

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS.....	iv
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Microalgues : source d'énergie.....	1
1.2 Culture algale.....	2
1.3 Mise en contexte industrielle	3
1.4 Problématique	6
1.5 Mode trophique.....	7
1.6 La photosynthèse	10
1.6.1 L'intensité lumineuse.....	12
1.6.2 L'assimilation du CO ₂	18
1.6.3 Utilisation du carbone organique	20
1.7 Problématique spécifique.....	21
1.8 Objectifs et approche expérimentale	21
1.8.1 Déterminer le mode trophique	22
1.8.2 Déterminer la concentration en CO ₂	22
1.8.3 Déterminer l'intensité lumineuse.....	23
1.9 Originalité de la recherche.....	23
CHAPITRE II	
<i>CHLORELLA SPP.</i> CONSORTIUM UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS IN ALUMINIUM SMELTER WASTEWATER: EFFECTS ON GROWTH AND LIPIDS ACCUMULATION.....	24
Abstract	25
Introduction.....	26

Material and methods.....	27
Microalgae-bacteria consortium and cultured medium	27
Culture conditions.....	27
Determination of microalgae photosynthetic efficiency.....	28
Determination of microalgae biomass concentration and specific growth rate..	28
Determination of microalgae lipid production	29
Statistical analysis	29
Results.....	29
Maximum photochemical efficiency of Photosystem II.....	29
Growth rate and lipid accumulation	30
Discussion.....	31
Conclusion	36
Acknowledgments.....	36
References	37
Tables	40
Figure legends	42
Figures.....	43
CHAPITRE III	
EFFECTS OF LIGHT INTENSITY AND USE OF CO₂ AS CARBON SOURCE FOR <i>CHLORELLA SPP.</i> GROWTH IN INDUSTRIAL WASTEWATER.....	45
Abstract	46
Introduction.....	47
Material and methods.....	48
Microalgal strain and culture medium.....	48
Culture conditions.....	49
Microalgae photosynthetic efficiency.....	49
Microalgae cell density and productivity	50
Microalgae lipids accumulation.....	50
Statistical analysis	51
Results and discussion	51
Conclusion	55

Acknowledgments.....	55
References.....	56
Tables.....	58
Figure legends.....	59
CHAPITRE IV	
CONCLUSION.....	62
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Voies de valorisation de la biomasse algale en vue d'une production énergétique (Tirée de Pires <i>et al.</i> , 2012).....	2
1.2	Schéma du concept intégré d'une culture d'algues à haute valeur calorifique à une usine de Rio-Tinto Alcan du Québec.....	4
1.3	Souche d'algues CHRT-B à 1000X (<i>Chlorella sp.</i>).....	5
1.4	Comparaison du profil lipidique de <i>C. vulgaris</i> à 72 heures de culture sous un mode trophique autotrophe, hétérotrophe et mixotrophe (Tirée de Heradia-Arroyo <i>et al.</i> , 2011).....	9
1.5	Schéma de l'appareil photosynthétique adapté de Raven <i>et al.</i> (2007) et de Zhab <i>et al.</i> (2012).....	11
1.6	Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance autotrophique d'une cellule photosynthétique (Tirée d'Ogbonna et Tanaka, 2000).....	13
1.7	Fixation du CO ₂ , utilisant deux molécules de NADPH ₂ et trois d'ATP produite pendant la réaction de photosynthèse, ce qui représente un gain de $5,2 \times 10^{-4}$ J ou 13 kcal (Tirée de Richmond, 2004).....	18

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Résumé de la source d'énergie et de carbone utilisé dans les différents métabolismes microalgales (Tiré de Chojnacka et Marquez-Rocah, 2004) ..	7
1.2	Différentes intensités lumineuses et souche algales associées	15
1.3	Taux de consommation et efficacité d'élimination, productivité en biomasse, taux de croissance et production lipidique relative à différentes concentrations en CO ₂ d'un gaz d'aération injecté dans une culture de <i>Chlorella vulgaris</i> (Tiré de Lam et Lee, 2013).....	19

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP	Adénosine triphosphate
Chl	Chlorophylle
CHRT-B	Souche microalgale (<i>Chlorella spp.</i>) utilisée dans cette étude
CO	Carbone organique
CO ₂	Dioxyde de carbone
CO ₃ ²⁻	Carbonate
CRIEB	Chaire de recherche en environnement et biotechnologie de l'UQTR
DCMU	3-(3:4-dichlorophenyl)-1: 1-diméthyl urée
H ⁺	Proton
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
H ₂ CO ₃	Acide carbonique
F _v /F _m	Rendement quantique maximum du PSII
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O ₂	Dioxygène
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
RTA	RioTinto Alcan

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Microalgues : source d'énergie

Les algocarburants sont mondialement considérés comme une filière d'avenir. Ils suscitent à la fois l'intérêt du monde de la recherche et celui des industries, puisqu'ils possèdent les caractéristiques adéquates pour la production d'un biodiesel de qualité comparable au diesel conventionnel (Xu *et al.*, 2006; Li et Xu, 2007; Liu *et al.*, 2011). La conversion des microalgues en énergie inclut la conversion thermochimique comme la conversion des lipides en biodiesel. Des procédés thermiques, tels que la gazéification (Figure 1.1) pour la production d'hydrogène, la carbonisation résultant en un charbon activé et la liquéfaction pour l'obtention d'une huile biologique ont été développés dans le but d'obtenir du biodiesel, des huiles de lubrification ou des carburants. Ils offrent une base durable pour l'utilisation intégrée et la culture d'algues à des fins énergétiques. Pour les microalgues, l'accent en recherche a surtout été déployé au niveau de la conversion biologique, telle que la digestion anaérobique et la fermentation (Figure 1.1), dû à leur contenu en hydrates de carbone (Onwudili *et al.*, 2013). La production de méthane est un exemple résultant d'une digestion anaérobique de la biomasse algale résiduelle suite à l'extraction lipidique (Chisti, 2007; Pittman *et al.*, 2011; Onwudili *et al.*, 2013).

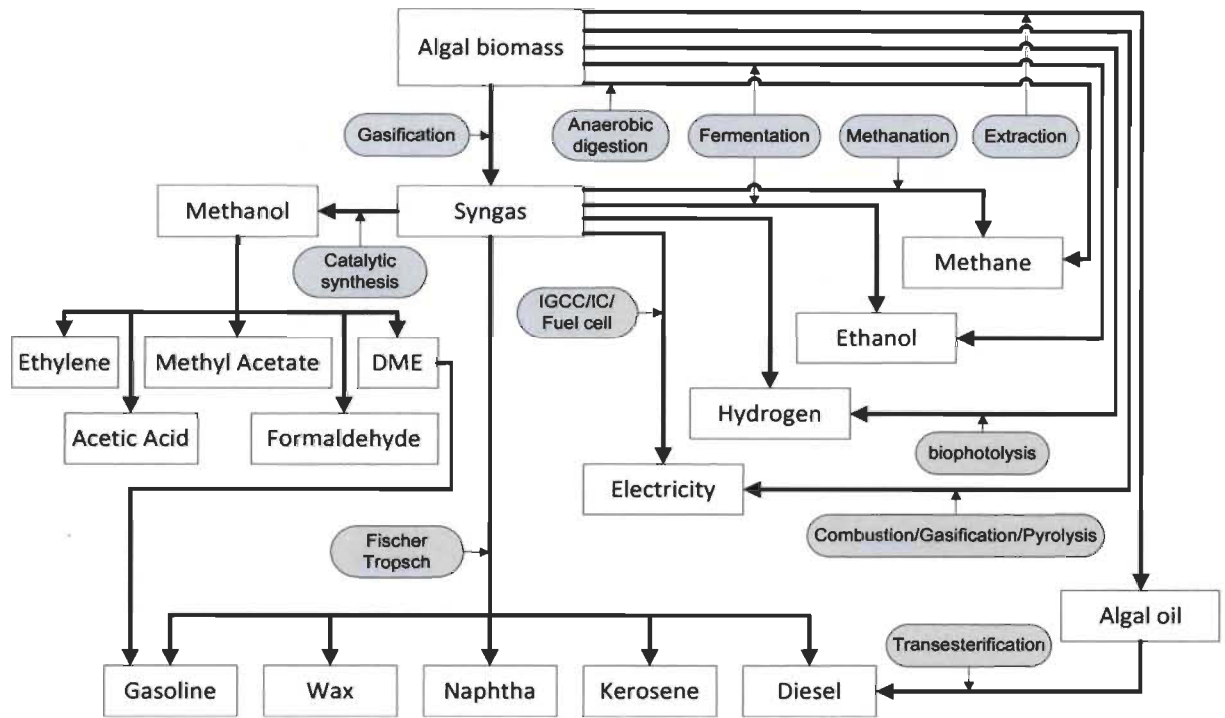


Figure 1.1 Voies de valorisation de la biomasse algale en vue d'une production énergétique (Tirée de Pires *et al.*, 2012).

Plusieurs voies de valorisation de la biomasse algale sont disponibles et à considérer puisque plusieurs combustibles et co-produits peuvent être utilisés au sein même de l'entreprise. En plus de diminuer l'impact environnemental de l'industrie par la valorisation de ses rejets, une diminution des coûts reliés à l'utilisation de carburant fossile sera réalisée par un remplacement du diesel conventionnel.

1.2 Culture algale

La culture algale à des fins énergétiques est une avenue prometteuse afin de répondre aux besoins énergétiques industriels, surtout lorsque l'on considère la forte productivité en termes de biomasse, ainsi que la teneur lipidique des microalgues. Plusieurs genres d'algues ont, à ce jour, été convoités pour la production de biocarburant. De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser les différents organismes, tels que les cyanobactéries, les rhodophytes, les dynophytes et plusieurs

autres groupes algaux, incluant les chlorophytes (Andersen, 2005; Hu *et al.*, 2008). Cette dernière division, celle des algues vertes, inclut plusieurs genres algaux ayant les caractéristiques recherchées pour la production de bioénergie, dont le genre *Chlorella* (Mata *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2010).

Les origines de la phycologie appliquée datent probablement de la mise en place d'une culture de *Chlorella sp.* par Beijerinck en 1890 (Richmond, 2004). À ce jour, une dizaine d'espèces de microalgues sont cultivées à l'échelle industrielle et parmi elles, trois espèces sont prédominantes : *Arthrospira*, *Chlorella* et *Dunaliella*. Aujourd'hui, les différentes espèces de *Chlorella* occupent le premier rang pour des fins de cultures autant commerciales qu'industrielles (Richmond, 2004; Andersen, 2005). La structure cellulaire simple des microalgues permet une croissance rapide (Bélair *et al.*, 2012; Lam et Lee, 2013). Sur une base de biomasse sèche, les chlorelles peuvent accumuler plus de 80 % d'acide gras, 80 % d'hydrocarbures ou 40 % de glycérol, en plus des autres composés tels que les pigments, dans des conditions de culture favorisant leur croissance (Richmond, 2004; Anderson, 2005). Afin d'obtenir un rendement maximal de la culture de microalgues, plusieurs paramètres de culture doivent être pris en considération.

1.3 Mise en contexte industrielle

La conjoncture économique, énergétique et environnementale actuelle encourage les industries à réduire leur utilisation de carburants fossiles et à trouver une voie de valorisation de leurs rejets. Rio Tinto Alcan (RTA) s'est joint à l'entreprise Alga Labs et à la Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie de la Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières (CRIEB) en 2011 afin de réduire l'empreinte environnementale et les coûts liés à la dépendance fossile de l'usine. Le groupe de recherche a été mis sur pied afin de développer un procédé de culture intensive de microalgues.

En effet, des microalgues seront éventuellement cultivées directement sur le site de l'usine dans des bassins extérieurs et ouverts (Figure 1.2). La chaleur résiduelle du

procédé de transformation de l'aluminium sera dirigée vers les bassins afin de maintenir la température optimale pour la souche algale. De plus, les eaux usées seront utilisées comme principale composante du milieu de culture et les gaz de cheminées comme source de carbone pour la réalisation de la photosynthèse par les microalgues. En combinant un maximum de rejets de l'industrie et l'utilisation des algues, des économies supplémentaires et des bénéfices environnementaux seront les résultats de la culture intensive de la souche algale au sein de l'industrie.

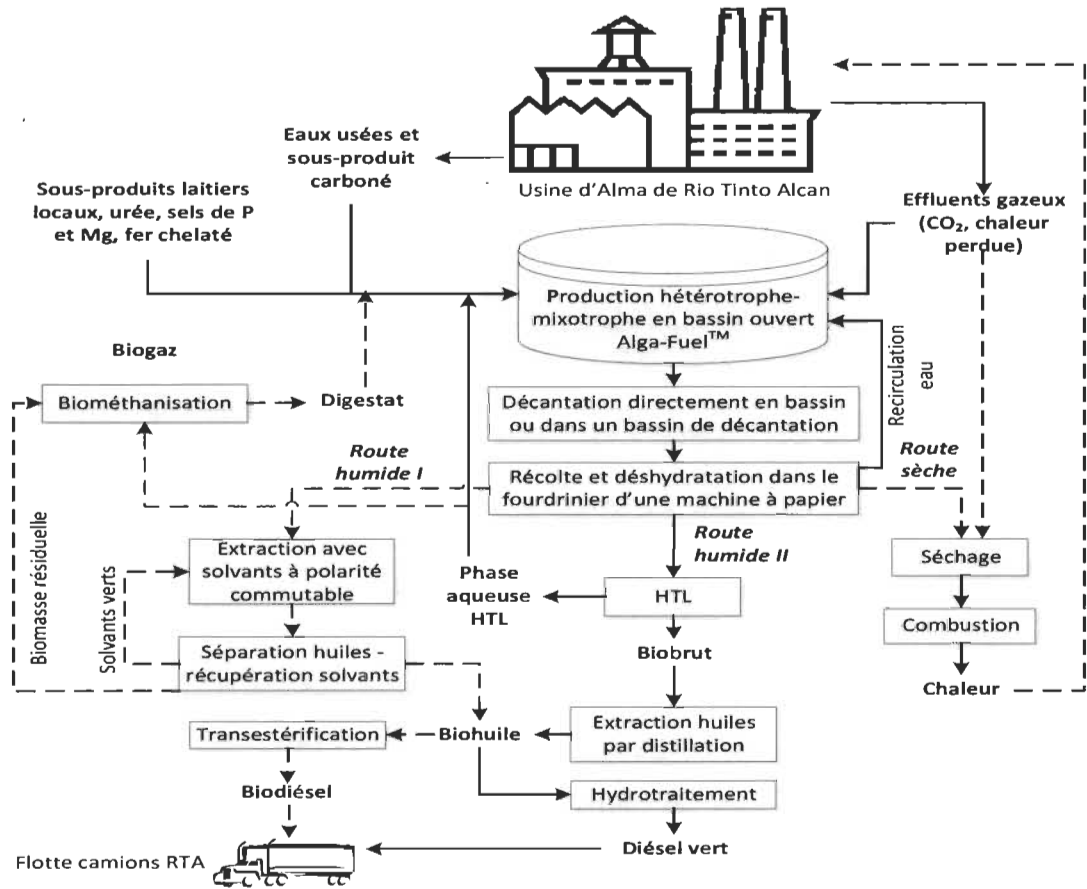


Figure 1.2 Schéma du concept intégré d'une culture d'algues à haute valeur calorifique à une usine de Rio-Tinto Alcan du Québec.

Afin d'obtenir le remplacement des combustibles fossiles et des carburants de l'usine, plusieurs facteurs doivent être pris en considération. La productivité en biomasse et la teneur en lipide des microalgues font partie des facteurs déterminants pour atteindre une rentabilité dans la production de bioénergie à partir de cette biomasse.

Cette rentabilité repose directement sur la méthode de culture utilisée qui se définit selon plusieurs paramètres, tels que le trophisme, la température, le type de bassin utilisé, l'asepsie et la souche d'algues sélectionnée (Bélaïr *et al.*, 2012). Tous ces facteurs sont déterminés en fonction du produit final recherché, le biodiesel.

La souche CHRT-B (Figure 1.3), utilisée à ces fins industrielles, a été recueillie directement dans les eaux usées de l'aluminerie. Un consortium algues-bactéries a par la suite été développé par les biologistes de la compagnie AlgaLabs. La souche, composée à 90 % de *Chlorella sp.*, a été sélectionnée pour sa forte production lipidique et son haut taux de croissance (Huo *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012), caractéristiques premières recherchées dans ce contexte de production énergétique. L'algue est adaptée à la toxicité résiduelle des eaux usées de l'aluminerie. Ceci favorise directement sa robustesse et sa dominance sur les potentiels contaminants tels que les bactéries, les champignons, les autres algues, etc. Cette robustesse est une autre caractéristique clé dans la sélection de la souche (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Dans ce milieu non aseptique (bassin ouvert), la stabilité de la souche est importante afin que la culture résiste aux différentes fluctuations environnementales, incluant la compétition interspécifique.

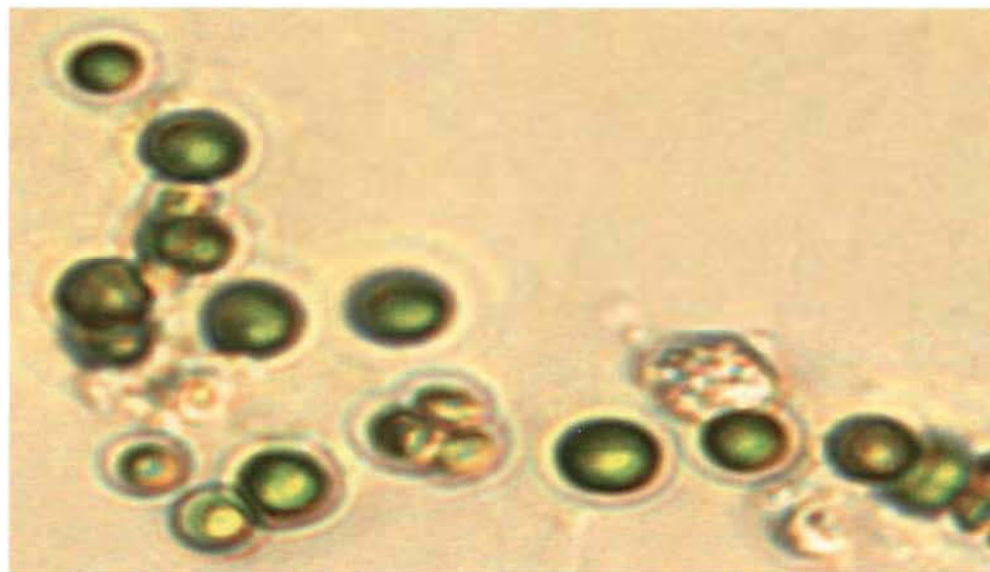


Figure 1.3 Souche d'algues CHRT-B à 1000X (*Chlorella sp.*).

1.4 Problématique

Les eaux usées industrielles, principales composantes du milieu de culture, ne sont pas suffisamment riches en carbone et autres nutriments pour soutenir la croissance de la souche *Chlorella sp.* Le glucose a été sélectionné comme source de carbone organique (CO) en laboratoire, parce qu'il est le plus facilement assimilable (Xiong *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010; Perez-Garcia *et al.*, 2011). Cependant, son utilisation à grande échelle n'est pas industriellement viable dû au coût d'acquisition élevé et aux grandes quantités nécessaires pour soutenir la croissance des microalgues. Il devient donc nécessaire de favoriser une source de carbone bon marché et de préférence locale pour la réussite du projet. Des résidus pertinents sont disponibles à proximité de l'usine (Saguenay, Lac St-Jean) tels que le lactosérum des fromageries et ses dérivés, les résidus brassicoles de levures, les boues d'épuration municipales, les boues papetières, les boues d'abattoirs porcins, etc. Par contre, toutes ces sources de carbones sont assimilables par tous les organismes vivants dans le milieu de culture. De plus, il faut sécuriser ces ressources carbonées afin de s'assurer d'un approvisionnement constant et sans variabilité.

L'option d'enrichir le milieu de culture en carbone inorganique devient donc considérable. Grâce à la photosynthèse, les microalgues fixent le CO₂ et le transforment en lipides, en protéines, en polysaccharides, etc. (Lam et Lee, 2013). Toute chaîne de production industrielle crée inévitablement du dioxyde de carbone qui peut devenir une source carbonée non seulement déjà sécurisée et constante, mais aussi sans frais. De plus, l'utilisation de la photosynthèse donne un avantage non négligeable aux microalgues pour leur croissance.

La croissance des microalgues dépend essentiellement de l'interaction entre certains paramètres, dont la l'intensité lumineuse reçue par cellule et l'échange du dioxyde de carbone. Une meilleure compréhension de la synergie entre ces deux derniers facteurs est déterminante quant aux différents modes trophiques pouvant être utilisés par la souche algale, ainsi que pour obtenir la meilleure productivité possible de la biotechnologie microalgale.

1.5 Mode trophique

Le mode trophique pouvant être utilisé par les espèces de microalgues est diversifié (Tableau 1.1). Il est un des principaux facteurs ayant une influence significative sur la croissance et l'accumulation de lipides (Yeh et Chang, 2012). Les chlorelles sont reconnues pour leur capacité à croître sous un mode autotrophe, hétérotrophe ou mixotrophe (Ling et Chang, 2012). Certaines espèces d'algues ont la capacité d'utiliser différents modes trophiques, passant de l'un à l'autre selon les conditions du milieu (Chojnacka et Marquez-Rocha, 2004; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Tableau 1.1

Résumé de la source d'énergie et de carbone utilisé dans les différents métabolismes microalgales (Tiré de Chojnacka et Marquez-Rocah, 2004)

Métabolisme	Source d'énergie	Source de carbone
Autotrophe	Lumière	Inorganique
Hétérotrophe	Organique	Organique
Photohétérotrophe	Lumière	Organique
Mixotrophe	Lumière et organique	Inorganique et organique

L'autotrophie est le mode trophique le plus répandu. Les organismes utilisant cette voie métabolique sont capables de synthétiser leur matière organique par la photosynthèse à partir de carbone inorganique (CO₂), de la lumière (énergie des photons) et de nutriments (Bélair *et al.*, 2012). L'hétérotrophie peut se faire en absence totale de lumière (hétérotrophie stricte) ou en présence de lumière (Burrell *et al.*, 1984). Selon certains auteurs, l'hétérotrophie en présence de lumière représente la mixotrophie (Lalucat *et al.*, 1984; Ogonna et Tanaka, 2000; Bélair *et al.*, 2012) Selon Yang *et al.* (2011), la mixotrophie utilise la lumière comme source principale d'énergie et requière un apport en CO₂ et en carbone organique. La photohétérotrophie est définie par ces mêmes auteurs comme un métabolisme selon lequel la lumière est requise pour assimiler le carbone organique et non comme source d'énergie. Cette dernière serait chimique et

il n'y aurait pas de fixation de CO₂ puisque la source de carbone utilisée serait uniquement organique. Ces deux derniers modes trophiques exigent un apport en carbone organique comme source d'énergie métabolisable et dans cette optique, la mixotrophie différencierait de la photohétérotrophie par son besoin en CO₂ (Mata *et al.*, 2010). En culture mixotrophe, la relation entre le métabolisme hétérotrophique et autotrophique est complexe. Chez certaines souches algales, mais sous conditions précises, l'activité hétérotrophique et autotrophique peuvent se produire en simultané ou indépendamment, ce qui résulte en un taux de croissance et en une concentration cellulaire qui est la somme des valeurs pouvant être observées pour ces deux métabolismes. Les cultures en mixotrophie sont une option prometteuse dépendamment du produit recherché, puisque les métabolites synthétisés par la cellule en hétérotrophie diffèrent ceux synthétisés suite à la photosynthèse. Par contre, la balance optimale entre le métabolisme autotrophique et hétérotrophique est difficile à atteindre, surtout en conditions non stériles (Ogbonna et Tanaka, 2000).

Dans une étude de Yeh et Chang (2012), les rendements en termes de biomasse (g L⁻¹) diminuent dans l'ordre suivant : la culture autotrophe > culture photohétérotrophe > culture mixotrophe > culture hétérotrophe, pour une souche de *Chlorella vulgaris*. D'autres études préconisent la photohétérotrophie à l'hétérotrophie stricte, sur une base comparative de biomasse sèche (Burrell *et al.*, 1984; Miao et Wu, 2004; Richmond, 2004; Heredia-Arroyo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Amaro *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Perez-Garcia *et al.* (2011) proposent, d'abord pour des raisons économiques liées au coût de l'aménagement des installations et pour la facilité du maintien d'une culture à grande échelle, l'hétérotrophie. La culture hétérotrophe profite de l'avantage d'une distribution homogène de la source de carbone, ce qui rend l'optimisation relativement plus simple (Ogbonna et Tanaka, 2000). Les travaux de Liang *et al.* (2009) démontrent que le taux de croissance de *C. vulgaris* était plus élevé sous croissance hétérotrophe. Cependant, c'est sous condition mixotrophique que la productivité lipidique la plus élevée a été obtenue comparativement aux autres modes trophiques. D'un autre côté, Heredia-Arroyo *et al.* (2011) aucune différence significative n'a été observée concernant la productivité lipidique entre les différents modes trophiques.

C. vulgaris a la capacité de produire différents profils d'acide gras possédant les caractéristiques adéquates pour la production d'un biodiesel de qualité comparable au diésel conventionnel (Liu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2006; Li et Wu, 2007). Moser et Vaughn (2012) mentionnent qu'un fort pourcentage d'acides gras mono-insaturés, de 16 et 18 atomes de carbone, est le profil idéal, puisqu'il procure une balance entre la stabilité oxydative et les propriétés de tension à froid. *C. vulgaris* peut produire des lipides composés de différents acides gras : les acides palmitiques (C16:0), oléiques (C18:1) et linoléiques (C18:2) par exemple. Les C16:0 sont les acides gras les plus abondamment produits sous un mode de culture mixotrophe, tandis que les C18:2 sont significativement plus élevés en hétérotrophie (Figure 1.4). Selon Heradia-Arroyo *et al.* (2011), les cellules cultivées sous hétérotrophie et mixotrophie ont un pourcentage plus élevé d'acides gras insaturés comparativement à la culture autotrophe. Cependant, des études démontrent que la quantité et la qualité des lipides d'une cellule algale peut varier en fonction des conditions de croissance, notamment la température et l'intensité lumineuse (Converti *et al.*, 2009; Takeshita *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015).

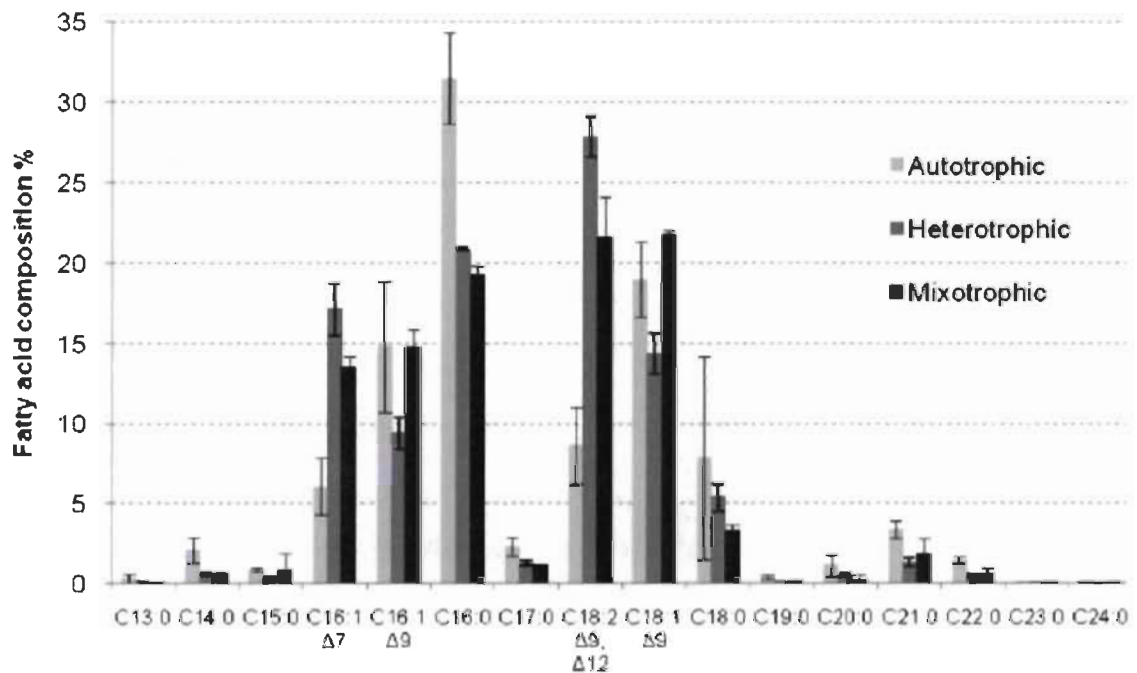


Figure 1.4 Comparaison du profil lipidique de *C. vulgaris* à 72 heures de culture sous un mode trophique autotrophe, hétérotrophe et mixotrophe (Tirée de Heradia-Arroyo *et al.*, 2011).

La température est un facteur important à considérer pour la performance d'une culture algale, notamment dans le contexte industriel dans lequel s'insèrent les présents travaux. En effet, le contenu lipidique d'une souche de *Chlorella vulgaris* a été fortement influencé par un changement de température (Converti *et al.*, 2009). Une diminution dans la température de croissance, de 30 à 25 °C a résulté en une augmentation du contenu lipidique de *C. vulgaris*, passant de 5,9 à 14,7 %. Le taux de croissance étant demeuré inchangé mène à une augmentation de la productivité lipidique de 8 à 20 mg L⁻¹ jour⁻¹ (Converti *et al.*, 2009). Ces mêmes travaux soulignent qu'augmenter la température à 38 °C, ce qui est au-dessus de la valeur optimale pour *C. vulgaris*, a résulté en une augmentation des C18:1. Cependant, au Canada, la température hivernale maximale est régulièrement sous 0 °C, bien inférieur aux températures optimales de croissance, se situant entre 15 et 30 °C, chez la majorité des espèces microalgales (Chisti, 2007).

D'un autre côté, une nouvelle approche émerge de l'avantage d'être localisé à même le site de l'industrie. Les travaux de Shang *et al.* (2010) démontrent la possibilité d'utiliser les effluents gazeux riches en CO₂, mais surtout en chaleur perdue, pour maintenir la température d'une culture algale. Ainsi, l'utilisation des gaz de cheminées pour supporter la croissance algale dans les bassins ouverts extérieurs, comme visés par la présente étude, représente des bénéfices économiques et environnementaux pour l'industrie. Par l'utilisation des rejets gazeux de l'industrie, l'augmentation de la concentration en CO₂ dans le milieu de culture devrait avoir un effet positif sur la croissance de la souche *Chlorella spp.* En effet, le CO₂ est la source de carbone utilisé par les microalgues sous une condition de croissance autotrophe, via le processus biologique de la photosynthèse.

1.6 La photosynthèse

La photosynthèse est le processus biologique permettant aux organismes autotrophes, tels que les algues, les plantes, certaines bactéries et cyanobactéries, de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. *Chlorella vulgaris* appartient à la

famille des Chlorophytes, son unique chloroplaste contient les chlorophylles (Chl) *a* et *b*, ainsi que les caroténoïdes comme pigments accessoires. C'est au sein du chloroplaste que l'appareil photosynthétique, comprenant le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII), est sollicité (Figure 1.5). Le PSII absorbe les photons dans une longueur d'onde maximale de 680 nm, générant un oxydant capable de séparer l'eau en proton (H^+), en électrons et en oxygène (O_2) (Figure 1.5). Les électrons sont par la suite transférés par une série de transporteurs d'électrons vers le PSI, où des photons ont été absorbés sous une longueur d'onde maximale de 700 nm, afin de réduire la ferrédoxine et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Le NADPH, le CO_2 , ainsi que l'adénosine triphosphate (ATP) sont ensuite utilisés dans le cycle de Calvin pour la réduction du carbone nécessaire à la croissance cellulaire. L'excès de carbone produit par la photosynthèse est conservé dans la cellule sous forme de glucides ou de lipide, selon la souche algale (Znab *et al.*, 2012).

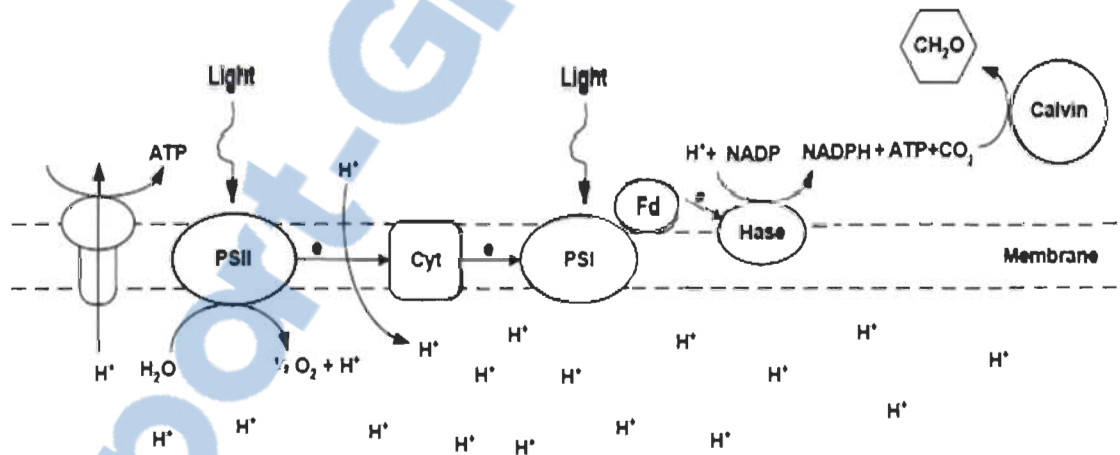


Figure 1.5 Schéma de l'appareil photosynthétique adapté de Raven *et al.* (2007) et de Znab *et al.* (2012).

Les organismes autotrophes dépendent directement de la performance de l'appareil photosynthétique pour la production de leur carbone organique. Certains herbicides sélectifs sont utilisés pour contrôler la végétation. Le 3-(3:4-dichlorophenyl)-1:1-diméthyl urée (DCMU) par exemple, bloque la chaîne de transport des électrons dans le centre réactionnel du PSII (Gonen-Zurgil, 1996). De ce fait, la production d'oxygène est alors inhibée. Cependant, l'utilisation du carbone organique présent dans le milieu

par les souches algales n'est pas considérablement affectée par l'ajout de DCMU (Bourab *et al.*, 2004). Une corrélation positive entre l'activité photosynthétique et le taux de croissance a été démontrée dans une étude de Belkoura et Dauta (1994).

Aucune étude sur la performance photosynthétique ne semble complète sans résultats de fluorescence chlorophyllienne. Le test de fluorescence basé sur le rendement quantique maximum du PSII (F_v/F_m) est conçu pour comparer le taux de fluorescence maximale et minimale émis par la chlorophylle-*a*. Une valeur F_v/F_m se situant à 0,83 est maximale. Un résultat inférieur démontre généralement un stress végétal (Maxwell et Johnson, 2000). Cependant, les travaux de Belkoura et Dauta (1994) soulignent l'existence d'une inhibition plus ou moins prononcée de la capacité photosynthétique aux fortes intensités lumineuses.

1.6.1 L'intensité lumineuse

La lumière est la source d'énergie nécessaire à tous microorganismes photosynthétique et se situe parmi les facteurs environnementaux qui influencent le plus la croissance microalgale (Wahidin *et al.*, 2013). L'effet de l'augmentation de l'intensité lumineuse sur la croissance microalgale peut être classifié en quatre phases : la phase de latence, la phase de limitation, la phase de saturation et la phase d'inhibition (Yeh *et al.*, 2010). Dans la majorité des cultures, la lumière est le facteur le plus limitant pour la croissance cellulaire. La relation entre l'intensité lumineuse, la croissance autotrophique et l'activité cellulaire est complexe. Un exemple typique de l'effet de l'intensité lumineuse sur la croissance autotrophique est montré à la figure 1.6. La diminution de la croissance ou de la concentration cellulaire quand la lumière est insuffisante est bien documentée (Ogbonna et Tanaka, 2000; Wahidin *et al.*, 2013; Takeshita *et al.*, 2014). Quand l'éclairement énergétique est insuffisante, la croissance algale se retrouve sous une condition de photolimitation. Dans cette situation, une augmentation de l'intensité lumineuse améliore la croissance algale jusqu'à l'intensité lumineuse saturante. La croissance microalgale est inhibée quand l'intensité lumineuse s'élève au-dessus du point de saturation photosynthétique. Dans la nature, l'intensité lumineuse est largement

au-dessus de cette limite et peut inhiber la croissance algale pendant la majeure partie de la journée. Une quantité insuffisante de lumière peut donc mener à un taux de croissance plus faible. D'autre part, à une intensité lumineuse trop élevée, la photoinhibition devient un problème tout aussi important (Wahidin *et al.*, 2013).

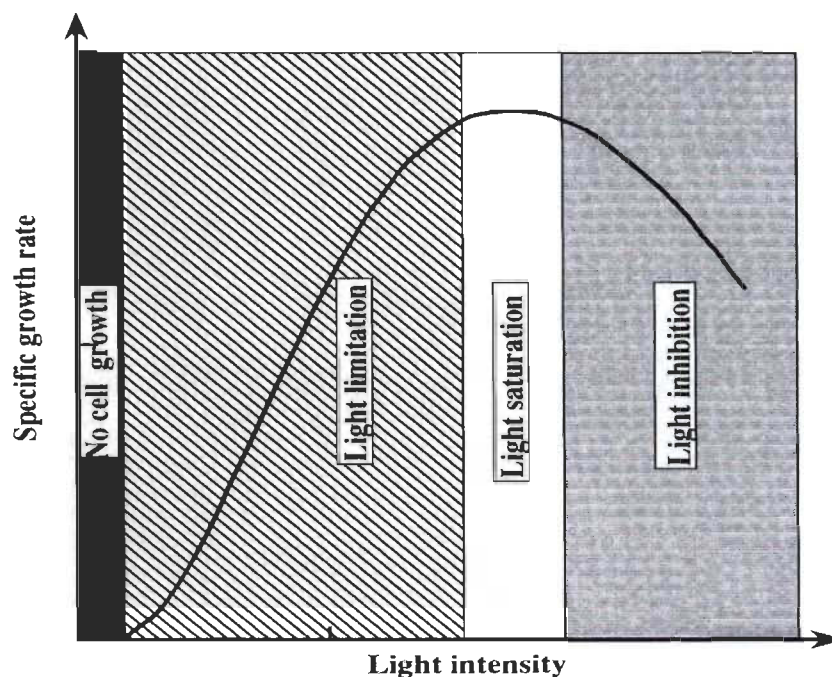


Figure 1.6 Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance autotrophique d'une cellule photosynthétique (Tirée d'Ogbonna et Tanaka, 2000).

Une intensité lumineuse naturelle d'environ $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ peut être observée durant une journée nuageuse, mais elle peut varier de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sous une météo modérée, à plus de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sous un soleil direct au milieu de la saison estivale (Takeshita *et al.*, 2014). Dépendamment de la localisation géographique de la culture et de la saison, le nombre d'heures par jour où l'intensité lumineuse est suffisamment élevée pour supporter la croissance algale peut être très court. De plus, une mauvaise météo prolongée (journées nuageuses consécutives) conduit souvent à un échec d'une culture si l'énergie solaire uniquement est utilisée. Intégrer une source de lumière artificielle permet de compenser l'énergie manquante et ainsi contourner le problème (Ogbonna et Tanaka, 2000).

Un vaste éventail d'intensité lumineuse est observé dans la littérature (Tableau 1.2). Certaines études décrivent une culture sous une intensité lumineuse plus faible se situant entre 20 et 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Safonova *et al.*, 2004; Sydney *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2010). Par contre, le potentiel de croissance n'est pas inhibé par une intensité lumineuse de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour trois espèces de chlorelle (*Chlorella viscosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*). Au contraire, les résultats d'une étude de Takshita *et al.* (2014) démontrent que cultiver une souche de *Chlorella* à haute intensité lumineuse diminue le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire de croissance. Selon cette même étude, la phase exponentielle de croissance a été atteinte quatre jours seulement après l'inoculation et les souches algales sont entrées en phase stationnaire dès la cinquième journée. Sous une intensité lumineuse de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, environ le triple du temps (14 jours) est requis pour que la phase stationnaire soit observée. Par contre, Yeh *et al.* (2010) proposent une intensité lumineuse moins élevée, puisqu'à 18 W/m^2 (82 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) une inhibition de la croissance est clairement observée dans leurs travaux pour une souche de *Chlorella vulgaris*. De plus, ces mêmes auteurs proposent, pour des raisons économiques engendrées par les coûts énergétiques, une intensité lumineuse de 9 W/m^2 (environ 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ces différents effets de l'intensité lumineuse peuvent être expliqués par l'utilisation de sources lumineuses variées qui affectent la croissance algale principalement à cause de la différence entre les longueurs d'onde émises par ces sources (Sargent et Taylor, 1972; Morais et Costa, 2007; Yeh *et al.*, 2010). Le tube fluorescent est principalement utilisé dans les études (Safonova *et al.*, 2004; Sydney *et al.*, 2010; Jacobs-Lopees *et al.*, 2010; Priscila *et al.*, 2011; Hulatt et Thomas, 2011; Fernandes *et al.*, 2013). Les diodes électroluminescentes (Fu *et al.*, 2012; Elmography et Farag, 2012) ou même une combinaison des deux dernières sources (Tekshita *et al.*, 2014) sont aussi des alternatives intéressantes. Par contre, pour une même source lumineuse, la configuration du récipient de culture (Yeh *et al.*, 2010; Dauta, 1982) la densité cellulaire (Raesossadati, 2014; Dauta, 1982) et le régime lumineux (Ogbonna et Tanaka, 2000; Tekshita *et al.*, 2014) sont des facteurs affectant non seulement la croissance algale, mais aussi la composition cellulaire.

Tableau 1.2

Différentes intensités lumineuses et souche algales associées

Intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Souche algale	Références
25	<i>Chlorella sp.</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Stichococcus sp.</i> <i>Phormidium sp.</i>	Safonova <i>et al.</i> , 2004
29	<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Spirulina platensis</i> <i>Botryococcus braunii</i>	Sydney <i>et al.</i> , 2010
39	<i>Chlorella vulgaris</i>	Lv <i>et al.</i> , 2010
54	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella ellipsoidea</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Han <i>et al.</i> , 2012
60	<i>Chlorella vulgaris</i>	Yeh et Chang, 2012
96	<i>Chlorella kessleri</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>	Morais et Costa, 2007
100	<i>Nannochloropsis salina</i> <i>Chlorella protothecoides</i>	Sforza <i>et al.</i> , 2012
225	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Sargent et Taylor, 1972
255	<i>Chlorella vulgaris</i>	Fu <i>et al.</i> , 2012
300	<i>Chlorella sp.</i> <i>Nannochloropsis oculata</i>	Chiu <i>et al.</i> , 2011 Chiu <i>et al.</i> , 2009
350	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Hulatt et Thomas, 2011
600	<i>Chlorella viscosa</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella sorokiniana</i>	Takshita <i>et al.</i> , 2014
1200	<i>Parachlorella kessleri</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2013

L'acclimatation de la cellule algale à une nouvelle intensité lumineuse prend place simultanément avec la croissance de la cellule. Le contenu en Chl par unité de poids sec diminue généralement d'environ la moitié pendant les premières 24 heures suivant un changement de 3 Klux (environ $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à 30 Klux (environ $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Une période de 24 à 48 heures n'est pas suffisante pour retrouver des cellules de grosseurs comparables à celles acclimatées à une faible intensité lumineuse (Neilsen, 1962). Le taux élevé de chlorophylle par unité de poids sec est la conséquence d'une part du profil d'âge de la population cellulaire (rapport cellules jeunes / cellules âgées) et d'une autre part de l'acclimatation à une faible intensité lumineuse (Dauta 1982). À l'inverse, le contenu en chlorophylle par unité de poids sec augmente d'un facteur de deux pendant les premières 24 heures après un changement de 30 Klux à 3 Klux et le taux de croissance demeure le même que lors de la croissance à 30 Klux (Jorgensen, 1964). Il a été observé que le plus haut taux de croissance obtenu en mixotrophie était suite à des conditions lumineuses limitantes. Sous une intensité lumineuse saturante, le taux de croissance d'une souche algale de chlorelle était presque le même que celui observé en autotrophie. Sous des conditions mixotrophes, la concentration cellulaire de métabolites dépend de l'activité relative entre l'autotrophie et l'hétérotrophie. À une concentration cellulaire élevée, la lumière devient normalement limitante, ce qui réduit l'activité photosynthétique comparativement au métabolisme d'hétérotrophie. Le contenu en chlorophylle d'une cellule de *Chlorella vulgaris* et de *Scenedesmus acutus* serait moins élevé en chlorophylle, soit 61,4 % en mixotrophie et 45,5 % en hétérotrophie, comparativement des valeurs en culture autotrophe (Ogbonna et Tanaka, 2000). À défaut de ne pas effectuer efficacement la photosynthèse, pendant des périodes d'obscurité comme la nuit, ou en absence de carbone organique métabolisable dans le milieu de culture, la cellule algale consomme les glucides accumulés afin de produire sa propre énergie, ce qui conduit à une diminution de la productivité cellulaire (Ogbonna et Tanaka, 2000; Takeshita *et al.*, 2014).

Les chlorelles accumulent le carbone sous forme d'amidon et de lipides. Un compromis entre l'accumulation d'une de ces deux formes de stockage est observée sous une intensité lumineuse élevée ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) chez *Parachlorella kessleri*

(Fernandes *et al.*, 2013). La composition cellulaire d'une souche de chlorelle est affectée, non seulement par l'intensité lumineuse, mais aussi par la durée de la photopériode. L'accumulation de lipide a augmenté rapidement trois jours après l'inoculation, atteignant un maximum après cinq jours d'expérimentation dans une étude de Takeshita *et al.* (2014). *P. kessleri* a accumulé 2,15 fois plus de lipides, *C. vulgaris* 1,78 fois et *C. emersonii* 1,75 fois plus de lipides sous un régime lumineux continu en comparaison aux cultures sous un régime 12 : 12 heures. Selon cette même étude, les proportions de C18:3 et de C18:1 seraient plus élevées sous des conditions d'alternance lumière et noirceur que sous des conditions lumineuses constantes. Cependant, des études démontrent qu'un changement dans la composition cellulaire peut être entraîné en condition de stress nutritionnel. Par exemple, les C:16 et C:18 augmentent en condition de carence en azote (Lamers *et al.*, 2012). En conditions nutritionnelles non limitantes, le taux de croissance d'une population d'algues est une fonction de l'éclairement et de la température. En conditions nutritionnelles défavorables, la capacité photosynthétique maximale (Pmax) dépend des réserves cellulaires en phosphore. Pour ce qui est des cultures carencées en azote, une bonne corrélation est démontrée entre Pmax et le taux de croissance, dans le cas où Pmax est exprimé par unité de Chl et non en cellule, ce qui résulte à la fois des variations du quota cellulaire, de Chl et de la taille de la cellule en fonction du degré de carence (Dauta, 1982).

En bref, le taux photosynthétique, et par la même occasion le taux de croissance devraient être proportionnels au taux d'énergie lumineuse absorbée par les cellules. Le besoin en lumière est le facteur le plus important limitant la productivité des cultures photosynthétiques (Ogbonna et Tanaka, 2000). La gamme d'intensité lumineuse utilisée dépend, dans une large mesure, de l'espèce et de l'histoire de la cellule algale (Takeshita *et al.*, 2014). La cellule algale de *Chlorella vulgaris* s'adapte à un changement d'intensité lumineuse par une variation de la concentration en Chl, menant à une modification du taux photosynthétique (Jorgensen, 1964; Dauta, 1982). L'intensité lumineuse affecte la photosynthèse, le taux d'assimilation du CO₂, la concentration en biomasse et donc globalement la croissance (Raeesossadati, 2014).

1.6.2 L'assimilation du CO₂

J. Ingen-Housz élabore en 1779 une série d'expériences lui permettant de démontrer que la fonction purificatrice des plantes sur l'atmosphère ne s'exerce qu'en présence de lumière. Il est clairement établi que les feuilles (immergées) rejettent sous éclairage des bulles d'« air vital », tandis qu'à l'obscurité, les plantes, comme les animaux, rendent l'air impropre à la vie. C'est à J. Sénebier que revient la véritable découverte de la photosynthèse en 1780. Selon ce dernier, le dioxyde de carbone est la nourriture que les plantes tirent de l'air dans laquelle elles baignent (Farineau et Morot-Gaudry, 2011). La réaction de fixation est aujourd'hui bien établie (Figure 1.7).

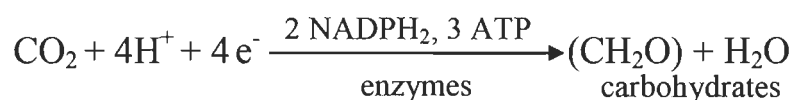


Figure 1.7 Fixation du CO₂, utilisant deux molécules de NADPH₂ et trois d'ATP produite pendant la réaction de photosynthèse, ce qui représente un gain de $5,2 \times 10^{-4}$ J ou 13 kcal (Tirée de Richmond, 2004).

La biofixation du CO₂ par la culture algale a reçu un intérêt croissant avec les années. Le dioxyde de carbone améliore la croissance des microalgues, qui ont déjà un taux de croissance élevé, comparativement aux plantes terrestres, leur conférant une efficacité de biofixation 10 à 50 fois plus élevée (Lam et Lee, 2013). Il faut par contre être attentif au ratio CO₂/O₂ injecté dans la culture. Une trop grande proportion d'oxygène résulterait en une diminution de la fixation de CO₂ par la ribulose biphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco), en faveur de la fixation de l'oxygène. Ce processus est celui de la photorespiration (Farineau et Morot-Gaudry, 2011; Rahaman *et al.*, 2011). Par contre, la concentration atmosphérique actuelle en CO₂ (0,038 %) n'est pas encore suffisante pour soutenir une culture algale strictement autotrophe (Rahaman *et al.*, 2011). Afin de fournir un apport suffisant en CO₂ à la culture, la concentration en dioxyde de carbone peut être augmentée dans le gaz d'aération.

Les travaux de Cheng *et al.* (2006) démontrent que le taux de croissance maximal de *Chlorella vulgaris* est obtenu suite à une concentration en CO₂ dans le gaz d'aération

à environ 1 %. Dans une autre étude (Lam et Lee, 2013) c'est sous une concentration de 5 % de CO₂ que la meilleure croissance a été atteinte (Tableau 1.3). Chiu *et al.*, (2011) démontrent eux aussi qu'une concentration élevée en CO₂ est bénéfique pour la croissance algale, spécialement lorsque *Chlorella sp.* est cultivée avec une forte densité cellulaire (8×10^6 cellules mL⁻¹). Hausser la concentration en dioxyde de carbone du gaz destiné à l'aération des cultures algales semble une bonne stratégie lorsqu'une biomasse ou une densité cellulaire élevée est visée. Par contre, comme démontré par Lam et Lee (2013), cette hausse n'affecte pas de façon significative la composition lipidique d'une souche de *Chlorella vulgaris* (Tableau 1.3).

Tableau 1.3

Taux de consommation et efficacité d'élimination, productivité en biomasse, taux de croissance et production lipidique relative à différentes concentrations en CO₂ d'un gaz d'aération injecté dans une culture de *Chlorella vulgaris* (Tiré de Lam et Lee, 2013)

Concentration CO ₂ dans le gaz (%)	Taux de consommation du CO ₂ (mgL ⁻¹ j ⁻¹)	Efficacité d'élimination du CO ₂ (%)	Taux de croissance (j ⁻¹)	Biomasse produite (mgL ⁻¹ j ⁻¹)	Production de lipides (%)
0.03	63.1	92.2	0.156	31.54	18.1
0.5	76.3	7.1	0.160	34.06	18.5
1	96.6	4.5	0.190	43.14	18.4
2	106.7	2.5	0.196	47.36	18.4
5	162.7	1.5	0.283	72.66	18.7

En référence au **Tableau 1.3**, le taux de consommation en CO₂ par la souche microalgale aérée avec une concentration de 5 % était supérieur (162,7 mg L⁻¹ j⁻¹), comparativement à la culture aérée avec 0,03 % qui a obtenu 63,1 mg L⁻¹ j⁻¹. Cette observation démontre une corrélation négative entre l'efficacité d'élimination l'augmentation de la concentration en CO₂. La raison principale de cette observation est la faible solubilité du dioxyde de carbone dans l'eau, qui est approximativement de 1,45 g/L à 25 °C et 1 atm (Lam et Lee, 2013). Cet effet a comme conséquence de retourner dans l'atmosphère une quantité de CO₂ inutilisée par les algues. Fournir une forte concentration en CO₂ dans le milieu de culture peut augmenter la probabilité de dissolution, mais n'indique pas que les algues pourront pleinement l'utiliser. En revanche, l'utilisation d'une concentration en dioxyde de carbone près de celle

retrouvée dans l'atmosphère semble être plus prometteuse pour ce qui a trait au bilan de carbone inorganique (Lam et Lee, 2013). Une bonne capacité de mélange du milieu s'avère être aussi indispensable de sorte que les zones mortes, où la capacité d'élimination du CO₂ sont réduites. Une bonne agitation favorise la rétention des bulles d'air dans le milieu augmentant la capacité de transfert ainsi que l'uniformité de la température (Fan *et al.*, 2008). La dissolution du dioxyde de carbone est complexe en raison des réactions réversibles possibles dans le liquide. Il y a quatre espèces solubles possibles incluant le dioxyde de carbone, le bicarbonate (HCO₃⁻), l'acide carbonique (H₂CO₃) et le carbonate (CO₃²⁻) qui sont dépendants du pH. À un pH inférieur à 5, pratiquement toutes les formes inorganiques de carbone sont présentes, le HCO₃⁻ domine quand le pH se trouve entre des valeurs de 7 et 9 tandis que c'est le carbonate qui est favorisé par un pH supérieur à 9. La valeur du H₂CO₃ n'est pas significative dans une eau à 25 °C à cause de sa rapide déprotonation. Toutes ces formes de carbone peuvent être utilisées selon Lam et Lee (2013), tandis que Fan et ses collaborateurs (2008) soutiennent que seulement le CO₂ dissous peut être assimilé par *Chlorella vulgaris* et que la biofixation du CO₂ n'est pas limitée à un pH se situant dans les environs de 6 et 7.

Par contre, plusieurs cellules photosynthétiques sont capables de croître sous un mode hétérotrophe en utilisant le carbone organique comme source énergétique en pleine obscurité (Ogbonna et Tanaka, 2000).

1.6.3 Utilisation du carbone organique

Chez la majorité des espèces du genre *Chlorella*, le transport du glucose est basé sur l'induction d'un système symport hexose/H⁺ (Komor et Tanner, 1973; Zheng *et al.*, 2012). En laboratoire, Přebyl *et al.* (2012) ont obtenu des valeurs en productivité de 1 à 1,5 g L⁻¹ jour⁻¹, un taux lipidique représentant jusqu'à 60 % de la biomasse sèche et une densité cellulaire de 7 à 12 g L⁻¹ pour une souche de *Chlorella vulgaris* alimentée en glucose, sous un éclairage fluorescent blanc. Les résultats de Martinez et Orús (1991) démontrent que le taux de croissance d'une souche de *Chlorella vulgaris* supplémentée

en glucose et sous une lumière de fluorescent blanc froid ($3,16 \pm 0,07 \text{ j}^{-1}$) avait dépassé celui des fioles sans glucose sous les mêmes conditions lumineuses ($1,95 \pm 0,09 \text{ j}^{-1}$), ou celui des cultures mis à l'obscurité avec glucose ($1,90 \pm 0,04 \text{ j}^{-1}$). Cela suggère que les fonctions photosynthétiques et respiratoires sont complémentaires et que la lumière est nécessaire pour atteindre le taux de croissance maximale de cette souche. La présence de glucose stimulerait la croissance, même en présence de 2 % de dioxyde de carbone, ce qui est considéré comme une démonstration selon laquelle, les cellules algales utilisent le glucose comme source de carbone supplémentaire (Martínez et Orús, 1991).

1.7 Problématique spécifique

Diverses études démontrent que les eaux usées industrielles sont de bonnes candidates pour supporter la croissance microalgale. Elles permettent d'obtenir une production intensive à des fins énergétiques, malgré la concentration plus faible de certains nutriments. Depuis longtemps, l'assainissement des eaux usées par les microalgues est connu et la faisabilité du projet a été démontrée (Rawat *et al.*, 2011). Par contre, les divers avantages et inconvénients des différents modes trophiques semblent encore nébuleux dans la littérature. Néanmoins, les auteurs s'entendent sur le fait que l'efficacité d'assimilation de CO_2 dépend largement de l'espèce microalgale cultivée, des conditions de cultures et de la lumière disponible (Martínez et Orús, 1991; Fan *et al.*, 2008; Lam et Lee, 2013). La littérature démontre aussi que peu d'étude porte sur l'utilisation des eaux usées d'aluminerie pour la production d'algues à des fins énergétiques. C'est pourquoi il nous faut envisager tous les points pouvant améliorer l'efficacité de la souche algale *Chlorella sp.* utilisée à des fins énergétiques dans le présent projet.

1.8 Objectifs et approche expérimentale

Plusieurs défis technologiques restent encore, à ce jour, à résoudre quant à la production de microalgues dans des eaux usées industrielles. Ce milieu de culture particulier nécessite une attention particulière et chaque projet doit être traité

individuellement. L'objectif de cette étude a été de vérifier l'impact du carbone organique et de différentes concentrations de carbone inorganique, ainsi que différentes intensités lumineuses sur la croissance du consortium composé majoritairement de *Chlorella sp.* La productivité en termes de biomasse, de densité cellulaire et d'accumulation lipidique de la souche algale, en plus de sa capacité photosynthétique, ont été étudiés. Les essais ont été menés en considérant de façon constante le but final du présent projet visant l'utilisation à des fins énergétiques d'une biomasse algale au sein même de l'usine RTA.

1.8.1 Déterminer le mode trophique

En premier lieu, le mode trophique pouvant mener à la productivité en termes de cellules par jour, ainsi qu'à l'accumulation lipidique les plus élevés ont été vérifiés. Pour ce premier bloc expérimental, le DCMU a été utilisé pour simuler la photohétérotrophie, tout en gardant en tête que le PSI, et donc la photophosphorylation cyclique (qui produit l'ATP) ne sont pas ou peu atteints par le DCMU, qui interrompt la chaîne de transport des électrons du PSII uniquement. Les cultures ont été soumises à une intensité lumineuse de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (autotrophie, mixotrophie et photohétérotrophie), à l'exception des cultures hétérotrophes qui ont été à l'obscurité. Du glucose a été ajouté comme source de carbone organique (hétérotrophie, mixotrophie et photohétérotrophie) et la concentration en CO_2 atmosphérique (0,038 %) comme source de carbone inorganique (autotrophie et mixotrophie).

1.8.2 Déterminer la concentration en CO_2

En deuxième lieu, il a été vérifié si l'augmentation de la concentration en CO_2 avait un effet positif sur la productivité cellulaire et l'accumulation lipidique des souches sous croissance autotrophe et mixotrophe. Différentes concentrations en CO_2 (0,038 % v/v, 1 % v/v et 2 % v/v) ont été injectées dans les cultures algales en considérant la concentration disponible dans les gaz de cheminée de l'usine. Les cultures ont été soumises à une intensité lumineuse de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

1.8.3 Déterminer l'intensité lumineuse

En dernier lieu, l'effet de l'intensité lumineuse sur la productivité cellulaire et l'accumulation lipidique a été vérifié pour *Chlorella spp.* Ainsi, différentes intensités lumineuses ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ont été étudiées pour les cultures sous croissance autotrophe et mixotrophe.

1.9 Originalité de la recherche

L'originalité de ce projet repose d'abord sur l'utilisation d'un milieu de culture non conventionnel pour la culture de microalgue. En effet, même si les eaux usées ont fait leur preuve quant à leur capacité à soutenir une croissance microalgale (Rawat *et al.*, 2011), l'aluminium est rarement un composant du milieu. De plus, dans le contexte environnemental actuel, l'utilisation bénéfique des gaz de cheminées s'avère un avantage pour l'industrie. Non seulement la chaleur perdue de ces gaz pourrait être avantageuse pour le maintien de la température des cultures de microalgues lors de l'hiver québécois, mais l'apport en CO_2 est non négligeable pour la croissance algale. En effet, il a déjà été démontré que l'augmentation de la concentration en CO_2 dans les gaz d'aération pouvait avoir un effet positif sur la croissance algale (Lam et Lee, 2013). Ce projet est également original en suggérant la possibilité de cultiver des microalgues dans le climat québécois en cohabitant avec une aluminerie pour bénéficier de ses gaz de cheminée.

Enfin, le contexte industriel dans laquelle s'insère cette étude est aussi un élément d'originalité. Très peu d'études ont porté sur l'utilisation des rejets de l'industrie de la fabrication de l'aluminium pour la croissance et l'accumulation lipidique de la souche algale *Chlorella sp.* Cette étude contribuera donc aux connaissances sur la production de microalgues en cohabitation avec des usines existantes qui est maintenant une approche de plus en plus préconiser par le secteur privé pour rentabiliser des productions de biocombustibles et de coproduits.

CHAPITRE II

***CHLORELLA SPP.* CONSORTIUM UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS IN ALUMINIUM SMELTER WASTEWATER: EFFECTS ON GROWTH AND LIPIDS ACCUMULATION**

Manuscrit en attente de soumission

**M. Lemire¹, M. Gélinas¹, F. Bélanger-Lépine¹, N. Dubois-Calero²,
S. Gaboury³ and S. Barnabé¹**

¹ University of Quebec in Trois-Rivières, 3351 Boulv. Des Forges, Trois-Rivières, Qc,
Canada

² AlgaLabs, 1751 Rue Richardson, Montréal, Qc, Canada

³ Rio Tinto Alcan INTL, Arvida R&D Center, 1955 Boulv. Mellon, Jonquière, Qc,
Canada

Corresponding author: Simon Barnabé; Email: simon.barnabe@uqtr.ca;

Phone: 819-376-5011, ext 4531

Abstract

The potential for growth and lipid accumulation of an indigenous *Chlorella spp.* strain were investigated using an aluminium smelter wastewater as growth medium. Results showed that *Chlorella spp.* grows in the absence (autotrophy) or presence (mixotrophy) of glucose in the light as well as in the dark (heterotrophy). To highlight the importance of photosynthesis, a specific inhibitor of the photosystem II (DCMU) was added to *Chlorella spp.* cultures. Algae growth was observed under light, glucose and DCMU conditions (photoheterotrophy). The growth under heterotrophic condition was more important and reached the highest cell density (2.38×10^4 cell L⁻¹), followed by mixotrophic condition (1.45×10^4 cell L⁻¹), autotrophic condition (1.21×10^4 cell L⁻¹), photoheterotrophic (1.06×10^4 cell L⁻¹) and finally only DCMU supplemented condition (4.41×10^3 cell L⁻¹). Higher neutral lipid (2.23 RFU cell⁻¹) was obtained under autotrophy on day 5 of the experiment, whereas highest lipids productivity (0.187 RFU cell⁻¹ d⁻¹) was reached by the algae under mixotrophic growth condition. Considering cell growth and overall lipid accumulation, these experiments suggest that the mechanism of glucose uptake is independent of photosynthesis. However, the low average values of F_v/F_m suggest that algal culture is subjected to stress during growth.

Keywords: *Chlorella spp.* consortium; smelter wastewater; co-location; DCMU; cultivation conditions; photoheterotrophism; microalgae lipids.

Introduction

Microalgae are among the fastest growing photosynthetic organisms (Lam and Lee, 2013; Chisti, 2007), with higher productivity than terrestrial crops or wood (Demirbas et al., 2009). Unlike oil crops, many microalgae species can accumulate between 20 and 60% of oil content. Microalgae with high oil productivities are sought for biodiesel production (Demirbas and Demirbas, 2010; Chisti, 2007). However, among all the challenges and issues around biomass cultivation and its use for biofuel production, securing the supply of this biomass remains a critical factor for success and profitability.

An industry producing its own biomass by recycling their own CO₂ stream, wastewater, residues and waste energy could benefit from this microalgae alternative. Microalgae have advantage to acclimate at several cultivation methods, using different energy sources (light or organic) and carbon sources (inorganic or organic). Autotrophic condition is commonly used because microalgae use CO₂ as unique carbon source while light provides the energy required for biomass production. Organic carbon sources, like glucose, can support microalgae growth and increase overall biomass productivity (Yang et al., 2000) either in presence (mixotrophy) or absence (heterotrophy) of light. Yeh and Chang (2012) suggested that in photoheterotrophic culture, microalgae use light as energy source and organic compound as carbon source. However, both organic carbon and CO₂ are essential in mixotrophic growth, as light source is also provided. *Chlorella spp.* is a strain found able to grow under autotrophic, heterotrophic as well as mixotrophic conditions (Chojnacka and Marquez-Rocha, 2007). Perez-Garcia et al. (2011) suggest that heterotrophy should be the favourable condition due to economic reasons related to facilities cost and ease of large-scale cultivation maintenance. However, Ling and Chang (2012) obtained higher lipid productivity (67 to 144 mg L⁻¹ day⁻¹), under mixotrophic growth condition for *Chlorella spp.* Still, there are many aspects of cultivations conditions and medium composition to be considered to achieve higher cell growth and lipid accumulation of microalgae species (Yeh and Chang, 2012).

An industrial plant co-locating project for rich lipid microalgae production was conducted in Quebec, Canada. Aluminium smelter wastewater was used for biofuel and bioenergy production purposes from algal biomass. In this study, an indigenous microalgae-bacteria consortium (mainly *Chlorella spp.*), isolated directly from the smelter wastewater, was examined for its growth potential and lipids production. Environmental conditions, such as autotrophy, heterotrophy and mixotrophy, were studied including photoheterotrophic conditions. The lipid productivity, cell density and the maximal photochemical activity were monitored. This study aimed to determine an optimal trophic mode for further cultivation in a pilot Alga-Fuel™ open tank (Dubois-Calero and Mangin, 2011).

Material and methods

Microalgae-bacteria consortium and cultured medium

A microalgae-bacteria consortium, mainly composed by *Chlorella spp.*, was originally obtained from smelter wastewater located in Quebec (Canada) and isolated in our laboratory (unpublished data). This native consortium was cultured in the same smelter wastewater (Table 1) wherein were added more nutrients: 300 mg L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, 750 mg L⁻¹ KNO₃, 700 mg L⁻¹ KH₂PO₄ and 28 mg L⁻¹ C₁₀H₁₂FeN₂NaO₈.

Culture conditions

A previous culture (3.0×10^4 cell L⁻¹) was added to 450 ml fresh medium in 1L-Erlenmeyer flasks (1:10 v/v). The cultures were maintained at 25 °C and constantly stirred at 150 rpm. Microalgae were grown under four different conditions (Table 2). For autotrophy, mixotrophy and photoheterotrophy, the *Chlorella spp.* cultures were illuminated by 32 W cool-white fluorescents tubes (20 μmol m⁻² s⁻¹) under a 12:12 photoperiod cycle for 8 days. To assess the impact of organic carbon addition, 0.5 g L⁻¹ of glucose was added twice to the cultures, on day 4 and 6. Dark condition to maintain heterotrophy was obtained by wrapping the flask with aluminium foil.

Photoheterotrophic cultured condition was also investigated in this study by the mean of 3-(3:4-dichlorophenyl)-1:1-dimethyl urea (DCMU) in presence of light. Cultures were exposed once to 10^{-4} M DCMU, 24h after the first glucose addition. Each culture was covered with a foam plug (Identiplug 35-45 mm, Fisher) allowing atmospheric air circulation.

Determination of microalgae photosynthetic efficiency

Maximum photochemical efficiency of Photosystem II was estimated from the chlorophyll fluorescence ratio F_v/F_m measured daily using a handy Plant Efficiency Analyser (PEA; Hansatech Instrument). One ml of microalgal samples were adapted for 30 minutes under dark condition at room temperature and then filtered on glass fiber prefilters (Whatman Millipore, 934 AH). Measurements were made by placing the filter toward the instrument's optical sensor unit.

Determination of microalgae biomass concentration and specific growth rate

The cell concentration of the culture was determined daily by visual counting with a hemacytometer, under electronic microscopy (Binocular Microscope ZEISS Axio Lab.A1, Germany). Briefly, a sample of 10 μ L, pre-diluted (HCL) for a maximum concentration of 10^6 cells ml^{-1} , was introduced between the Neubauer plate and the coverslip. The hemacytometer was then observed at 100X magnification. Meanwhile, the growth rate (μ , day^{-1}) of microalgae was calculated as indicated:

$$\text{Growth rate} = (\mu_f - \mu_i) \Delta t^{-1}$$

where μ_f and μ_i indicate the final and initial algae cells concentration (cell L^{-1}), respectively and Δt represent the cultivation time (days).

Determination of microalgae lipid production

Algal neutral lipids were estimated using Nile Red staining. The measuring of the orange fluorescence was done by a Cytomics FC500 series flow cytometer (Beckman Coulter; Canada; Ottawa) equipped with an argon-ion laser probe and programmed with the standard configuration. A stock Nile Red (Sigma) solution (10 mg/ml) was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) 10%. This solution was directly added to 500 μl of algal prediluted in phosphate buffer solution from Sigma to attain a final concentration of 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The mixture solution was then incubated in the dark at room temperature for 30 minutes before to be read by the flow cytometer. The data were expressed as relative fluorescence intensity units (RFU) measured on a minimum of 5000 cells and until 10000 cells were reached. Lipids productivity over the time was also investigated through the same equation than the growth rate.

Statistical analysis

The algal growth, lipid accumulation and photosynthetic activity were analyzed using repeated analysis of variance (ANOVA) and mean comparison (Tukey HSD). Effects related to time, glucose (presence or absence), light (12/12 h photoperiod or darkness) and their interactions were analyzed using JMP Pro 11. All the statistical analyses were performed on data obtained from day 4 to day 8 of the experimentations. The first 3 days were considered as an acclimation phase.

Results

Maximum photochemical efficiency of Photosystem II

Maximum photosystem II efficiency was measured to monitor the impacts of the different growth conditions on the integrity of the photosynthetic apparatus. Microalgae were largely affected by DCMU and did not recover any photosynthetic activity by the end of the experiment (Figure 1). Indeed, the F_v/F_m values decrease significantly ($p < 0.05$), from 0.58 to 0.05 and 0.53 to 0.05 after 24 hours of DCMU addition for

photoheterotrophic and DCMU only cultivations respectively. At the end of the experiment, no significant difference was observed between F_v/F_m results from the two supplemented DCMU cultures. Regarding heterotrophic cultures, no significant difference over the time was observed (Figure 1). However a slight F_v/F_m decrease (0.42 to 0.38) was observed for autotrophic growth condition, while a steady decline from 0.57 to 0.17 for mixotrophy. Light availability had a significant effect on F_v/F_m ($p < 0.0001$), but glucose addition does not affect F_v/F_m values ($p > 0.05$) over the time.

Growth rate and lipid accumulation

Initial cell density was about $3.02 \times 10^4 \pm 100$ cell L^{-1} for all growth conditions (Figure 2-a). During the 5 experimental days, an increase in cell number was observed for all growth conditions (Figure 2-a), except for cultures that were supplemented with DCMU only. DCMU only culture had the lowest final cell density (4.41×10^4 cell L^{-1}), followed by autotrophic cultivations (1.06×10^4 cell L^{-1}), mixotrophic cultivations (1.21×10^4 cell L^{-1}) and finally heterotrophic cultures (2.38×10^4 cell L^{-1}). Consequently, mixotrophic (3248 ± 165 cell $L^{-1} d^{-1}$) and heterotrophic (5040 ± 490 cell $L^{-1} d^{-1}$) growth conditions obtained the highest growth rate (Table 3) compared to autotrophy (2440 ± 864 cell $L^{-1} d^{-1}$). The absence of light had a significant impact on algal growth ($p < 0.001$). Moreover, mixotrophic growth rate was 2 times higher than autotrophic growth. Indeed, the addition of glucose in algal cultures showed to be significantly advantageous ($p < 0.05$).

Despite the increase of algal cell number over time for the different growth conditions (Figure 2-a), a decrease in cell neutral lipid accumulation was rather observed (Figure 2-b). Therefore, in heterotrophy, as for photoheterotrophy or supplemented DCMU only, slight decreases from 0.03 ± 0.01 RFU cell $^{-1}d^{-1}$, 0.09 ± 0.03 RFU cell $^{-1}d^{-1}$ and 0.06 ± 0.01 RFU cell $^{-1}d^{-1}$ (Table 3) were observed respectively. The autotrophy presented a different trend with a marked lipid accumulation of 2.02 ± 0.89 RFU cell $^{-1}$ on day 5 of the experiment (Figure 2-b). Subsequently, the decrease of lipid accumulation, under autotrophy, was observed until the last day of the experiment

to reach $0.61 \text{ RFU cell}^{-1}$, which is still around 1.5 times higher than the results obtained by *Chlorella spp.* cells under photoheterotrophic or heterotrophic growth (Figure 2-b). A slight increase was also observed under mixotrophic growth, from $0.65 \pm 0.33 \text{ RFU cell}^{-1}$ at the beginning to $1.36 \pm 0.63 \text{ RFU cell}^{-1}$ at end of culture (Figure 2-b). The result obtained during mixotrophic cultivation was 2 to 3 times faster than other growth conditions (Table 3), which was the highest rate of cellular lipid accumulation ($0.19 \pm 0.09 \text{ RFU cell}^{-1}\text{d}^{-1}$). However, none of these factors (light, glucose and DCMU) had a significant effect over the time on algae strain lipid accumulation.

Discussion

The microalgae-bacteria consortium used in this study evolved in a culture medium composed mainly by the wastewater of the aluminum processing industry. As for most industries, wastewater contains heavy metal (Table 1), that can become toxic to microalgae and bacteria at a certain concentrations. Some metals, such as copper (Cu) and zinc (Zn), are involved in several metabolic pathways and their absence of these elements can lead to a growth and photosynthetic capacity decrease. Ouyang et al., (2012) demonstrated that inhibitory effect of Cu on growth could be observed at low concentrations (0.003 mg L^{-1}). In this present study, the Cu concentration found in the smelter wastewater was not sufficient (Table 1) to affect the growth of the algae, while *Chlorella vulgaris* strain is more resistant to Zn. It is only at 0.325 mg L^{-1} Zn concentration that growth decreased may be observed. Actually, at this same concentration, Zn improves the quantum yield of photochemistry (F_v/F_m) of a *Chlorella vulgaris* culture after 72 hour exposure (Ouyang et al., 2012). In addition to Cu and Zn, aluminum (Al) is found in the culture medium used in this study (Table 1).

Aluminum is not usually found in traditional culture media used for microalgal growth. Al also demonstrated growth inhibitory effect at concentration of 1 mg L^{-1} . However, the decrease of cell division rate could only be observed when phosphorus (P) concentration of the culture medium is about 1.9 mg L^{-1} . In a P rich medium (31 mg L^{-1}), the same Al concentration stimulates algae growth by not less than 70%.

Regarding photosynthesis, an Al concentration of 12.15 mg L^{-1} must be achieved to affect the Photosystem II quantum yield, but only in poor P environments (Greger et al., 1992). Low Al concentration (0.65 mg L^{-1}) was observed in the culture medium used in this study, despite its wastewater origin (Table 1). Moreover, culture medium is enriched with KH_2PO_4 at the beginning of the experiment which could reduce Al effect. Only Zn is in sufficient concentration to affect cell division. However, the results obtained in this study suggest that the native *Chlorella spp.* strain grows efficiently in the smelter wastewater. Andrade et al., (2004) propose a self protective mechanism against toxic metals, such as cadmium (Cd) and lead (Pb), by polysaccharide overproduction. This intense production directly requests, at least among autotrophic algae, a stimulation of the photochemical process whose photosynthesis is the basis (Ouyang et al., 2012). But in our study, the algal cells value of F_v/F_m under autotrophic growth is not higher (Figure 1) in comparison to other trophic modes. Thus, the concentration of Zn present in the medium would be sufficient to damage the photosynthetic capacity of the algal strain *Chlorella spp.* However, besides the significant effect of DCMU, a significant decrease of the F_v/F_m function over the time was observed.

By measuring the yield of chlorophyll fluorescence, informations about maximum efficiency of PSII photochemistry are obtained. The F_v/F_m value is used as a sensitive indicator for photosynthesis potential, with a maximal value of 0.83 in higher plants (Maxwell and Johnson, 2000). In our experiment, F_v/F_m were consistently lower than 0.83 (Figure 1). The higher performance of the PSII quantum yield was obtained by heterotrophic cultures but does not reach over than 0.75. However, heterotrophs results are in agreement with the study of Chemeris et al. (2004). Their results shown that even after 2 days in total darkness, the F_v/F_m ratio remains stable. Moreover, the F_v/F_m of heterotrophy cultures remains, throughout the experiment, significantly higher of the cultures under autotrophic or mixotrophic growth. Lower F_v/F_m value indicate damage at the level of photosystem II, which suggests a loss of photosynthetic integrity and capacity. The F_v/F_m measures the quantum yield of PSII intrinsic and must be correlated with the maximum quantum yield of photosynthetic gas exchange (Maxwell and

Johnson, 2000; Murchie and Laewson, 2013). In this study, a microalgae-bacteria consortium is used, and the presence of bacteria alter the gas exchange results that cannot be directly associated to microalgae photosynthetic metabolism. It has been demonstrated that F_v/F_m ratio is a strong indicator of the maximum quantum yield of PSII chemistry and the existence of a stress inevitably results in an F_v/F_m decrease. The culture conditions, including light intensity, affect the metabolic state of algae cell (Murchie and Laewson, 2013). Indeed, a previous study (Gélinas et al., 2015) demonstrated a significant interaction of the metabolic activity for *Chlorella spp.* strain between time and light. These results suggest that light intensity used for this study ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) is not high enough to effectively support the photosynthetic activity of the microalgae strain. In addition, the light energy would be required for the efficient assimilation of organic carbon for *C. vulgaris* strain (Chonjacka and Marquez-Roach, 2004; Yeh and Chang, 2012).

According to Yeh and Chang (2012), *Chlorella vulgaris* does not growth effectively under heterotrophic condition, but with a light supply ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) cell production was 15 times higher than heterotrophic cultivation. The addition of glucose in an algal culture with light generally corresponds to the mixotrophy description. Microalgae growing under mixotrophic growth can easily shift from autotrophic to heterotrophic nutrition mode depending on environmental condition as light and organic compound availability (Chonjacka and Marquez-Roach, 2004). According to Martínez, and Orús (1991) the photoheterotrophism can occur naturally under low light conditions, when the light supply is not sufficient to support autotrophic growth. Thus, under photoheterotrophy condition, microalgae would use organic material as carbon source, while ATP is provided by cyclic electron transfer around the photosystem I or by respiration. Inhibition of photosynthesis by DCMU would force heterotrophy with or without light supply (Chonjacka and Marquez-Roach, 2004).

In the present study, DCMU was used to simulate the photoheterotrophic growth, under the same glucose and light conditions that mixotrophic cultivation. For growth comparison purposes of the strain *Chlorella spp.*, some cultures were submitted to

DCMU only. It has been reported that DCMU can be used as selective tools against unicellular algae in open pond (Gonen-Zurgil et al., 1996). Our results are not in agreement with Gonen-Zurgil et al. (1996). Indeed, the growth rate of the microalgae supplemented with DCMU only, even if nearly 8 times lower than other growth modes, is positive ($458 \pm 110 \text{ cell L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), which suggests no cell loss. This can possibly be explained by the neutral lipids productivity decreased (Table 3). This finding indicates that storage compounds can be used as energy and carbon source for the growth and reproduction process, as noted by Fernandes et al. (2013). In fact, even in glucose presence, the cultures that have been supplemented with DCMU (photoheterotrophs) possibly used their lipid also (Table 3). Furthermore, photoheterotrophic growth rate is higher, approaching the final density achieved by the autotrophic cultures (Figure 2). The results indicated that the absorption of glucose was not photosensitive for *Chlorella spp.* and corroborates with the results of a study by Martinez and Orus (1991).

The growth or cell concentration decrease in insufficient light condition is well documented (Ogbonna and Tanaka, 2000; Wahidin et al., 2012; Takeshita et al., 2014.). Under a light intensity of $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a maximum cell density of $1.3 \times 10^4 \text{ cell L}^{-1}$ was reached by *Nanochloropsis sp.* under autotrophic growth (Wahidin et al., 2012), which is comparable to the results obtained in our study (Figure 2). According to Wahidin et al., 2012, increase light intensity to $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ improves cell growth and division. Furthermore, at lower light intensity, increasing the photoperiod (12:12 to 24:0) also promotes the growth and cell division. However, an optimum was observed by combining a light intensity of $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 18:06 photoperiod, obtaining a growth rate about 1.5 times higher than under $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and a 12:12 photoperiod. This suggests that the light intensity used in this study was not optimal for autotrophic growth of algal strain. In addition, the growth of *Chlorella spp.* was improved when they grow under mixotrophic or heterotrophic conditions.

In absence of light, the only available source of energy is from the culture medium, while mixotrophic growth allows photosynthesis and organic carbon use. It has been reported that *Chlorella vulgaris* has an inducible hexose transportation system

allowing it to use glucose (Komor and Tanner, 1973; Zheng et al., 2012.). The results of Martinez and Orús (1991) demonstrated that the growth rate of *Chlorella vulgaris* supplemented with glucose ($3.16 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$) exceeded the autotrophic cultures ($1.95 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$), or the heterotrophic cultures ($1.90 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$). Moreover, Cheirslip and Torpee, (2012) also reported that the highest cell density was achieved under mixotrophic growth condition. In contrast, the highest cell density in our study was obtained under heterotrophic conditions (Figure 2). Glucose was added at 0.5 g L^{-1} concentration twice to the heterotrophic and mixotrophic cultures. This concentration of glucose is 2 to 5 times less than the one used by Martinez and Orús (1991) and Cheirslip and Torpee, (2012) respectively. However, considering the industrial context in which the present study is located, the use of a minimum glucose concentration was desirable. However, alternative inexpensive sources of organic carbon are envisaged. On the other hand, the addition of glucose, even in low concentration, has still proven advantageous for the growth of the algal strain, contrary to lipid accumulation in our study.

As shown in Figure 2, microalgae produce the higher lipid content under autotrophic condition on day 5 of the experiment. However, a decrease in the accumulation of neutral lipids is then observed until the end of the experiment. The higher lipid productivity can be observed under mixotrophy. Statistical analysis showed no significant difference in time and between the different growing conditions. These results are in agreement with Cheirslip and Torpee (2012) and Heredia-Arroyo et al., (2010). Their studies have also shown that the lipid contained was not significantly different under different culture conditions. It is possible that lipid accumulation was algal strain dependent, as proposed by Přibyl et al. (2012). Moreover lipid content, the final cell concentration shall be considered to bring this process to industrial scale, especially considering the expensive harvesting and dewatering steps. Consequently, it was not possible to determine an optimal condition by only taking into account the criteria of highest lipid content. Impact of cultivation conditions on fatty acid profiles should be evaluated in future work to provide a better insight on the possibility of using the algae lipids for biofuel production.

Conclusion

This study demonstrated the growth ability of the indigenous strain *Chlorella spp.* in the aluminium smelter wastewater. *Chlorella sp.* can be adapted to different growing conditions. Higher cell density (2.38×10^4 cell L⁻¹) was obtained from heterotrophic cultivation, whereas higher lipids content (2.02 ± 0.89 RFU L⁻¹) was reached on day 5 of the experiment. The highest lipid productivity (0.19 RFU L⁻¹ d⁻¹) was achieved using the mixotrophic growth condition. In addition, DCMU allowed the simulation of the photoheterotrophic growth condition and thereby demonstrate that glucose uptake is not photosensitive for *Chlorella spp.* However, the cell growth is affected by the low light intensity used in this study. More studies of different light intensities and carbon organic concentrations are required to determine the optimum conditions for high biomass productivity to induce high lipid production.

Acknowledgments

This research was supported in part by Rio Tinto Alcan INTL (RTA), the University of Quebec of Trois-Rivières, the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ), BioFuelNet and MITACS. We thank Daniel Reyes and Andrew Diamond for providing technical help.

References

- Andrade L R, Farina M, Filho G M A. (2004). Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 117-125.
- Cheirsilp, B. and Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516.
- Chemeris, Y., Korol'kov, N., Seifullina, N. and Rubin, A. (2004). Changes in the contents of inactive complexes of photosystem II in *Chlorella* cells incubated in the light and darkness. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(3), 287-293.
- Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F-J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1), 21-34.
- Demirbas, A. and Demirbas M. F. (2010). *Algae Energy – Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer London Dordrecht Heidelberg New York, 199 pages, ISBN 978-1-84996-049-6.
- Dubois-Calero, N., Magnin, G. (2011). *System and process for the treatment of gases and effluents, and production of alga biomass*. Patent Application WO/2011/029178.
- Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. A., Kawano, S., Bišová, K., Přibyl, P., Zachleder, V. and Vítová, M. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology*, 144, 268-274.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W. and Hu, B. (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 162(7), 1978-1995.
- Gélinas, M., Lemire, M., Adjallé, K. and Barnabé, S. (2015). Glucose addition in microalgae consortium cultivation as substitute for the absence of CO₂. *Advances in Water Science and Technology*, 1(1), 15-26.

- Gonen-Zurgil, Y., Carmeli-Schwartz, Y., and Sukenik, A. (1996). Selective effect of the herbicide DCMU on unicellular algae a potential tool to maintain monoalgal mass culture of *Nannochloropsis*. *Journal of Applied Phycology*, 8(4), 415-419.
- Greger, M., Tillberg, J-E. and Johansson, M. (1992). Aluminium effects on *Scenedesmus obtusiusculus* with different phosphorus status. II. Growth, photosynthesis and pH. *Physiologia Plantarum*, 84(2), 202-208.
- Komor, E. and Tanner, W. (1973). The Hexose-Proton Symport System of *Chlorella vulgaris*. *European Journal of Biochemistry*, 44 (1), 219-223.
- Lam, M. K. and Lee, K. T. (2013). Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 14, 169-176.
- Ling, Y-K. and Chang, J-S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120-128.
- Maxwell K. and Johnson N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Martínez, F. and Orús, M-I. (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 1011. *Plant Physiology*, 95(4), 1150-1155.
- Murchie, E.H. and Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983-3998.
- Ogbonna, J. and Tanaka, H. (2000). Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 207-218.
- Ouyang, H., Kong, X. Z., He, W., Qin, N., He, Q. S., Wang, Y., Wang, R., and Xu, F. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Chinese Science Bulletin*, 57(25), 3363-3370.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic culture of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.

- Příbyl, P., Cepák, V. and Zachleder, V. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 549-561.
- Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V. and Kawano, S. (2014). Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology*, 158, 127-134.
- Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S. and Raehanah, M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* *Bioresource Technology*, 129, 7-11.
- Yeh, K. L. and Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120-128.
- Zheng, Y., Chi, Z., Lucker, B. and Chen, S. (2012). Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresource technology*, 103 (1), 484-492.

Tables

Table 1. Waster waters elements concentrations from the smelter.

Ion	mg L ⁻¹
Cl ⁻	166.28
Br ⁻	0.58
NO ₃ ⁻	54.48
PO ₄ ⁻	2.01
SO ₄ ²⁻	<LD
Al	0.65
Mn	0.01
Mg	6.65
Mo	0.09
Zn	0.38
F	5.10
Co	<LD
Cr	<LD
Cu	<LD
Fe	<LD
Oil and grease	0.40
Aliphatic hydrocarbons	-

Table 2. Characteristics of different cultivation conditions (adapted from Yeh and Chang, 2012).

Cultivation conditions	Energy source	Carbon source used in this study
Autotrophic	Light	CO ₂
Heterotrophic	Organic carbon	Glucose
Photoheterotrophic*	Light	Glucose
Mixotrophic	Light and organic carbon	Glucose and CO ₂

* Cultured in presence of 10⁻⁴ M DCMU

Table 3. Growth rate and lipids productivity comparison among autotrophic, mixotrophic, heterotrophic, and photoheterotrophic (DCMU + gluc) cultured conditions of *Chlorella spp.*

Productivity	Autotrophy	Mixotrophy	Heterotrophy	DCMU + gluc	DCMU
Growth (cell L ⁻¹ J ⁻¹)	2440.63 ± 864	3248.44 ± 165	5040.63 ± 490	1368.75 ± 103	457.81 ± 110
Lipid (RFU L ⁻¹ J ⁻¹)	0.010 ± 0.01	0.187 ± 0.09	-0.027 ± 0.01	-0.09 ± 0.03	-0.06 ± 0.01

Figure legends

Figure 1. Photosystem II activity of *Chlorella spp*, evaluated by PEA, comparison among autotrophic (A), mixotrophic (M), heterotrophic (H), photoheterotrophic or DCMU+glucose (PH) and only DCMU cultured conditions over the time (n = 2).

Figure 2. Time-dependant cell density augmentation (a) obtained by visual counting, and neutral lipids concentration (b), estimated by Nile Red fluorescence. Each graph is a comparison among autotrophic (A), mixotrophic (M), heterotrophic (H), photoheterotrophic or DCMU + glucose (PH) and only DCMU growth conditions of *Chlorella spp*. (n = 2).

Figures

Figure 1

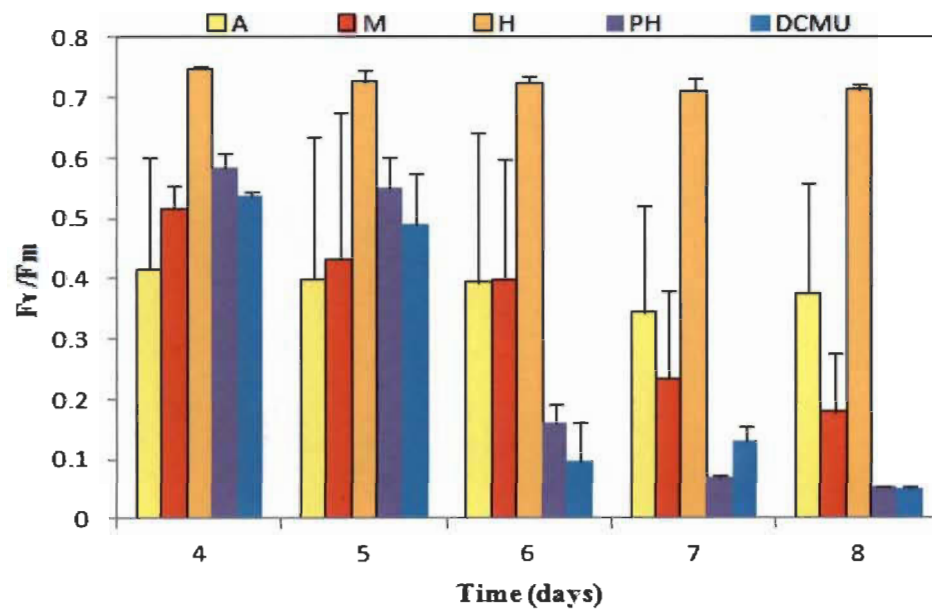
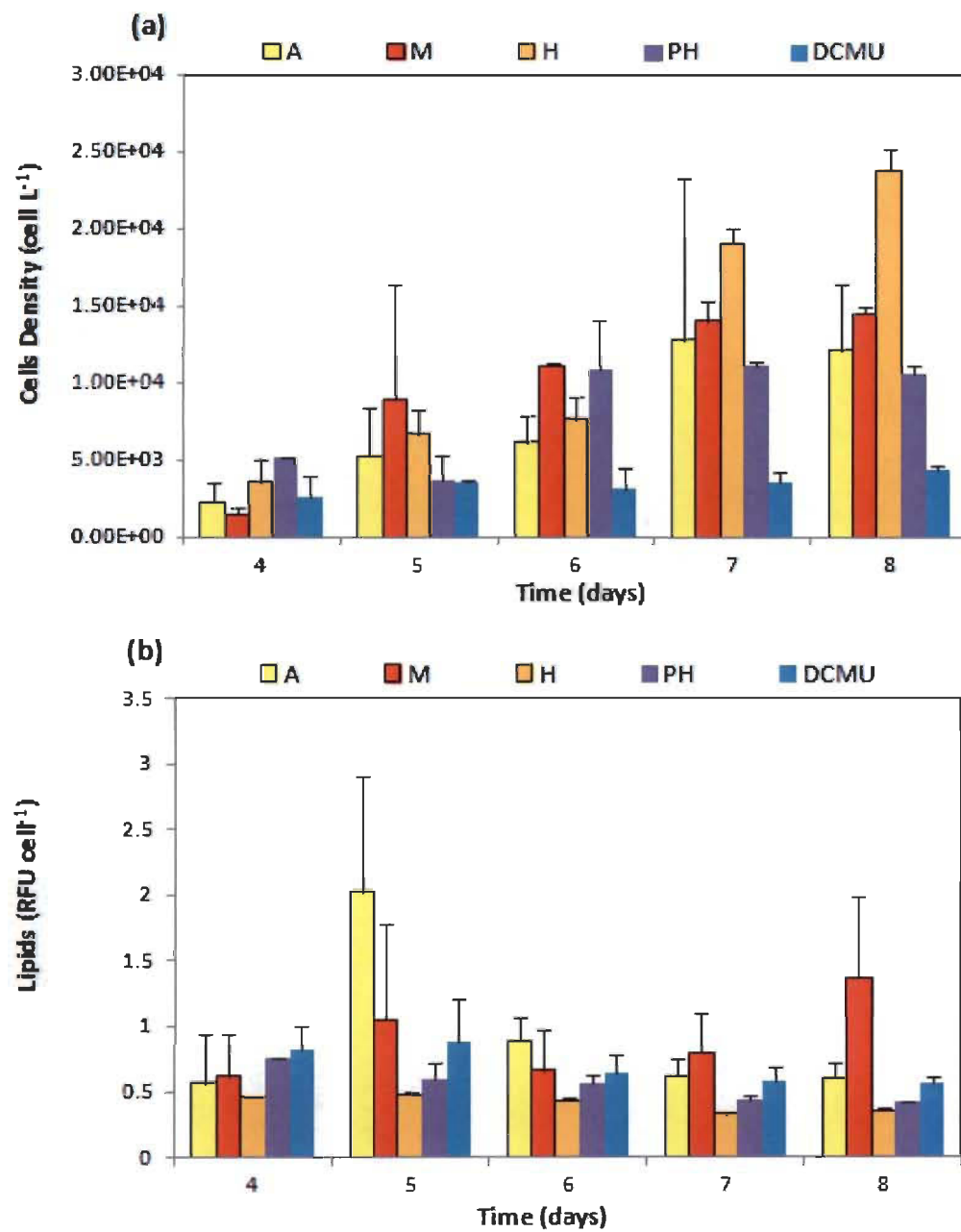


Figure 2



CHAPITRE III

EFFECTS OF LIGHT INTENSITY AND USE OF CO₂ AS CARBON SOURCE FOR *CHLORELLA SPP.* GROWTH IN INDUSTRIAL WASTEWATER

Manuscrit en attente de soumission

M. Lemire¹, M. Gélinas¹, F. Bélanger-Lépine¹, N. Dubois-Calero²,
S. Gaboury³ and S. Barnabé¹

¹ University of Quebec in Trois-Rivières, 3351 Boulv. Des Forges, Trois-Rivières, Qc,
Canada

² AlgaLabs, 1751 Rue Richardson, Montréal, Qc, Canada

³ Rio Tinto Alcan INTL, Arvida R&D Center, 1955 Boulv. Mellon, Jonquière, Qc,
Canada

Corresponding author: Simon Barnabé; Email: simon.barnabe@uqtr.ca;

Phone: 819-376-5011, ext 4531

Abstract

Industrial wastewater and flue gas are waste nutrients and waste energy to reduce the cost of microalgae production in collocation with an existing plant. A study was conducted to investigate the ability of a strain of *Chlorella spp.* to grow and accumulate lipids in the wastewater of a smelter in Quebec, Canada. The light intensity and CO₂ concentration can influence algal growth and were studied in this specific case. CO₂ concentration was increased (from 0.038 to 1% and 2%) according the flue gas concentrations of the smelter. Three different light intensities (20, 44 and 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were also tested. The results showed that cell division and lipid accumulation are stimulated by different culture conditions. When the conditions were monitored at 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 0.038% CO₂ under mixotrophy, *Chlorella spp.* was found to grow favorably. However under autotrophy with 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 1% CO₂ the best lipid accumulation was observed.

Keyword: Industrial flue gas, industrial wastewater, microalgae production, CO₂ concentration, *Chlorella spp.*, light intensity.

Introduction

Industrial processes consume a lot of energy and are responsible for a third of global energy consumption. About 70% of this energy is provided by fossil fuels and emissions related to this consumption account for about 40% of total emissions of carbon dioxide (CO₂) in the world (Brown et al., 2012). Measures have been put in place by many governments to decrease various greenhouse emissions (GES) such as CO₂. In Canada, a decrease of 12% in industrial emissions was observed in 2005 and 11% of total emissions between 2005 and 2010. This reduction is due to several factors, including the installation of emission control technologies in the aluminum industry for example. The use of non-conventional fuels such as biomass in industrial process is also responsible for these reductions (Environment Canada, 2012).

Biomass production is seen as a way for mitigating GES emissions, especially the CO₂ capture, by photosynthesis process. Microalgae have the advantage of being adaptable to different growing methods depending on the species. They can use light as energy source and CO₂ as carbon source via photosynthesis (autotrophy). Autotrophy mode of growth is limited by light availability, but is widely used because of its simplicity. The addition of organic carbon, such as glucose, may also support algae growth (Sforza et al., 2012). In this last case, no light is needed and that are heterotrophic growth conditions. Perez-Garcia et al. (2011) suggested this method of growth for the low cost of facilities and maintenance for a large-scale production. Finally, some microalgae species have the ability to use a third mode of growth called mixotrophy. This last growth pattern allows the algae to switch from autotrophy to heterotrophy, depending on the carbon source availability and light intensity (Chojnacka and Markez-Rocah, 2004; Lam and Lee, 2013).

Some algal species can accumulate up to 20 to 60% of their dry weight in lipid (Demirbas and Demirbas, 2010; Chisti, 2007). Lipid accumulation is influenced by several factors, including the composition of the culture medium and advocated growth method (Lam and Lee, 2013). The use of algal biomass provides many benefits to an industry as replacing some of their fossil fuels consumption, in addition to reducing CO₂

emissions and secures their own biomass production, which remains a factor of success and profitability in the merging bioeconomy.

An industrial facility co-location project was conducted in Quebec, Canada. The industrial wastewater of an aluminium smelter was used as culture medium for lipid-rich microalgae biomass production. In this project, a native consortium of algae and bacteria, mainly dominated by *Chlorella spp.*, and isolated directly from the smelter wastewater, was developed and examined as regards on its growth effectiveness and lipids production in this particular culture medium.

A previous study (Lemire et al., in prep) allowed us to verify the advantageous trophic modes on growth and lipids accumulation of *Chlorella spp.* However, to make the process economical, microalgae production has to mainly rely on waste nutrients and energy from the industrial plan. It was therefore verified in laboratory if the CO₂ concentration from the industrial flue gas of the smelter could be beneficial to the growth and lipid accumulation of the algae-bacteria consortium within second work. Comparison was made with cultures supplemented or not with glucose. It was also verified if the light intensity was limiting for autotrophic or mixotrophic growth conditions.

Material and methods

Microalgal strain and culture medium

The native algae-bacteria consortium was obtained from the aluminium smelter wastewater located in Quebec, Canada, isolated in our laboratory and adapted to a culture medium made of the same smelter wastewater (unpublished data). The smelter wastewater was used throughout the study as culture medium. The wastewater contained (mg L⁻¹): Mn, 0.01; Mo, 0.09; Br⁻, 0.578; Al, 0.65; F, 5.1; Mg, 6,65; Zn, 0.0378; Cl⁻, 166.28; NO₃⁻, 54.48; PO₄⁻, 2.01; wherein was added more nutrients (mg L⁻¹): MgSO₄ 7H₂O, 300; KNO₃, 750; KH₂PO₄ 700 and C₁₀H₁₂FeN₂NaO₈, 28.

Culture conditions

An inoculum size of 50 ml (approximately 3.0×10^4 cell L⁻¹) was added to 450 ml of fresh medium in 1L Erlenmeyer flasks. The cultures were maintained at room temperature for 8 days and constantly stirred at 150 rpm. Different carbon sources were used for the growth of the *Chlorella spp.*, either inorganic carbon (CO₂) and organic carbon (glucose). For the treatment using organic carbon, 0.5 g L⁻¹ of glucose was added twice to the cultures, on day 4 and 6. Glucose consumption by algae was monitored every day by the mean of a Multi Channel Biochemistry Analyser (model 7100, Yellow Springs Incorporated).

For the first experiments, gas was supplied at rate of 0.42 L min⁻¹ using flowmeter (Sho-Rate) through a porous sparging stone lodged onto the flask base. Concentration of CO₂ in the gas stream was adjusted to 1% or 2% with 21% O₂ and nitrogen balance. It was bubbled, from day 4 to 8, in the cultures during 15 minutes every hour during light phase only. Otherwise, atmospheric air was injected into the media. For all of these growth conditions, cultures were under 32 W cool-white fluorescent lamps (20 μmol m⁻² s⁻¹, light/dark cycle: 12/12 h).

On the second experimental step of this study, light intensity was modified but CO₂ remains equal to atmospheric concentration (0.038%). Cool-white fluorescent provided at first, 44 μmol m⁻² s⁻¹ and than 92 μmol m⁻² s⁻¹. These cultures were under the same photoperiod as the previous experiment.

Microalgae photosynthetic efficiency

Photosynthetic activity (Fv/Fm) was measured daily using a handy Plant Efficiency Analyser (PEA; Hansatech Instrument). One ml of microalgal samples were dark adapted for 30 minutes at room temperature, then filtered on glass fiber filters (Whatman Millipore, 934AH) and measurements were made by placing the filter toward the instrument's optical sensor unit.

Microalgae cell density and productivity

Algal cell density was monitored every day by hemacytometer counting. A sample of 10 μL , pre-diluted (HCL) for a maximum concentration of 10^6 cells ml^{-1} , was introduced between the Neubauer plate and the coverslip of a hemacytometer. The hemacytometer was then observed at 100X magnification under electronic microscopy (Binocular Microscope ZEISS Axio Lab.A1, Germany).

The cell productivity was determined according to the formula:

$$\text{Cell productivity: } (D_f - D_i) \Delta t^{-1}$$

where D_f and D_i are the cells density (cell L^{-1}) on day 4 and 8 of the experiments and Δt the cultivation time. The first 3 days were considered as an acclimation phase.

Microalgae lipids accumulation

Nile Red coloration allowed a daily value of neutral lipid accumulated by algae cells. A Nile Red (Sigma) stock solution (10 mg ml^{-1}) was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) at 10%. This solution was directly added to 500 μl of pre-diluted algae in a Sigma phosphate buffer to achieve a final concentration of $20 \mu\text{g ml}^{-1}$. The sample was then incubated in the dark, at room temperature, for 30 minutes. An argon-ion laser probe of a flow cytometer (Cytomics FC500 series, Beckman Coulter) was used to measure the orange fluorescence of neutral lipids. The data were expressed as relative fluorescence intensity units (RFU) measured on a minimum of 5000 cells and maximum 10000 cells. Then the flow cytometer calculated the relative fluorescence per cell (RFU cell^{-1}). Finally, lipids productivity was investigated through the same equation than for the growth rate.

Statistical analysis

All the statistical analyses were performed on data obtained from day 4 to day 8 of the experimentations. Repeated analysis of variance (ANOVA) and mean comparison (Tukey HSD) were used for the treatment comparison among each data set through the JMP pro 11 software. All used statistics were based on a confidence level of 95% hence p value smaller than 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion

In our previous study (Lemire et al., in prep), heterotrophic growth condition led to the highest cell productivity ($5041 \text{ cell L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), while no lipid accumulation was observed. Lipid accumulation was improved by autotrophic condition ($2.23 \text{ RFU cell}^{-1}$), whereas under mixotrophy, the higher lipid productivity ($0187 \text{ RFU cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$) was reached. In the present industrial context, the use of a low organic carbon concentration is desirable, whereas a high cell density and lipid are desired. Microalgae are photosynthetic microorganisms and are able to convert CO_2 to glucose for their growth (Cheah et al., 2014). However, it has been reported that the atmospheric CO_2 concentration (0.038%), as used in our previous work, could not be sufficient to adequately support a microalgae colony (Rahaman et al., 2011). The proximity of algal cultures with the aluminum smelter (RTA) gives the advantage of using the flue gases and increase the concentration of CO_2 in the algal cultures, in addition to reducing biomass production cost (Douskova et al., 2009). Some studies have already demonstrated the possibility of using flue gas as a carbon source (Douskova et al., 2009; Chiu et al., 2011; Cheah et al., 2014). *Chlorella spp.* growing potential and lipid accumulation were investigated at higher CO_2 concentrations.

The increase in CO_2 concentration has generally a positive effect on algal growth. For example, Centeno da Rosa et al. (2011) obtained a maximum biomass of 2.62 g L^{-1} when cultures of *Chlorella kessleri* have been aerated with gas containing 12% CO_2 , which is 4 times higher than the biomass obtained under CO_2 atmospheric concentration.

In a study by Lam and Lee (2013), the growth rate of *Chlorella vulgaris* was increased by 44.90% when the aeration passed from 0.03% to 5% CO₂. However, the increase in CO₂ concentration in our study had no significant effect on the autotrophic growth cultures. By contrast, the maximum cell productivity was reached under atmospheric CO₂ condition (Table 1). The difference might be explained by the different growth modes explored in this work.

A similar phenomenon has been observed for a strain of *Chlorella vulgaris* obtained a better final biomass under 1% CO₂, while a concentration of 12% CO₂ decreased the algal productivity (Lv et al., 2010). These results may be associated with the algal cells conditioning. Indeed, *Chlorella spp.* used in our study was grown under CO₂ atmospheric condition and this condition led to the highest cell productivity (Table 1). Lv et al. (2011) work highlight that algal conditioning to a CO₂ concentration might increase CO₂ tolerance and amending fixation rate. For example, CO₂ fixation ratio decrease from 35% to 2% continuously while CO₂ concentration increase from 0.5% to 12% and the highest biomass was obtained under 1% CO₂. The results were different from their previous work on the same microalgae. The largest CO₂ removal (55.3%) appeared at 0.15% CO₂ and the maximum fixation rate was under 1% CO₂. The difference was that the microalgae strain was pre-adapted to 1% CO₂ before inculcation on the first work (Lv et al., 2011). The difference might also be explained by the low light intensity used in our study. Indeed, Centeno da Rosa et al. (2011) and Lam and Lee (2013) used about 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 60 to 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectively. Light intensity affects photosynthesis, the CO₂ capture rate, biomass concentration and so overall growth (Raeesossadati, 2014).

Figure 1 illustrated the fluorescence yield of chlorophyll. Information on the maximum efficiency of PSII photochemistry is used as a sensitive indicator of photosynthetic potential. In our study, the increase in CO₂ concentration has a positive impact on the F_v/F_m ($p < 0.05$) for the autotrophic cultures. In fact, a slight increase from baseline F_v/F_m can be observed in experiments under 1% and 2% CO₂, from 0.67 to 0.73 and 0.67 to 0.73 respectively. By cons, the final value of F_v/F_m of these two experiments

is lower than obtained when the cultures were subjected to 0.038% CO₂ (0.778). Light has no significant influence on the value of F_v/F_m under autotrophy. On the other hand, increasing the CO₂ concentration ($p < 0.05$) and the light intensity ($p < 0.001$) have a positive effect on mixotrophic cultivations. However, highest F_v/F_m value obtained was 0.80 for autotrophic cultures under atmospheric CO₂ and the lowest light intensity (Figure 1). Value lower than 0.83, might indicate photosystem II disorder in response to stress (Maxwell and Johnson, 2000). Indeed, our results suggest that atmospheric CO₂ concentration and light intensity of 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ are not sufficient to effectively support maximal growth of *Chlorella spp.* However, increasing the light intensity and the concentration of CO₂ simultaneously would possibly lead to a highest growth rate. On the other hand, glucose supplement had a significant stimulation ($p < 0.001$) on the growth of *Chlorella spp.* strain (Table 1).

Organic carbon is essential to *Chlorella spp.* growth under insufficient light conditions (Martínez and Orús, 1991). According to Martínez and Orús (1991), the growth rate of *Chlorella vulgaris* supplemented with glucose ($3.16 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$) exceeded the cultures without glucose ($1.95 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$) under the same light intensity, or cultures under the dark condition with glucose ($1.90 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$). The results of our study are consistent with these authors. Indeed, the cell productivity in mixotrophy was greater than obtained under autotrophic conditions (Table 1). Even by increasing the CO₂ concentration to 1% and 2%, mixotrophic cell productivity was 4 and 2 times respectively higher than under autotrophy. Unlike values obtained by Martínez and Orús (1991), it is only under the highest light intensity ($5577 \text{ cell L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) than the cell productivity exceeded the value under heterotrophy ($5041 \text{ cell L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) of our previous work (Lemire et al., in prep). The glucose consumption by the algae strain was monitored every 24 hours throughout of the experiments. Glucose was completely consumed 24 hours after addition for all experiments, except for 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. During this experiment, slightly more than half of the glucose was consumed 24 hours after the first addition. However, 48 hours later, glucose was no longer detected. On the other hand, no glucose was detected in the culture medium the next day following the second glucose addition. This can be explained because the cell density was

1.3 times higher on day 7 than on day 5 (Figure 2-a). This result suggests that *Chlorella spp.* utilized glucose as supplementary carbon source if the light is limiting for growth. Furthermore, the same intensity did not carry out lipid accumulation, a decrease of 0.02 RFU cell d⁻¹ can be observed for mixotrophy. However, no accumulation or significant lipid loss was recorded for cultures under autotrophy (Table 1).

The light supply strongly influences cell growth, CO₂ fixation by the photosynthetic system and also can change the biochemical composition of microalgae, such as lipids or carbohydrates (Ho et al., 2012). Lv et al. (2010) showed that a luminous intensity of 60 μmol m⁻² s⁻¹ can lead to pH, NADPH and Mg²⁺ changes at the same time than a biomass and lipid content increase. Comparatively, no significant change in lipid content of *Scenedesmus obliquus* is observed by Ho et al. (2012) in respect to light intensity. Maximum productivity was obtained at 420 μmol m⁻² s⁻¹, which is about 3 times higher than the values obtained under 60 μmol m⁻² s⁻¹ of the same work. Increasing the light intensity did not lead to a significant lipid accumulation by *Chlorella spp.* in our study (Table 1). On day 6, under 1% CO₂ and the lowest light intensity, the highest lipid accumulation (3.08 RFU cell⁻¹) was obtained (Figure 3). It is also under 1% CO₂ that the final lipid accumulation was the highest (1.19 RFU cell⁻¹). On day 6, a slight lipid increase could also be observed for the cultures under 2% CO₂. For these two experiments, a decrease in cell density may also be observed on this day. Results suggested that cell productivity harmed lipid accumulation. Lv et al. (2010) suggested that while adaptation period to a new environment, *Chlorella vulgaris* strain assimilates almost no nutrients, suppressing cell division and directly promoting lipid accumulation. Consequently, lipid content is slightly higher in latency phase than in log phase.

Figure 2 showed the growth and lipid accumulation of *Chlorella spp.* under autotrophy (Figure 2-a) and mixotrophy (Figure 2-b). Under mixotrophic growth, no decrease in cell growth was associated with a lipid increase. These results suggested that the strain *Chlorella spp.* used glucose as energy source for cell division. In addition, at the last day of the experiment, it can be seen that the stationary phase of growth was

not achieved. Indeed, during the last days, an increased number of cells and a decrease in lipid accumulation were visible to all growth conditions. These values suggested that the culture time should be extending to obtain a highest lipid concentration.

Conclusion

In summary, the growth of algae-bacteria consortia, mostly dominated by *Chlorella spp.*, can be improved by increasing light intensity under mixotrophy. The increase of the CO₂ concentration of the aeration gas for autotrophic cultures led to a lipid accumulation increase. This work suggests that the CO₂ present in the gaseous emissions of the aluminum smelter represent an appropriate concentration to be used as carbon source for lipids production by the algal biomass. However, it was under mixotrophy growth condition that the highest cell density was recorded. Additional works focusing on the effects of increased light intensity and CO₂ concentration simultaneously over longer cultivation period is required.

Acknowledgments

This research was supported in part by Rio Tinto Alcan INTL (RTA), the University of Quebec of Trois-Rivières, the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ), BioFuelNet and MITACS. We thank Daniel Reyes and Andrew Diamond for providing technical help.

References

- Brown, T., Gambhir, A., Florin, N. and Fennell, P. (2012). Reducing CO₂ emissions from heavy industry: a review of technologies and considerations for policy makers. *Grantham Institute for Climate Change Briefing paper*, 7, 1-32.
- Centeno da Rosa, A. P., Carvalho Fernandes, L., Goldbeck, L. and Costa Vieira, J. A. (2011). Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52(8), 3071-3073.
- Cheah, W. Y., Show, P. L., Chang, J-S., Ling, T. C. and Juan, J. (2015). Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresource Technology*, 184,190-201.
- Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F-J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1), 21-34.
- Chiu, S-Y., Kao, C-Y., Huang, T-T., Lin, C.-J., Ong, S-C., Chen, C-D., Chang, J-S. and Lin, C-S., (2011). Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella sp.* cultures. *Bioresource Technology*, 102(19), 9135-9142.
- Demirbas, A. and Demirbas M. F., (2010). *Algae Energy – Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer London Dordrecht Heidelberg New York, 199 pages, ISBN 978-1-84996-049-6.
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., Machat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V. and Vitova, M. (2009). Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 179-185.
- Environnement Canada (2012). Tendances en matière d'émissions au Canada 2012. Canada. ISBN: 978-1-100-99582-3.
- Ho, S-H., Chen, C-Y. and Chang, J-S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244-252.

- Lam, M. K. and Lee, K. T. (2013). Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 14, 169-176.
- Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L. and Chen, H.L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101(17), 6797-6804.
- Martínez, F. and Orús, M-I. (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 1011. *Plant Physiology*, 95(4), 1150-1155.
- Maxwell K. and Johnson N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic culture of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- Raesossadati, M.J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M.P. and Moheimani, N.R. (2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Research*, 6, 78-85.
- Rahaman, M. S. A., Cheng, L-H., Xu, X-H., Zhang, L. and Chen, H-L. (2011). A review of carbon dioxide capture and utilization by membrane integrated microalgal cultivation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 4002-4012.
- Sforza, E. Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertucco, A. and Giacometti, Giorgio M. (2012). Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 104, 523-529.

Tables

Table 1. Cells ($\text{cell L}^{-1}\text{d}^{-1}$) and lipids ($\text{RFU cell}^{-1}\text{d}^{-1}$) productivity of *Chlorella spp.* under tree different CO_2 concentrations and light intensities.

Environnemental conditions		Autotrophy productivity		Mixotrophy productivity	
CO_2 (%)	Light ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Cell ($\text{cell L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Lipids ($\text{RFU cell}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Cell ($\text{cell L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Lipids ($\text{RFU cell}^{-1} \text{d}^{-1}$)
0.038	20	2440.63	-0.06	3248.44	-0.10
1	20	1015.63	0.10	4309.38	-0.06
2	20	1792.19	-0.06	3545.31	-0.08
0.038	44	596.88	0.02	4225.00	0.03
0.038	92	1151.56	-0.01	5576.56	-0.012

Figure legends

Figure 1. Initial and final photosystem II activity of *Chlorella spp*, evaluated by PEA, comparison among autotrophic and mixotrophic cultured conditions over the time (n = 2).

Figure 2. Effect of three CO₂ concentrations (atm, 1 and 2%) and light intensity (20, 44 and 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on cell density and lipids accumulation under autotrophic (a) and mixotrophic (b) growth conditions of *Chlorella spp* (n = 2).

Figures

Figure 1

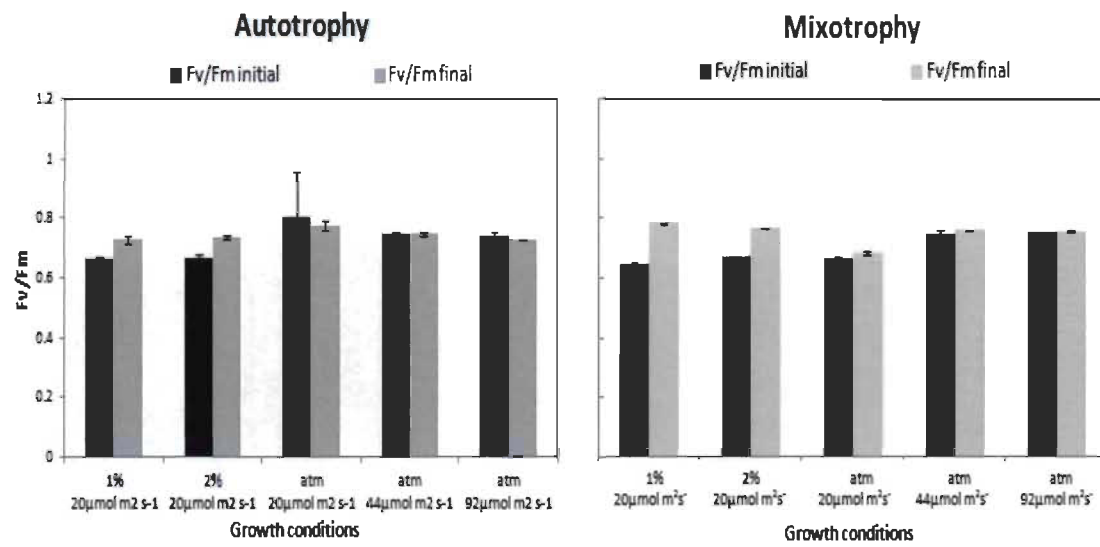
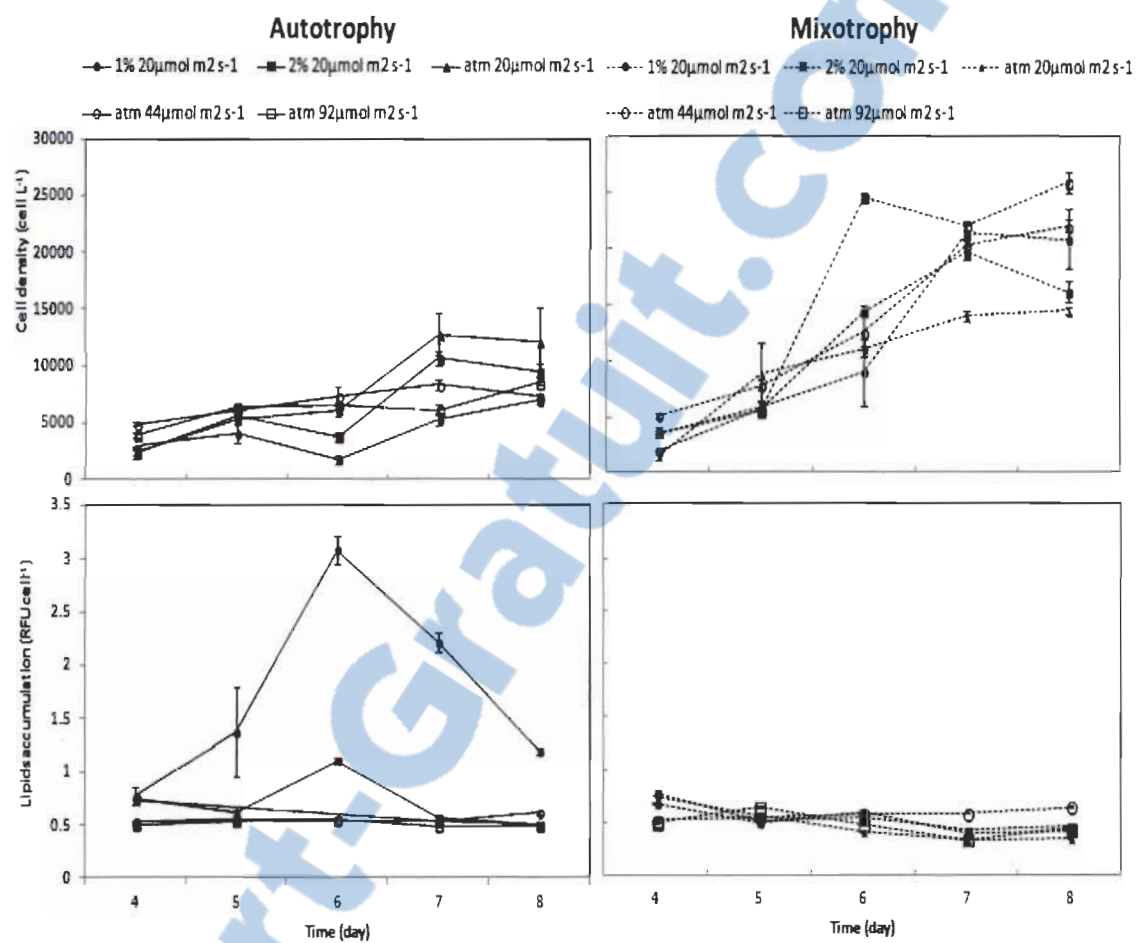


Figure 2



CHAPITRE IV

CONCLUSION

L'objectif général de ce projet de recherche portait sur l'étude et l'amélioration des modes trophiques envisageables pour une production de microalgues dans les eaux usées d'une aluminerie en co-habitation avec celle-ci. Les eaux usées issues de l'industrie de l'aluminium ont démontré leur capacité à soutenir la croissance de la souche indigène *Chlorella ssp.* L'ajout de glucose dans le milieu de culture s'est avéré avantageux pour la croissance microalgale. L'augmentation de l'intensité lumineuse a eu un effet positif sur les cultures mixotrophes seulement. Cependant, aucune différence majeure dans la densité cellulaire finale n'est observée entre les conditions de croissance hétérotrophe et mixotrophe (Chapitre II – Figure 2; Chapitre III – Figure 2). Également, aucune différence significative n'est observée quant à l'augmentation de la concentration en CO₂ sur la croissance microalgale, contrairement à son effet sur l'accumulation lipidique. En effet, c'est à une concentration en CO₂ de 1 % que l'accumulation lipidique la plus importante a été observée (Chapitre III – Figure 2). Ce résultat est très intéressant car la concentration actuelle du CO₂ des émissions gazeuses de l'usine d'Alma de RTA se situe entre 0,5 et 1 %.

Les résultats de cette étude suggèrent que les modes de croissance hétérotrophe et mixotrophe favoriseraient l'augmentation de la densité cellulaire. Pour sa part, l'autotrophie serait plus avantageuse pour l'accumulation lipidique. L'utilisation de carbone organique pour la croissance mixotrophe ou hétérotrophe ajoute des coûts non négligeables à la culture microalgale. Ainsi, d'autres travaux devront porter sur l'utilisation de sources alternatives de carbone organique, ainsi que les coûts s'y rattachant. De plus, des travaux additionnels devront porter sur l'effet de l'augmentation de l'intensité lumineuse et de la concentration en CO₂ simultanément, afin de représenter le plus fidèlement possible les conditions environnementales extérieures. Pour des raisons pratiques et économiques, il serait plus avantageux d'utiliser la croissance

autotrophique. Aucune source de carbone organique n'est requise, les gaz de cheminées sont disponibles pour l'ajout de CO₂ et l'intensité lumineuse devrait être plus élevée en bassins extérieurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amaro, H.M., Guedes, A.C. and Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402-3410.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, Burlington, USA, 578 pages, ISBN 0-12-0888426-7.
- Bélaïr, V., Bertrand, N. and Benyagoub, M. (2012). *Aspects technologiques et commerciales de la valorisation industrielle de microalgues dans les secteurs nutraceutique et énergétique*. CRIBIQ, 131 pages.
- Belkoura M. and Dauta A. (1994). Caractéristiques photosynthétiques de *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss, en relation avec l'intensité lumineuse et la température. *Corrélation avec le taux de croissance. Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 30(1), 3-9.
- Bouarab, L., Dauta, A. and Loudiki, M. (2004). Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Research*, 38(11), 2706-2712.
- Burrell, R.B., Inniss, W.E. and Mayfield, C.I. (1984). Development of an optimal heterotrophic growth medium for *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 281-283.
- Centeno da Rosa, A. P., Carvalho Fernandes, L., Goldbeck, L. and Costa Vieira, J. A. (2011). Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52(8), 3071-3073.
- Cheng, L., Zhang, L., Chen, H. and Gao, C. (2006). Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 50(3), 324-329.
- Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F-J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1), 21-34.

- Chiu, S-Y., Kao, C-Y., Tsai, M-T., Ong, S-C., Chen, C-H. and Lin, C-S. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource technology*, 100(2), 833-838.
- Chiu, S-Y., Kao, C-Y., Huang, T-T., Lin, C.-J., Ong, S-C., Chen, C-D., Chang, J-S. and Lin, C-S., (2011). Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella sp.* cultures. *Bioresource Technology*, 102(19), 9135-9142.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. and Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- Dauta, A. (1982). Conditions de développement du phytoplancton. Étude comparative du comportement de huit espèces en culture. 1. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 18(3), 217-262.
- Elmoraghy, M. and Farag, I-H., (2012). Green Approach to Produce Bio-Jet Fuel from Microalgae. *Technology in Sustainable Energy*, 6, 23-25.
- Fan, L-H., Zhang, Y-T., Zhang, L. and Chen, H-L. (2008). Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science*, 325(1), 336-345.
- Farineau, J. and Morot-Gaudry, J.F. (2011). La photosynthèse Processus physiques, moléculaires et physiologiques. Quae, 403 pages. ISBN : 978-2-7592-0903-3.
- Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. A., Kawano, S., Bišová, K., Přibyl, P., Zachleder, V. and Vítová, M. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology*, 144, 268-274.
- Fu, W. Gudmundsson, O. Feist, A-M. Herjolfsson, G. Brynjolfsson, S. and Palsson, B. (2012). Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 242-249.
- Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y. and Wu, Q. (2010). Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Applied Energy*, 87(3), 756-761.

- Gonen-Zurgil, Y., Carmeli-Schwartz, Y., and Sukenik, A. (1996). Selective effect of the herbicide DCMU on unicellular algae a potential tool to maintain monoalgal mass culture of *Nannochloropsis*. *Journal of Applied Phycology*, 8(4), 415-419.
- Han, F., Huang, J., Li, Y., Wang, W., Wang, J., Fan, J. and Shen, G. (2012). Enhancement of microalgal biomass and lipid productivities by a model of photoautotrophic culture with heterotrophic cells as seed. *Bioresource Technology*, 118, 431-437.
- He, Q., Yang, H., Wu, L. and Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219-228.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W. and Hu, B. (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 162(7), 1978-1995.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 54(4), 621-660.
- Hulatt, C. J. and Thomas, D. N. (2011). Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, 102(10), 5775-5787.
- Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Zhou, W., Dong, R. and Yuan, Z. (2012). Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresource Technology*, 121, 76-82.
- Jacob-Lopes, E., Gimenes-Scoparo, C. H., Queiroz, M. I., Franco, T. T. (2010). Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Conversion and Management*, 51(5), 894-900.
- Jørgensen, E. G. (1964). Adaptation to different light intensities in the diatom *Cyclotella meneghiniana kütz.* *Physiologia Plantarum*, 17(1), 136-145.
- Komor, E. and Tanner, W. (1973). The Hexose-Proton Symport System of *Chlorella vulgaris*. *European Journal of Biochemistry*, 44 (1), 219-223.
- Lalucat, J., Imperial, J., Parés, R. (1984). Utilization of Light for the Assimilation of Organic Matter in *Chlorella sp.* VJ79. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(7), 677-681.

- Lam, M. K. and Lee, K. T. (2013). Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 14, 169-176.
- Lamers, P., Janssen, M., Vos, R., Bino, R. and Wijffels, R. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, 162, 21-27.
- Li, X. X. and Wu, H., Q. (2007). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 764-771.
- Ling, Y-K. and Chang, J-S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120-128.
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y. and Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of autotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 106-110.
- Lu, S., Wang, J., Niu, Y., Yang, J., Zhou, J. and Yuan, Y. (2012). Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1651-1662.
- Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L. and Chen, H.L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 101(17), 6797-6804.
- Martínez, F. and Orús, M-I., (1991). Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 1011. *Plant Physiology*, 95(4), 1150-1155.
- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
- Maxwell K. and Johnson N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Miao, X. and Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 85-93.

- Morais, M. and Costa, J. (2007). Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp.* cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters*, 29(9), 1349-1352.
- Moser, B. R. and Vaughn, S. F. (2012). Efficacy of fatty acid profile as a tool for screening feedstocks for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 37, 31-41.
- Ogbonna, J. and Tanaka, H. (2000). Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3), 207-218.
- Onwudili, J.A., Lea-Langton, A.R., Ross, A.B. and Williams, P.T. (2013). Catalytic hydrothermal gasification of algae for hydrogen production: composition of reaction products and potential for nutrient recycling. *Bioresource Technology*, 127, 72-80.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic culture of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G. and Simões, M. (2012). Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3043-3053.
- Pittman, J.K., Dean, A.P. and Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17-25.
- Přibyl, P., Cepák, V. and Zachleder, V. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 549-561.
- Raeesossadati, M.J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M.P. and Moheimani, N.R. (2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Research*, 6, 78-85.
- Rahaman, M. S. A., Cheng, L-H., Xu, X-H., Zhang, L. and Chen, H-L. (2011). A review of carbon dioxide capture and utilization by membrane integrated microalgal cultivation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 4002-4012.
- Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichkom, S.E. (2007). *Biologie végétale 2ème Édition*. De Boeck Université, 733 pp. ISBN : 978-2-8041-5020-4.

- Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T. and Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biodiesel production. *Applied Energy*, 88 (10), 3411-3424.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture*. Blackwell Science Ltd, USA, 584 pages. ISBN 0-632-05953-2.
- Safonova, E., Kvitko, K. V., Iankevitch, M. I., Surgko, L. F., Afti, I. A. and Reisser, W. (2004). Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia. *Engineering in Life Sciences*, 4(4), 347-353.
- Sargent, D. F., Taylor, C. P. S. (1972). Light-induced inhibition of respiration in DCMU-poisoned *Chlorella* caused by photosystem I activity. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 13-21.
- Sforza, E. Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertucco, A. and Giacometti, Giorgio M. (2012). Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource Technology*, 104, 523-529.
- Shang, H., Scott, J.A., Shepherd, S.H and Ross, G.M. (2010). A dynamic thermal model for heating microalgae incubator ponds using off-gas. *Chemical Engineering Science*, 65(16), 4591-4597.
- Steemann Nielsen, E., Hansen, V. Kr. and Jørgensen, E. G. (1962). The adaptation to different light intensities in *Chlorella vulgaris* and the time dependence of transfer to a new light intensity. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 505-517.
- Sydney, E. B., Sturm, W., De Carvalho, J. C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A. and Soccol, C. R. (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, 101(15), 5892-5896.
- Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V. and Kawano, S. (2014). Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology*, 158, 127-134.
- Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S. and Raehanah, M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7-11.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J. and Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), 29-36.

- Xiong, W., Liu, L., Wu, C., Yang, C. and Wu, Q. (2010). ^{13}C -tracer and gas chromatography-mass spectrometry analyses reveal metabolic flux distribution in the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. *Plant Physiology*, 154(2), 1001-1011.
- Xu, H., Miao, X. and Wu Q. (2006). High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 499-507.
- Yang, J., Rasa, E., Tantayotai, P., Scow, K.M., Yuan, H. and Hristova, K.R. (2011). Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 102(3), 3077-3082.
- Yeh, K. L., Chang, J. S. and Chen, W., M. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), 201-208.
- Yeh, K. L. and Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120-128.
- Zhang, X.W., Zhang, Y-M. and Chen, F. (1998). Kinetic models for phycocyanin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21(6), 283-288.
- Zheng, Y., Chi, Z., Lucker, B. and Chen, S. (2012). Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresource technology*, 103 (1), 484-492.
- Znad, H., Naderi, G., Ang, H.M. and Tade, M.O. (2012). CO_2 biomitigation and biofuel production using microalgae: photobioreactors developments and future directions. In Z. Nawaz (dirr) *Advances in Chemical Engineering* (p. 229-244). Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-chemical-engineering/co2-biomitigation-and-biofuel-production-using-microalgae-photobioreactors-developments-and-future-d>. ISBN: 978-953-51-0392-9.