainsi que des énergies renouvelables (solaire, éolien, géothermie...) ne représente que 11 % de l'énergie globale.

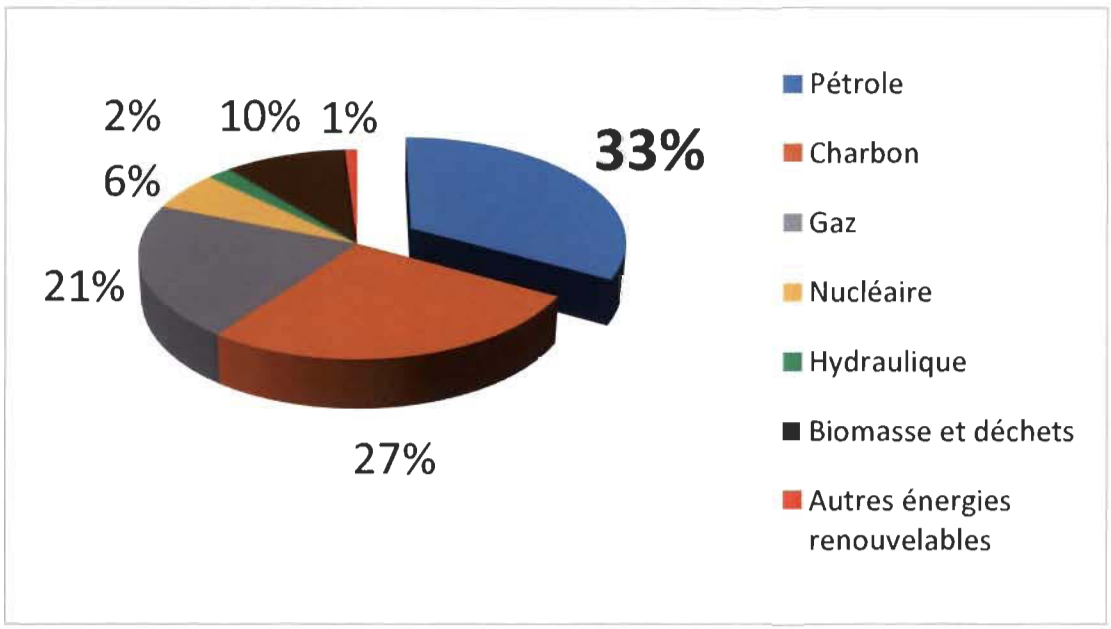

Figure I-1 : Sources d'énergie mondiale

Les énergies fossiles sont aujourd'hui à la base de nombreuses préoccupations à l'échelle mondiale. Tout d'abord, le problème majeur lié à ces ressources et leurs raréfactions. En effet Shafie et ses collaborateurs ont estimé en 2009 l'épuisement des ressources non renouvelables dans 35, 37 et 107 ans respectivement pour le pétrole, le gaz et le charbon [1]. Il faut noter que ces calculs ne prennent pas en compte l'utilisation d'autres méthodes d'exploitation qui permettent d'exploiter des gisements auparavant inaccessibles et qui posent de nombreux problèmes éthiques et environnementaux. Le fractionnement hydraulique pour l'exploitation du gaz de schiste ou encore l'utilisation

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

des sables bitumineux en sont des exemples. Les réserves de pétrole tendent à disparaître avec le temps alors que la demande en carburant est présente et ne cesse d'augmenter. En effet, il y avait déjà plus d'un milliard de voitures dans le monde en 2010 [2]. Ensuite, l'exploitation des ressources fossiles présente des problèmes environnementaux, notamment avec la pollution qu'elle engendre. Elle est impliquée dans l'accélération du réchauffement climatique par la production de gaz à effet de serre.

Devant ces divers enjeux énergétiques, économiques et écologiques, de nouvelles technologies renouvelables et non-génératrices de gaz à effet de serre sont étudiées. Les biocarburants issus de la biomasse peuvent être une alternative aux énergies fossiles et ils sont classés en trois générations. La première génération utilise comme source de biomasse les cultures qui sont traditionnellement destinées à l'alimentation, par exemple le maïs, la canne à sucre ou encore les céréales. Le substrat de départ pour la seconde génération est la biomasse lignocellulosique comme les résidus forestiers ou agricoles. La troisième génération tente de s'affranchir du sol via l'utilisation de micro-organismes.

Nous nous intéressons ici à la 3ième génération de biocarburants et plus particulièrement aux microalgues, car la culture de ces dernières est actuellement en plein essor. Les 1ère et 2ème générations d'agrocarburants utilisent des terres arables, engendrent de la déforestation et augmentent la consommation d'eau et le prix des denrées alimentaires. Ces biocarburants augmentent aussi la pollution du fait de l'utilisation de pesticides et d'engins agricoles afin d'augmenter leur productivité. Ces différents problèmes ne s'appliquent pas à la 3ième génération de biocarburants. Plusieurs avantages découlent de la 3ième génération comme une capacité de production de biomasse plus importante et des fréquences de récoltes plus élevées. Les microalgues présentent une bonne adaptation aux changements de milieu et contrairement aux plantes terrestres, elles ont un taux de croissance beaucoup plus élevé. En effet, elles sont capables de doubler leur croissance en 3,5 heures [3] [4]. De plus, leur production est continue sur toute l'année car elles ne dépendent pas des saisons. Cela permet d'avoir une plus grande quantité d'huile produite comparativement aux carburants de 1ère et 2ème génération.

La culture intensive de ces microorganismes pour produire de l'énergie présente un avenir prometteur afin de répondre aux différents problèmes liés aux énergies fossiles.

En effet, l'huile présente dans les cellules algales peut être transformée en biodiesel après extraction [5]. De plus, la biomasse algale peut être, après séchage, utilisée directement comme combustible du fait d'un fort contenu lipidique chez certaines d'entre elles. Cette teneur en lipide leurs confère un pouvoir calorifique intéressant [6].

Le frein majeur de cette génération de biocarburant est son coût. En effet, les « algocarburants » ne sont pas encore assez compétitifs pour rivaliser avec les carburants traditionnels. Cependant, le secteur fait l'objet de nombreuses études afin d'améliorer ce point négatif. En 2006, Xu et ses collaborateurs estimaient la production de biodiesel algal à plus de 0,50$ le litre contre 0,35$ le litre pour le diesel fossile [7]. Satyanarayama et son équipe estiment en 2011 le cout de production de biodiesel algale à 2,80$ le litre alors que le diesel est à 0,49$ [8]. Il y a un an, en 2014, Jason C. Quinn et ses collaborateurs ont donné une palette de prix pour le biodiesel algale. Ce dernier est de 1,64 $ à plus de 30 $ par gallon soit de 0,43$ à plus de 7,92$ le litre [9]. Ces amplitudes de prix entre les différents auteurs s'expliquent par la variation de productivité en huile des microalgues ainsi que par la variation des méthodes utilisées lors de la production de carburant. La production de biodiesel comporte différentes étapes comme la culture, la récolte, l'extraction des huiles et leur conversion en biocarburant. La figure I-2 présente les différentes étapes de production de biodiesel à partir de microalgues [3]

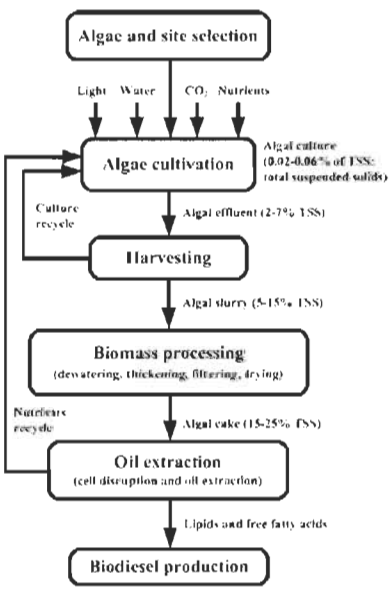

Figure I-2 : Stades de production de biodiesel à partir de biomasse algale

Afin de diminuer le coût de production des algocarburants plusieurs solutions sont étudiées comme l'implantation de cultures d'algues dans des parcs industriels déjà existants. Nous sommes ici dans le cadre de projets de bioraffinage où les microalgues vont permettre par exemple le recyclage des eaux usées. Pittman et son équipe montrent que plusieurs espèces de microalgues ont la capacité de se développer dans des milieux contenant une faible concentration d'eau douce [6]. Elles peuvent se développer dans les eaux saumâtres, salées et également dans les eaux usées. Les eaux usées contiennent de forte concentration d'azote et de phosphore et certaines, en fonction de leur provenance contiennent des métaux lourds. Cela pose un problème pour le traitement des eaux et c'est à ce niveau que les algues interviennent. Effectivement, les microalgues peuvent se développer dans des milieux riches en nutriments, elles vont pouvoir épurer un milieu riche en substrat. Elles permettent de diminuer le coût du traitement des eaux et également de réduire le phénomène d'eutrophisation lié aux fortes concentrations en azote et phosphore des eaux usées. Les microalgues peuvent donc avoir un rôle important durant la phase tertiaire (dernière étape) du traitement des eaux, en assimilant l'azote et le phosphore présents en forte concentration dans cette étape. L'utilisation d'eaux usées d'origine domestique, agricole ou industrielle permet donc de diminuer les coûts de production de biocarburants issus des microalgues.

D'autres effluents industriels peuvent être utilisés afin de réduire les coûts de production des algocarburants, comme le dioxyde de carbone provenant d'effluents gazeux. Le dioxyde de carbone, qui est le substrat de la photosynthèse, est utilisé par les algues comme source de carbone. Utiliser le dioxyde de carbone des usines permet de réduire la quantité de gaz à effet de serre émis dans l'atmosphère par les industries. Notons également que certains rejets industriels comme des lixiviats de sites d'enfouissement de déchets municipaux contenant des nutriments peuvent être utilisés dans la culture des microalgues. Un autre moyen de diminuer le coût de la culture algale est d'utiliser la chaleur résiduelle provenant des usines pour maintenir le milieu de culture à une température constante.

Les microalgues ont la capacité de pouvoir réagir à un changement de leur environnement en modifiant leurs voies métaboliques. En effet, en fonction des conditions

du milieu (disponibilité en lumière, source de carbone, ...), elles vont pouvoir utiliser différents modes trophiques comme la phototrophie, l'hétérotrophie ou encore la mixotrophie. Ces propriétés sont intéressantes lors de l'utilisation d'eaux usées puisque leur composition est variable [6].

Il est important de constater qu'il y a d'autres voies de valorisation énergétique possible avec les microalgues. En effet il est possible de produire du bioéthanol par fermentation des sucres algaux. Les algues peuvent également produire de l'hydrogène pouvant être utilisé par la suite dans des piles à combustible ou encore pour produire de l'électricité. La production de méthane via le processus de méthanisation par la digestion anaérobie est envisageable sur la biomasse résiduelle une fois l'extraction des lipides réalisée [10][6].

Notons également que la culture d'algues à l'échelle industrielle permet la production d'autres métabolites à haute valeur ajoutée et aux domaines d'applications variés. Par exemple la production de divers colorants à partir des pigments qu'elles contiennent, la fabrication de compléments alimentaires et de nutraceutiques à partir des protéines contenues dans la biomasse algale ainsi que l'extraction de polymères et la fabrication de bioplastiques ou encore la création de cosmétiques.

1.2 Mise en contexte

Dans la perspective d'un transfert progressif de l'économie actuelle basée sur les ressources fossiles vers une « bioéconomie » où la biomasse sera beaucoup plus utilisée, les algues auront un rôle important. Les algues sont une source importante en biomasse et peuvent produire des métabolites capables de remplacer des molécules d'origine pétrochimique. La culture d'algue offre des opportunités de décentralisation des unités de production de carburant permettant de sécuriser les approvisionnements puisqu'elles peuvent s'insérer sur place dans les parcs industriels.

Dans ce mémoire nous aborderons des travaux s'intégrant dans deux projets industriels de bioraffinage qui ont pour but d'utiliser les microalgues afin d'ajouter de la valeur aux effluents produits par les industries tout en essayant de devenir autonome en énergie. Ce sont les projets projet Rio Tinto Alcan (RTA) à Alma et VERTECH I à Victoriaville.

1.2.1 Le Projet RTA

Devant les divers enjeux économiques, énergétiques et environnementaux actuels un projet de recherche a démarré en 2011, en collaboration entre l'aluminerie Rio Tinto Alcan (RTA), la compagnie Algal Labs, le Centre d'innovation sur les Produits Cellulosiques (Innofibre) du Cégep de Trois-Rivières et la Chaire de Recherche Industrielle en Environnement et Biotechnologie (CRIEB) de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR). Le but de ce projet était d'évaluer la faisabilité de développer un procédé de production de biocarburant à partir de microalgues cultivées en mixotrophie dans les eaux usées d'une usine RTA à Alma, en bassin ouvert. Un schéma de ce projet est illustré dans la figure I-3.

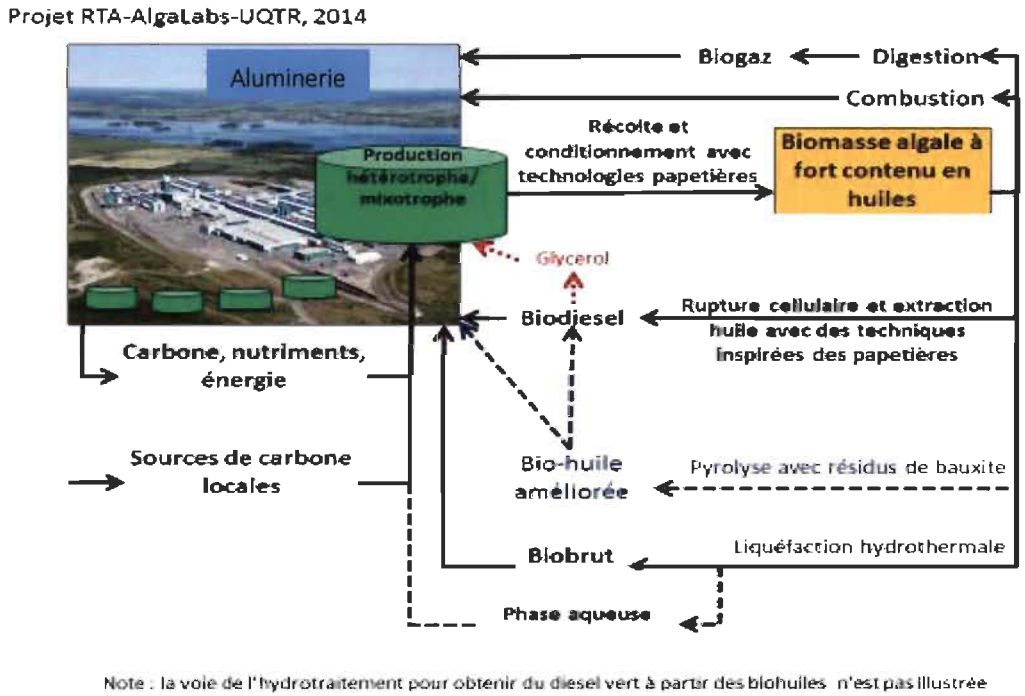

Figure I-3: Schéma global du Projet RTA

En effet, l'usine RTA, comme de nombreuses industries, étudie la potentialité d'utiliser la biomasse comme moyen de substitution aux énergies fossiles employées dans l'usine. Cela est fait dans le but de réduire sa dépendance aux carburants fossiles et de diminuer son empreinte environnementale, mais aussi pour baisser les coûts énergétiques et permettre le traitement d'une partie des eaux usées qu'elle génère et de recycler le dioxyde de carbone produit par l'usine.

La productivité en biomasse et en lipides totaux visées dans le cadre du projet global par l, sont respectivement de 0,4g·L^{-1}· jour $^{-1}$ et 0,16g·L^{-1}· jour $^{-1}$. Les équipes d'Alga-Labs, de RTA et de la CRIEB ont estimé que ces objectifs permettraient d'aller de l'avant avec des essais de démonstration à plus grande échelle si elles étaient atteintes.

1.2.2 Le Projet VERTECH I

Le projet VERTECH est un projet d'écologie industrielle intégrant la production de microalgues via la réutilisation et la récupération de flux résiduel de matière et d'énergie (eaux usées, chaleur résiduelle, …) provenant des stations d'épuration et du parc industriel P.-A.-Poirier de Victoriaville, ainsi que du site d'enfouissement technique de St-Rosaire (lixiviat). Le but de ce projet est de produire des surfactants verts à partir d'acide gras à chaine moyenne (C12:0 /C14:0) pour l'industrie Sani Marc, mais aussi du biodiesel afin d'alimenter la flotte de véhicules des différentes entreprises du projet et ceux de la ville de Victoriaville. Un schéma de ce projet est illustré dans la figure I-4

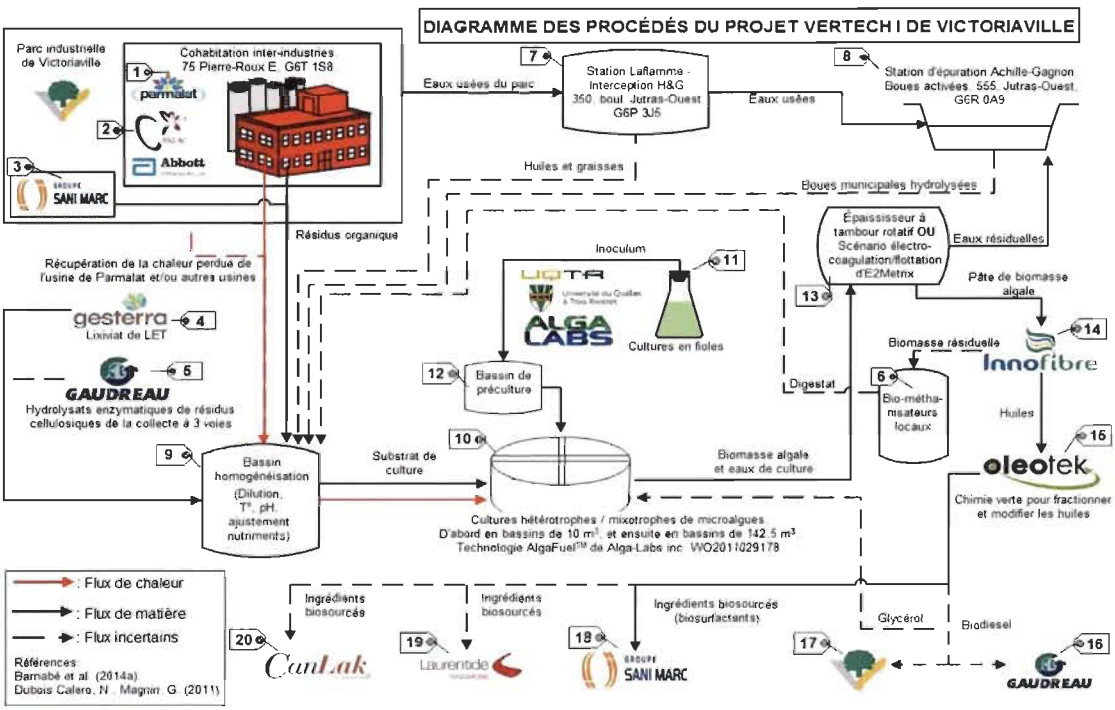

Figure I-4: Schéma global du projet VERTECH

Chapitre II - Problématique et objectifs

2.1 Problématique

Les expériences antérieures au projet réalisées au sein de la CRIEB ont montré que les eaux usées, dans le cadre des projets RTA et VERTECH, peuvent supporter la croissance algale. Les conditions de cultures doivent cependant être étudiées afin de définir celles qui permettront une production maximale de biomasse et de lipide. Les eaux du projet RTA ne contiennent pas assez de nutriments pour le bon développement de celle-ci. Les concentrations optimales en nutriments à ajouter aux milieux de culture ont été déterminées dans des expériences antérieures à ce projet. Ces expériences ont également démontré que la lumière et le CO_2 ont un effet sur le développement des microalgues [11][12][13][14]. En effet, la lumière et le CO_2 sont d'une grande importance puisque la première fournie l'énergie nécessaire à la fixation du second, lors de la photosynthèse.

L'utilisation de plusieurs modes trophiques présente des avantages et inconvénients car ces modes ne favorisent pas la même chose. En effet selon les expériences précédentes, il a été établit que l'hétérotrophie et la mixotrophie favorisent la production de biomasse, et que la phototrophie favorise l'accumulation de lipides [12][13][14]. Il est donc nécessaire de trouver le bon équilibre entre les différents paramètres que sont la lumière, la concentration en dioxyde de carbone et les différents modes trophiques afin d'augmenter la production de lipides de nos souches.

Finalement, la phase mixotrophique requiert un apport en carbone organique. Afin de diminuer les coûts de production, des sources alternatives doivent être envisagées en remplacement du glucose.

2.1.1 But et objectifs

Le but de ce projet est d'évaluer si la culture en deux étapes favorise la productivité en biomasse et en lipides de deux souches (RTA et VERTECH), soit des consortiums algues-bactéries dominés par Chlorella sp, cultivés dans leur milieu respectif à base d'eaux usées industrielles. Ces consortiums ont été isolés de ces mêmes effluents, pour le projet RTA et le projet VERTECH lors de travaux antérieurs.

La première étape consiste à favoriser une productivité maximale de biomasse via une culture en mixotrophie. La seconde à permettre une accumulation maximale en lipide via un passage en phototrophie. L'étude de la souche VERTECH comporte aussi l'évaluation de sources de carbone alternatives étant donné leur disponibilité dans le cadre de ce projet.

2.1.1.1 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques se subdivisent selon les projets étudiés.

2.1.1.2 Objectifs en lien avec le projet RTA

- **Objectif 1**

Définir la concentration en CO_2 optimale pour la productivité en biomasse et en lipides d'une culture mixotrophique de la souche RTA, en fioles, dans le milieu de culture à base d'eaux usées de l'usine de Rio Tinto Alcan à Alma.

- **Objectif 2**

Mesurer la productivité en biomasse et en lipides d'une culture de la souche RTA en deux étapes, dans le même milieu de culture. La première étape sera réalisée en mixotrophie et la deuxième en phototrophie.

- **Objectif 3**

Évaluer si une prolongation de chacune des étapes de la culture en deux étapes augmente la productivité en lipides et en biomasse de la souche RTA, pour une culture dans le même milieu, en bioréacteur.

- **Objectif 4**

Caractériser le profil d'acide gras de la souche RTA selon les différentes conditions de culture expérimentées.

Rapport-Gratuit.com

2.1.1.3 Objectifs en lien avec le projet VERTECH I

- **Objectif 5**

Appliquer les conditions de la culture en deux étapes de l'objectif 4 du projet RTA à la souche VERTECH, cultivée dans un mélange d'effluents industriels provenant du parc industriel de la ville de Victoriaville.

- **Objectif 6**

Mesurer la productivité en biomasse et en lipides de la souche VERTECH dans son milieu de culture contenant des résidus carbonés en remplacement du glucose, et ce, en concentration définie selon leur disponibilité dans les usines liées au projet VERTECH.

- **Objectif 7**

Caractériser le profil d'acide gras de la souche VERTECH selon les différentes conditions de culture expérimentées.

Chapitre III - Revue de littérature

3.1 Généralités sur les microalgues

3.1.1 Qu'est-ce qu'une microalgue ?

Les microalgues (figure III-1) sont des micro-organismes photosynthétiques eucaryotes (ex : algues vertes, rouges et brunes) ou procaryotes (ex : cyanobactéries). Elles peuvent être unicellulaires ou multicellulaires. Elles ont la capacité de se développer rapidement dans des milieux et elles peuvent croître dans des conditions extrêmes (espèces halophiles dans les milieux très salés, espèces thermophiles dans les milieux très chauds). Les microalgues sont présentes dans quasiment tous les écosystèmes terrestres, et il en existe une grande variété d'espèces (50 000 à 1 million d'espèces estimées pour 30 000 étudiées)[3][15].

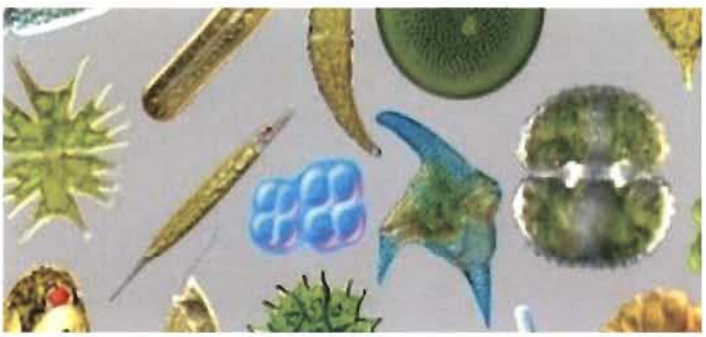

Figure III-1: Quelques microalgues [15]

3.1.2 Métabolisme algal

Les algues sont des organismes autotrophes ou phototrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent la lumière (via la photosynthèse) et du carbone inorganique (CO_2) afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP et du sucre pour assurer leur croissance. Toutefois, les algues ont la capacité de changer de mode trophique en fonction des variations des conditions de l'environnement où elles se développent (Tableau III-1). Elles peuvent passer d'un métabolisme à l'autre en fonction du milieu [16][17]. Nous pouvons distinguer deux autres types trophiques en plus de celui autotrophe : l'hétérotrophie et la mixotrophie. En l'absence de lumière, les algues en mode hétérotrophe utilisent dans ce cas une source de carbone organique dans le but de substituer la fixation de CO2 par la respiration cellulaire. Elles vont donc consommer de l'oxygène. Enfin la mixotrophie ou photohétérotrophie est un mixte entre la phototrophie et l'hétérotrophie. Les microalgues utilisent le carbone organique et inorganique du milieu en présence de lumière pour

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

subvenir à leurs besoins énergétiques. Elles vont donc utiliser concomitamment la respiration cellulaire et la photosynthèse. [6][17][18].

Modes Trophiques	Nutriments	Molécules générées	Voies métaboliques
Autotrophe	H_2O, CO_2, et sels minéraux	O_2 et composés organiques	Photosynthèse
Hétérotrophe	Matière organique et O_2	H_2O, CO_2 et composés organique	Respiration
Mixotrophe	H_2O, CO_2, O_2, sels minéraux et matière organique	O_2, H_2O, CO_2 et composés organiques	Photosynthèse et Respiration

Tableau III-1: Les différents modes trophiques pouvant être utilisés par les microalgues

Une classification plus détaillée (Tableau III-2) des modes trophiques autotrophes et hétérotrophes est possible, elle prend en compte le type de carbone assimilé en plus de la source d'énergie.

Source d'énergie	Type de Carbone	Mode trophique
Lumière	Organique	Photohétérotrophe
	Minérale – CO_2	Photoautotrophe
Composé chimique Organique ou Inorganique	Organique	Chimiohétérotrophe
	Minérale – CO_2	Chimioautotrophe

Tableau III-2 : Détails des modes trophiques en fonction de la nature des composés assimilés

3.1.3 Le choix des microalgues pour produire des biocarburants

La culture de microalgues semble être un moyen prometteur afin de répondre aux besoins énergétiques futurs du fait de leur teneur en lipides élevée et de leurs productivités

en biomasse élevées. Les microalgues présentent un net avantage par rapport aux biocarburants des générations antérieures en terme de rendement d'huile par surface. En effet, comme l'indique Chisti et ses collaborateurs (figure III-2)[10], les microalgues contenant 30% de lipides (en masse sèche) ont besoin d'environ 350 fois moins d'espace que le maïs pour une production d'huile par hectare bien plus élevée (58 700 $L.ha^{-1}.an^{-1}$ contre 172 $L.ha^{-1}.an^{-1}$). Cet écart est encore plus important quand les lipides représentent 70% du poids des microalgues (136 900 $L.ha^{-1}.an^{-1}$ contre 172 $L.ha^{-1}.an^{-1}$). En effet, dans ce cas, la production d'huile par hectare est environ 800 fois plus élevée que le maïs [10]. Yang et son équipe vont dans ce sens en expliquant que les cultures d'algues ont un rendement en huile 300 fois plus important que les cultures terrestres [19].

Comparison of some sources of biodiesel

Crop	Oil yield (L/ha)	Land area needed (M ha)[a]	Percent of existing US cropping area[a]
Corn	172	1540	846
Soybean	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coconut	2689	99	54
Oil palm	5950	45	24
Microalgae[b]	136,900	2	1.1
Microalgae[c]	58,700	4.5	2.5

[a] For meeting 50% of all transport fuel needs of the United States.
[b] 70% oil (by wt) in biomass.
[c] 30% oil (by wt) in biomass.

Figure III-2: Comparaison des sources de biodiesel [11]

Beaucoup de recherches ont été effectuées sur la productivité en biomasse et la teneur en lipides des microalgues. En 2004, Richmond démontre que le taux de lipides peut atteindre 70% et même 85% du poids sec d'une cellule d'algue lorsque les conditions de culture favorisant leurs productions sont réunies [18]. Mata et son équipe montrent qu'une souche de *Chlorella protothecoïdes* peut atteindre une productivité en biomasse de 2,00 à 7,70 $g.L^{-1}$ avec une teneur lipidique de 14,6 à 57,7% du poids sec de la cellule algale pour une productivité en lipide de 1214 $mg.L^{-1}.jour^{-1}$[3]. Christi en 2008 affirme que le rendement net global en énergie provenant d'une culture d'algue en étang ouvert (race pond) est de 1444 $G.J.ha^{-1}.an^{-1}$ contre 163,9 $G.J.ha^{-1}.an^{-1}$ pour du biocarburant issu de canne à sucre [20].

Les microalgues semblent donc plus avantageuses que les cultures terrestres en termes de productivité en biomasse, de teneur en lipides et de productivité d'huile par hectare.

3.1.4 Les lipides chez les algues

Les lipides présents dans les cellules algales peuvent être classifiés en deux grandes catégories, les lipides neutres et les lipides polaires. Les triglycérides (figure III-3), aussi appelés triacylglycérols (TAG) appartiennent à la première catégorie tandis que les phospholipides et glycolipides, constituants principaux de la membrane plasmique, font partie du second groupe.

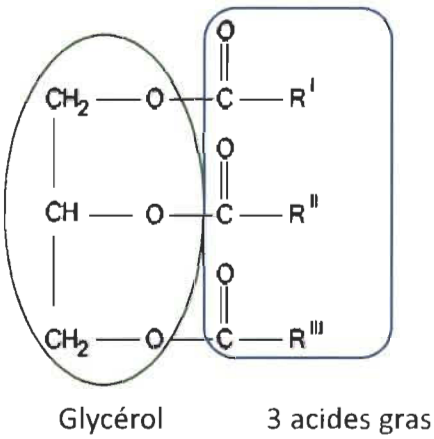

Figure III-3 : Un triglycéride

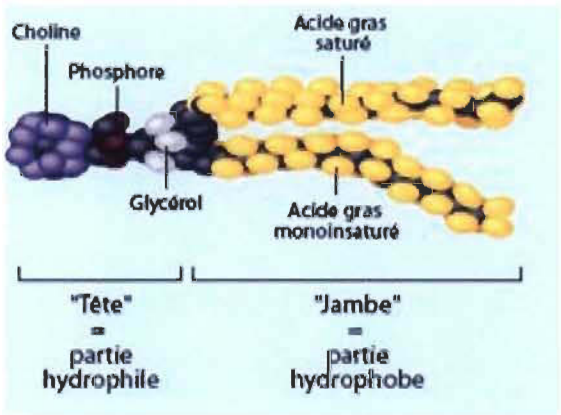

Figure III-4 : Un phospholipide [21]

Ce sont les triglycérides, qui sont des substances de réserve et s'accumulent dans les vacuoles des cellules, que nous ciblons. En effet, selon Pruvost et ses collègues, les TAG ont un meilleur potentiel pour être transformés en biodiesel du fait de leurs plus forte concentration en acide gras et de l'absence de groupement phosphate [21]. Dans le cas des phospholipides (figure III-4) la présence d'un groupement phosphate donne un diesel de moins bonne qualité, et il est plus difficile à purifier.

Les TAG sont transformés en biodiesel par une réaction de transestérification (figure III-5) pour donner des esters d'alkyle d'acide gras. La réaction de transestérification ou

encore appelée alcoolyse fait réagir un ester avec un alcool pour produire un ester différent (figure III-6) [22].

Figure III-5 : Réaction générale de la transestérification

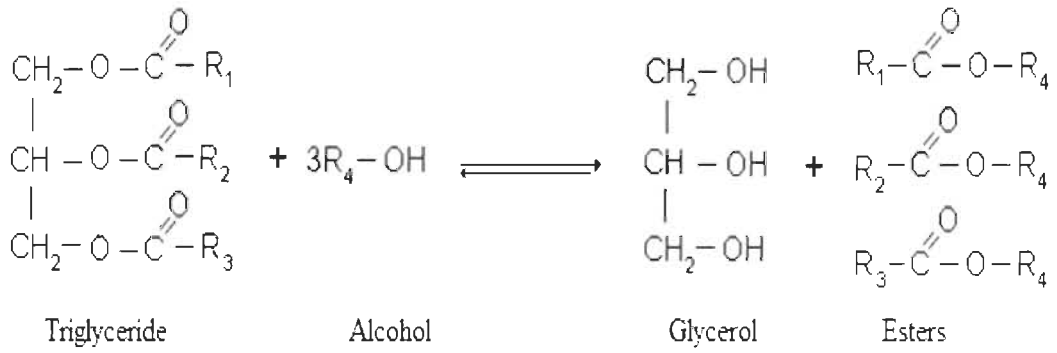

Figure III-6 : Réaction de la transestérification d'un triglycéride

En général, le groupement alkyle est un méthyle ou un éthyle car les réactifs les plus courants lors d'un transestérification sont le méthanol ou l'éthanol [7][8].

Pour qu'une huile algale puisse donner du biodiésel, elle doit respecter plusieurs critères : la longueur des chaines carbonées des acides gras, le nombre d'insaturations et leurs positions sur la chaîne. En fonction de ces différents paramètres les propriétés du carburant produit comme la densité, le pouvoir calorifique, le point éclair ou encore la viscosité, vont varier. Il faut donc bien connaitre les lipides produit par la souche d'algue ciblée. De plus, le ratio des acides gras a une répercussion sur la qualité du biocarburant formé d'où l'importance du profil lipidique des souches d'algues choisies.[7][23][24].

Selon plusieurs auteurs, une huile algale contenant un taux important en acide gras mono-insaturés à 16 et 18 carbones est une huile au profil adéquat [24][25]. En effet, il permet un équilibre entre viscosité et stabilité oxydative. Après de nombreuses études sur le taux de production en huile et le profil en lipide de plusieurs souches de microalgues il a été démontré que certaines espèces de *Chlorella sp* possédent les attributs nécessaires pour produire un biodiesel de qualité comparable au diesel d'origine fossile [7][23][26].

3.1.5 Les techniques de culture de la biomasse algale

Il existe diverses méthodes de cultures pour produire de la biomasse algale en quantité : les étangs ouverts, les photo-bioréacteurs et les fermenteurs. Dans les deux premiers cas, des cultures phototrophes et mixotrophes peuvent être réalisées tandis que, dans le dernier, des cultures hétérotrophes sont réalisées.

⇨ **Étang ouvert ou open ponds (figure III-7)**

Le système d'étang artificiel ouvert le plus utilisé est l'étang « Raceway ». Il s'agit d'une boucle ovale fermée où l'on cultive les algues dans 0,2 à 0,5 m de profondeur d'eau. Il y a la présence d'une roue à aube permettant un processus de culture continue et qui empêche la sédimentation des algues en créant un flux constant. Les algues et les éléments nutritifs sont introduits devant la roue. En plus de la présence du CO_2 atmosphérique, il y a des aérateurs sous l'eau qui injecte du gaz afin d'avoir une bonne diffusion de ce dernier. Pour la production d'algue à grande échelle, cette méthode est moins onéreuse que la culture algale en photo-bioréacteur. Cependant, la production de biomasse est plus faible avec cette méthode qu'avec un photo-bioréacteur ou un fermenteur [3][10][27].

Figure III-7: "open race ponds" [28]

⇨ **Photobioréacteurs (figure III-8)**

Les photobioréacteurs sont des systèmes fermés. Ils permettent de remédier à certains inconvénients des étangs ouverts comme la mauvaise diffusion de la lumière et du CO_2 ainsi que l'homogénéisation imparfaite du milieu. De plus ils diminuent grandement le risque de pollution et de contamination de la culture dû à l'exposition à l'air libre. Le système est composé de tubes ou de panneaux pouvant être verticaux, horizontaux inclinés ou encore en hélice (pour les tubes). Les tubes présentent un diamètre

de 0,1 m ou moins. Les panneaux sont constitués d'un sac en plastique à usage unique, dont le volume est variable, situé entre des plaques en fer. Dans un photobioréacteur, les conditions de cultures sont strictement contrôlées et la productivité en biomasse est supérieure à un étang ouvert. Toutefois, comparé aux étangs ouverts, ce système reste plus onéreux (coût du matériel). De nombreuses études sont réalisées sur ce système de culture car il permet d'obtenir de meilleur rendement de croissance algale pour la production de biodiesel [8][10][28][29].

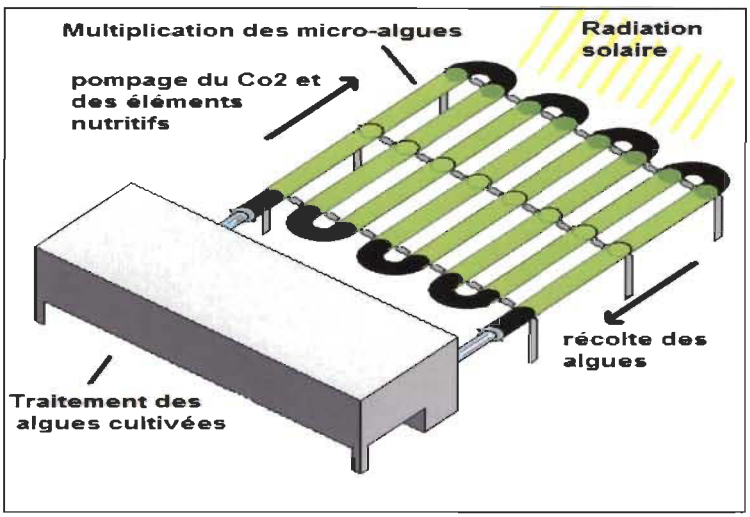

Figure III-8: Illustration d'un photo-bioréacteur [29]

⇨ **Les fermenteurs (figure III-9)**

Les bioréacteurs fermés ou fermenteurs sont utilisés pour la culture d'algue hétérotrophe. À l'échelle industrielle, le volume de culture des réacteurs se situe entre 80 et 200 m^3. Ce système de culture est avantageux par rapport aux systèmes de cultures autotrophes. Effectivement, avec ce fermenteur, les moyens de contrôle et de régulation du milieu de culture sont très développés. De plus, les caractéristiques et le fonctionnement de ce système sont bien maitrisés aujourd'hui, ce qui permet de maintenir le milieu dans les conditions optimales pour une croissance maximale des cellules algales. En stérilisant le réacteur et le milieu de culture, le risque de contamination par d'autres micro-organismes est limité [3][17] [30] [31].

Figure III-9: Fermenteur [32]

Borowitzka et ses collaborateurs ont montré que via cette méthode, le rendement de biomasse algale obtenue était bien supérieur comparé aux systèmes d'étangs ouverts. Effectivement ils rapportent que, pour des cultures hétérotrophes, le rendement de biomasse algale est de 20 à 100 g.L-1 contre 0,5 à 1,0 g.L-1 pour des cultures phototrophes [30].

Dans le cadre des projets RTA et VERTECH I, une culture à grande échelle en mixotrophie en bassin ouvert est envisagée avec le bassin pilot Algafuel™ de 10 m^3 (figure III-10). De forme circulaire, il dispose d'un système d'agitation conçu pour une homogénéisation optimale du milieu de culture. L'installation est moins dispendieuse qu'un système de photobioréacteurs. De plus, selon Jorquera et son équipe (2010), le ratio d'énergie net est meilleur dans le cadre de système de type étang ouvert [32].

Figure III-10 : pilot Algafuel™

3.2 Le choix du mode de culture en deux étapes : Mixotrophie – Phototrophie

3.2.1 Une définition des modes trophiques pas toujours claire

Le choix du mode de culture a une grande influence sur la productivité en biomasse et en lipides mais également sur le profil des lipides dans les cellules algales. Nous avons vu précédemment que les microalgues peuvent employer différents modes trophiques leurs permettant de s'adapter aux changements du milieu dans lequel elles évoluent. Certaines études montrent que l'hétérotrophie permettrait une meilleure accumulation en lipides qu'une culture en phototrophie [33][34][26][17]. Comme nous l'avons abordé antérieurement, la phototrophie nécessite de la lumière et du dioxyde de carbone pour la photosynthèse alors que l'hétérotrophie (figure III-11) exige un apport en carbone organique. En ce qui concerne la mixotrophie, elle nécessite un apport de carbone organique, un apport de CO_2 et la présence de lumière. La figure III-11 présente les voies métaboliques responsables de la synthèse des TAG dans le cadre de la phototrophie (ou autotrophie) et de l'hétérotrophie.

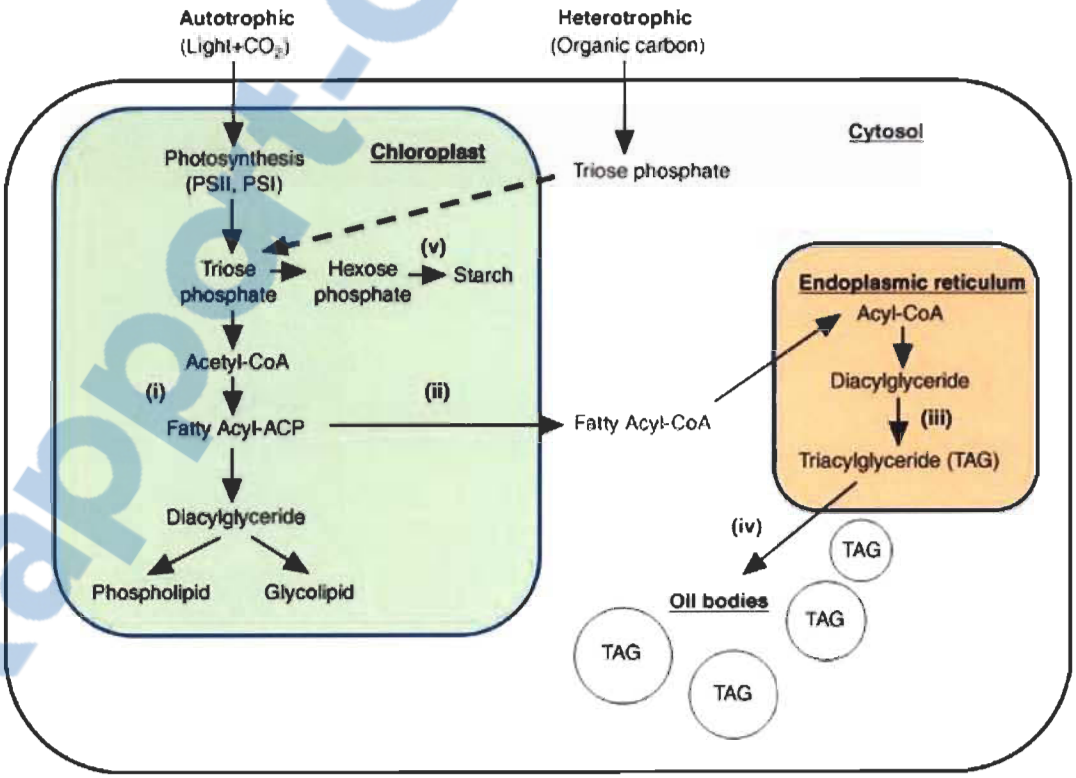

Figure III-11 : Voies métaboliques simplifiées de la synthèse des TAG [25]

Rapport-Gratuit.com

Selon certains auteurs, on distingue deux types d'hétérotrophie, l'hétérotrophie stricte en absence totale de lumière et l'hétérotrophie en présence de lumière [35]. Une certaine confusion autour de ce second type d'hétérotrophie et de la mixotrophie est retrouvée dans la littérature. Pour divers auteurs, la photohétérotrophie ou hétérotrophie en présence de lumière consiste en de la mixotrophie, ils utilisent donc ces termes comme synonymes [36][37]. D'autres auteurs différencient la mixotrophie de la photohétérotrophie [38]. En fait, La mixotrophie se distinguerait de la photohétérotrophie par son besoin en dioxyde de carbone [3]. Yang et son équipe prétendent que la lumière est la source principale d'énergie de la mixotrophie tout en nécessitant un apport en carbone organique et en CO_2 [19]. Ces auteurs définissent la photohétérotrophie comme un mode trophique où la lumière est nécessaire pour assimiler le carbone organique et pas comme source d'énergie. Dans le cas de la photohétérotrophie, la source d'énergie serait donc chimique et il n'y aurait aucune fixation de CO_2 car la source de carbone employée serait uniquement organique. Selon Chojnacka et son équipe la lumière pourrait, en photohétérotrophie, servir d'activateur d'enzyme dans l'assimilation du carbone organique [16]. Finalement, Zhang et ses collègues émettent l'hypothèse que la lumière est la source d'énergie de la photohétéotrophie et que la source de carbone est strictement organique. Il est évident qu'il y a un véritable imbroglio dans la définition de ces termes.

3.2.2 Des divergences sur le mode trophique à choisir

Il existe des divergences dans la littérature concernant les modes trophiques à privilégier dans le cadre de production de biomasse et de lipides. Tout d'abord, si on s'intéresse à la biomasse, certains auteurs prétendent que c'est en hétérotrophie que la production est la plus importante, comparativement à la mixotrophie et la phototrophie [39][40][41]. D'autres montrent l'inverse, c'est-à-dire que la mixotrophie entraîne une production en biomasse plus importante [17][26][42]. Ces contradictions se retrouvent également au niveau de la productivité en lipides. En effet, certains chercheurs prétendent que la productivité en lipide est meilleure en mixotrophie comparativement à l'hétérotrophie [26]. Pendant que d'autres affirment que la phototrophie est la meilleure voie pour produire des lipides comparativement à la mixotrophie ou l'hétérotrophie [43]. Cependant, pour Zheng et son équipe (2012), l'hétérotrophie et la phototrophie présentent une production en lipides similaire dans leurs expérimentations [41].

D'autres divergences existent en fonction des auteurs, prenons l'exemple de la figure III-12 [40].

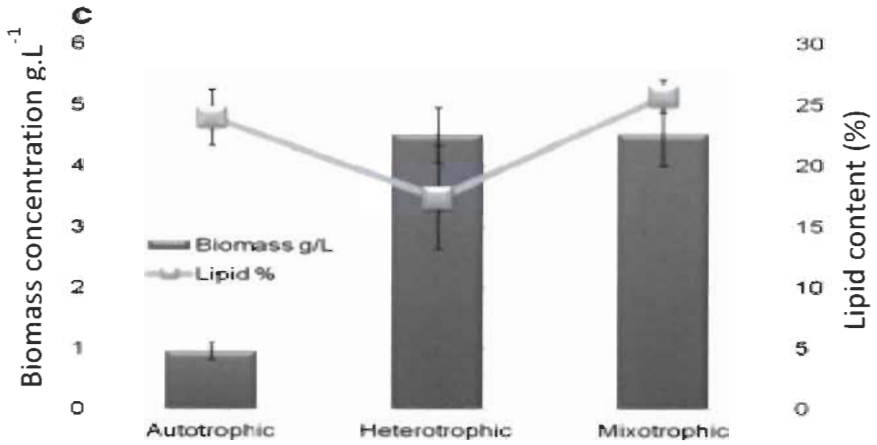

Figure III-12 : Graphique comparant la concentration en biomasse et le taux en lipides en fonction du mode trophique

Pour la concentration en biomasse, l'auteur montre que celle-ci est équivalente entre la mixotrophie et l'hétérotrophie et qu'elle est inférieure en phototrophie. Alors qu'auparavant, il a était observé que que la mixotrophie présentait une productivité en biomasse supérieur ou inférieur comparativement à l'hétérotrophie [17][26][39][40][41][42].

Pour le taux de lipides, il est montré clairement que la mixotrophie et la phototrophie présentent un taux similaire et supérieur à l'hétérotrophie. Alors que préalablement, il a était évoqué que la phototrophie donnait de meilleurs taux de lipide qu'en mixotrophie [41] [43].

Cette variabilité de résultats en fonction des auteurs peut s'expliquer par les différentes espèces d'algues utilisées. En effet bien que le genre soit commun : *chlorella sp* entre les différents articles, l'espèce utilisée est différente (*Vulgaris, sorokinia* ou en encrore *protothecoides*). De plus, des variabilités au sein d'une même espèce ne sont pas à exclure. En effet, en fonction de son environnement, la souche peut évoluer différemment. Il est donc nécessaire de bien connaitre la souche de microalgue avec laquelle on travaille.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.2.3 Le choix de la mixotrophie pour favoriser le développement de la biomasse

Dans le cadre de notre stratégie de culture en deux étapes nous avons choisis la mixotrophie en première étape afin de stimuler la croissance de la biomasse. Ce choix est justifié par les expériences antérieures du projet RTA [13][12]. Malgré des divergences dans la littérature sur la meilleure manière de produire de la biomasse, de nombreux auteurs vont dans le sens de la mixotrophie [26][17][42][44]. De plus, selon Vonshak et son équipe, le taux de croissance est plus élevé en mixotrophie qu'en phototrophie [45]. Abreu et ses collaborateurs vont dans le même sens en présentant un taux de croissance spécifique de 0,43 j^{-1} en mixotrophie contre 0,13 j^{-1} en phototrophie, ainsi qu'une concentration en biomasse en fin de culture de 3,58 g.L-1 contre 1,22 $g.L^{-1}$ [46].

Les expériences de Yeng et Chang (2013) démontrent également la meilleure productivité de l'hétérotrophie. Dans leurs expériences, ils ont effectué une culture en deux étapes afin d'augmenter la concentration en biomasse en fin de culture. La première étape est en phototrophie puis la seconde en mixotrophie. Ils ont ensuite comparé ces résultats avec une culture maintenue uniquement en phototrophie. Leurs résultats sont présentés dans le tableau III-3, nous pouvons constater que la mixotrophie a permis d'augmenter la concentration en biomasse [43].

	Concentration biomasse fin de culture ($g.L^{-1}$)	Durée culture (j)
Phototrophie	4,5	8
Phototrophie + Mixotrophie	**7,4**	4 + 4

Tableau III-3 : Résultats de Yeng et Chang [43]

3.2.4 Le choix de la phototrophie pour stimuler l'accumulation en lipides

Le but de notre culture en deux étapes est d'augmenter la croissance cellulaire puis de stimuler la production de lipides. Afin de réaliser cette dernière étape nous avons opté ici pour la phototrophie. Nonobstant les avis divergents de la littérature sur le meilleur mode trophique pour favoriser l'accumulation des lipides, le passage d'une culture en mixotrophie à une culture en phototrophie semble le plus propice pour la production de lipide. En effet, si on s'intéresse aux expériences de Yeng et Chang que nous avons abordées un peu plus haut, la phototrophie présente une meilleure proportion en lipides (poids d'huile/poids d'algues sèches). La figure III-13 montre que le passage en mixotrophie tend à diminuer la teneur en lipide. Ces données vont donc dans le sens de notre culture en deux étapes. Liang et ses collaborateurs vont dans le même sens (celui de la culture en deux étapes) en affirmant que leurs souches de microalgues présentent un taux de lipide de 38 % en phototrophie soit quasiment le double que lorsque la culture est réalisée en mixotrophie où le taux de lipides s'élève à 21 %.

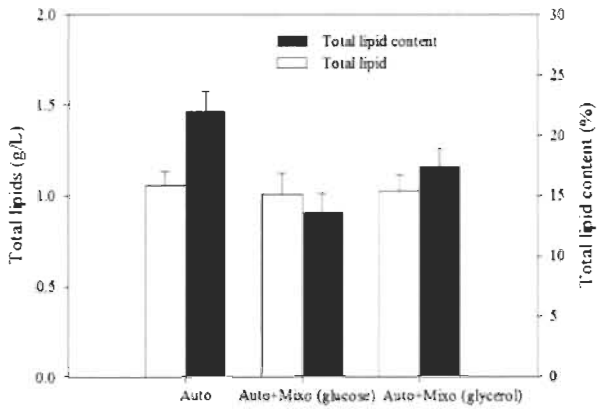

Figure III-13 : Teneur en lipide en fonction des conditions de culture [43]

De plus, le passage de la mixotrophie à la phototrophie permet l'induction d'un stress par la carence en glucose, qui selon certains auteurs, favorise l'accumulation en lipides[41][47]. D'autre part, il a été prouvé qu'une insuffisance en nutriments et notamment en azote favorise l'accumulation en lipides dans les cellules [18][38][48][49][50][51]. En effet une carence en azote provoque des conditions de stress stimulant la production de substances de réserve, les lipides. Cependant, un manque en azote a un rôle négatif sur la production de la biomasse en limitant cette dernière. Il faut

donc trouver le juste milieu entre la production de biomasse et la concentration en lipides cellulaires pour obtenir une productivité maximale en lipide. C'est ce que nous cherchons à réaliser par le biais de notre culture en deux étapes.

Par ailleurs, Cheng et son équipe ont aussi développé une méthode de culture en deux étapes [52]. La première étape favorisant la production de biomasse dans un milieu optimisé dans ce but et la seconde favorisant la production de lipide suite à un transfert de la biomasse algale dans un milieu optimal à cette fin. De plus, d'autres systèmes de culture en deux étapes ont déjà été expérimentés. Zheng et ses collègues ont testé un système en deux étapes de cultures qui permettraient de rendre la culture rentable avec en premier lieu une culture hétérotrophique en fermenteur suivit d'une phase phototrophique en étang ouvert [41]. Dans le cadre de nos projets, une culture en mixotrophie est préconisée plutôt que l'hétérotrophie en raison d'une disponibilité insuffisante de sources de carbone alternatives mais aussi du coût de production en fermenteur. En effet, le besoin en substrat carboné est beaucoup plus important en hétérotrophie comparativement à la mixotrophie. De plus, l'installation d'étang ouvert est moins dispendieuse pour un passage à l'échelle industrielle, bien que le bassin pilote est plus onéreux qu'un étang ouvert [32].

3.3 L'intensité lumineuse

Comme précédemment, il y a des contradictions sur l'effet de la lumière dans la littérature. Certains auteurs comme Martinez et son équipe soutiennent qu'une augmentation de l'intensité lumineuse n'influe pas sur le développement de la biomasse de leurs culture mixotrophe de *Chlorella pyrenoidosa* [53]. Alors que d'autres soulignent une augmentation de la biomasse suite à un apport de lumière plus important sur leurs cultures mixotrophe de *Chlorella.sp* et *C.prothecoides* [40][54].

En effet, un apport plus important en lumière va stimuler la photosynthèse et donc stimuler la croissance de la biomasse algale. Cheirsilp et son équipe remarque, que l'application d'une intensité lumineuse situé entre 80 et 135 μmol photon/m^2/s augmente la croissance de leurs souches de microalgues[54].

Cependant, il est important de ne pas soumettre les microalgues à une intensité lumineuse trop élevée sous peine de créer le phénomène de photoinhibition et donc le ralentissement de la photosynthèse [55][56][57].

3.4 Les sources de carbone organiques : glucose et alternatives

Il a été prouvé plusieurs fois que le glucose ($C_6H_{12}O_6$) est une des sources de carbone organique aisément assimilable par les algues [17][58]. Néanmoins le glucose présente un coût assez élevé ne permettant pas d'atteindre une production rentable en biocarburants. L'utilisation de sources alternatives de carbone organique bon marché est donc une nécessité. Ces sources de carbone alternatives peuvent provenir des résidus d'industries laitières (exemple : lactosérum de fromagerie), des eaux usées et boues d'industries papetières, des boues de stations d'épuration municipales ou d'abattoirs porcins, d'hydrolysats de matières lignocellulosiques agricoles, des résidus brassicoles, des huiles et graisses usées d'usines, etc. [3][46][47][59][60]. Ces sources peuvent donc être de diverses origines. Dans le projet VERTECH I, les nutriments alternatifs proviennent en grande partie d'une industrie laitière Parmalat (graisse, petit lait, perméat, résidu d'ébouage), mais également du lixiviat d'un site d'enfouissement ainsi que d'eaux usées provenant d'une usine de fabrication de produits d'assainissement.

Chapitre IV - Matériels et méthodes

4.1 Souches

4.1.1 Projet RTA

La souche développée pour le projet RTA provient des eaux usées d'une aluminerie RTA de la région du Saguenay-Lac-St-Jean et a été spécialement adaptée pour les fins du projet. Elle a été isolée par Alga-Labs, un laboratoire spécialisé dans la culture d'algue collaborant au projet. Il est justifié d'isoler la souche à même les eaux usées utilisées comme milieu de culture de base car elle est déjà bien adaptée à ce milieu. Cette souche est composée d'un consortium d'algues et de bactéries dominé par *Chlorella* sp qui est une algue verte unicellulaire.

4.1.2 Projet VERTECH I

Dans le cadre du projet VERTECH I, la souche de microalgues utilisée provient du site de l'entreprise Parmalat. La souche a été isolée dans les effluents de cette industrie puis adaptée graduellement aux milieux de cultures utilisés actuellement qui comportent également les effluents des usines Canlac-Abbott, Sani Marc et les lixiviats du site d'enfouissement de Gesterra. Comme dans le cas du projet RTA, la souche est composée d'un consortium d'algues-bactéries constituée principalement de *Chlorella sp.*

4.2 Méthodes de culture

4.2.1 Projet RTA

Les méthodes de cultures utilisées se basent sur celle de la compagnie Alga-Labs. Dans le cas des objectifs 1 et 2, les microalgues sont cultivées dans des erlenmeyers de 1L pour un volume de culture de 500 mL. Les erlenmeyers sont placés sur un agitateur horizontal réglé à 150 rpm. Les cultures sont exposées lors de la phase effective à un éclairage de 130-140 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} avec une photopériode de 12 heures de lumière par jour pour 12 heures d'obscurité. Les cultures sont maintenues à la température ambiante soit 24°C.

La période de culture effective a été fixée à 2 jours ½ pour l'objectif 1 et à 4 jours pour l'objectif 2. La première injection de carbone organique dans le milieu correspond au début de la phase effective (jour 0). Une période d'adaptation de cinq jours précède la phase effective afin de stabiliser la culture fraichement inoculée. Pour cette phase

d'adaptation, l'intensité lumineuse est de 20 µmol photon.$m^{-2}.s^{-1}$. Une seconde injection de carbone organique est effectuée au jour 2 de culture. L'ajout de glucose est étalé dans le temps afin d'éviter un risque de contamination trop important par l'ajout d'une forte concentration en glucose en une seule fois.

Pour l'objectif 3, les microalgues ont été cultivées en photobioréacteur d'un volume de travail de 2,5 L. Une agitation constante a été appliquée via un agitateur à hélice. Comme pour les premiers objectifs, une phase d'adaptation a été réalisée avant l'ajout de substrat carboné afin de stabiliser la culture nouvellement inoculée. Dans le cadre de cet objectif la phase d'adaptation était de 4 jours avec une intensité lumineuse de 20 µmol photon/m^2/s. La phase effective durait 9 jours (récolte au début du 9ième jour) et l'intensité lumineuse était fixée à 130-140 µmol photon.$m^{-2}.s^{-1}$. La photopériode est la même que précédemment, c'est à dire 12 heures de lumière par jour pour 12 heures d'obscurité.

La phase effective débute par l'injection de substrat organique. Ce dernier étant du glucose pour tous les objectifs. Les injections de glucose sont espacées dans le temps afin de diminuer le développement de microorganisme par l'apport d'une trop grande quantité, mais aussi pour éviter une diminution trop importante du pH du milieu de culture. Les injections sont réalisées le 1er et le 3ième jour de la phase effective.

4.2.2 Projet VERTECH I

Dans le cadre du projet VERTECH I, la souche de chlorelle ne nécessite pas de phase d'adaptation. Les expériences ont donc débuté directement par la phase effective et l'ajout de glucose qui correspond au jour 0 des expérimentations. Comme pour le projet RTA, les injections ont été réalisées le 1er et le 3ième jour de la phase effective. Les cultures VERTECH ont également été soumisent à une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures de noirceur. Les cultures ont été maintenues à la température ambiante soit 24°C.

Pour l'objectif 5, les mêmes paramètres de culture que l'objectif 4 du projet RTA ont été utilisés. Les expérimentations ont donc était réalisées en photobioréacteur avec un volume de travail de 2,5 litres et une intensité lumineuse de 130 - 140 photon.$m^{-2}.s^{-1}$. La durée de la culture est de 9 jours (récolte au début du 9ième jour).

En ce qui concerne l'objectif 6, la culture s'est déroulée sur 5 jours (récolte au début du 5ième jour), les microalgues ont été cultivées dans des erlenmeyers de 1L pour un volume de culture de 500 ml. Les erlenmeyers ont été placés sur un agitateur horizontal réglé à 150 rpm, l'intensité lumineuse était de 130 - 140 photon.m^{-2}.s^{-1}.

4.3 Le milieu de culture

4.3.1 Projet RTA

Le milieu de culture se compose majoritairement d'eaux usées industrielles de l'usine RTA situé à Alma (Tableau IV-1). Un sous-produit carboné (SCP) provenant du traitement de la brasque issue du procédé d'électrolyse lors de la production d'aluminium est utilisé comme facteur de contrôle de la contamination puisqu'il limite le développement des microorganismes qui ne lui sont pas adaptés. Des nutriments sont ajoutés au milieu de culture selon le milieu standard « Bold's Basal » afin d'optimiser le développement des microalgues [18]. En effet, il a été démontré dans de précédents essais que ces eaux industrielles peuvent soutenir la croissance algale mais que des nutriments sont nécessaires au milieu de culture afin d'optimiser la croissance des microalgues ainsi que l'accumulation des lipides [11]. Le milieu de culture contient un volume d'inoculum de 10% (v/v) que l'on soit en erlenmeyer ou en photobioréacteur. La composition du milieu de culture, déterminée dans des expériences antérieures est détaillée dans le tableau présenté en annexe (Annexe 1) [12][11][61].

Le SCP a été macéré pendant 24 heures dans l'eau RTA qui a ensuite été filtrée comme le montre les images ci-dessous (figure IV-1 et IV-2).

Figure IV-1: Macération du SCP

Figure IV-2 : Filtration de l'eau RTA contenant le SCP macéré

Les concentrations en azote et en phosphore, éléments limitants la croissance des algues sont respectivement de 0,2g/L et 0,2g/L, ce qui procure une productivité maximale en biomasse d'après les expériences antérieures du projet [11].

4.3.2 Projet VERTECH

Le milieu de culture pour le projet VERTECH se compose également d'effluents industriels. Ils proviennent des industries partenaires du projet situé à Victoriaville, soit Parmalat (industries laitières) Canlac-Abbott (industrie pharmaceutique), Sani Marc (industrie de détergent) ainsi que du site d'enfouissement de Gesterra (lixiviat). Comme dans le cas du projet RTA, des nutriments du « Bold's Basal medium » (BBM) sont ajoutés au milieu de culture, mais en moindre proportion du fait que les eaux issues des industries de Victoriaville sont plus riches en nutriments. Le milieu de culture contient 25% d'inoculum (v/v) pour les deux objectifs. La composition du milieu de culture pour l'objectif 5 est détaillée en annexe (Annexe 2).

4.4 Plan d'expériences

Les objectifs présentés précédemment vont se traduire en six expériences différentes. Les expériences sont réalisées en triplicatas.

4.4.1 Expériences projet RTA

- **Expérience 1 :**

Cette expérience, s'insérant dans le cadre de l'objectif 1, vise à optimiser la productivité en biomasse de notre souche en combinant les conditions optimales en nutriments déterminées dans des expériences antérieures au projet RTA. Trois traitements de cultures ont été appliqués, ils sont présentés dans le tableau IV-1 :

Traitement	Mode trophique	Ajout de CO_2 à 1%
1	Mixotrophie	-
2	Mixotrophie	+
3	Phototrophie	+

Tableau IV-1 : Traitements appliqués pour l'expérience 1 (+, présent / -, absent)

Rapport-Gratuit.com

Du CO_2 à 1% (v/v) a été utilisé. L'intensité lumineuse utilisée était de 130-140 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}, valeur plus élevée que dans les expériences antérieures afin d'obtenir une productivité en biomasse plus élevée.

La concentration finale en glucose ajouté dans les fioles mixotrophes a été de 2 g.L^{-1} [12]. Le dispositif utilisé est présenté figure IV-3.

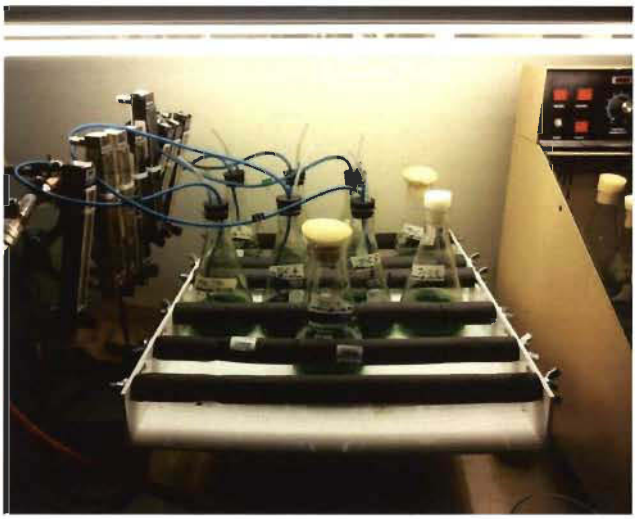

Figure IV-3: Montage utilisé pour les expériences 1 et 2

- **Expérience 2 :**

Comme dans le cas de l'expérience 1, l'expérience 2 s'insère dans le cadre de l'objectif 1 afin de déterminer la concentration optimale en CO_2 à utiliser. Les traitements qui ont été réalisés sont présentés dans le tableau IV-2 ci-dessous :

Traitement	Mode trophique	Ajout de CO_2 à 2%
1	Mixotrophie	-
2	Mixotrophie	+
3	Phototrophie	+

Tableau IV-2 : Traitements appliqués pour l'expérience 2 (+, présent / -, absent)

Du CO_2 à 2% (v/v) a été utilisé afin de vérifier si une augmentation de la concentration augmenterait la production de biomasse et de lipides. Les mêmes intensités lumineuses ainsi que les mêmes concentrations en glucose que pour l'expérience 1, ont été utilisées.

- **Expérience 3 :**

Les conditions de culture de l'expérience 3 ont été fixées en fonction des résultats obtenus dans les deux expériences précédentes (ajout de CO_2 à 1% et de glucose [2g.L^{-1}], intensité lumineuse de 130-140 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}). L'expérience 3 consistait à mesurer la productivité en biomasse et en lipides dans un cycle de culture en deux étapes, soit une phase mixotrophique suivi d'une étape phototropique. Cette expérience a permis de répondre à l'objectif 2. Les conditions du cycle mixotrophique, d'une durée de 48h, étaient les mêmes dans toutes les fioles. Le cycle autotrophique, également d'une durée de 48h, comportait 3 traitements, qui sont présentés dans la figure suivante :

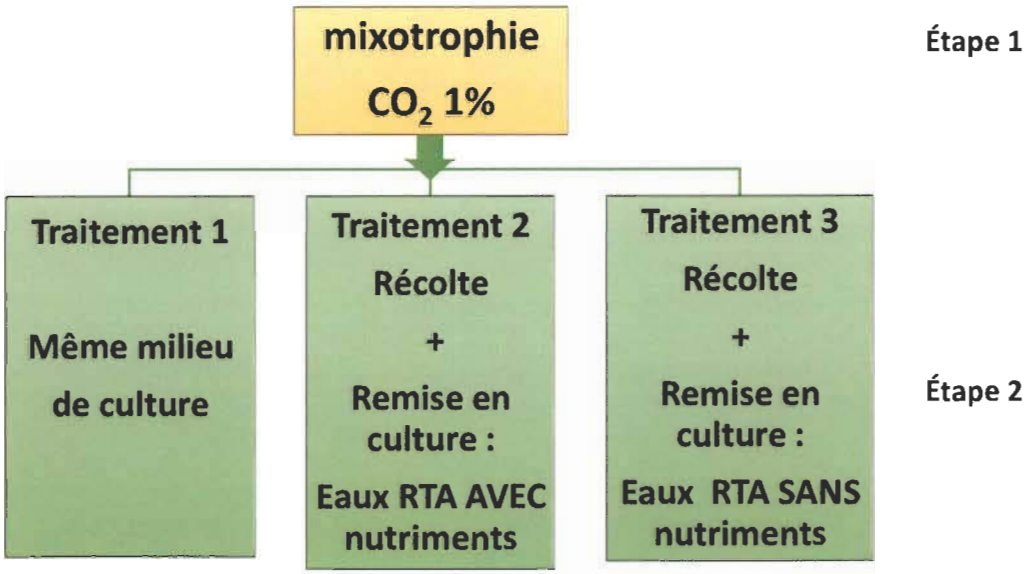

Figure IV-4: Présentation des conditions de la deuxième étape de culture

Dans le cadre du traitement 2, les microalgues ont été remise en suspension dans avec une concentration de 0,1040 g.L^{-1} d'azote et de 0,1596 g.L^{-1} de phosphore. Ces concentrations ont été choisies car elles correspondent, selon des expériences antérieures au projet, à la quantité d'azote et de phosphores censée être présente dans le milieu après 48 heures de culture.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- **Expérience 4 :**

Cette expérience consistait à reprendre les meilleures conditions de la culture en deux étapes et d'augmenter le volume et le temps de culture afin de constater ci-cela a un effet sur le développement de la biomasse et sur la productivité en lipides. Afin de répondre à l'objectif 3. Pour cette expérience un photobioréacteur a été utilisé (figure IV- 5).

Dans le cadre des expériences en fioles, le CO_2 est injecté pendant 15 minutes par heure sur un cycle de 12 heures. Après les 15 minutes d'injection de CO_2, de l'air ambiant est injecté pendant 45 minutes au milieu de culture afin de ne pas diminuer le pH. Le changement injection CO_2/injection air ambiant est réalisé manuellement à l'aide d'une pompe pour les expériences en fioles. Dans le cas du photobioréacteur, l'injection de gaz est programmée à l'aide de pompes automatisées.

Figure IV-5 : Photobioréacteur utilisé pour les expériences 4 et 5

4.4.2 Expériences projet VERTECH I :

- **Expérience 5 :**

Cette expérience vise à appliquer la culture en deux étapes en photobioréacteur à une souche de microalgue différente afin de tester la répétabilité du procédé. Afin de répondre à l'objectif 5. Bien que le pourcentage d'inoculum de départ et le milieu de culture soient différents (milieu VERTECH), l'intensité lumineuse, la durée de culture, l'injection de CO_2 et la température sont les mêmes que dans l'expérience 4.

- **Expérience 6 :**

Dans le cadre du projet VERTECH I, plusieurs sources de nutriments alternatifs sont disponibles. Certaines de celle-ci ont été testées afin de savoir s'ils modifiaient la productivité en biomasse et en lipide de la souche. Trois traitements ont été réalisés, ils sont présentés dans le tableau IV-3 ci-dessous :

Traitement	Milieu de culture	Glucose	Nutriments Alternatifs
1	VERTECH	-	-
2	VERTECH	+	-
3	VERTECH	-	+

Tableau IV-3 : Traitements de l'expérience 6 (+, présent / -, absent)

Le milieu de culture VERTECH est le même que l'expérience 5 (Annexe 2) mais avec un volume de travail de 500 ml puisque dans ce cas les expérimentations ont été réalisées en fioles:

Dans le cadre du traitement 3, le glucose est remplacé par des sources de carbone alternatives, soit : du lactosérum salé (petit lait), du perméat de lactosérum, des résidus d'ébouage et de graisse provenant de l'usine Parmalat et du DLP (perméat délactosé) provenant de l'industrie Canlac.

Pour comparer l'effet des sources alternatives à l'effet du glucose, la même quantité de carbone organique total a été ajoutée dans les traitements 2 et 3, tout en enlevant le volume de l'effluent Parmalat correspondant au volume de résidus ou solution de glucose ajouté. La concentration des résidus a été fixée d'après les informations données par l'industriel sur leur disponibilité.

Selon des analyses effectuées par un laboratoire extérieur, la quantité de carbone organique total (COT) présents dans les sources alternatives était de 2.10^{-2} g. Une solution de glucose en concentration de carbone organique total équivalente à celle du mélange de résidus a été ajoutée dans le traitement 2.

Les différents milieux de cultures qui ont été utilisés lors des conditions 1, 2 et 3 de l'expérience 6 sont récapitulés dans le tableau IV-4 ci-dessous. Les nutriments du BBM sont présentés dans la section précédente (Tableau IV-5).

Pour rappel, il n'y a pas d'injection de CO_2 pour ces expérimentations, les cultures sont uniquement soumissent au CO_2 atmosphérique pour cette expérience.

Eléments	Traitement 1	Traitement 2	Traitement 3
Glucose	-	0,78 %	-
Mélange nutriments alternatifs	-	-	0,78 %
Eau Parmalat	41 %	40,22 %	40,22 %
Eau Canlac	45 %	45%	45%
Mélange Sani Marc + Lixiviat	14 %	14 %	14 %

Tableau IV-4 : Proportions des différents effluents utilisés.

4.4 Paramètres mesurés quotidiennement

4.4.1 Concentration en biomasse algale

4.4.1.1 Biomasse

La méthode utilisée pour déterminer le taux de productivité des microalgues a été adapté de la méthode décrite par Zhu et Lee [62] et réutilisée par de nombreux auteurs[18][63][64]. Un échantillon de 10 mL de la suspension algale de chacune des fioles a été filtré sur Buchner à l'aide d'un filtre Whatman™ (filtre glass microfiber 934-AH, porosité de 1,5µm). Les filtre (figure IV-6) ont été préalablement séchés à l'étuve à 105°C pendant 20 minutes afin de s'assurer qu'il n'y ait aucune trace d'humidité pouvant

fausser sa masse, puis pesé après un passage de 15 minutes au dessiccateur. Une fois la filtration de la solution de microalgues effectuée le filtre est récupéré puis séché à l'étuve à 50°C pendant 24 heures. Ensuite, le filtre est de nouveau mis au dessiccateur pendant 15 minutes pour éliminer les traces d'humidité résiduelle puis pesé.

Pour calculer la productivité, l'équation décrite par Chiu et ses collègues (2011) a été utilisée [65]:

$$\text{Productivité (g/L/j)} = \frac{\mathrm{Wf} - \mathrm{Wi}}{\Delta t}$$

Où Wf et Wi représentent la biomasse finale et initiale respectivement et Δt représente le temps de culture en jours.

Le filtrat obtenue est conservé au congélateur à -20°C pour des analyses ultérieures en chromatographie ionique.

Figure IV-6: Filtres contenant la biomasse sèche

4.4.1.2 Densité cellulaire

Pendant la durée de chacune des expérimentations, la densité cellulaire a été mesurée via un compte au microscope optique à contraste de phase (x400) (modèle Axio Scope A1, fabricant Zeiss). Un hématimètre avec cellules de Neubauer a été utilisé selon la méthode décrite par Guillard et Sieracki [66]. Cette méthode permet de suivre la croissance de la souche de microalgues en suivant la prolifération des cellules et leurs

divisions mais aussi celui des contaminants possibles du milieu de culture (bactéries, protozoaires mobiles, rotifères, ...).

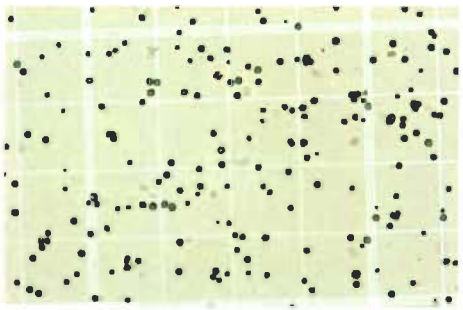

Figure IV-7: Aperçue de la souche RTA au microscope optique x400

4.4.2 Mesure du pH

Le pH de chacune des fioles (ou du photobioréacteur) a été relevé quotidiennement à l'aide d'un pH mètre (pH mètre Symphony, modèle SB70P, fabricant VWR). Le suivi du pH permet de détecter une anomalie dans le milieu de culture. En effet, les consortiums utilisés dans les deux cas maintiennent le pH entre 7 et 9. Si une anomalie comme par exemple une contamination a lieu une variation de pH peut probablement apparaitre.

4.5 Récolte des algues, extraction et transestérification des lipides

4.5.1 Récolte

Une fois les cultures effectuées, la biomasse algale a été récoltée. Le but de cette étape est de récupérer le maximum de biomasse afin de réaliser par la suite une extraction des lipides pour les quantifier et les analyser. La récolte est basée sur la méthode de Shen et collaborateur [67]. Elle a été effectuée pour toutes les expériences par centrifugation (5 min, 5000 g). Au total, quatre centrifugations sont réalisées. La première centrifugation permet de séparer la biomasse (culot) de son milieu de culture (surnageant). Les trois autres centrifugations permettent de nettoyer (éliminer au maximum les traces du milieu de culture) la biomasse par l'ajout d'eau déminéralisée. Après l'étape de centrifugation, la biomasse algale humide a été récupérée puis soumise à évaporation grâce à un évaporateur centrifuge (figure IV-8). Cette étape permet d'obtenir une biomasse algale sèche en évaporant le surplus d'eau présent dans le culot en 48 heures[67].

Figure IV-8: Speed Vac système (évaporateur centrifuge)

4.5.2 Extraction des lipides

Le but de cette étape est d'aller chercher les lipides et notamment les acides gras présents dans les cellules algales. L'extraction est réalisée en deux étapes selon le protocole utilisé par Zhu et son équipe [68], s'inspirant des expérimentations de Bligh et ses collaborateurs. [69].

La première consistait à mettre en contact le solvant d'extraction, composé de chloroforme et de méthanol (2/1, v/v), avec la biomasse algale sèche et préalablement broyée en fine poudre. Le mélange était ensuite placé au bain marie à 65°C pendant 24 heures.

La seconde étape correspond à l'étape de filtration. Après les 24 heures de bain marie, le mélange a été filtré afin d'éliminer les résidus solides. Le filtrat obtenu a ensuite été placé sous la hotte afin d'évaporer le solvant d'extraction. Les lipides obtenus ont ensuite été placés au congélateur avant d'être transestérifiés.

4.5.3 Transestérification

Comme abordé dans la revue de littérature, la réaction de transestérifiaction est une technique classique pour la production de biodiesel. Cette réaction a été réalisée selon la méthode de Li et son équipe [70]. Une fois le solvant d'extraction évaporée, les lipides algaux ont été mis en contact avec l'agent de transestérification le boron trifluoride-methanol ou BF3-Méthanol. Le mélange a ensuite été placé au bain marie pendant 20 min à 65°C. Une fois les tubes refroidis, une solution de NaCl saturée ainsi que de l'hexane ont été ajoutés aux lipides transestérifiés. Cela permet de récupérer les esters méthylés d'acides gras dans la phase organique (hexane). Une étape de centrifugation a été effectuée afin de séparer les phases aqueuses (BF3-méthanol + NaCl) et organique (hexane). La

phase organique contenant l'huile algale a été récupérée puis analysée au GC-MS afin de connaître la composition et la quantité des acides gras.

4.6 Méthodes d'analyses

4.6.1 Chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS)

Les esters méthylés d'acides gras extraits de la biomasse sont quantifiés par cette méthode. L'appareil de chromatographie gazeuse couplé au spectromètre de masse qui a été employé est le modèle 7820A GC Sytème 5977E MSD du fournisseur Agilent Technologies (figure IV-9). La colonne qui a été utilisée en CG est une colonne apolaire de type DB-WAX, le gaz vecteur est de l'Helium 5.0. L'injection était de 1 microL en mode splitless. Lors de l'enregistrement des spectres de masse, la température d'injection était de 90°C, l'énergie d'ionisation de 70 eV, la fréquence de lecture était de 2,5 s, la gamme de m/z de 50-650. La température initiale d'analyse était de 100°C. Elle a été augmentée de 10°C.min^{-1} pendant 2 minutes puis de 5°C.min^{-1} jusqu'à atteindre 250°C. La durée de chaque analyse était de 48 minutes. L'identification et la quantification des esters de méthyle d'acides gras a été effectuée selon les normes de spectre de masse Supelco® 37 Composant FAME Mix (Bellafonte, USA).

4.6.2 Chromatographie ionique

Cette technique a permis de suivre la concentration des nutriments dans le milieu de culture pour chaque jour de culture. Afin de déterminer la consommation des nutriments par les algues. Le système de chromatographie ionique qui a été utilisé est munis d'une colonne de garde de type Ion-PAC AG11-HC et d'une colonne Ion-PAC-AS11-HC. L'élution des composés fût réalisée en mode isocratique et la phase mobile etait composée d'une solution de potasse (KOH) à 30 mM. Le volume injecté était de 10 microL, la température de la colonne et du compartiment du détecteur était à 30°C. La durée de l'analyse était de 9 min par échantillons. Le détecteur utilisé est de type conductimètrique.

4.6.3 Analyse du glucose, du COT et de l'azote total

La concentration en glucose au cours du temps des milieux de culture a été déterminée à l'aide d'un analyseur de sucre, l'YSI (modèle 7100 MBS). En ce qui concerne l'analyse de la concentration en carbone organique total (COT) et en azote

Kjeldahl total (N_t) pour les effluents et sources alternatives de carbone (expérience 5), ces dernières ont été réalisées par un laboratoire extérieur, le Centre National en Electrochimie et Technologies Environnementales (CNETE) de Shawinigan.

4.6.4 Analyses statistiques

Des tests statistiques ont été effectués, à l'aide du logiciel JMP, afin de vérifier la significativité des résultats obtenus via des analyses de variances (ANOVA, α 0,05).

Rapport-Gratuit.com

Chapitre V - Résultats et discussion

5.1 Projet RTA

5.1.1 Objectif 1

Dans le cadre de cet objectif, l'effet de l'ajout de dioxyde de carbone sur le développement de la biomasse algale a été testé, et cela sur deux jours et demi de culture. Les différentes conditions de cultures qui ont été appliquées sont : le témoin, soit la mixotrophie (M) sans ajout de dioxyde de carbone, la mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 et 2 % (M1 et M2) et la phototrophie avec ajout de CO_2 à 1 et 2 % (P1 et P2)

5.1.1.1 Productivité en biomasse

Le graphique ci-dessous présente les résultats obtenus en termes de productivité en biomasse au cours des expériences réalisées dans le cadre de l'objectif 1 (figure V- 1).

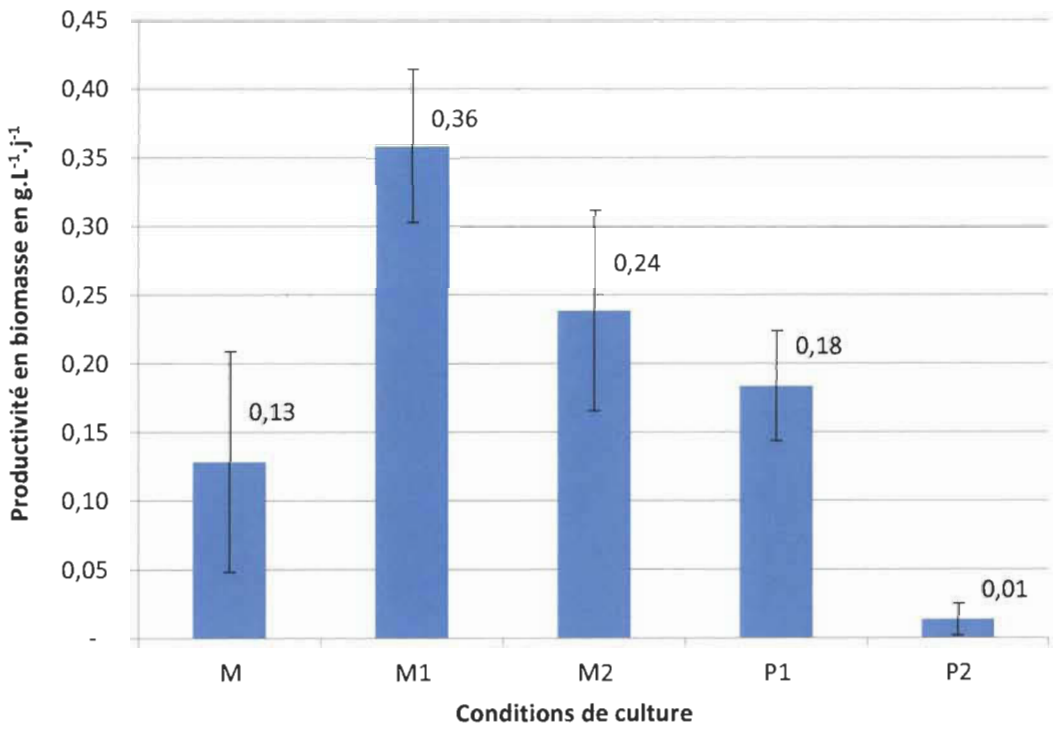

Figure V-1 : Evolution de la productivité en biomasse en fonction des conditions opératoires

Comme attendu, on constate dans les deux cas, l'ajout de CO_2 (1 et 2 %) augmente la productivité en biomasse dans le cadre de la mixotrophie (M1 et M2). De plus, la phototrophie avec ajout de CO_2 à 1 % (P1) semble également avoir un effet favorable sur la productivité en biomasse comparativement à la simple mixotrophie (M). Cependant,

aucune différence significative (p>0,05) n'est observée entre la mixotrophie (M) , la mixotrophie avec ajout de CO_2 à 2 % (M2) et la phototrophie avec ajout de CO_2 à 1 % (P1), du fait des écarts types importants. La productivité en biomasse est la plus faible dans le cas de la phototrophie avec ajout de CO_2 à 2 % (P2). La meilleure productivité est atteinte en mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1% (M1). Cependant, les écart-types importants sur la figure V-1 ne permettent de conclure significativement sur la meilleure productivité. En effet, il n'y a aucune différence significative (p>0,05) entre la mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 et 2 %.

Lors de l'analyse de la biomasse, la présence de contaminants peut causer un biais dans la pesée de cette dernière et donc sur les résultats de la productivité en biomasse. L'analyse de la densité cellulaire dans le paragraphe suivant, est un moyen de diminuer l'impact de ces contaminants.

5.1.1.2 Densité cellulaire

Des comptes cellulaires ont été réalisés en plus de la biomasse car ils permettent de suivre la division des cellules algales et aussi d'éliminer le facteur contamination qui est présent lors de la mesure de la biomasse sèche (protozoaires, rotifères, ...). Les résultats de densité cellulaire effectués dans le cadre de l'objectif 1 sont récapitulés sur le graphique ci-dessous figure V-2.

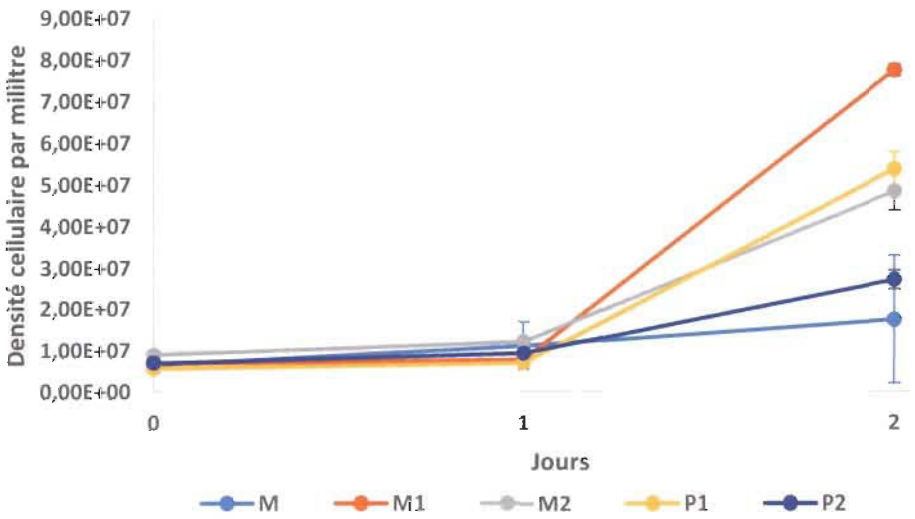

Figure V-2 : Evolution de la densité cellulaire au cours du temps et en fonction des conditions de culture

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Ces résultats suivent ceux de la productivité en biomasse. Or, dans le paragraphe précédent, aucune différence significative n'était détectée entre les conditions. Ce qui n'est pas le cas pour la densité cellulaire, ou des différences significatives sont observées entre les conditions. En effet, la présence probable de contaminants dans les réplicas des différentes conditions ont biaisé les résultats de productivité en biomasse.

On constate une augmentation de la biomasse dans tous les cas au bout du 2ème jour de culture. L'ajout de dioxyde de carbone favorise la densité cellulaire et donc la production de cellules. En effet, les conditions où il y a ajout de dioxyde de carbone (M1, M2, P1 et P2) présentent une meilleure densité cellulaire par rapport à la condition sans ajout (M). Cela est cohérent puisque l'apport en dioxyde de carbone stimule la photosynthèse et donc la croissance cellulaire. Ces résultats sont en accord avec certains auteurs et les expériences antérieures au projet, où un apport en CO_2 favorise la division cellulaire [14][71]. Cependant, du fait des écart-type qui se recoupent pour les conditions M et P2, cette différence est significative uniquement lorsque l'on compare les conditions M1, M2 et P1 à la condition témoin (M) ($p<0,05$). En effet, aucune différence significative n'est observée entre les conditions P2 et M ($p>0,05$) ce qui pourrait s'expliquer par un temps de croissance trop cours pour observer une différence entre ces deux conditions.

Si on s'intéresse maintenant aux conditions les plus favorables à la densité cellulaires, on remarque, que les conditions M2 (mixotrophie avec CO_2 2 %) et P1 (phototrophie avec du CO_2 1 %) présentent des densités similaire ($p>0,05$). Tandis que, la condition M1 (mixotrophie avec CO_2 1 %), présente clairement, la meilleure densité cellulaire par rapport aux autres conditions ($p<0,05$). Alors que, lors de l'analyse de la productivité en biomasse, aucune conclusion n'a pu être tirée sur la meilleure condition de culture entre la mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 % et 2%. Cela peut s'expliquer par la présence de contaminant lors de la mesure de la productivité en biomasse. La densité cellulaire a donc permis de faire abstraction de ce facteur de contamination.

L'hypothèse qu'une augmentation en dioxyde stimulerait la photosynthèse via une augmentation de l'activité de l'enzyme responsable de la fixation du CO_2, la rubisco et donc la productivité en biomasse, n'est pas validée ici. En effet, l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone (passage de 1 à 2 %) ne semble avoir aucun effet sur

la productivité en biomasse. Une concentration trop importante en CO_2 inhibe possiblement la rubisco, et par ce fait la photosynthèse et le développement en biomasse. Une autre explication serait que la lumière n'était pas assez intense pour maximiser la fixation du CO_2 plus concentré. Ces résultats semblent être en accord avec les expériences antérieures au projet où la biomasse cultivée en mixotrophie avec une intensité lumineuse moins élevée (20 µmol photon/m^2/s) atteint une productivité plus élevée avec du CO_2 à 1 % [14]. Les travaux de Rahaman et son équipe présentent le même fait. Le taux de croissance maximal de leur souche de *Chlorella vulgaris* est obtenu à l'aide d'une concentration en CO_2 de 1 % [71].

Suite aux résultats obtenus en termes de densité cellulaire et de productivité en biomasse, c'est la mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1% qui semble la meilleure condition pour favoriser le développement de la biomasse algale.

5.1.1.3 Evolution de la concentration en nutriments

La teneur en nutriments de l'environnement de culture, et plus particulièrement celle en nitrates et en phosphates, a été suivie au cours du temps (figure V-3).

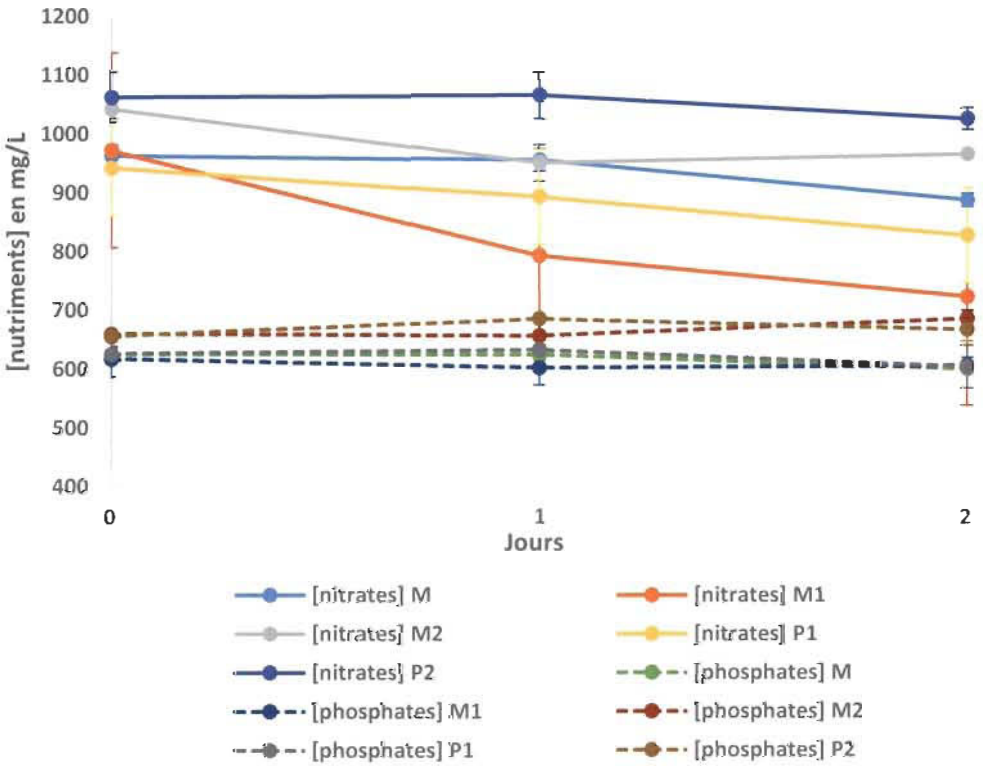

Figure V-3 : Evolution de la concentration en nutriment au cours du temps

Les concentrations sont similaires en fonction des différentes conditions de cultures. En effet, dans tous les cas une diminution de la concentration en nitrates est constatée. La concentration en phosphates semble rester stable voir légèrement diminuer. Ces résultats semblent logiques puisque, après le carbone, l'azote est l'élément le plus rapidement assimilé par les microalgues, il est donc consommé plus rapidement que les autres nutriments [18]. La baisse peu importante de la teneur en nutriment s'explique également par le fait que la durée de culture n'est que de deux jours et demi. Une légère augmentation de la concentration en nitrates et phosphates est constatée dans certains cas, ce qui n'est pas commun. En effet, les nutriments sont censés être consommés par les algues qui se développent. Ces résultats non cohérents résultent possiblement de problèmes lors de l'analyse des nutriments, ou alors d'une erreur de manipulation.

En négligeant les résultats incohérents, l'évolution de la concentration en nutriment est liée à celles de la densité cellulaire et de la productivité en biomasse. En effet, la concentration en nutriments diminue alors que la biomasse croît. Mata et son équipe démontrent le même phénomène en présentant en parallèle la courbe de croissance des algues et celle de la concentration en nutriment du milieu de culture [3].

5.1.1.4 Evolution de la concentration en glucose

La concentration en glucose a été suivie afin de s'assurer que ce dernier est bien assimilé par les microalgues et que l'on se trouve bien en mixotrophie (figure V-4).

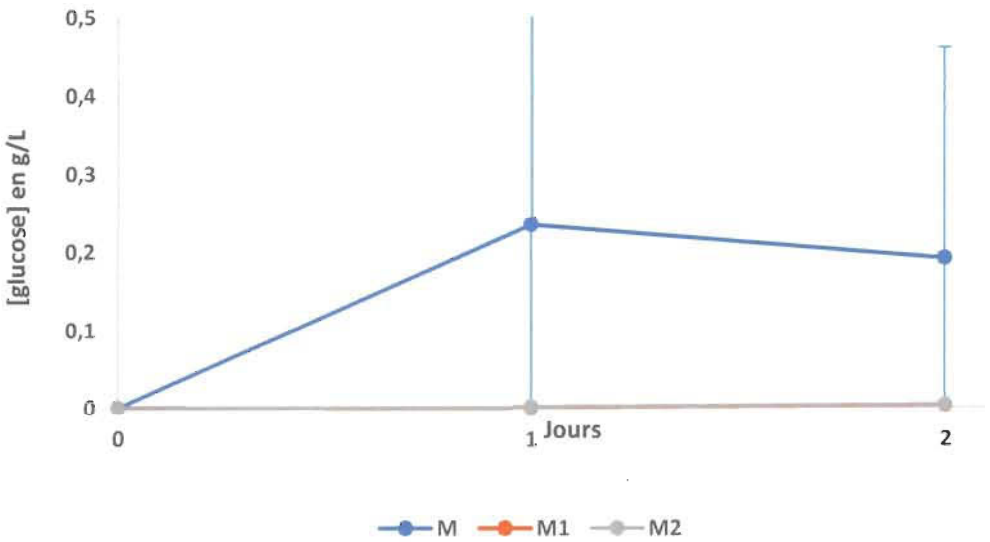

Figure V-4 : Evolution de la concentration en glucose au cours du temps

Cette partie s'applique exclusivement aux traitements en mixotrophie puisqu'en phototrophie il n'y a pas d'injection de carbone organique. À titre de rappel, l'injection de glucose est effectuée au jour 0 après les prélèvements effectués.

Au jour 0, la concentration en glucose est nulle dans tous les cas, ce qui est normal puisque l'injection de ce dernier est effectuée une fois les prélèvements pour les différentes analyses effectuées. La concentration réelle au J0 dans le milieu est de 2 g/L une fois l'injection effectuée.

Tout le glucose injecté au J0 est consommé au J1 à l'exception du traitement sans injection de CO_2 (M). Cependant, pour ce dernier cas, l'écart type est très élevé du fait qu'un des réplicas n'a pas fonctionné comme les autres. L'assimilation du glucose a été plus lente pour un réplica sans ajout de CO_2. Cela peut s'expliquer par la présence de contaminants (rotifères, protozoaires) dans ce dernier, ce qui a limité le développement des microalgues et par conséquent la consommation de glucose.

Malgré le fait qu'un réplica d'une des conditions n'a pas fonctionné comme les autres, on peut conclure que le glucose est assimilé en 24h par les microalgues. En effet, tout le glucose ajouté au milieu de culture entre le jour 0 et le jour 1 est consommé.

5.1.1.5 Teneur et productivité en lipides

Une analyse de la teneur et de la productivité en lipides a été effectuée, afin de voir l'effet des différentes conditions de culture sur ces dernières. Les inocula de départ contenaient en moyenne 13% de lipides (poids/poids). Les résultats présentés figures V-5 montrent que l'utilisation de CO_2 à 1 % (M1 et P1) augmente la teneur en lipides alors que le CO_2 à 2 % (M2 et P2) la diminue. Cependant, ces données ne permettent pas de conclure sur l'effet des différentes conditions testées sur la teneur en lipides et sur la productivité en lipides de notre souche de microalgue. En effet, les écarts types sont bien trop importants pour conclure d'une façon significative. Aucune différence significative n'existe entre ces différents traitements en terme de productivité en lipides ($p>0,05$) et en teneur en lipides ($p>0,05$).

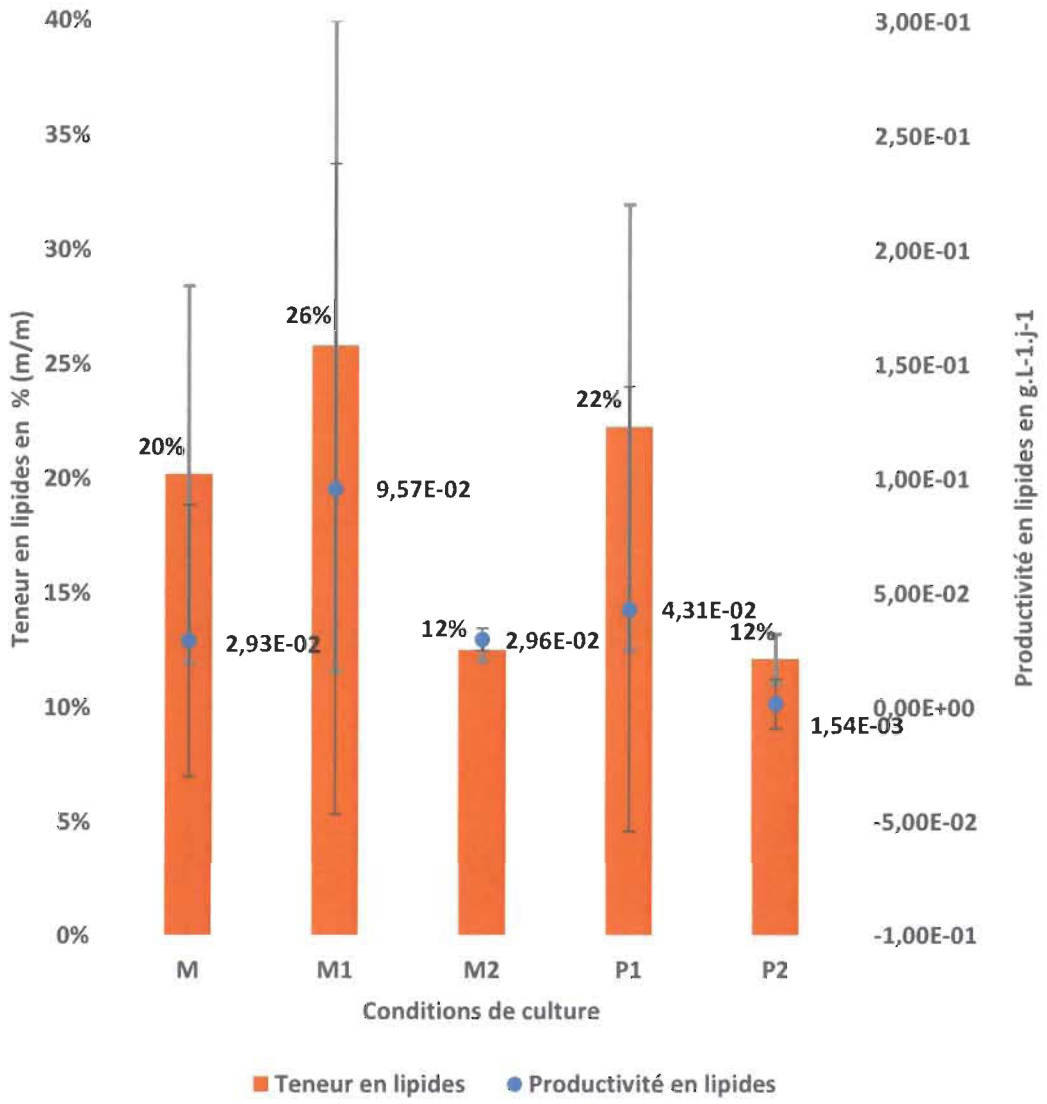

Figure V-5 : Teneur et productivité en lipides en fonction des conditions expérimentales

Cela peut probablement s'expliquer par un temps de culture trop court pour que la biomasse puisse produire et accumuler suffisamment de lipides. Aussi, cela peut s'expliquer par le fait qu'il y a possiblement un biais dans les données dû à la quantité très faible de biomasse utilisée pour les extractions. En effet, comme en témoignent les grands écarts types, il y a une très grande variabilité entre les réplicas.

Les expériences réalisées dans le cadre de l'objectif 1, ont permis de définir quelles sont les meilleures conditions de culture afin de favoriser la productivité en biomasse et en lipides de notre souche. La mixotrophie avec ajout de CO2 à 1%, a donc été

sélectionnée pour la réalisation de la première phase de culture en deux étapes pour les objectifs 2 et 3.

5.1.2 Objectif 2

L'objectif 2 était de déterminer si un système de culture en deux étapes pouvait augmenter la productivité en lipides. La période effective de la culture a donc été divisée en deux étapes de 48 heures chacune. En premier lieu, suite aux résultats des deux premières expériences, la mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 % (M1) a été choisie afin de produire le maximum de biomasse. Ensuite, la phototrophie, bien qu'elle n'ait pas démontré une plus grande accumulation en lipide dans l'objectif précédent, a été simulée pour induire une accumulation de lipides dans les cellules algales. En effet, le passage de la mixotrophie à la phototrophie permet l'induction d'un stress, par la carence en glucose, et ainsi l'accumulation en lipides [41][47]. Trois traitements ont été réalisés : le premier est le témoin, dans lequel les microalgues sont laissées dans le même milieu (MM) ; dans le second, les algues sont récoltées puis remises en culture dans un milieu avec des nutriments (AN) ; enfin dans le troisième, les algues sont récoltées puis remises en cultures dans un milieu sans nutriment (SN). Le premier traitement sans récolte a servi de témoin, le second a été utilisé pour initier un stress via le passage en phototrophie et la récolte afin d'être sûr de ne plus avoir de glucose dans le milieu. Enfin le dernier a été testé pour engendrer un stress plus important que le second traitement, via la phototrophie et une carence totale en nutriment.

5.1.2.1 Productivité en biomasse et densité cellulaire

La figure V-6 ci-dessous présente la productivité en biomasse en fonction des conditions de la seconde étape de culture. La productivité en biomasse à la fin de la première étape de culture est plus importante que celle obtenue à l'issue de chacun des traitements de la deuxième étape. Cela est cohérent puisque la première étape sert à produire un maximum de biomasse. Dans le cas de la deuxième étape de cultures, il y a une différence entre les trois traitements ($p<0,05$). La condition où la culture se poursuit dans le même milieu (MM) présente une meilleure productivité en biomasse que les deux conditions (AN : avec nutriments, SN : sans nutriments) où une récolte est effectuée. De plus, aucune différence n'apparaît entre les conditions AN et SN ($p>0,05$).

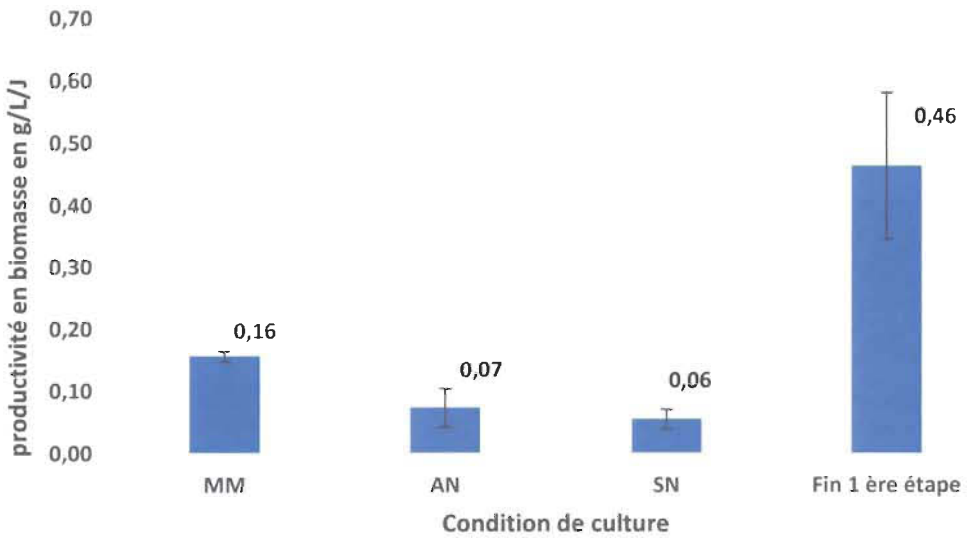

Figure V-6 : Productivité en biomasse selon les conditions de la seconde étape de culture

Il y a donc une perte de biomasse lorsqu'il y a une phase de récolte (AN et SN). Ces résultats sont cohérents puisque le changement de milieu induit un stress aux cellules qui doivent se réadapter à ce dernier avant de pouvoir croître et proliférer de manière optimale. Ces résultats sont confirmés par les comptes cellulaires.

En effet, les résultats obtenus via la densité cellulaire (figure V-7) vont dans le même sens que ceux de la productivité en biomasse. Les microalgues semblent atteindre leur maximum de croissance au deuxième jour de culture pour les trois conditions ce qui est en accord avec la productivité en biomasse de la fin de la première étape de culture.

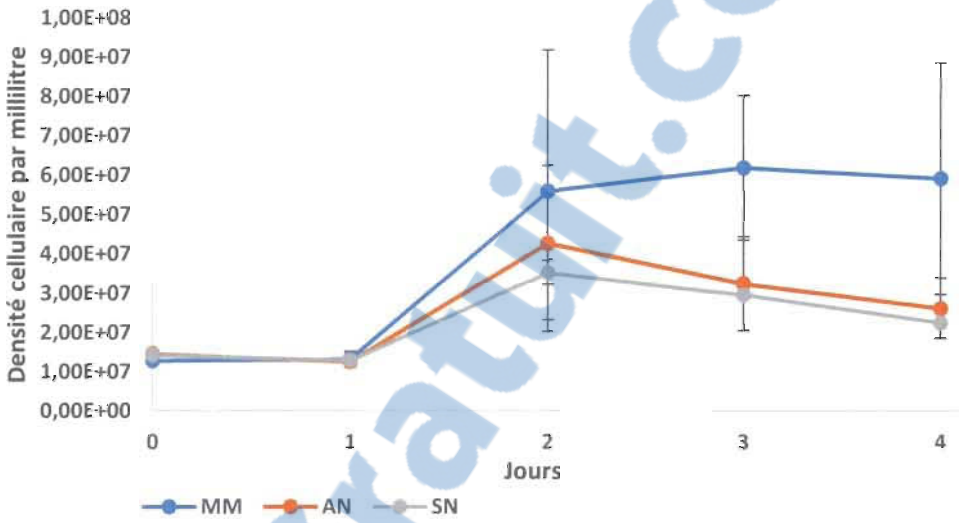

Figure V-7 : Densité cellulaire en fonction des conditions de la seconde étape de culture

Comme précédemment, en fin de culture, c'est pour la condition MM, que la population algale parait la plus élevée. En effet, pour cette condition, un plateau est atteint après le deuxième jour de culture et la densité cellulaire semble stable, la phase de croissance stationnaire est atteinte [3]. Cependant, les écarts types important ne nous permettent pas de conclure de manière significative sur une différence entre les traitements ($p>0,05$).

Pour les traitements AN et SN (avec l'étape de récolte), la densité cellulaire diminue. Cela s'explique par le stress induit aux cellules algales lors de la récolte (centrifugation) et de la remise en suspension de ces dernières dans un nouveau milieu de culture. Bien que la densité cellulaire diminue pour ces deux traitements, le stress créé a pour but de favoriser la productivité en lipides.

Rapport-Gratuit.com

5.1.2.2 Evolution de la concentration en nutriments

Comme dans le cadre de l'objectif 1, lors des deux premiers jours de cultures (phase de mixotrophie), la concentration en phosphates semble rester stable alors que celle en nitrates diminue (Figure V-8). Pour la deuxième phase de culture, la teneur en phosphates de la condition MM a tendance à légèrement augmenter, ce qui est inhabituel puisque les nutriments sont censés être consommés et non produits. Ces résultats incohérents sont possiblement liés à une erreur de manipulation. Par contre, l'évolution de la teneur en phosphates pour les traitements AN et SN, est cohérente.

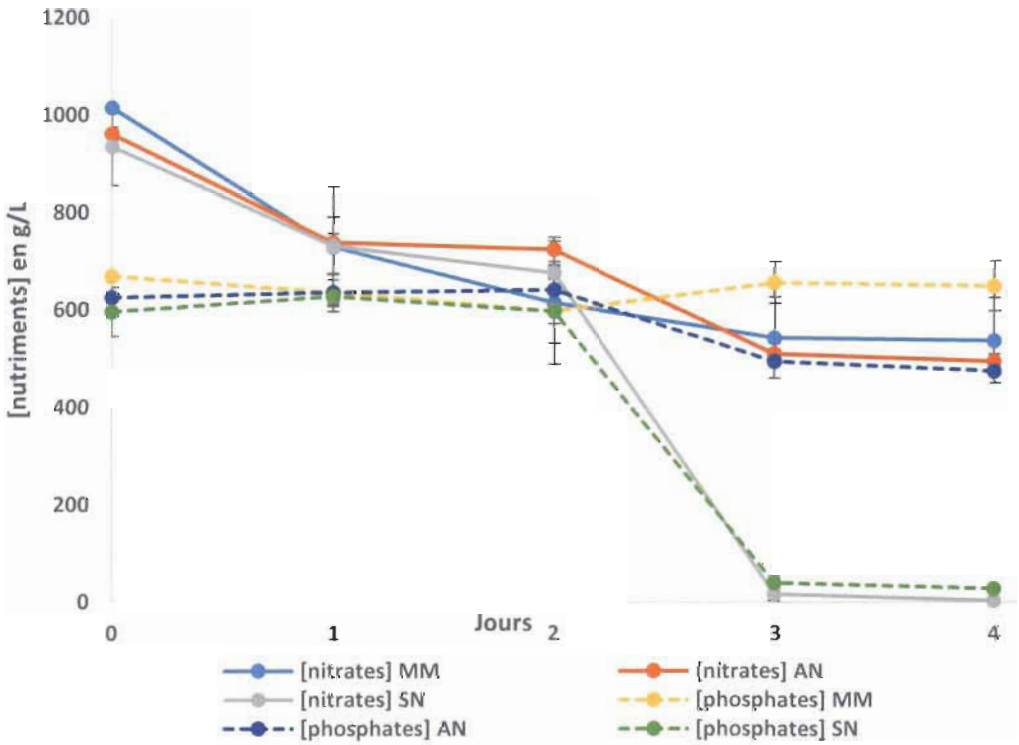

Figure V-8 : Evolution de la concentration en nutriments au cour du temps

En effet, il y a une diminution de la concentration en phosphates pour le traitement AN qui s'explique par la remise en culture dans un milieu avec une concentration en nutriments plus basse que le milieu de départ. Dans le cadre du traitement SN, une chute jusqu'à une concentration en phosphates quasi nulle est constatée.

En ce qui concerne l'évolution de la concentration en nitrates après deux jours de culture, la diminution est constante dans le cas du traitement MM. Cela est cohérent puisque les nutriments sont consommés au fur et à mesure que les cellules algales se

développent et se maintiennent dans le milieu de culture qui contrairement aux fioles ayant subi une récolte, n'a pas subi de modifications [3][18]. La concentration en nitrates pour le traitement AN est également plus faible que la concentration initiale, malgré la remise en culture dans un milieu contenant des nutriments. Cela s'explique par le fait que la concentration en nitrate pour la condition AN a été choisie de manière à ce qu'elle corresponde à la quantité de nitrates censée être présente dans le milieu après 48 heures de culture. Afin d'être au plus proche des conditions de culture du traitement MM malgré l'étape de récolte. Il est donc cohérent que, comme pour la concentration en phosphates, la concentration en nitrates du traitement AN diminue au cours du temps. Pour le traitement SN, une chute jusqu'à une concentration en nitrates quasi nulle est constatée. Ce qui est cohérent, puisque les algues ont été placées dans un milieu sans nutriments.

Mise à part la concentration en phosphates de la condition MM, l'évolution des concentrations en nitrates et phosphates est cohérente pour les différents traitements. En effet, les concentrations en nutriments diminuent, lorsque ces derniers sont présent dans le milieu (condition MM et AN) puisqu'ils sont consommés par les microalgues [3]. Enfin, la concentration en nutriments est nulle lorsqu'ils sont absents du milieu (condition SN)

5.1.2.3 Evolution de la concentration en glucose

La figure V-9, présente l'évolution de la concentration en glucose au cours du temps.

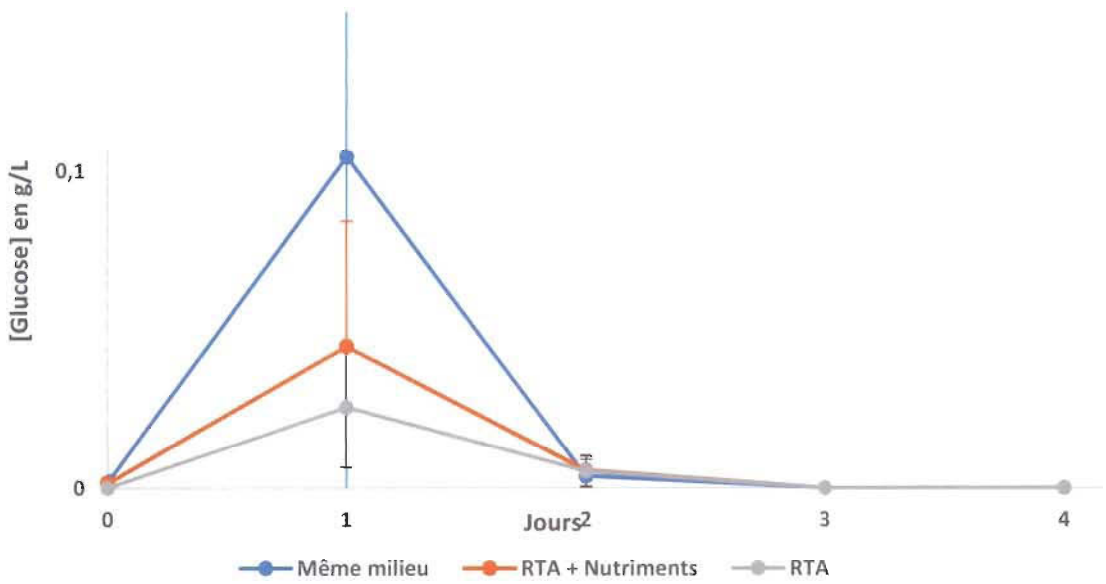

Figure V-9 : Evolution de la concentration en glucose au cours du temps

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Cette figure montre que la concentration en glucose au jour 0 est nulle, ce qui est normal puisque son injection est effectuée une fois les prélèvements faits pour les différentes analyses. La concentration réelle est de 2 g/L au J0. Le pic en glucose est atteint sur le graphique au jour 1, jour suivant l'injection, puis une chute jusqu'à épuisement du glucose au jour 2. Cela s'explique par la consommation totale du glucose après deux jours de culture. Ces résultats sont cohérents avec les expériences de l'objectif 1 où le glucose était assimilé rapidement par les microalgues.

Il n'y a donc plus de glucose dans le milieu après deux jours de culture. Quel que soit le traitement lors de la deuxième étape de culture, le métabolisme employé par les microalgues n'est donc plus la mixotrophie, mais bien la phototrophie puisqu'il n'y a plus de carbone organique dans le milieu.

5.1.2.4 Teneur et productivité en lipides

La figure V-10 présente la teneur et la productivité en lipides des expérimentations réalisées dans le cadre de l'objectif 2.

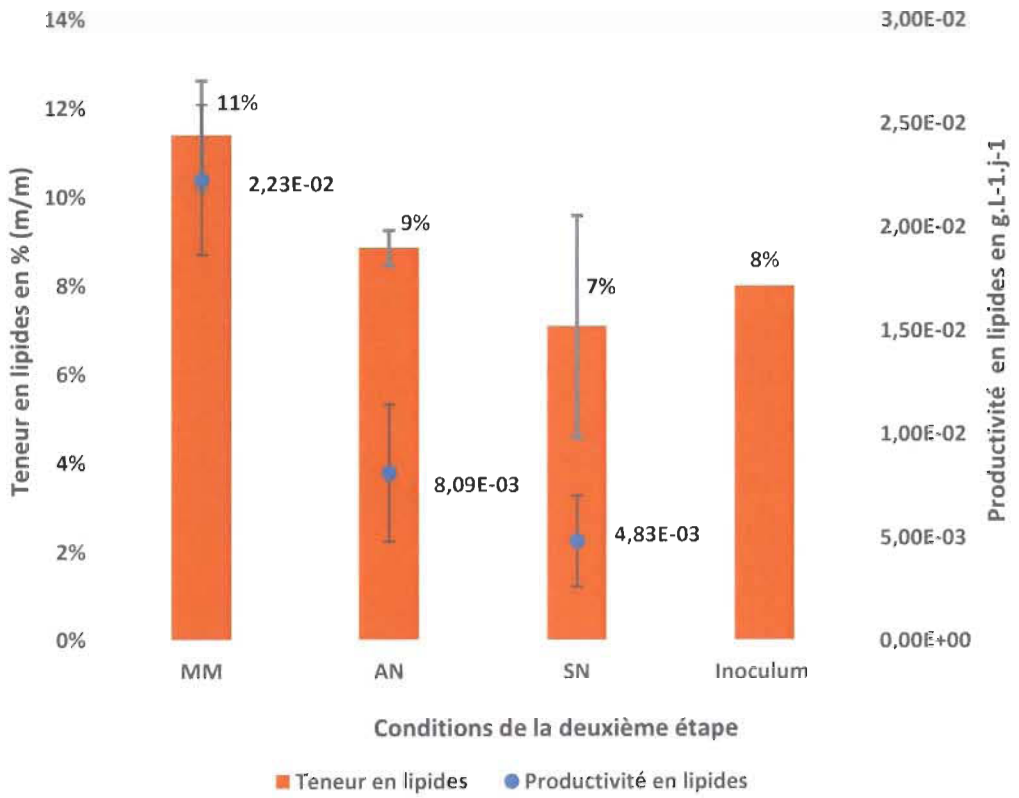

Figure V-10 : Evolution de la teneur et la productivité en lipides en fonction de la deuxième étape de culture

La teneur en lipides ne semble pas augmenter après les deux étapes de cultures. En effet, la teneur en lipide de l'inoculum de départ est de 8 % contre respectivement 11, 9 et 7 % pour les trois conditions de la culture en deux étapes testées (MM, AN et SN). De plus les écart-types se chevauchent et montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les conditions de cultures et l'inoculum de départ ($p>0,05$)

En ce qui concerne la productivité en lipides, celle-ci est meilleure pour la condition MM par rapport aux conditions AN et SN ($p<0,05$). Aucune différence n'apparait entre la condition AN et la condition SN ($p>0,05$). La productivité en lipides est donc meilleure lorsqu'il n'y a pas de phase de récolte en milieu de culture. Ce qui est cohérent puisque c'est pour cette même condition (MM) que la productivité en biomasse est la plus importante. En effet, la productivité en lipides étant dépendante de la productivité en biomasse, cela explique cette différence avec les traitements AN et SN, traitements où une perte de biomasse est constatée.

Le stress auquel ont été soumis les cellules algales via une étape de récolte en milieu de culture et via une carence en nutriment n'a pas eu l'effet escompté. En effet, cela n'a pas augmenté la teneur et la productivité en lipides de la souche RTA, contrairement à ce que qui est rapporté dans la littérature [41][47].

Une période en phototrophie plus longue pourrait être nécessaire afin d'entraîner une accumulation de lipides plus importante [51].

C'est pour cela qu'un temps de culture plus long, soit quatre jours en mixotrophie suivie de quatre jours en phototrophie, a été appliqué dans le cadre de l'objectif 3. Les mêmes conditions de culture que le traitement 1 de l'objectif 2 ont été appliquées : une première étape en mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 % pendant 4 jours (ajout de glucose au J0 et J2 de culture), suivie d'une période de 4 jours en phototrophie.

Bien que la teneur en lipides soit la même, la deuxième étape dans le même milieu de culture doit être favorisée car la productivité en lipide est plus importante comparativement aux deux conditions où il y a une étape de récolte du milieu de la culture. De plus, si un passage à l'échelle pilote et industrielle est envisagé, une étape de récolte peut poser des problèmes au niveau du coût de production. En effet, la récolte est l'une des étapes limitantes lors de la production d'algocarburants; ajouter une seconde étape de récolte (en plus de la récolte finale) augmenterait ainsi le coût de production et donc le prix du biocarburant [27].

5.1.3 Objectif 3

Suite aux conclusions des expériences de l'objectif 2, une culture en deux étapes a été effectuée, avec une première étape en mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 % pendant 4 jours, suivit de 4 jours en phototrophie sans changer le milieu de culture. Le volume de culture a été augmenté à 2,5 L, afin de constater l'effet d'une augmentation de volume sur la productivité en biomasse et en lipides de la souche de microalgues. De plus, un volume de culture plus important permet de récolter plus régulièrement au cours des expérimentations et ainsi, observer la variation au cours du temps de la quantité de lipides.

5.1.3.1 Productivité en biomasse et densité cellulaire

Les figures V-11 et V-12, présentent respectivement l'évolution de la densité cellulaire et celle de la biomasse au cours du temps. Le développement de la biomasse

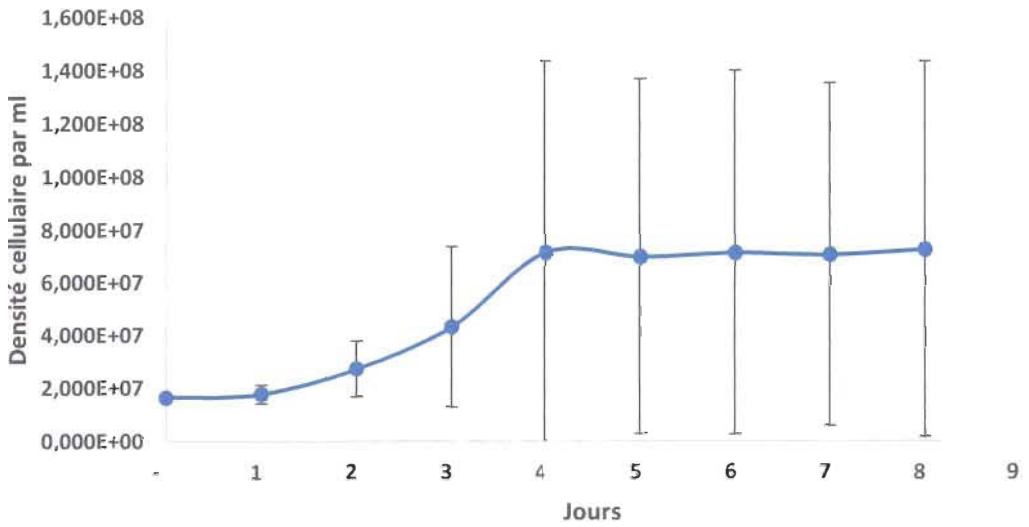

Figure V-11 : Evolution de la densité cellulaire au cours du temps

est similaire sur ces deux graphiques. En effet le seuil maximal en biomasse et de densité cellulaire est atteint au 5ième jour de culture. Une phase de croissance stationnaire est ensuite observée sur les deux graphiques.

Les écarts-types importants sur les deux figures montrent une importante différence entre les triplicatas. Ces différences peuvent être liées à une croissance différente des algues au cours de chacun des réplicas. En effet, bien que les milieux de cultures utilisés pour chacun des réplicas soient les mêmes, chaque photobioréacteur réagit comme un écosystème bien spécifique avec ses propres paramètres physico-chimiques. De plus, n'ayant qu'un seul photobioréacteur à disposition, chaque réplica a été réalisé l'un après l'autre. Ces différences peuvent donc également s'expliquer par le fait que les réplicas n'ont pas été inoculés le même jour.

La productivité moyenne en biomasse a été de 0,16±0,04 $g.L^{-1}.j^{-1}$. Cette productivité est plus faible que les expériences précédentes du fait que le temps de culture est plus long, ce qui a un effet sur le calcul de celle-ci.

La concentration en nutriment et l'évolution de la biomasse sont représentés (figure V-12).

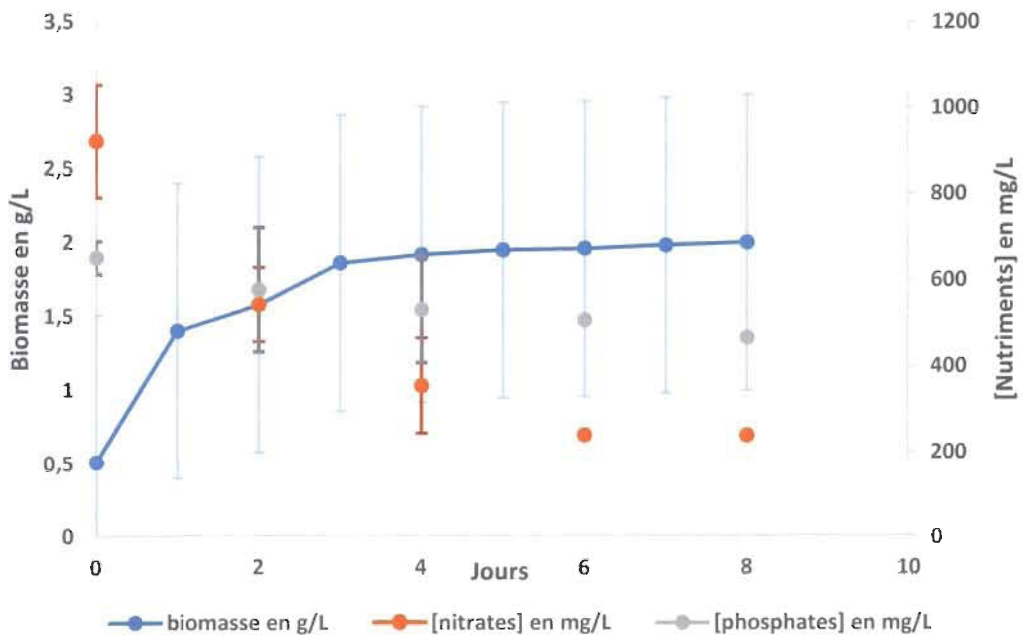

Figure V-12 : Evolution de la biomasse sèche et de la concentration en nutriments au cours du temps

Une diminution de la concentration en phosphates et en nitrates est observée au cours du temps. Ces résultats semblent cohérents car ils sont en corrélation avec l'augmentation de la croissance de la biomasse. En effet, il est normal que la concentration en nutriments diminue au cours du temps car ces derniers sont consommés par les microalgues [3].

5.1.3.2 Evolution de la concentration en glucose

La figure V-13, présente l'évolution de la concentration en glucose au cours du temps lors de la culture en photobioréacteur. Les deux injections en glucose d'une concentration de 1 $g.L^{-1}$ sont réalisées au jour 0 et au jour 2 de culture une fois que les échantillonnages pour les différentes analyses effectuées pour un total de 2 $g.L^{-1}$. Les échantillons analysés ici correspondent aux prélèvements effectués lors du J0, J1, J2, J3, J4 et J5 de la culture. Au jour 0, il n'y a pas de présence de glucose dans le milieu puisque comme dans les expériences précédentes, du fait que les échantillonnages soient effectués avant l'ajout en glucose. C'est donc à partir du J1 que l'on observe une concentration en glucose dans le milieu (figure V-13).

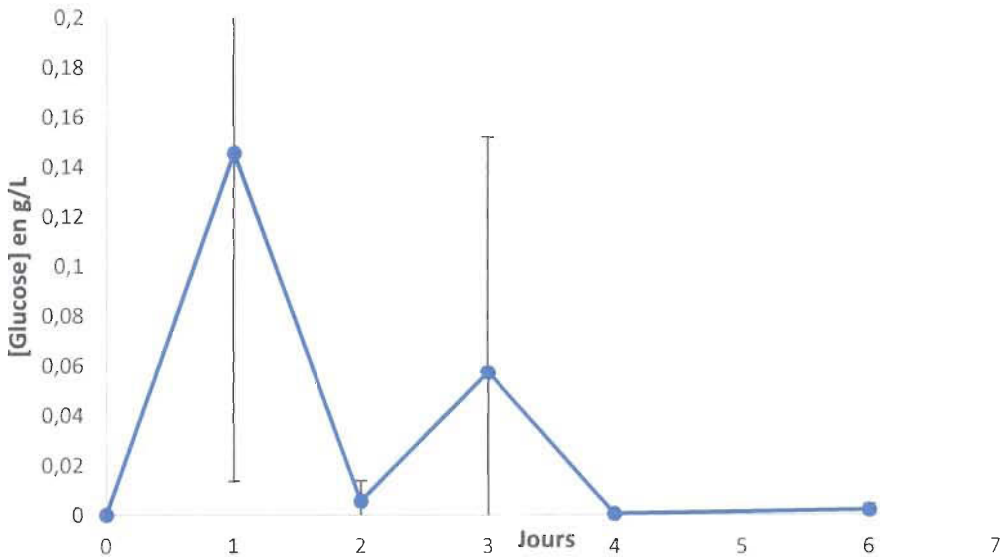

Figure V-13 : Evolution de la concentration en glucose au cours du temps

Après la première injection en glucose, sa concentration diminue jusqu'à devenir nulle au J2 de culture. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'expérience 3 où la concentration en glucose devenait également nulle au J2 de culture.

La seconde injection en glucose intervient après l'échantillonnage du J2. Le pic de concentration en glucose est logiquement atteint le lendemain (J3) et la disparition du glucose dans le milieu deux jours après son injection (J4). Les microalgues semblent donc assimiler le glucose en 2 jours ou moins.

En comparant ces résultats et ceux obtenues en terme de biomasse on suppose qu'il y a un temps de latence entre l'assimilation en glucose et l'effet qu'à celle-ci sur la biomasse. En effet, la concentration en glucose devient nulle au J4 de culture alors que la croissance en biomasse est maximale au J5 de culture. Des conclusions similaires on été décrites dans les expériences antérieures au projet [12][14].

5.1.3.3 Teneur et productivité en lipides

La figure V-14, montre la teneur et la productivité en lipides des expérimentations effectuées dans le cadre de l'objectif 3.

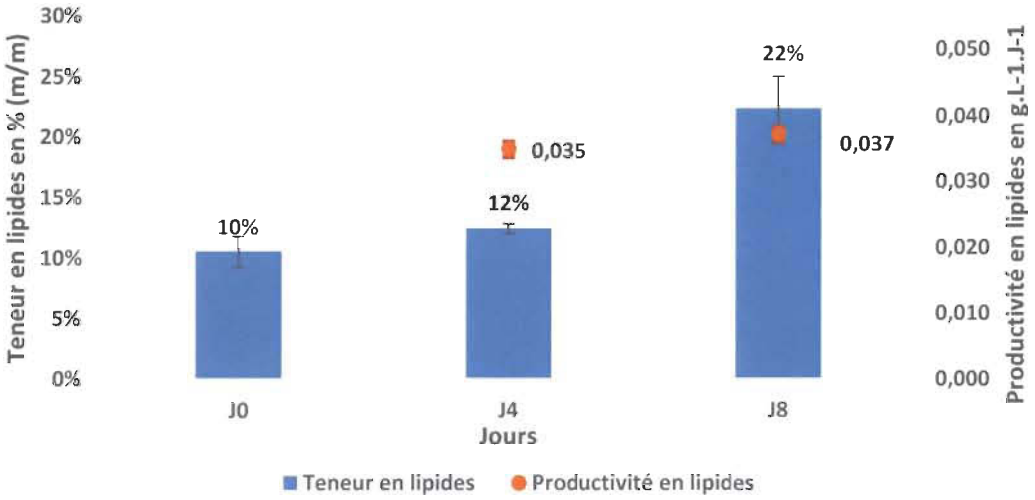

Figure V-14 : Teneur et productivité en lipides aux jours 0, 4 et 8 de culture

La teneur en lipide de notre inoculum de départ s'élevé à 10%. Une augmentation de la teneur en lipide est constatée, sur la figure V-14, entre le premier jour (J0) et le dernier jour de culture (J8). En effet la teneur en lipides passe de 10 % à 22 % ($p<0,05$). La teneur en lipide a donc doublé entre l'inoculum de départ et la fin de la culture en deux étapes. La teneur en lipide n'as pas évoluée lors de la phase de mixotrophie (J0 à J4) ($p>0,05$). La phase en phototrophie de 4 jours a permis de doubler la teneur en lipides. Cependant, une teneur en lipides d'une vingtaine de pourcent, est relativement faible par

rapport à ce que recense la littérature, où des teneurs en lipides dépassaient les 50 % du poids sec de la cellule algales sont présentés[3][72].

En ce qui concerne la productivité moyenne en lipides obtenue aux jours 4 et 8 de culture, celle-ci est sensiblement la même du fait des écart-types obtenus. Elle s'élève respectivement à $3{,}50.10^{-2}$ $g.L^{-1}.j^{-1}$ et $3{,}70.10^{-2}$ $g.L^{-1}.j^{-1}$. Aucune différence significative entre ces résultats n'a été observée ($p>0{,}05$). Ces résultats de productivité en lipides sont du même ordre de grandeur que les expériences réalisées précédemment.

Malgré la prolongation de chacune des étapes et un volume de culture plus important, la culture en deux étapes ne semble pas avoir l'effet souhaité. C'est-à-dire augmenter la productivité en lipide de notre souche algale. En effet, la productivité en lipide n'augmente pas, malgré une augmentation de la teneur puisque la productivité en biomasse diminue trop avec une deuxième étape phototrophe [46].

Le stress induit par la phototrophie stimule bien l'accumulation en lipides, mais a un impact trop important sur la biomasse pour que l'augmentation de la teneur en lipides augmente la productivité en lipides. Afin d'éviter ce désagrément, une modification de la seconde étape de culture pourrait être envisagé. Une substitution de la phase phototrophe par une phase hétérotrophe pourrait être un moyen d'augmenter la productivité en lipides de la souche [58][72].

5.1.4 Objectif 4

Le but de cet objectif est de caractériser le profil des acides gras obtenus lors des expériences précédentes effectués sur la souche RTA, afin de voir si ces acides gras ont le profil adéquat pour la fabrication de biocarburants.

5.1.4.1 Culture en une étape (choix du mode trophique et de la [CO_2])

Suite à des problèmes lors des manipulations, aucune donnée sur les acides gras de l'expérience 1 (M1 et P1) de l'objectif 1 n'a été obtenue. Les résultats concernant le profil des acides gras obtenus suite à l'expérience 2 (M, M2, P2 de l'objectif 1 sont présentés sur la figure V-15.

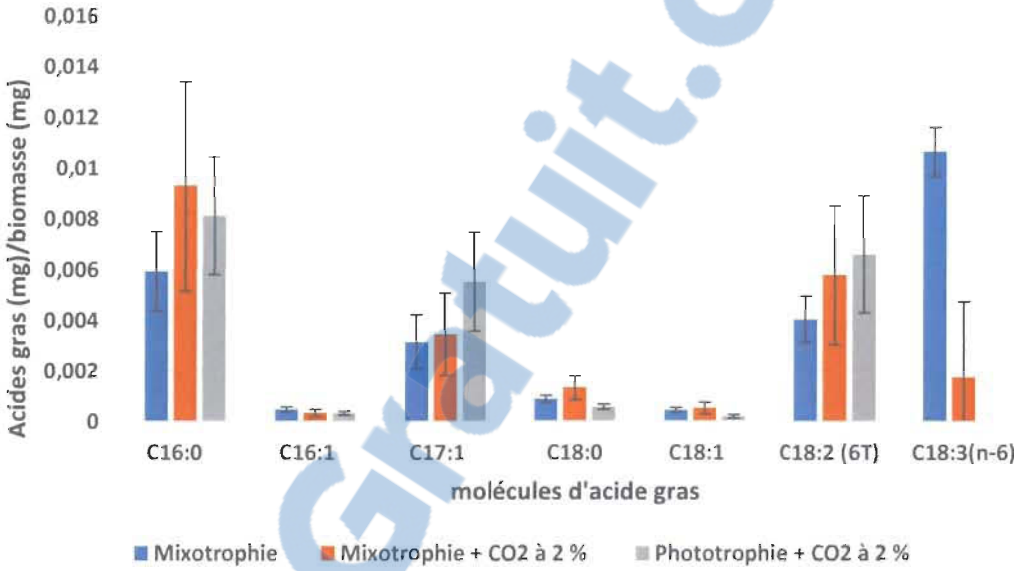

Figure V-15 : Proportions en acides gras en fonction des conditions de culture

Les analyses aux GC-MS ont identifié 32 acides gras différents au sein des huiles algales obtenues, la liste de ces derniers est répertoriée en annexe (Annexe 3).

Les acides gras prépondérants de la souche sont présentés ici, soit les C16:0, C16:1, C17:1, C18:0, C18:1, C18:2(6T) et C18:3(n-6). Ces sept acides gras représentaient près de 99 % de la composition globale en acides gras.

Le profil des acides gras obtenus ne semble pas varier pour les acides gras suivant ; C16:0, C16:1, C17:1, C18:0, C18:1, et C18:2(6T). La seule différence présente sur le graphique, est la présence de l'acide gras C18:3(n-6) pour les deux conditions en mixotrophie et l'absence de ce dernier pour la phototrophie. Le mode trophique utilisé a donc peu d'influence sur le profil des acides gras obtenus.

D'après ces résultats, l'ajout de CO_2 dans le cadre d'un traitement mixotrophe affecte peu le profil des acides gras de la souche RTA. En effet, aucune différence n'apparait entre les acides gras, exepté pour la proportion plus élevé en C18:3(n-6) dans

Rapport-Gratuit.com

le cas où il n'y a pas d'ajout de CO_2. Le CO2 a donc, dans ce cas, peu d'influence sur le profil des acides gras.

Les acides gras produits par la souche RTA sont appropriés pour produire des biocarburants et notamment du biodiesel. En effet, des acides gras mono- insaturés et non saturés à 16 et 18 carbones sont idéals pour produire du biodiesel [24][73].

5.1.4.2 Culture en deux étapes

- **Culture en fioles**

Dans le cadre de la culture en deux étapes en fioles, les acides gras prépondérants sont les même que précédemment, soit les C16:0, C16:1, C17:1, C18:0, C18:1, C18:2(6T) et C18:3(n-6). Ces sept acides gras représentent également près de 99 % de la composition globale en acides gras. Ils sont représentés sur la figure V-16.

Aucune variation de profil d'acides gras n'est observée entre les différentes conditions de cultures de la seconde étape. En effet, ce sont les mêmes acides gras majoritaires qui sont retrouvé à l'issue de la première étape ainsi qu'à la fin de chacune des secondes étapes.

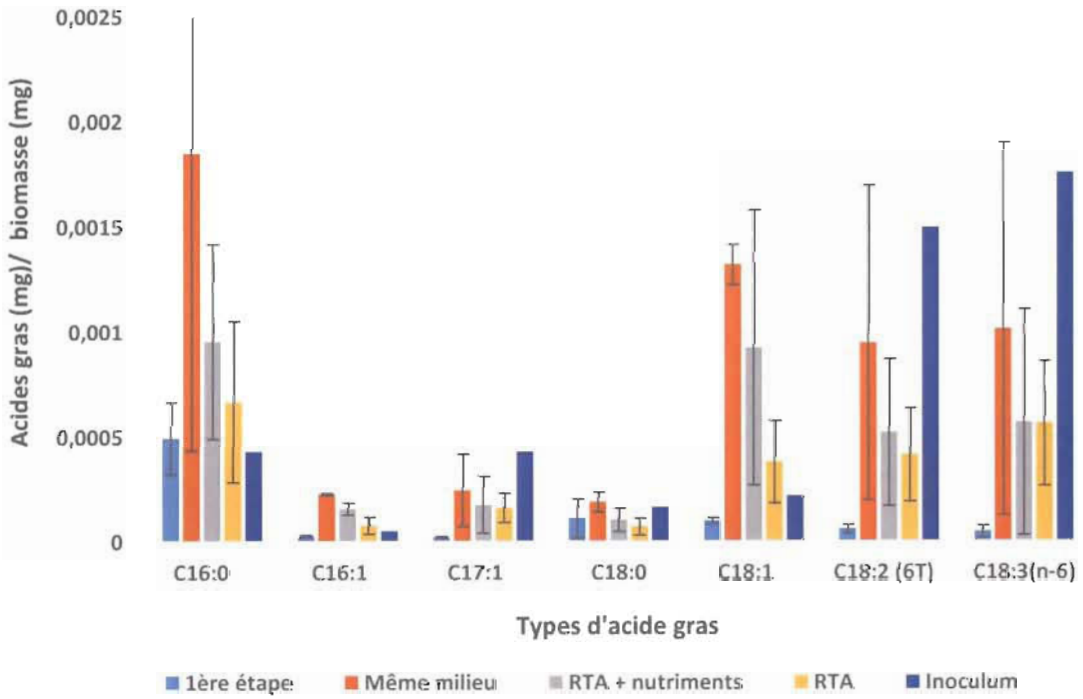

Figure V-16 : Proportions en acides gras en fonction des conditions de la 2e étape de culture

Le profil des acides gras ne varie pas, mais la quantité de ces derniers semble varier en fonction des conditions de la deuxième étape de culture. Cependant, les écarts types important et qui se recoupent ne permettent pas de conclure à une différence de proportion en fonction des conditions de la seconde étape de culture ($p>0,05$). Aucune conclusion significative sur une variation de la proportion d'acide gras ne peut être effectuée.

La culture en deux étapes sur quatre jours n'a donc pas modifié le profil des acides gras de la souche. Cela est intéressant, puisque la souche RTA produit des acides gras appropriés à la production de biodiesel. En effet, une modification du profil des acides gras, à l'issue de la culture en deux étapes, pourrait nuire à la qualité du biodiesel produit.

Afin d'avoir à l'avenir des résultats significatifs et pour limiter d'avoir des écarts-types importants, il serait important d'augmenter le nombre de réplicas.

- **Culture en photobioréacteur**

Contrairement aux objectifs 1 et 2 réalisés en fioles, où il y avait 7 acides gras majoritaires sur l'ensemble des acides gras présents dans les huiles algales, il y a 4 acides gras majoritaires pour les expérimentations de l'objectif 3. Ces quatre acides gras sont les C16:0, C16:1, C18:0 et C18:1 (figure V- 17).

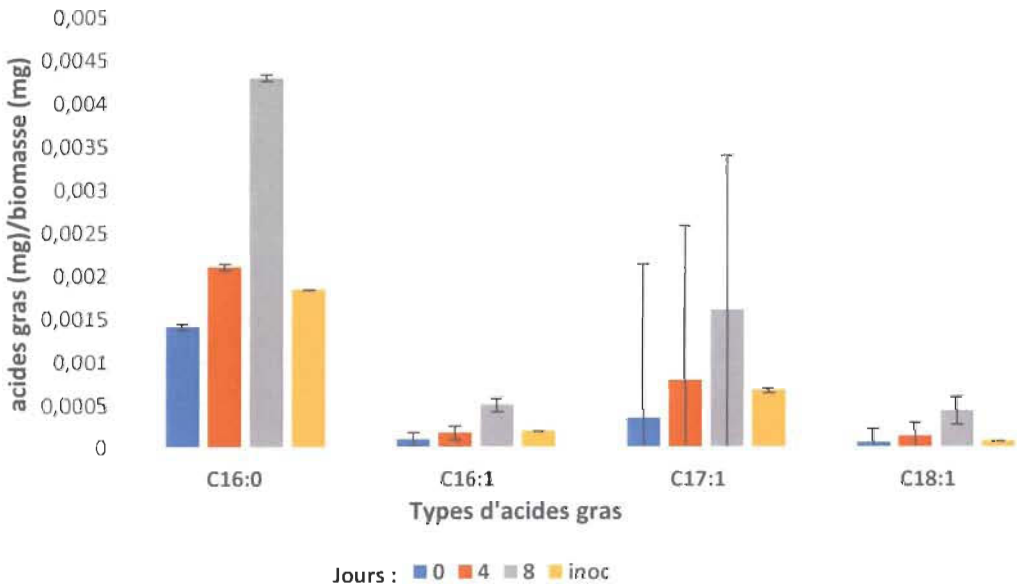

Figure V-17 : Proportions des acides gras en fonction des jours de culture

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

D'après la figure V-17, aucune variation du profil en acides gras suite à la culture en deux étapes n'est observée entre l'inoculum de départ, le début, le milieu et la fin de culture ($p>0,05$). En effet, les mêmes acides gras sont retrouvés à l'issue des différents jours de culture.

Effectivement, la quantité des acides gras majoritaires de la souche, illustrée à la figure V-17, a tendance à augmenter à l'issue de la culture en deux étapes. En effet, la quantité en C16:0, C16:1, C17:1 et C18:1 semblent plus importantes au jour 8 de culture comparativement au jour 0, au jour 4 et à l'inoculum de départ. L'augmentation est significative pour les acides gras C16:0, C16:1 ($p<0,05$). Cependant, les écarts-types importants sur la figure V-17 ne permettent pas de conclure d'une façon significative sur l'augmentation de la quantité des acides gras C17:1 et C18:1 ($p>0,05$).

La différence entre les profils d'acides gras des cultures en fioles et en photobioréacteur est présentée dans le tableau V-1 ci-dessous :

Acides Gras	Fioles	Photobioréacteurs
C16:0	+	+
C16:1	+	+
C17:1	+	-
C18:0	+	+
C18:1	+	+
C18:2(6T)	+	-
C18:3(n-6)	+	-

Tableau V-1: Différences de profil d'acide gras entre la culture en fioles et celle en PBR, (+, présent / -, absent)

Cette différence peut possiblement s'expliquer par le temps de culture plus important en photobioréacteurs comparativement aux expérimentations en fioles. Effectivement, le stress induit par une phase phototrophique plus longue peut modifier le type d'acide gras. En effet, il est mentionné dans la littérature que le profil des acides gras varie en fonction des modes trophiques [17][26][74][75][76]. Or dans le cadre de l'objectif 1, où plusieurs modes trophiques ont été appliqués, aucune variation du profil des acides gras n'as été observée (section 5.1.4.1), ce qui peut s'expliquer par un temps de culture trop courts (2 jours) pour observer une différence, lors de ces expérimentations.

La variation du profil en acides gras entre la culture en deux étapes en fiole et en photobioréacteur peut aussi s'expliquer par le fait qu'il y a possiblement un biais dans les données (problèmes lors des analyses des acides gras, erreurs de manipulation, ...). Ce qui explique d'ailleurs les grands écarts types, dû à la quantité très faible de biomasse utilisée pour les extractions.

L'augmentation du temps et du volume de culture, via l'utilisation d'un photobioréacteur, lors de la culture en deux étapes, semble avoir un effet sur le type d'acides gras produit par la souche RTA. Comme dans le cas de la culture en deux étapes en fioles, les acides gras obtenus sont intéressants pour le projet RTA.

En effet, les acides gras majoritaires, soit C16:0, C16:1, C18:0 et C18:1, sont des acides gras appropriés pour produire du biodiesel. Puisque, selon plusieurs auteurs, une huile algale contenant un taux important en acides gras mono-insaturés et non saturés à 16 et 18 carbones est une huile au profil adéquat [24][25].

5.2 Projet VERTECH

5.2.1 Objectif 5

Le but de cet objectif est d'évaluer l'effet de la culture en deux étapes sur la souche VERTECH. Les mêmes conditions de culture en deux étapes que pour le projet RTA sont utilisées. La culture est donc réalisée en mixotrophie avec ajout de CO_2 à 1 % pendant 4 jours (ajout de glucose au J0 et J2 de culture), suivi de 4 jours en phototrophie. Le milieu de culture qui a été utilisé est un milieu adapté à la souche VERTECH (cf paragraphe 4.3.2). Il n'y a pas de phase d'adaptation pour la souche VERTECH.

5.2.1.1 Productivité en biomasse et compte cellulaire

La croissance est similaire sur les figures V-18 et V-19 qui présentent respectivement l'évolution de la densité cellulaire et de la biomasse.

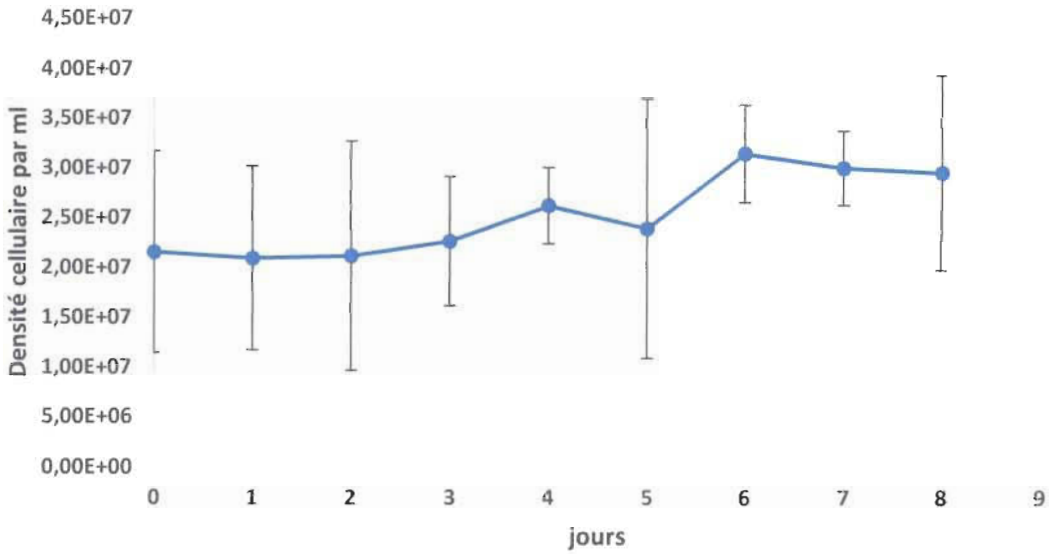

Figure V-18: Evolution de la densité cellulaire au cours du temps

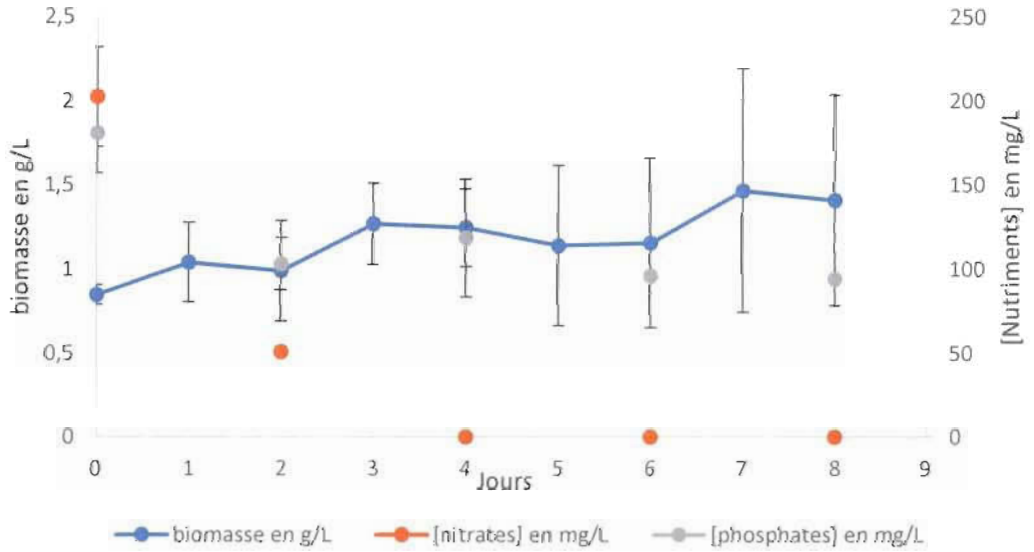

Figure V-19 : Evolution de la biomasse sèche et de la concentration en nutriment au cours du temps

Sur les deux graphiques, une légère augmentation de la biomasse sèche et de la densité cellulaire est observée. La productivité moyenne en biomasse obtenue en fin de culture est de 0,063 $g.L^{-1}.j^{-1}$ (+/-0,065). Des écarts types importants sont constatés pour la densité cellulaire et le développement de la biomasse. Ces derniers peuvent s'expliquer, par le fait d'une croissance différente des triplicatas à cause d'une contamination

bactérienne et en zooplancton (rotifères et protozoaires) plus ou moins forte selon les réplicas. De plus, l'eau usée était différente au cours des expériences parce qu'un nouveau lot d'eaux usées a été utilisé. Bien que les eaux usées proviennent des mêmes sites de prélèvement, leur composition peut varier en fonction des activités industrielles. Cette variation de milieu a donc un impact sur la croissance des microalgues. Malgré cela, une augmentation de la biomasse au cours du temps est constatée. Cette augmentation n'est pas très importante, ce qui peut s'expliquer par la forte contamination du milieu.

En ce qui concerne la concentration en nutriments, celle en nitrates diminue jusqu'à être nulle au jour 4 de culture tandis que la concentration en phosphate diminue puis reste constante à partir du jour 4 de culture. Les algues ont donc consommé tout l'azote présent dans le milieu au bout de quatre jours de culture. Cela peut expliquer la faible croissance de notre souche en termes de biomasse et de densité cellulaire. Également, la concentration en phosphate stagne à partir du quatrième jour de culture. En effet, l'azote est dans ce cas, le facteur limitant pour le développement de la biomasse algale, une absence de ce dernier freine donc la croissance cellulaire.

La culture en deux étapes en photobioréacteur n'est donc pas adaptée au bon développement des microalgues de la souche VERTECH. Il faudrait certainement revoir les conditions de culture (concentration en nutriments, temps de culture, modes trophiques,…) afin d'optimiser la croissance de la biomasse.

5.2.1.2 Evolution de la concentration en glucose :

Comme lors des expérimentations de l'objectif 2 réalisées dans le cadre du projet RTA, les deux injections en glucose d'une concentration de 1 $g.L^{-1}$ sont réalisées au jour 0 et au jour 2 de culture une fois que les échantillonnages pour les différentes analyses effectuées pour un total de 2 $g.L^{-1}$. Les échantillons analysés, présentés sur la figure V-20, correspondent aux prélèvements effectués lors du J1, J3, J4 et J6 de la culture Au J0, la concentration en glucose est nulle puisque les échantillonnages ont été effectués avant l'ajout en glucose.

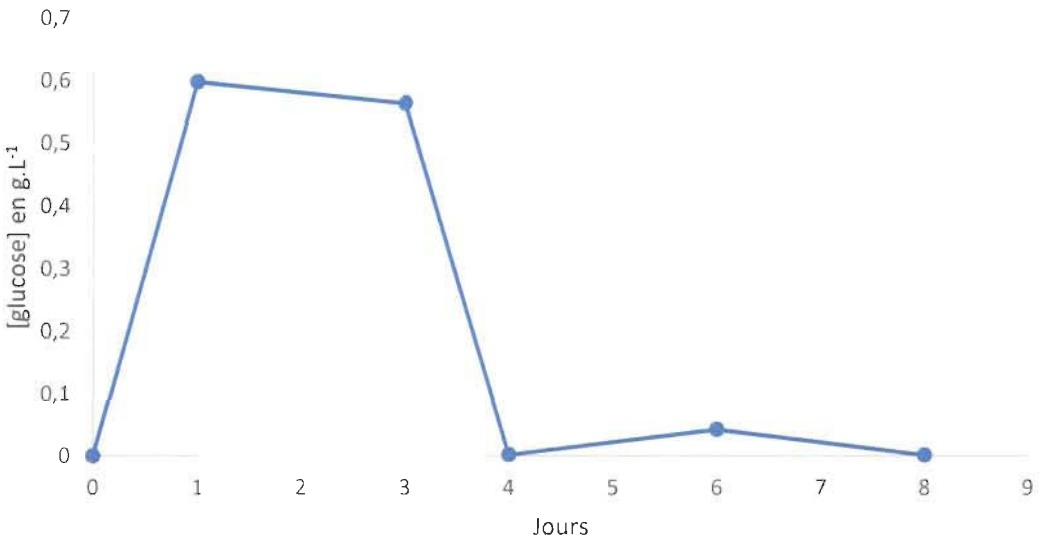

Figure V-20 : Evolution de la concentration en glucose au cours du temps

L'évolution de la concentration en glucose semble similaire à celle de à la culture en photobioréacteur de la souche RTA. Suite à des problèmes techniques, aucune mesure au J2 de culture n'a été effectuée. Cependant, la concentration en glucose lors du J2 doit être plus basse qu'au J1 puisqu'il doit être consommé par le consortium. Ensuite, la concentration en glucose augmente au J3 suite à l'injection de glucose au J2. La concentration en glucose devient nulle au J4, ce dernier étant consommé par le consortium.

Cependant, comme précédemment, puisque le développement de la biomasse n'est pas très important, une partie du glucose a probablement été consommé par les contaminants présents durant ces expérimentations, notamment les bactéries.

Les conditions de culture en deux étapes de la souche RTA n'étaient donc pas optimales pour la production de biomasse avec de la souche VERTECH. La teneur en nutriments du milieu doit donc être optimisée. Les effets des variations en approvisionnement des eaux usées sur la souche doivent aussi être étudiés afin de définir les meilleures conditions pour une culture en deux étapes pour cette souche.

5.2.1.3 Teneur et productivité en lipides

La figure V-21 présente la teneur et la productivité en lipides des expérimentations de l'objectif 5. Pour rappel, il n'y a pas de phase d'adaptation avec la souche VERTECH. La teneur en lipides de l'inoculum de départ est égale à celle du premier jour de culture J0, soit 23%.

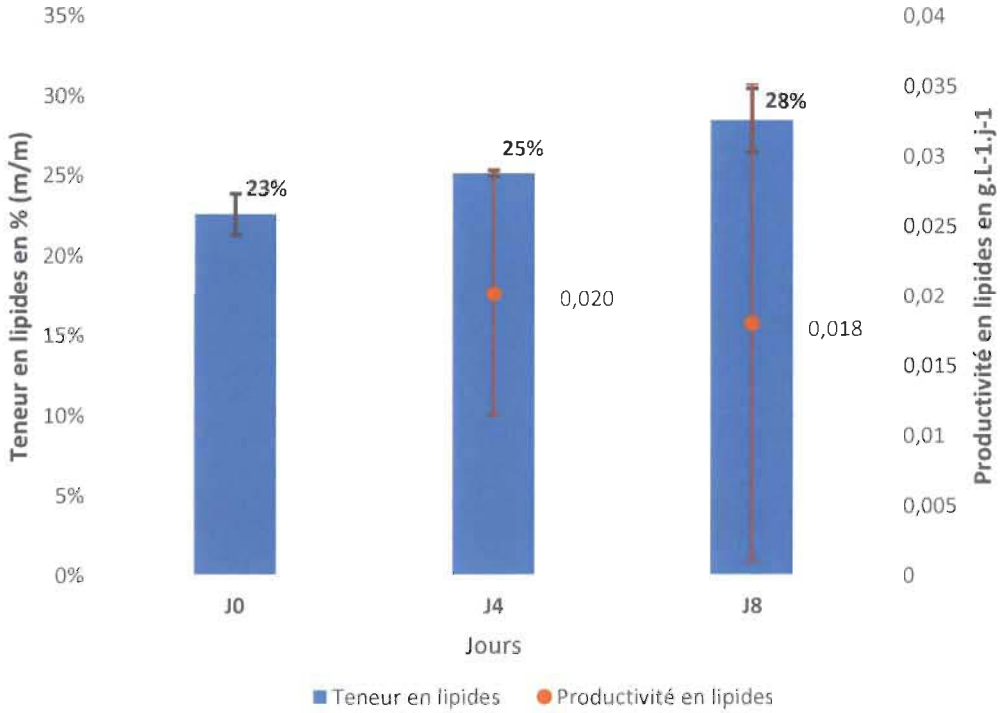

Figure V-21 : Evolution de la teneur en lipides en fonction des jours de cultures

D'après la figure V-21, il semble y avoir une légère variation de la teneur en lipides, entre le début et la fin de culture En effet l'inoculum de départ contient en moyenne 23 % de lipides contre 28 % à la fin de la culture en deux étapes, cette légère différence est significative, les écart-types ne se recoupent pas ($p<0,05$). Aucune différence de teneur en lipides n'est observée entre les jours J0 et J4 de culture ($p>0,05$). La culture en deux étapes semble avoir un effet favorable sur la teneur en lipides de la souche VERTECH.

Cependant, cette augmentation de la teneur en lipides est faible par rapport à la souche RTA, où l'étape de phototrophie avait permis de doubler cette teneur.

En ce qui concerne la productivité en lipides, elle ne diffère pas entre le milieu et la fin de la culture. En effet, les écarts types sont importants et se recoupent ($p>0,05$). La productivité en lipides en fin de culture est quasiment deux fois plus faible que celle obtenue lors des expériences avec la souche RTA. Cependant, aucune conclusion n'est tirée de ces résultats en raison de la forte variabilité entre les réplicas. En effet, la faible productivité en lipides peut s'expliquer par la faible croissance de la biomasse. Effectivement, celle-ci a été perturbée par une contamination importante mais aussi par la variation d'approvisionnement des eaux usée.

La faible productivité en biomasse et en lipides de la souche VERTECH démontre que les conditions de cultures appliquées à une souche (RTA) afin d'augmenter la productivité en lipides et en biomasse ne sont pas les mêmes pour une souche d'algue différente (VERTECH). Afin de déterminer les conditions optimales pour favoriser l'accumulation en lipides de la souche VERTECH, d'autres expériences sont nécessaires. Par exemple, la teneur en nutriments du milieu de culture pourrait être modifiée ou encore la durée de chacune des deux phases de culture. Il serait également intéressant de réaliser à nouveau ces expériences sans un changement de lot d'eaux usées au milieu des expériences, mais aussi de réaliser plus de réplicas afin d'améliorer la significativité des résultats.

5.2.2 Objectif 6

Le but de cet objectif est de mesurer l'effet de l'utilisation de nutriments alternatifs et notamment de résidus carbonés en remplacement du glucose sur la productivité en lipides et en biomasse de la souche VERTECH. Le milieu de culture reste inchangé. Le glucose est seulement remplacé par une source de nutriments alternative.

5.2.2.1 Productivité en biomasse et densité cellulaire

La figure V-22 montre la productivité en biomasse obtenue à l'issue des expérimentations réalisées dans le cadre de l'objectif 6.

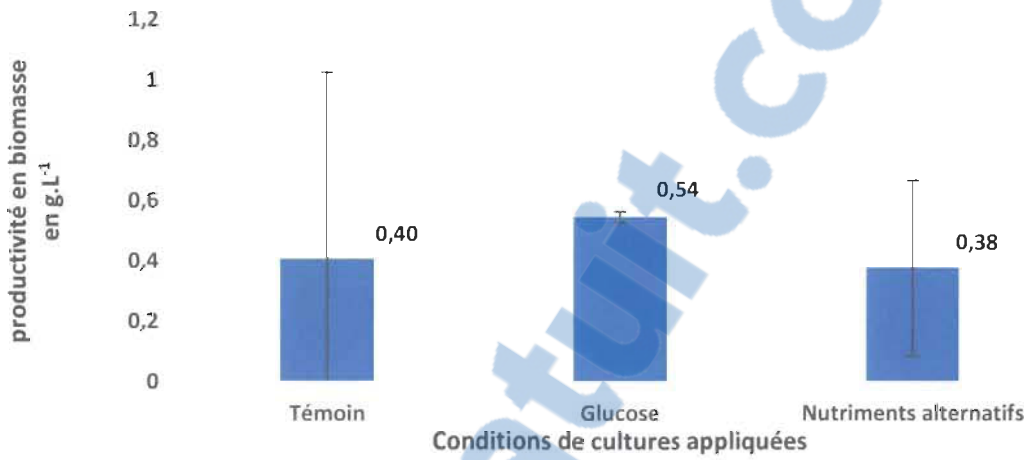

Figure V-22: Productivité en biomasse selon les conditions opératoires

Aucune différence significative n'est observée sur la figure V-22 en termes de productivité en biomasse en raison des écarts types importants pour le témoin et l'utilisation de nutriments alternatifs ($p>0,05$). Toutefois, l'utilisation d'une source différente de carbone organique ne semble avoir aucun effet sur le développement de la biomasse à la concentration expérimentée. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de la densité cellulaire et de la biomasse sèche présentés figures V-23 et V-24.

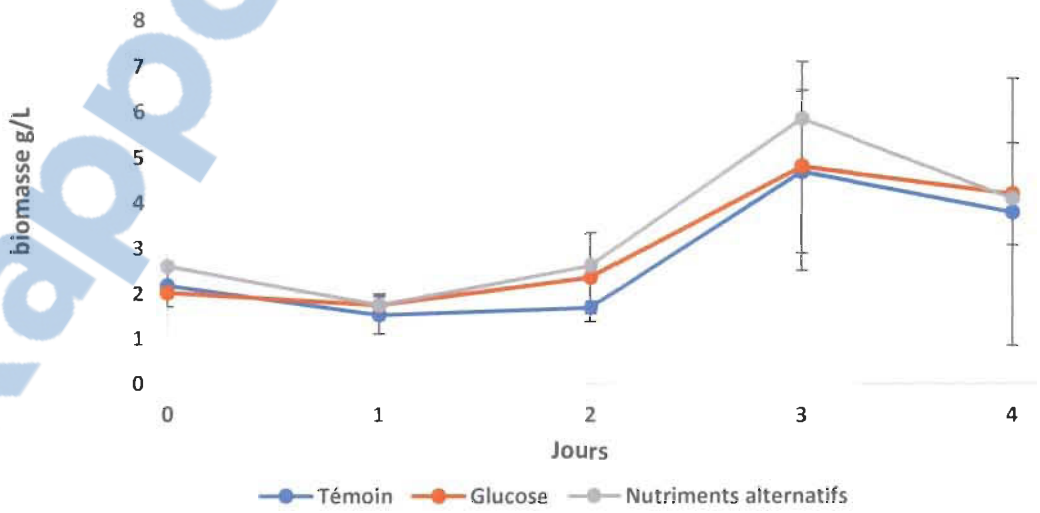

Figure V-23 : Evolution de la biomasse sèche au cours du temps

Rapport-Gratuit.com

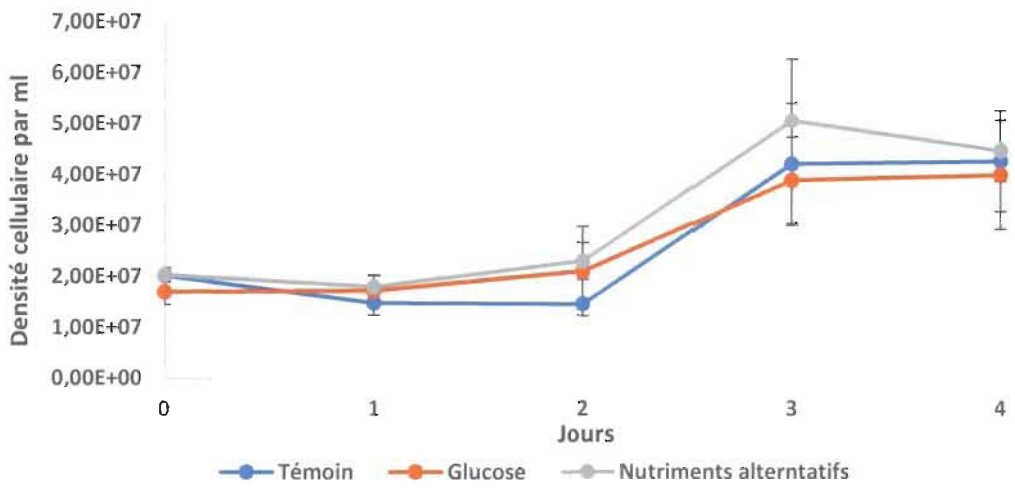

Figure V-24 : Evolution de la densité cellulaire au cours du temps

En effet, comme le présente les figures V-23 et V-24, les microalgues semblent se développer de la même façon dans le milieu de base, avec ou sans ajout de glucose ou de nutriment alternatifs. Aucune différence significative n'est observée pour l'évolution de la biomasse séche ($p>0,05$) et pour la densité cellulaire ($p>0,05$) en fin de culture.

5.2.2.2 Evolution de la concentration en COT et azote organique total

Dans le tableau V-2, les concentrations en carbone organique total dans le milieu de culture ainsi que celle en azote Kjeldahl total (N_T) sont représentées au J0 et J5 de culture. Les concentrations sont exprimées en $mg.L^{-1}$.

Conditions	[COT] Initiale	[COT] Finale	[N_T] Initiale	[N_T] Finale
Témoin	552,3	266,3	39,5	0
Glucose	956,0	284,3	78,0	29,0
NA	941,3	310,6	85,5	34,0

Tableau V-2 : Concentration en N_T et COT ($mg.L^{-1}$)

La concentration en COT et en N_T diminue au cours du temps, puisque les nutriments sont graduellement consommés par le consortium. La concentration de départ en COT est naturellement plus importante pour les conditions avec ajout de glucose et de nutriments alternatifs (NA) par rapport à la condition témoin puisqu'il y a ajout de

composés carbonés dans ces deux cas. La concentration en N_T, au J0, devrait être identique pour les conditions témoins et avec ajout de glucose puisque le même milieu est utilisé. Cependant, ce n'est pas le cas. Cela est probablement lié à des erreurs de manipulation. Il sera donc fait abstraction de la condition témoin pour l'analyse de la concentration finale en N_T, du fait de ces résultats incohérents.

Aucune différence significative n'est observée pour la concentration finale en COT ($p>0,05$). La souche de microalgues assimile donc, de la même manière le carbone organique qu'il provienne du glucose ou des nutriments alternatifs. Ce qui n'est pas le cas du carbone organique présent de base dans le milieu VERTECH (Témoin). En effet, la concentration en COT initiale est quasiment deux fois plus basse pour le témoin que lorsqu'il y a ajout de glucose et de NA, alors que la concentration finale est semblable ($p>0,05$). Le carbone organique présent de base dans le milieu est donc assimilé plus lentement par le consortium. Ce qui peut s'expliquer par le fait que le carbone organique n'est pas disponible directement, sous une forme assimilable par les microalgues, et que ce dernier doit subir une modification avant de pouvoir être assimilé.

En ce qui concerne la concentration finale en N_T, il n'y a aucune différence lorsqu'il y ajout de glucose ou de nutriment alternatifs ($p>0,05$). La source de nutriments alternatifs n'apporte donc pas d'azote supplémentaire au milieu de culture. Cela ne semble pas cohérent, puisque ces sources de nutriments sont censées contenir de l'azote provenant des protéines issues des effluents laitiers. L'absence de cet azote supplémentaire peut s'expliquer par la faible quantité du mélange de nutriments alternatifs ajouté au milieu de culture.

L'utilisation d'une source alternative de nutriments ne semble donc pas avoir d'effet à cette concentration sur l'assimilation en carbone et en azote des microalgues et peut donc être envisagée afin de substituer le glucose. Comme cela se fait de plus en plus souvent dans la littérature [46][77][78][79][80].

5.2.2.3 Teneur et productivité en lipides

Dans le cas de la teneur et la productivité en lipides, les mêmes conclusions que pour le développement de la biomasse peuvent être formulées. En effet, comme le présente la figure V-25, aucune différence n'est observée pour la teneur en lipides quand on ajoute

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

du glucose ou des nutriments alternatifs au milieu de culture. (p>0,05). L'utilisation de nutriments alternatifs n'a donc pas d'effet sur la teneur en lipides de la souche.

Selon la figure V-25, la productivité en lipides est légèrement plus élevée lorsqu'il y a du glucose comparativement à la présence de nutriments alternatifs et l'absence de glucose. Cependant il n'y a pas de différence significative entre les trois conditions (p>0,05). L'ajout de carbone organique (glucose ou alternatif), n'as donc pas d'influence sur la teneur et la productivité en lipides.

L'utilisation de résidus carbonés issus des rejets des industrielles du parc de Victoriaville ne semble donc pas avoir d'influence sur la productivité en biomasse et sur la productivité et la teneur en lipides. Ces résultats sont encourageants puisque l'utilisation de ces résidus industriels permetrait à Parmalat de réduire le coûts de traitement de ses effluents en les injectant dans la production de microalgues.

Cependant ces études préliminaires sont à approfondir afin de s'assurer de la viabilité de ces résultats. D'autres expérimentations pourrait être effectuées avec un temps et un volume de culture plus important afin de s'assurer que la source de nutriments alterntatifs n'apporte pas de contaminants au milieu de culture.

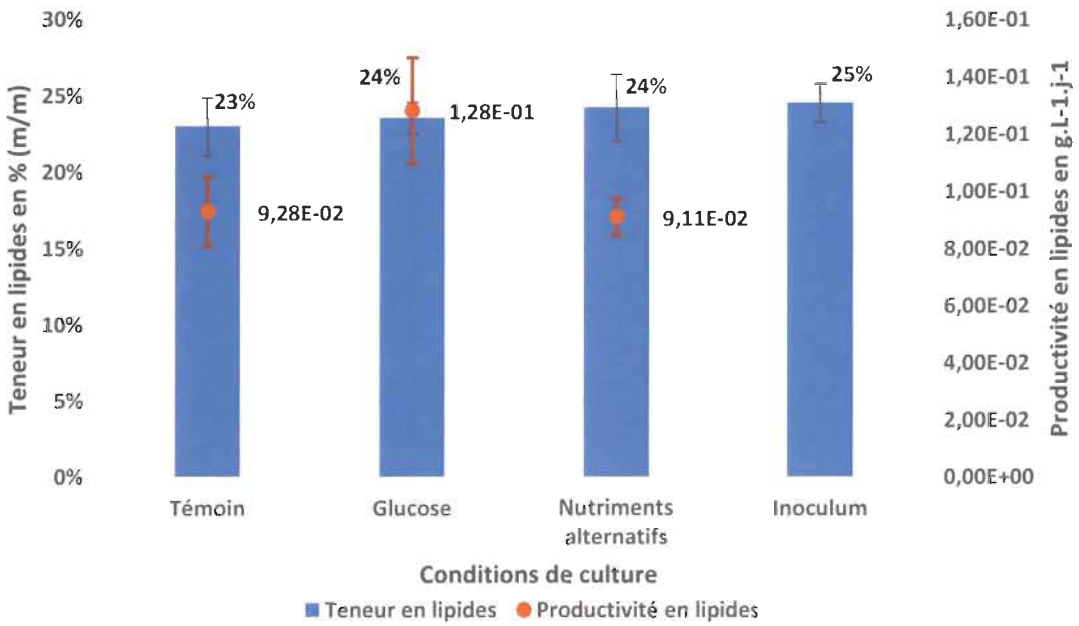

Figure V-25 : Variation de la teneur et de la productivité en lipides en fonction des conditions opératoires

5.2.3 Objectif 7

Le but de cet objectif est de caractériser le profil des acides gras obtenus lors des expériences précédentes effectués sur la souche VERTECH.

5.2.3.1 Culture en photobioréacteur

D'après la figure V-26, on remarque que le profil et d'acides gras de la souche VERTECH est différent par rapport à la souche RTA. Cela parait cohérent, puisque les caractéristiques varient d'une souche à l'autre. Les acides gras majoritairement obtenus sont au nombre de 14 ; C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:0 et C18:1.

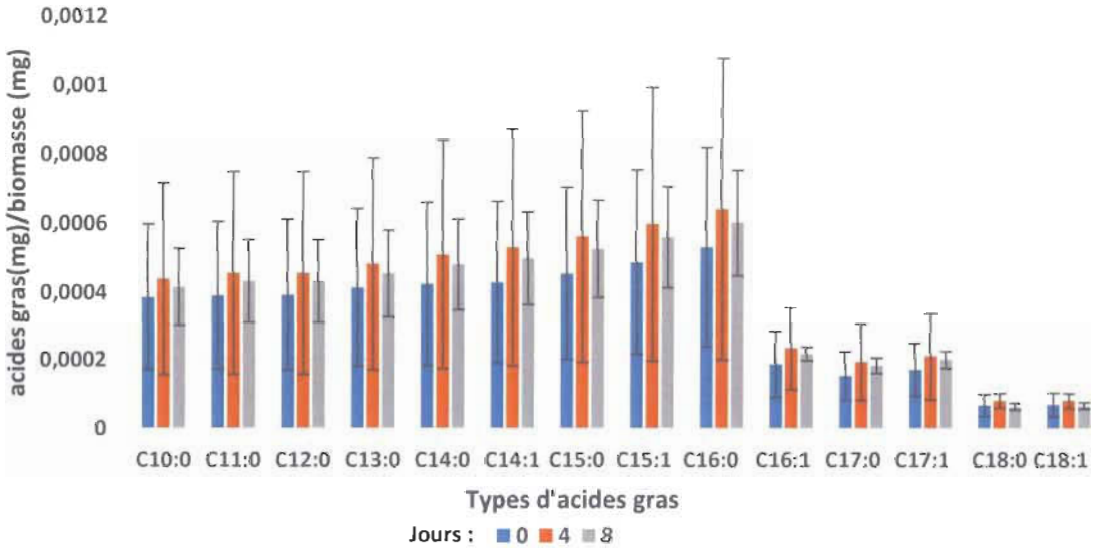

Figure V-526 : Proportions en acides gras selon les jours de culture

La culture en deux étapes en photobioréacteur n'a pas d'influence sur le profil et la quantité des acides gras de la souche VERTECH alors que la quantité en acides gras semblait augmenter en fin de culture pour la souche RTA. En effet, aucune variabilité de profil et de quantité en acides gras n'est détectée que ce soit, en début, au milieu ou en fin de la culture ($p>0,05$).

La présence des cinq acides gras suivants : C10:0, C11:0, C13:0, C15:0, C15:1, est surprenante, puisques ils n'ont jamais été détecté, dans la souche VERTECH. De plus les microalgues ne peuvent pas synthétiser ce type d'acide gras. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces résultats incohérents, serait la production de ces 5 acides gras par des bactéries présentent dans le milieu de culture. En effet, la contamination bactérienne fût

importante lors de ces expérimentations. De plus les bactéries ont la capacité de produire ce type d'acides gras [81][82].

Comme observé avec la souche RTA, la souche VERTECH pourrait être utilisée pour la production de biocarburant. En effet, l'huile algale contient des acides gras adéquats pour produire du biodiesel avec les acides gras mono-insaturés et insaturés à 16 et 18 carbones [24][25]. Cependant, la présence des acides lauriques et myristiques (C12:0 et C14:0) est également intéressante pour la production de produit à plus haute valeur ajouté comme des biosurfactants pouvant être utiles à la compagnie Sani Marc (Victoriaville, QC) qui participe au projet VERTECH I.

5.2.3.2 Culture en fioles avec des nutriments alternatifs

Dans le cadre de l'objectif 6, le profil en acides gras est différent par rapport à la culture effectuée avec la souche VERTECH en photobioréacteur. En effet, 9 acides gras majoritaires sont observées contre 14 précédemment : soit C12:0, C14:0, C14:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:0 et C18:1 (Figure V-27).

D'après la figure V-27, la présence de glucose ou de nutriments alternatifs ne modifie pas le profil des acides gras. En effet, le profil et la quantité de chacun des acides gras majoritaires est sensiblement la même entre les différentes conditions ($p>0,05$), sauf pour pour la quantité en C17:0.

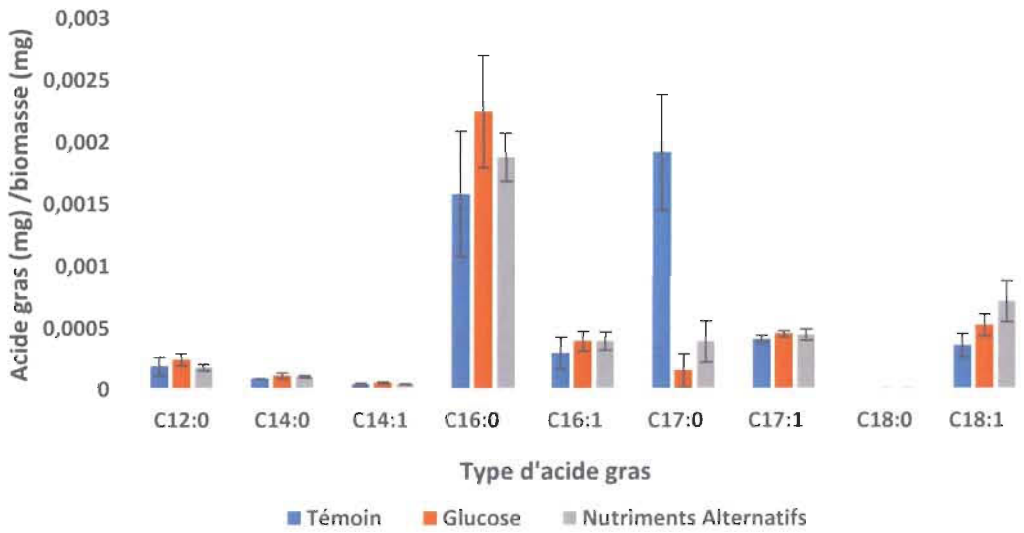

Figure V-27 : Proportions en acide gras en fonction des conditions de culture

D'après ces résultats, l'ajout de carbone organique (glucose ou nutriments alternatifs) affecte peu la quantité des acides gras de la souche VETECH. En effet, aucune différence n'apparait entre les acides gras, appart pour la quantité plus élevé en C17:0 dans le cas sans ajout de substrat carboné (témoin). La quantité plus élevée de C17:0 dans le cadre du témoin pourrait s'expliquer par une contamination bactérienne où alors par un apport externe. En effet, l'acide margarique ou C17:0, est un acide gras que l'on retrouve dans le lait ou la margarine [83]. Les effluents de Parmalat (industrie laitière) qui ont été utilisés pour ces expérimentations comportaient de petites particules de matières grasses. Ces matières grasses contenaient très probablement l'acide margarique. Une mauvaise élimination de ces particules, lors de la phase de récolte, pourrait expliquer la quantité d'acide margarique plus élevée pour la condition témoin

La différence de profil d'acide gras entre les cultures en fioles et en photobioréacteur est présentée dans le tableau V-1 ci-dessous :

Acides Gras	Fioles	Photobioréacteurs
C10:0	-	+
C11:0	-	+
C12:0	+	+
C13:0	-	+
C14:0	+	+
C14:1	+	+
C15:0	-	+
C15:1	-	+
C16:0	+	+
C16:1	+	+
C17:0	+	+
C17:1	+	+
C18:0	+	+
C18:1	+	+

Tableau V-3:Différences de profil d'acide gras entre la culture en fioles et celle en PBR, (+, présent / -, absent)

Cette différence peut s'expliquer, comme mentionné dans la section 5.2.3.1, par la contamination bactérienne. En effet, lors des expérimentations en photobioréacteur (objectif 5) la contamination bactérienne était importante, alors qu'elle était faible pour

les expériences en fioles (objectif 6). D'où l'absence des 5 acides gras atypique (C10:0, C11:0, C13:0, C15:0, C15:1) sur la figure V-27.

Comme il l'a été abordé dans la section 5.2.2.3 il serait nécessaire de réaliser d'autres expérimentations, en augmentant le nombre de réplicas afin de s'assurer de la reproductibilité de ces résultats et de diminuer l'incertitude.

Ces résultats vont dans le sens de la conclusion de l'objectif 6, c'est-à-dire qu'une utilisation des résidus carbonés est envisageable pour la culture VERTECH du fait de la faible variation de la productivité en biomasse et en lipides ainsi que de la quantité des acides gras. Cela permettrait de valoriser les déchets des industries du projet VERTECH I en traitant leurs effluents via la production de microalgues.

Chapitre VI - Conclusion

Le but de ce travail était d'évaluer l'influence de la culture en deux étapes sur la productivité en biomasse et en lipides chez les souches de microalgues RTA et VERTECH. La première étape consistait à favoriser une productivité maximale de biomasse via une culture en mixotrophie. La seconde à permettre une accumulation maximale en lipide via un passage en phototrophie.

La première partie de ce travail consistait à déterminer la concentration optimale en CO_2 pour favoriser la productivité en biomasse d'une culture mixotrophique de la souche RTA. Ensuite, la culture en deux étapes a été testée en faisant varier les conditions de la seconde phase de culture. La concentration en CO_2 à 1% a été retenue pour stimuler la productivité lipidique de la souche, et la seconde étape retenue est celle qui se produit dans le même milieu de culture. Nos travaux sur la culture en deux étapes en fioles n'ont pas permis d'augmenter significativement la productivité en lipides de la souche RTA.

En regard de ces résultats, une prolongation de chaque étape de la culture en deux étapes a été effectuée en photobioréacteur afin de stimuler la productivité en lipides. Dans ce cas, la teneur en lipides a doublé mais la productivité en lipides de la souche RTA n'a pas augmenté. Aucun effet sur le profil des acides gras de la souche n'a été remarqué. La culture en deux étapes n'a pas eu l'effet escompté sur la souche RTA.

Par la suite, la culture en deux étapes a été réalisée sur la souche VERTECH afin de voir si la méthode peut être adaptée à une souche différente. Or, nous avons constaté que cette technique ne donnait pas de résultats satisfaisants avec la souche VERTECH en termes de teneur et de productivité en lipides. Ce qui s'applique pour une souche d'algue ne fonctionne donc pas de la même manière avec une autre souche. Il faut donc faire du cas par cas et développer une méthode en deux étapes différentes pour chaque souche.

En parallèle, nous avons étudié la production de lipides et de biomasse de la souche VERTECH avec l'utilisation de résidus carbonés afin de substituer le glucose. Il s'est avéré que cela n'avait quasiment pas d'effet sur la productivité en biomasse en lipides de la souche comparativement à l'utilisation de glucose. Un passage dans un aquarium de 100 L pourrait être envisageable afin de tester l'utilisation de ces sources alternatives avec un volume de culture plus important. L'utilisation de nutriments alternatifs serait très

intéressante pour les industriels du parc de Victoriaville car elle permettrait le traitement d'effluents industriels via la culture des microalgues.

De nombreux aspects restent à clarifier afin d'optimiser la culture en deux étapes dans le cadre du projet RTA comme par exemple l'amélioration de la deuxième étape, l'étude des intensités lumineuses différentes ou encore l'utilisation de substrats alternatifs au glucose. Pour le projet VERTECH I, répéter ces expériences avec le même lot d'eaux usées pourrait donner des résultats plus significatifs.

Un problème récurrent est apparu lors de l'analyse des résultats, soit les marges d'erreurs importantes. En effet, nous avons ici travaillé à chaque fois en triplicata sur du matériel biologique. Afin de diminuer ces écart-types, nous pourrions envisager d'utiliser un plan expérimental factoriel pour avoir des résultats plus cohérents.

Il serait intéressant de réaliser des expériences, une fois la culture en deux étapes optimisée pour la souche RTA, dans de plus grands volumes de culture comme par exemple dans des bassins de 400 L et même envisager les deux étapes dans le bassin pilot Algafuel™ de 10 000 L.

Enfin, dans la littérature, une culture en trois étapes a récemment été testée sur une souche de chlorelle se développant dans les eaux usée d'une industrie laitière via l'utilisation de trois modes trophiques, soit la phototrophie, la mixotrophie et l'hétérotrophie. Un système de culture en trois étapes pourrait être une piste à essayer puisque ces auteurs ont obtenus une teneur en lipides de plus de 62 % du poids sec de la cellule algale [80].

Références Bibliographique

[1] S. Shafiee and E. Topal, "When will fossil fuel reserves be diminished?," *Energy Policy*, vol. 37, no. 1, pp. 181–189, 2009.

[2] Wardsauto, 15-Sep-2011. [Online]. Available: http://wardsauto.com/ar/world_vehicle_population_110815.

[3] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, Jan. 2010.

[4] A. Demirbas and M. F. Demirbas, *Algae Energy*. London: Springer London, 2010.

[5] A. Demirbas and M. F. Demirbas, "Importance of algae oil as a source of biodiesel," *Energy Convers. Manag.*, vol. 52, no. 1, pp. 163–170, Jan. 2011.

[6] J. K. Pittman, A. P. Dean, and O. Osundeko, "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2011.

[7] H. Xu, X. Miao, and Q. Wu, "High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters," *J. Biotechnol.*, vol. 126, no. 4, pp. 499–507, Dec. 2006.

[8] K. G. Satyanarayana, A. B. Mariano, and J. V. C. Vargas, "A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials," *Int. J. Energy Res.*, vol. 35, no. 4, pp. 291–311, Mar. 2011.

[9] J. C. Quinn and R. Davis, "The potentials and challenges of algae based biofuels: A review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling," *Bioresour. Technol.*, vol. 184, pp. 444–452, May 2015.

[10] Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 3, pp. 294–306, May 2007.

[11] N. Bourdeau, K. Adjalle, M. Lemire, F. Bélanger-Lépinde, N. Dubois-Calero, R. Dosnon-Olette, G. Samson, and S. Barnabé, "Mixotrophic cultivation of an algae-bacteria consortium in aluminium smelter wastewaters : a high concentration in nitrogen increases the lipid production. In submission," 2015.

[12] M. Lemire, "Étude de la concentration en glucose à ajouter au milieu de culture d'un consortium de Chlorella sp.," Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 2012.

[13] M. Gélinas, M. Lemire, K. Adjallé, and S. Barnabé, "Effects of different cultivation conditions on algal density, lipids production, metabolic activity and antioxidant defense in a bacteria- Chlorella spp consortium," 2013.

[14] M. Gélinas, M. Lemire, N. Bourdeau, K. D. Adjalle, and S. Barnabé, "Interactions between glucose, light and CO2 in a native consortium of Chlorella," 2013.

[15] "Résultats Google Recherche d'images correspondant à http://cerig.pagora.grenoble-inp.fr/memoire/2013/images/microalgues.jpg." [Online]. Available: http://images.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fcerig.pagora.grenoble-inp.fr%2Fmemoire%2F2013%2Fimages%2Fmicroalgues.jpg&imgrefurl=http%3A

Rapport-Gratuit.com

%2F%2Fcerig.pagora.grenoble-inp.fr%2Fmemoire%2F2013%2Fbiocarburant-microalgue.htm&h=288&w=410&tbnid=YtagTnOfPNOM1M%3A&docid=ZDGBd-Tl5O_kTM&ei=dNLmVvDaBsuzabjav_AC&tbm=isch&iact=rc&uact=3&dur=480&page=3&start=40&ndsp=25&ved=0ahUKEwjw5JCGucDLAhXLWRoKHTjtDy4QrQMIxAEwNg. [Accessed: 14-Mar-2016].

[16] M.-R. F.-J. Chojnacka Katarzyna, "Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae," *Biotechnology*, vol. 3, 2004.

[17] O. Perez-Garcia, F. M. E. Escalante, L. E. de-Bashan, and Y. Bashan, "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products," *Water Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 11–36, Jan. 2011.

[18] A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons, 2008.

[19] J. Yang, M. Xu, X. Zhang, Q. Hu, M. Sommerfeld, and Y. Chen, "Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 159–165, Jan. 2011.

[20] Y. Chisti, "Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 351–352, Jul. 2008.

[21] J. Pruvost, G. Van Vooren, G. Cogne, and J. Legrand, "Investigation of biomass and lipids production with Neochloris oleoabundans in photobioreactor," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 23, pp. 5988–5995, Dec. 2009.

[22] C. da, I. Vieitez, I. Jachmanin, F. de, L. Cardozo, and J. V. de Oliveir, "Non-Catalytic Production of Ethyl Esters Using Supercritical Ethanol in Continuous Mode," in *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, Z. Fang, Ed. InTech, 2012.

[23] X. Li, H. Xu, and Q. Wu, "Large-scale biodiesel production from microalga Chlorella protothecoides through heterotrophic cultivation in bioreactors," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 4, pp. 764–771, Nov. 2007.

[24] B. R. Moser and S. F. Vaughn, "Efficacy of fatty acid profile as a tool for screening feedstocks for biodiesel production," *Biomass Bioenergy*, vol. 37, pp. 31–41, Feb. 2012.

[25] H.-W. Yen, I.-C. Hu, C.-Y. Chen, S.-H. Ho, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, "Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products," *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 166–174, May 2013.

[26] J. Liu, J. Huang, Z. Sun, Y. Zhong, Y. Jiang, and F. Chen, "Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic Chlorella zofingiensis: Assessment of algal oils for biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 106–110, Jan. 2011.

[27] L. Brennan and P. Owende, "Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 557–577, février 2010.

[28] "Cultiver des microalgues en photobioréacteurs sur des façades de bâtiments," *Teramer® Blog.* .

[29] E. Sierra, F. G. Acién, J. M. Fernández, J. L. García, C. González, and E. Molina, "Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae," *Chem. Eng. J.*, vol. 138, no. 1–3, pp. 136–147, May 2008.

[30] M. A. Borowitzka, "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters," *J. Biotechnol.*, vol. 70, no. 1–3, pp. 313–321, Apr. 1999.
[31] I. Cantin, *La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe*. usherbrooke. Essai de maîtrise en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, 2010.
[32] O. Jorquera, A. Kiperstok, E. A. Sales, M. Embiruçu, and M. L. Ghirardi, "Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 4, pp. 1406–1413, Feb. 2010.
[33] Y.-Q. Li, Z.-Q. Yuan, Y. Feng, P. Li, M. Zhou, W. Yao, and J. Zhang, "Effect of carbon and nitrogen sources on lipid accumulation of heterotrophic microalgae Chlorella protothecoides," *Chin. J. Biol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1009–1013, 2010.
[34] S. A. Scott, M. P. Davey, J. S. Dennis, I. Horst, C. J. Howe, D. J. Lea-Smith, and A. G. Smith, "Biodiesel from algae: challenges and prospects," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 21, no. 3, pp. 277–286, Jun. 2010.
[35] R. Burrell, W. Inniss, and C. Mayfield, "Development of an Optimal Heterotrophic Growth-Medium for Chlorella-Vulgaris," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, no. 4, pp. 281–283, 1984.
[36] J. Lalucat, J. Imperial, and R. Pares, "Utilization of Light for the Assimilation of Organic-Matter in Chlorella," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 26, no. 7, pp. 677–681, 1984.
[37] A. Bhatnagar, M. Bhatnagar, S. Chinnasamy, and K. C. Das, "Chlorella minutissima-A Promising Fuel Alga for Cultivation in Municipal Wastewaters," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 161, no. 1–8, pp. 523–536, May 2010.
[38] Z. Li, H. Yuan, J. Yang, and B. Li, "Optimization of the biomass production of oil algae Chlorella minutissima UTEX2341," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 19, pp. 9128–9134, Oct. 2011.
[39] C. Yang, Q. Hua, and K. Shimizu, "Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions," *Biochem. Eng. J.*, vol. 6, no. 2, pp. 87–102, Oct. 2000.
[40] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, and B. Hu, "Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic Chlorella protothecoides," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 162, no. 7, pp. 1978–1995, Nov. 2010.
[41] Y. Zheng, Z. Chi, B. Lucker, and S. Chen, "Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production," *Bioresour. Technol.*, vol. 103, no. 1, pp. 484–488, Jan. 2012.
[42] H. M. Amaro, A. C. Guedes, and F. X. Malcata, "Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3402–3410, Oct. 2011.
[43] H.-W. Yen and J.-T. Chang, "A two-stage cultivation process for the growth enhancement of Chlorella vulgaris," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 36, no. 11, pp. 1797–1801, Nov. 2013.
[44] T. Li, Y. Zheng, L. Yu, and S. Chen, "Mixotrophic cultivation of a Chlorella sorokiniana strain for enhanced biomass and lipid production," *Biomass Bioenergy*, vol. 66, pp. 204–213, Jul. 2014.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

[45] A. Vonshak, S. M. Cheung, and F. Chen, "Mixotrophic Growth Modifies the Response of Spirulina (arthrospira) Platensis (cyanobacteria) Cells to Light," *J. Phycol.*, vol. 36, no. 4, pp. 675–679, Aug. 2000.
[46] B. F. Ana P Abreu, "Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source.," *Bioresour. Technol.*, vol. 118, pp. 61–6, 2012.
[47] Y. Zhang, H. Su, Y. Zhong, C. Zhang, Z. Shen, W. Sang, G. Yan, and X. Zhou, "The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of Chlorella pyrenoidosa in wastewater from the production of soybean products," *Water Res.*, vol. 46, no. 17, pp. 5509–5516, Nov. 2012.
[48] R. Gardner, P. Peters, B. Peyton, and K. E. Cooksey, "Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta," *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, no. 6, pp. 1005–1016, Dec. 2011.
[49] R. Chandra, S. Arora, M. V. Rohit, and S. V. Mohan, "Lipid metabolism in response to individual short chain fatty acids during mixotrophic mode of microalgal cultivation: Influence on biodiesel saturation and protein profile," *Bioresour. Technol.*, vol. 188, pp. 169–176, Jul. 2015.
[50] R. Praveenkumar, K. Shameera, G. Mahalakshmi, M. A. Akbarsha, and N. Thajuddin, "Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga Chlorella sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production," *Biomass Bioenergy*, vol. 37, pp. 60–66, Feb. 2012.
[51] K. K. Sharma, H. Schuhmann, and P. M. Schenk, "High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production," *Energies*, vol. 5, no. 5, pp. 1532–1553, May 2012.
[52] K.-C. Cheng, M. Ren, and K. L. Ogden, "Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of Chlorella protothecoides UTEX 250," *Bioresour. Technol.*, vol. 128, pp. 44–48, Jan. 2013.
[53] M. E. Martínez, F. Camacho, J. M. Jiménez, and J. B. Espínola, "Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of Chlorella pyrenoidosa mixotrophic growth," *Process Biochemistry*, Feb-1997. [Online]. Available: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959296000453. [Accessed: 17-Jun-2014].
[54] B. Cheirsilp and S. Torpee, "Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation," *Bioresour. Technol.*, vol. 110, pp. 510–516, Apr. 2012.
[55] J. Kim, J.-Y. Lee, and T. Lu, "A model for autotrophic growth of Chlorella vulgaris under photolimitation and photoinhibition in cylindrical photobioreactor," *Biochem. Eng. J.*, vol. 99, pp. 55–60, Jul. 2015.
[56] E. M. Grima, J. M. F. Sevilla, J. A. S. Pérez, and F. G. Camacho, "A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances," *J. Biotechnol.*, vol. 45, no. 1, pp. 59–69, Feb. 1996.
[57] J. Fan, Y. Cui, Y. Zhou, M. Wan, W. Wang, J. Xie, and Y. Li, "The Effect of Nutrition Pattern Alteration on Chlorella pyrenoidosa Growth, Lipid Biosynthesis-Related Gene Transcription," *Bioresour. Technol.*

[58] C. Gao, Y. Zhai, Y. Ding, and Q. Wu, "Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga Chlorella protothecoides," *Appl. Energy*, vol. 87, no. 3, pp. 756–761, Mar. 2010.
[59] D. Mitra, J. (Hans) van Leeuwen, and B. Lamsal, "Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous Chlorella vulgaris on industrial co-products," *Algal Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–48, May 2012.
[60] M. T. Ale, M. Pinelo, and A. S. Meyer, "ASSESSING EFFECTS AND INTERACTIONS AMONG KEY VARIABLES AFFECTING THE GROWTH OF MIXOTROPHIC MICROALGAE: pH, INOCULUM VOLUME, AND GROWTH MEDIUM COMPOSITION," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 242–256, 2014.
[61] N. Bourdeau, "Élaboration du milieu de culture pour la production d'un consortium d'algues Chlorella sp. dans des eaux usées industrielles à des fins énergétiques," Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 2012.
[62] C. J. Zhu and Y. K. Lee, "Determination of biomass dry weight of marine microalgae," *J. Appl. Phycol.*, vol. 9, no. 2, pp. 189–194, 1997.
[63] H. De la Hoz Siegler, A. Ben-Zvi, R. E. Burrell, and W. C. McCaffrey, "The dynamics of heterotrophic algal cultures," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 5764–5774, May 2011.
[64] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, and F. Bux, "Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3411–3424, Oct. 2011.
[65] S.-Y. Chiu, C.-Y. Kao, T.-T. Huang, C.-J. Lin, S.-C. Ong, C.-D. Chen, J.-S. Chang, and C.-S. Lin, "Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using Chlorella sp cultures," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 19, pp. 9135–9142, Oct. 2011.
[66] R. A. Andersen, *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, 2005.
[67] Z. P. Ying Shen, "Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. Int J Agric Biol Eng," *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, vol. 2, no. 1, 2009.
[68] M. Zhu, P. P. Zhou, and L. J. Yu, "Extraction of lipids from Mortierella alpina and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids," *Bioresour. Technol.*, vol. 84, no. 1, pp. 93–95, Aug. 2002.
[69] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, Aug. 1959.
[70] Z. Li, F. Jiang, Y. Li, X. Zhang, and T. Tan, "Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae Chlorella spp. by three-phase partitioning," *Bioresour. Technol.*, vol. 149, pp. 286–291, Dec. 2013.
[71] M. S. Abd Rahaman, L.-H. Cheng, X.-H. Xu, L. Zhang, and H.-L. Chen, "A review of carbon dioxide capture and utilization by membrane integrated microalgal cultivation processes," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 15, no. 8, pp. 4002–4012, Oct. 2011.
[72] X. Miao and Q. Wu, "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil," *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 6, pp. 841–846, Apr. 2006.
[73] H.-W. Yen, I.-C. Hu, C.-Y. Chen, S.-H. Ho, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, "Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products," *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 166–174, May 2013.

[74] Z.-Y. Wen and F. Chen, "Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae," *Biotechnol. Adv.*, vol. 21, no. 4, pp. 273–294, Jul. 2003.
[75] S.-C. Fang, "Chapter 3 - Metabolic Engineering and Molecular Biotechnology of Microalgae for Fuel Production," in *Biofuels from Algae*, A. P.-J. L. C. R. Soccol, Ed. Amsterdam: Elsevier, 2014, pp. 47–65.
[76] J. Liu, Z. Sun, and F. Chen, "Chapter 6 - Heterotrophic Production of Algal Oils," in *Biofuels from Algae*, A. P.-J. L. C. R. Soccol, Ed. Amsterdam: Elsevier, 2014, pp. 111–142.
[77] R. Kothari, V. V. Pathak, V. Kumar, and D. P. Singh, "Experimental study for growth potential of unicellular alga Chlorella pyrenoidosa on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 116, pp. 466–470, 2012.
[78] R. Blier, G. Laliberté, and J. de la Noüe, "Production of the cyanobacterium Phormidium bohneri in parallel with epuration of a dairy anaerobic effluent," *Process Biochem.*, vol. 31, no. 6, pp. 587–593, Aug. 1996.
[79] A. Bhatnagar, S. Chinnasamy, M. Singh, and K. C. Das, "Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3425–3431, 2011.
[80] S. Hena, N. Fatihah, S. Tabassum, and N. Ismail, "Three stage cultivation process of facultative strain of Chlorella sorokiniana for treating dairy farm effluent and lipid enhancement," *Water Res.*, vol. 80, pp. 346–356, Sep. 2015.
[81] L. Claude, *Les lipides dans le monde vivant*. Lavoisier, 2010.
[82] M. Clement, J. Tremblay, M. Lange, J. Thibodeau, and P. Belhumeur, "Purification and identification of bovine cheese whey fatty acids exhibiting in vitro antifungal activity," *J. Dairy Sci.*, vol. 91, no. 7, pp. 2535–2544, Jul. 2008.
[83] R. P. Hansen, F. B. Shorland, and N. J. Cooke, "Occurrence in Butterfat of n-Heptadecanoic Acid (Margaric Acid)," *Nature*, vol. 179, no. 4550, pp. 98–98, Jan. 1957.

Annexe 1 : Milieu de culture RTA

Eléments	Concentration ($g.L^{-1}$)
Eau RTA	25 (SCP)
Azote KNO_3	0,750
Phosphore (KH_2PO_4)	0,700
$MgSO_4.7H_2O$	0,300
EDTA	0,028
Inoculum	nd

Tableau Annexe 1-1: Milieu de culture RTA

Annexe 2 : Milieu de culture VERTECH

Eléments		Concentration ($g.L^{-1}$)
Major Stock Solution	$NaNO_3$	0,025
	$CaCl_2.2H_2O$	0,025
	NaCl	0,025
Phosphore (K_2HPO_4)		0,0075
Phosphore (KH_2PO_4)		0,00175
$MgSO_4.7H_2O$		0,0075
Boron Stock Solution (H_3BO_3)		0,0011
Métaux en trace	$ZnSO_4.7H_2O$	0,00088
	$MnCl_2.4H_2O$	0,00014
	MoO_3	0,00007
	$CuSO_4.5H_2O$	0,00016
	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,00005
Solution de fer acidifié	$FeSO_4.7H2O$	0,0005
	H_2SO_4	1 ml
Solution d'EDTA Alcaline	EDTA anhydre	0,005
	KOH	0,003
Inoculum		Nd

Tableau Annexe 2-1: Milieu de culture objectif 5

Effluents	Proportion (%)
Eau Parmalat	41
Eau Canlac	45
Eau Sani Marc	10
Lixiviat Gestera	4

Tableau Annexe 2-2: Proportion des effluents industriels

Annexe 3 : Liste des acides gras

C10:0_Decanoic acid

C11:0_Undecanoic acid

C12:0_Dodecanoic acid

C13:0_Tridecanoic acid

C14:0_ tetradecanoate

C14:1_ myristoleate

C15:0_Pentadecanoic acid

C15:1_cis-10 Pentadecenoic acid

C16:0_Hexadecanoic acid

C16:1_9-Hexadecenoic acid

C17:0_Heptadecanoic acid

C17:1_Cis-10 Heptadecenoic acid methil

C18:0_Mehtyl stearate

C18:1(n-9)_9-Octadecenoic acid

C18:2_9,12-Octadecadienoic acid (6T)

C18:2(n-6)_9,12 -Octadecadienoic acid (6C)

C18:3(n-6)_Gamma-Linolenic acid

C18:3(n-3)_9,12,15- Octadecatrienoic acid

C20:0_Eicosanoic acid

C20:1(n-9)_cis-11-eicosenoic acid

C20:2_cis-11,14- eicosadienoic acid

C20:3_8,11,14-eicosatrienoic acid

C21:0_Heneicosanoic acid

C20:4(n-6)_5,8,11,14- Eicosatetraenoic acid

C20:3(n-3)_11,14,17- Eicosatrienoic acid

C20:5(n-3)_5,8,11,14,17- Eicosapentaenoic acid

C22:0_Docosanoic acid

C22:1_13- Docosenoic acid

C22:2_cis13,16- Docosadienoic acid

C23:0_Tricosanoic acid

C24:0_Tetracosanoic acid

C22:6_4,7,10,13,16,19- Docosahexaenoic acid