

Traitement des eaux usées dans des bioréacteurs multitrophiques grâce à des flocs de microalgues-bactéries valorisables en biogaz

Olfa Beji

▶ **To cite this version:**

Olfa Beji. Traitement des eaux usées dans des bioréacteurs multitrophiques grâce à des flocs de microalgues-bactéries valorisables en biogaz. Génie des procédés. Université de Lorraine; Université de Carthage (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018LORR0289 . tel-02110006

HAL Id: tel-02110006
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02110006

Submitted on 25 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Traitement des eaux usées dans des bioréacteurs multitrophiques grâce à des flocs de microalgues-bactéries valorisables en biogaz

THÈSE

14 décembre 2018
pour l'obtention du

Thèse en cotutelle de l'Université de Carthage (Tunisie) et l'Université de Lorraine (France)
Domaine: Génie des Procédés et des Produits et des Molécules

par

Olfa BEJI

Ecoles Doctorales
Sciences et Ingénierie des Molécules, Procédés, Produits et Energie
et
Sciences et Technologies pour l'Ingénieur, INSAT

Unités de recherche

LRGP (UMR 7274) et LETMi (INSAT)

Membres du jury

Mme Kenza BENZADOK	Professeure, Univ. USTHB - Algérie	Rapporteure
Mme Fatma HAMAEID	Maître de conférences, CNSTN , Technopole Sidi Thabet - Tunis	Rapporteure
M. Christophe VIAL	Professeur, Polytech, Univ. UBP - Clermont-Ferrand	Examinateur
M. Huai Zhi LI	Professeur, LRGP, ENSIC, Univ. Lorraine - Nancy	Directeur de thèse
M. Moktar HAMDI	Professeur, LETMi, INSAT, Univ. Carthage - Tunisie	Directeur de thèse
Mme Nouceiba ADOUANI	Maître de conférences, LRGP, ENSIC, Univ. Lorraine - Nancy	Invitée
Mme Souhila PONCIN	Maître de conférences, LRGP, ENSIC, Univ. Lorraine - Nancy	Invitée

Liste des travaux relatifs à la thèse

Publication dans un revue à comité de lecture

(1) Beji, O., Adouani, N., Poncin, S., Li, H. Z., Hamdi, M. (2018). Mineral pollutants removal through immobilized microalgae-bacterial flocs in a multitrophic microreactor. *Environmental Technology*.

Communication orales à des congrés internationaux et nationaux

(1) Beji, O., Adouani, N., Poncin, S., Li, H. Z., Hamdi, M. Micro-scale wastewater treatment and nutrients removal using microalgal bacterial flocs entrapped in gelling matrix of PVA-alginate.**The 11ème Congrès international du GRUTTEE – ENSI Poitiers**, Poitiers, Octobre 2016.

(2)Beji, O., Adouani, N., Poncin, S., Pons, M.N., Li, H. Z., Hamdi, M.Multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC) with microalgae bacterial-flocs for pollutants removal.**The 7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts**, Hyatt Regency, Miami, FL, USA, June 2017.

(3)Beji, O., Adouani, N., Poncin, S., Pons, M.N., Li, H. Z., Hamdi, M. Impacts of hydrodynamic conditions on pollutants removal using immobilized microalgae-bacteria flocs in multiscale multitrophic reactors.**National congress:"30ème anniversaire de la Société Française de Génie des Procédés,** Nancy, Juillet 2017.

Remerciements

Ce travail a été effectué en coopération entre les deux laboratoires Technologie et Ecologie Microbienne à l'INSAT- Tunisie et le laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP, CNRS UMR 7274) àl'ENSIC, au sein desquelles j'ai trouvé une ambiance amicale dont je garderai un excellent souvenir. Je tiens tout d'abord à remercier M. Laurent Falk, directeur du laboratoire LRGP, pour m'avoir accueillie au sein de son établissement de recherche.

J'exprime ma gratitude à Moktar Hamdi, Directeur du Laboratoire LETMi et Professeur à l'INSAT pour m'avoir permis, en tant que mon directeur de thèse, d'effectuer mes travaux de recherche au sein de son laboratoire. Je lui suis reconnaissante pour son ouverture d'esprit, son soutien, nos discussions scientifiques toujours fructueuses ainsi que les opportunités de collaboration qu'il m'a offertes.

J'exprime mes profonds remerciements à Huai Zhi Li, mon directeur de thèse à l'Université de Lorraine, pour son encadrement, pour son soutien, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa patience et son encouragement à finir ce travail dans les délais.

Je suis très reconnaissante à Souhila Poncin et Nouceiba Adouani, mes co-directeurs de thèse et Maîtres de Conférences à l'Université de Lorraine pour leur soutien technique, leur disponibilité et leurs conseils expérimentaux et rédactionnels qui m'ont été d'une grande importance afin de bien structurer ce travail. Une pensée particulière à Mme Marie Noëlle Pons, Directeur de recherche au sein de l'équipe Sols et Eaux -LRGP, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et sa rigueur scientifique.

J'aimerai également exprimer toute ma gratitude à Kenza Bensadok et Fatma Hmaied, Maîtres de conférences à l'Université d'Alger et à Technopole CNSTN à Tunis, pour avoir accepté d'être rapporteures de ce projet de thèse. Mes remerciements s'adressent aussi à Christophe Vial, professeur à Polytechnique Clermont Férrond, pour avoir accepter de participer à mon jury de thèse et d'examiner ce travail.

Merci aux rencontres nationales et internationales que j'ai pu faire durant ces quatre années : Meriem Belhadj, Divyesh Arora, Laura Turri, Rana Hatoum, Rainier Hreiz, Xiaofeng Jiang…

Je dédie ce travail à ma famille et j'adresse mes plus profonds sentiments à mes parents, mon petit frère et mon mari pour leur soutien, leurs encouragements et leur investissement pour réussir mon projet professionnel.

NOMENCLATURE

Abréviations

MaB-flocs: Microalgae-Bacteria flocs

PBR : Photobioréacteur

CSC : Captage et stockage du CO_2

CO_2 : Dioxyde de carbone

SBR : Sequencing Batch Reactor

MMBR : Microscale multitrophic batch reactor

PVA : Polyvinyl Alcohol

H_3BO_3 : Acide borique

$(C_6H_7O_6Na)_n$: Solution d'alginate

Na_2SO_4 : Solution de sulfate

HRT : Hydraulic Retention Time

WWs : Synthetic wastewater

BBM : Bold's Basal Medium

QS : Quorum Sensing

AHL : Acyl-Homosérine-Lactones

DCO: Chemical Oxygen Demand

DA : Digestion Anaérobie

RBM : Rendement Biochimique en Méthane

CH_4 : Méthane

D_L : Liquid Digestate

S_L : Liquid Slurry

MFBBR : Multitrophic Fluidization Biofilm Bed Reactor

OPP : Olive Pit Powder

Chl(a): Chlorophylle(a),

PO_4-P: Phosphore

NH_4-N: Ammonium NH_4-N

NO_2^- : Nitrite

NO_3^- : Nitrate

R_{CO2} : Taux de fixation du CO_2

P: Productivité Biomasse

M_{CO2}: Poids moléculaire du dioxyde de carbone

M_C: Poids moléculaire du carbone

C_{CO2}: Contenu de CO_2.

H_2CO_3: Acide carbonique

HCO_3 : Carbonate d'hydrogène

CO_3^{-2} : Carbonate

$H_2PO_4^-$: Dihydrogène de Phosphate

HPO_4^{2-} : Hydrogène de Phosphate

TN : Azote Total

TP : Phosphore Total

HRAPs : High Rate Algal Ponds

GHG : Greenhouse Gasses

SEM : Scanning Electron Microscope

TSS : Total Suspended Solids

VSS : Volatile Suspended Solids

Chl(a) : Chlorophyll (a) concentration

AI : Autotrophic Index

MRBC : Multitrophic Rotating Biofilm Contactor

α_s: Solid fraction

U_g : Débits de gaz

ε : Gas holdup

ρ : Bulk density

£ : Porosity

K_m : Kinetic constan

D_m : Mean diameter des flocs

SOMMAIRE

Introduction générale et objectifs……..1

CHAPITRE I. Les acquis scientifiques……4

I.1. Valorisation de la biomasse algale……..9

I. 2. Evolution des bactéries et des microalgues……..19

I.3. Ecologie des interactions entre les microalgues-bactéries…….22

I.4. Récupération de la biomasse des flocs-MaB par bio-floculation……..28

I.5. Applications potentielles des flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB)……30

I.6.Valorisation des flocs-MaB par une co-digestion anaérobie et bioremédiation des digestats…….37

I.7. Les défis actuels des consortiums de flocs-MaB et les besoins de recherche……...41

I.8. Conclusion…….42

I.9. Positionnement et démarche expérimentale……..43

CHAPITRE II. Approche à multi-échelle d'élimination des polluants en utilisant des flocs de microalgues-bactéries (MaB-flocs) immobilisés dans des polymères PVA-alginate……...47

II.1. Introduction……..48

II.2. Microréacteur en batch pour l'élimination des polluants organiques et minéraux en utilisant de flocs de bactéries-microalgues immobilisées…….48

II.3. Impacts des conditions hydrodynamiques sur l'élimination des polluants en utilisant des flocs de bactéries-microalgues immobilisés dans des réacteurs multitrophiques à multi-échelles……..86

II.4. Conclusion générale……...100

CHAPITRE III. Etude de faisabilité des flocs de microalgues-bactéries fixés sur des poudres d'olives biodégradables pour le traitement des eaux usées……..101

III.1. Introduction……...102

III.2. Effet des propriétés des granules d'olive contenant des flocs de bactéries-microalgues sur l'élimination des polluants dans un réacteur lit fluidisé-SBR à biofilms……..102

III.3. Conclusion générale……..134

CHAPITRE IV. Etude de faisabilité des flocs de microalgues-bactéries dans un réacteur à disques rotatifs pour le traitement des eaux usées…..135

IV.1. Introduction……...136

IV.2. Traitement des eaux usées dans un réacteur à disques rotatifs à base de microalgues-bactéries flocs……..136

IV.3. Conclusion générale……...……162

CHAPITRE V. Valorisation de la biomasse des flocs-MaB par une co-digestion anaérobie pour la production de biogaz……163

V.1. Introduction……164

V.2.Valorisation de la biomasse multitrophique MaB-flocs pour la production de biogaz par une co-digestion anaérobie et recyclage des nutriments à partir du digestat……..164

V.3. Conclusion générale……194

Conclusion générale et perspectives……...195

Références bibliographiques……...201

Résumé……..213

Abstract……214

Introduction générale et objectifs

La décharge continue des eaux usées produites principalement par des activités anthropiques, telles que les pratiques agricoles, urbaines et industrielles, pose un problème majeur sous forme d'une pollution grave associée au phénomène d'eutrophisation (Gonçalves et al., 2017). Au cours de ce phénomène, l'enrichissement des ressources d'eau en nutriments, principalement de l'azote et du phosphore, entrainait la proliférations des algues aquatiques et par la suite l'appauvrissement en oxygène ce qui provoque la dégradation des écosystèmes avec une perte d'espèces clés (Renuka et al., 2013; Ruiz et al., 2013). Cela prouve clairement le besoin pour des méthodes de traitement efficaces, capables de réduire les concentrations d'azote et de phosphore dans les eaux usées avant de les décharger dans les ressources naturelles. La méthode la plus commune utilisée comprend des processus biologiques, tels que la digestion anaérobie suivie de la nitrification et de la dénitrification (Renuka et al., 2013) qui sont nécessaires pour atteindre les niveaux d'éléments nutritifs acceptés par la législation de l'UE. En addition, ces méthodes de traitement dits tertiaires nécessitent plusieurs réservoirs et des recyclages internes de boues activées, ce qui entraîne une augmentation globale des coûts de traitement et une complexité d'énergie (Singh et al., 2012). Afin de surmonter ces inconvénients, un traitement biologique à l'aide des microalgues photosynthétiques (eucaryotes et procaryotes) a été largement étudié au cours des dernières décennies (Renuka et al., 2013). D'autre part, la biomasse algale pourrait être un substrat ayant un potentiel énergétique considérable. En effet, les microalgues sont actuellement considérées comme des ressources renouvelables servant à la production de biogaz. L'utilisation des microalgues pour la production du méthane leur offrent une particularité très importante, c'est que leur production n'entraîne pas de concurrence avec les approvisionnements alimentaires contrairement aux biocarburants de première génération. Dans le but d'améliorer ces systèmes de phyto-bioremédiation, une nouvelle alternative à base du couplage multitrophique entre les microalgues et les bactéries a été intégrée sans apport d'oxygène et dégagement de CO_2.

Le projet de thèse en cotutelle intitulé "Traitement des eaux usées dans des bioréacteurs multitrophiques grâce à des flocs de microalgues-bactéries valorisable en biogaz" s'inscrit dans le cadre de l'économie circulaire combinée à la lutte contre le changement climatique et la pollution des ressources naturelles. Il vise à réduire l'impact du dioxyde de carbone sur le climat par son recyclage dans un procédé symbiotique de culture de microalgues-bactéries afin de promouvoir le développement durable et l'économie verte.

Ce travail comporte deux volets:

-Volet 1 (1/3 des travaux de la thèse): Etude biologique qui a été traitée au sein du laboratoire Technologie et Ecologie Microbienne à l'INSAT- Tunisie.

-Volet 2 (2/3 des travaux de la thèse): Etude des écoulements polyphasiques et approche multi-échelle qui a été effectuée en partenariat avec le laboratoire Réaction et Génie des procédés (LRGP, CNRS UMR 7274) à l'Université de Lorraine.

Lors de cette coopération, plusieurs technologies sont regroupées et différentes disciplines sont couplées tels que la biotechnologie, la génie chimie, l'hydrodynamique et la génie procédés afin de mettre en œuvre les principales actions de recherche et atteindre les objectifs ultimes.

Cette étude s'appuie sur des procédés intégrés, innovants et respectueux de l'environnement dans l'objectif de réduire les polluants (organiques et minéraux) dans les eaux usées domestiques et de produire du biogazmoyennant des opérations à base de biomasse algale. Un tel contexte a motivé le lancement d'une démarche dans l'optimisation du fonctionnement de nouveaux photobioréacteurs multitrophiques destinés au traitement des eaux usées par les flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB).

La démarche envisagée lors de cette thèse s'appuie sur le fait que l'efficacité des flocs-MaB pour l'élimination des polluants dépend à la fois du processus de traitement adopté, des conditions opératoires, des conditions environnementales etdes propriétés physico-chimiques de l'influent. On peut ainsi, en variant ces paramètres, contrôler les interactions symbiotiques mises en jeu entre ces micro-organismes et développer des systèmes de phyto-bioremédiation ayant les propriétés désirées. De plus, la valorisation de cette biomasse mutitrophique de flocs-MaB permet de produire de la bioénergie et de recycler les polluants à la sortie du digesteur afin d'obtenir ZERO rejet.

Les travaux effectués dans le cadre du projet de thèse s'organisent principalement sur cinq axes:

- Chapitre I, présente une synthèse des acquis scientifiques axée sur la description des mécanismes d'interaction entre les microalgues-bactéries. Différentes applications potentielles de ce couplage, à biomasse en suspension ou fixe, sont identifiées avec une focalisation sur les taux d'élimination des polluants et la production de biomasse valorisable dans ces process.

- Chapitre II, présente une première application des flocs-MaB afin d'étudier leur efficacité dans des systèmes immobilisés sous forme de billes de PVA-alginate.Une approche originale à multi-échelle permettra d'étudier l'évolution morphologique des flocs et leur performance à éliminer les polluants dans des microréacteurs en batch avec et sans recirculation de l'influent et dans une colonne 2D à méso-échelle.
- Chapitre III, étudie la faisabilité des flocs-MaB attachés sur des matériaux originaux biodégradables sous forme de poudres d'olive pour le traitement des eaux usées dans un réacteur à lit fluidisé.
- Chapitre IV, décrit un procédé de traitement des eaux usées à base de biofilm multitrophique dans un bioréacteur à disques rotatifs.
- Chapitre V, étudie un prétraitement du digestat à la sortie du digesteur déjà installé sur une ferme à Nancy et le recyclage des polluants moyennant une biomasse multitrphique de flocs-MaB. La valorisation de cette culture sera intégrée dans une co-digestion anaérobie afin d'améliorer la production de biométhane.

Pour des raisons d'organisation, nous avons fait le choix de détailler les différents protocoles expérimentaux utilisés dans le cadre de cette thèse dans chaque chapitre à part.En plus, les résultats sont obtenus sous forme d'articles soumis ou à soumettre. Finalement, une conclusion générale synthétise l'ensemble des résultats.

Chapitre I: Les acquis scientifiques

Chapitre I: Les acquis scientifiques……...4

I.1. Valorisation de la biomasse algale……....9

I.1.1. Classification taxonomique des algues……...9

I.1.2. Systèmes de culture des microalgues - Technologies de photobioréacteurs……10

I.1.2.1. Types de réacteurs……..10

I.1.2.2. Les paramètres de croissance……..12

I.1.2.3. Les conditions de culture……13

I.1.3. Captage et stockage du CO_2 (CSC)……14

I.1.3.1. Méthode biologique de capture et stockage de CO_2 par les microalgues……14

I.1.3.2. Mécanisme de photosynthèse……15

I.1.4. Assainissement des eaux usées par les microalgues……16

I.1.4.1. Les caractéristiques des eaux usées……16

I.1.4.2. Les mécanismes d'élimination des nutriments adoptés par les microalgues……17

I.1.4.3. Le rôle des consortiums de microalgues dans l'élimination des polluants……18

I. 2. Evolution des bactéries et des microalgues…..……19

I.2.1. L'évolution de la multicellularité des algues - les bactéries jouent-elles un rôle?..19

I.2.2. Régulation du cycle cellulaire des microalgues……..20

I.3. Ecologie des interactions entre les microalgues-bactéries……..…….22

I.3.1. Les types d'associations entre les microalgues-bactéries…….22

I.3.1.1. Mutualisme……23

I.3.1.2. Commensalisme……23

I.3.1.3. Parasitisme……24

I.3.2. Les Habitats…….……24

I.3.2.1. Phycosphère : un micro-environnement intime……24

I.3.3. Les mécanismes d'interaction…….....25

I.3.3.1. Rôle de l'état nutritionnel dans la structure des communautés bactériennes et algales, leur diversité et leur interaction……..25

I.3.3.2. Communication moléculaire "Quorum Sensing"……..26

I.4. Récupération de la biomasse des flocs-MaB par bio-floculation ……...28

I.5. Applications potentielles des flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB)……..30

I.5.1. Systèmes de traitement des eaux usées avec de cellules suspendues……....30

I.5.1.1. Systèmes "ouverts"……30

I.5.1.2. Systèmes "fermés"……30

I.5.2. Systèmes de traitement des eaux usées avec des cellules immobilisées.……...33

I.5.2.1. Systèmes d'immobilisation des MaB-flocs dans des polymères: Matrices d'encapsulation……34

I.5.2.2. Systèmes d'immobilisation des flocs-MaB dans des réacteurs à biofilm microalgal-bactérien……35

I.6. Valorisation des flocs-MaB par une co-digestion anaérobie et bioremédiation des digestats……....37

I.6.1. Co-digestion anaérobie des flocs-MaB pour la production du méthane…….37

I.6.1.1. Facteurs affectant la co-digestion anaérobie……39

I.6.2. Valorisation des digestats anaérobies comme étant des sources nutritives utiles pour la culture des flocs-MaB……....40

I.7. Les défis actuels des consortiums de flocs-MaB et les besoins de recherche…….41

I.8. Conclusion……..…..42

I.9. Positionnement et démarche expérimentale…….43

Liste des Figures

Figure I.1. Classification des microalgues: (a) les diatomées (*Bacillariophyceae*); (b) vert (*Chlorophyceae*):[1. *Desmotetra*, 2. *Stigeoclonium*, 3. *Desmodesmus*, 4. *Chlamydomonas*, 5. Pediastrum, 6. Volvox]; (c) les cyanobactéries bleues et bleu-vert (*Cyanophyceae*); (d) doré (*Chrysophyceae*); et (e) des algues rouges (*Rhodophyceae*)(adapté à partir de http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/fedor_kara/gallery.htm)……...……..9

Figure I.2. Principales configurations des PBRs: (a) Colonne à bulles; (b) Air-lift; (c) PBR tubulaires, (d) Plaque plane, (e) Etang Raceway (Yadav *et al*., 2017)…….11

Figure I.3. Diagramme des paramètres de croissance des microalgues…….…….12

FigureI.4. .Diagramme de processus de la photosynthèse: réactions dépendante de la lumièreet réactions sombres (cycle Calvin-Benson) (d'après Van Den Hende, 2014)……..…16

Figure I.5. Evolution multicellulaire des différentes espèces d'algues (Hallmann, 2006): A, Colonie rhomboïdale et plate de *Gonium pectorale* avec 16 cellules maintenues ensemble par une matrice; B, Colonie ellipsoïde de *Pandorina morum* avec 16 cellules rapprochées et entourées de très peu de matrice; C, Colonie sphérique d'*Eudorina unicocca* avec 32 cellules, dans une matrice distincte et volumineuse; D, Sphéroïde de *Volvox carteri* contenant environ 2000 petites cellules somatiques; E, Sphéroïde de *Volvox tertius* contenant environ 1000 petits cellules somatiques; F, Sphéroïde de *Volvox globator* contenant environ 3000 petites cellules somatiques…….20

Figure I.6. Photomicrographies à fluorescence de la coénobie de *Scenedesmus quadricauda* au cours du cycle cellulaire colorées avec 0,3% de colorant SYBR vert. (A) cellule fille uninucléaire coénobium; les noyaux sont visibles comme des taches vertes; les chloroplastes sont visibles en couleur rouge qui est une autofluorescence de la chlorophylle; (B) Cénobium binucléaire; (C) Cénobium tétranucléaire; (D) Cénobium octonucléaire de la mère; les cellules en division sont restées non colorées. Bar = 10 µm……..21

Figure I.7. Les étapes de la division pendant l'embryogenèse chez *Pandorina morum*. A_1: Cellule avant le début du clivage, $A_{2\text{-}5}$: 4 clivages de cellules longitudinales, une plakée à 16 cellules est formée; A_6: Vue latérale de la plakea à 16 cellules (Hallmann, 2006)…….……22

Figure I.8. Interaction microalgue-bactérienne dans un système à étang pour le traitement des eaux usées (Oswald *et al*., 1953)……25

Figure I.9. Interactions coopératives (✓) et compétitives (X) établies entre les micro-algues et les bactéries (adaptées par Munoz et Guieysse, (2006))……26

Figure I.10. Réponse de la micro-algue *Chlorophyta* sp. aux molécules de détection de QS bactérien (N-Acylhomoserine Lactones): Auto-agrégation (adaptée par (Zhou *et al*., 2017)..27

Figure I.11. Processus de récolte de la biomasse des flocs-MaB (Gerardo *et al*., 2015)…...29

Figure I.12. Processus de traitement des eaux usées avec les flocs-MaB (1) et production de biogaz (2) (Wieczorek *et al*., 2015)……...38

Figure I.13. Diagramme récapitulatif du processus en boucle fermée avec zéro déchet rejeté……41

Liste des Tableaux

Tableau I.1. Conditions de culture des microalgues……..…..13

Tableau I.2. Mécanismes impliqués dans l'élimination des nutriments (carbone, ammonium, phosphore) par les microalgues (Gonçalves *et al*., 2017)……17

Tableau I.3. Applications des consortiums de micro-algues/bactéries pour l'élimination de l'azote, du phosphore et du carbone dans différentes eaux usées et des rendements d'élimination respectifs (Gonçalves *et al*., 2017)……32

Tableau I.4. Avantages et limites des systèmes suspendus et immobilisés (Gonçalves *et al*., 2017)……....33

Tableau I.5. Classification des polymères d'encapsulation……..……..34

Tableau I.6. Application des consortiums d'algue et d'algue-bactérie dans des systèmes immobilisés……...35

I.1. Valorisation de la biomasse algale

I.1.1. Classification taxonomique des algues

Les microalgues sont l'une des formes les plus primitives des plantes.Les algues appartiennent à des groupes diversifiés de micro-organismes photosynthétiques allant des unicellulaires (microalgues ou phytoplancton) aux multicellulaires (macroalgues ou filamenteuses) dont la taille est inférieure à 400 µm et dont le diamètre est normalement compris entre 1 et 30 µm (Raheem *et al*., 2015; Sambusiti *et al*., 2015; Bharathiraja *et al*., 2015). Les biologistes ont classé les microalgues en fonction de leur cycle de vie, leur structure cellulaire de base et de la variation de leur pigmentation photosynthétique, à savoir les algues vertes, bleue-vertes, rouges, brunes et dorées (Chen *et al*., 2015).

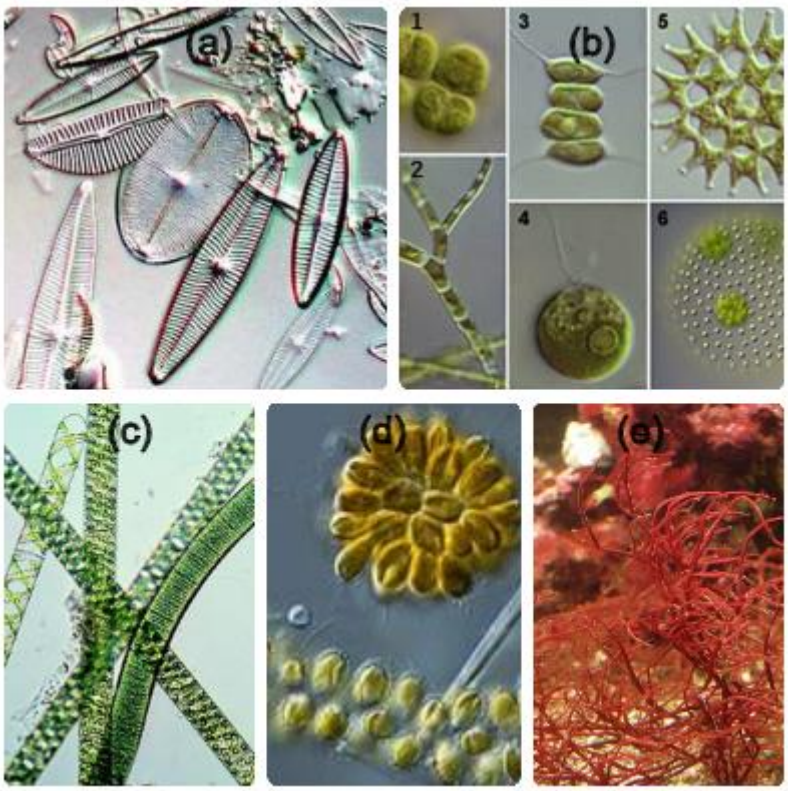


Figure I.1. Classification des microalgues: (a) les diatomées (*Bacillariophyceae*); (b) vert (*Chlorophyceae*):[1. *Desmotetra*, 2. *Stigeoclonium*, 3. *Desmodesmus*, 4. *Chlamydomonas*, 5. Pediastrum, 6. Volvox]; (c) les cyanobactéries bleues et bleu-vert (*Cyanophyceae*); (d) doré (*Chrysophyceae*); et (e) des algues rouges (*Rhodophyceae*)

(adapté à partir de ce lien: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/fedor_kara/gallery.htm)

Les classes les plus importantes de microalgues en termes d'abondance sont illustrées dans la Figure I.1:(a) les diatomées (*Bacillariophyceae*); (b) vert (*Chlorophyceae*); (c) les

cyanobactéries bleues et bleue-verte (*Cyanophyceae*); (d) doré (*Chrysophyceae*); et (e) des algues rouges (*Rhodophyceae*) (Vassilev *et al*., 2016).En effet, les diatomées représentent la forme de vie la plus dominante et le groupe le plus producteur de biomasse sur Terre (Demirbas *et al*., 2011). Les microalgues, diatomées et cyanobactéries ont des tailles de cellules allant de 0,5-200µm et adoptent différentes formes: allongées, filamenteuses ou sphériques (Gerardo *et al*., 2015). En outre, ces micro-organismes peuvent être regroupés en photosynthètiques, non-photosynthétiques, autotrophes, hétérotrophes, mixotrophiques, procaryotes et eucaryotes (Sambusiti *et al*., 2015; Bharathiraja *et al*., 2015). Par conséquent, ces micro-organismes contenant de la chlorophylle simple sont capables de capturer le CO_2 émis de sources variées et de le convertir en biomasse algale, pendant la photosynthèse, en présence de la lumière, l'eau, les nutriments et la température appropriée (Sambusiti *et al*., 2015; Bharathiraja *et al*., 2015). On estime environ 55 000 espèces et plus de 100 000 souches d'algues disponibles dans différents écosystèmes marines, saumâtres, d'eau douce et terrestres (Bharathiraja *et al*., 2015). Récemment, l'accent a été mise sur l'utilisation de la biomasse algale pour diverses applications bénéfiques, y compris le traitement des eaux usées et la production de bioénergie (biocarburants)(Rosenberg *et al*., 2008).

I.1.2. Systèmes de culture des microalgues - Technologies de photobioréacteurs

I.1.2.1. Types de réacteurs

La sélection du système de culture des microalgues est la clé d'une élimination efficace et pratique des nutriments à partir des eaux usées et une production élevée de la biomasse (Razzak *et al*., 2017). Généralement, les systèmes de cultures de microalgues diffèrent principalement selon le coût, le type de produits désirés etla source de nutriments. Ces systèmes sont généralement classés selon leurs conditions de conception en tant que systèmes "ouverts" ou "fermés" (Razzak *et al*., 2017). En effet, les photobioréacteurs "fermés" (PBR) pour la croissance des microalgues sont plus avantageux parce que les conditions de culturesont strictement contrôlées et optimisées afin d'atteindre des concentrations cellulaires plus élevées(Gonçalves *et al*., 2017). En plus, l'évaporation et les contaminations sont facilement évitées. Ainsi, plusieurs configurations classiques de systèmes fermés sont mentionnées dans la Figure I.2 telles que la colonne à bulles, l'airlift, les PBRs tubulaires (horizontaux et hélicoïdaux), la plaque plane (Kumar *et al*., 2011). Malgré ces avantages, les PBRs présentent certaines limites en termes de sur-chauffage, des difficultés de mise à

l'échelle industriellecausées par l'accrochage de la biomasse et des coûts de construction plus élevés (Posten *et al*., 2009).

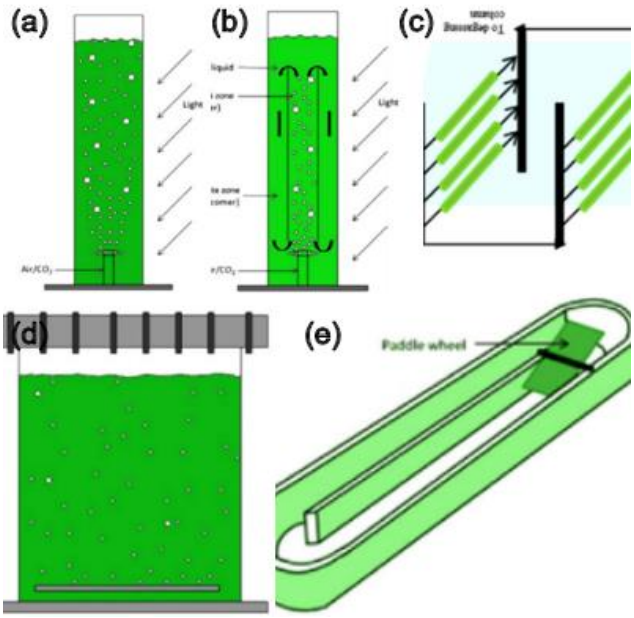


Figure I.2. Principales configurations des PBRs: (a) Colonne à bulles; (b) Air-lift; (c) PBR tubulaires, (d) Plaque plane, (e) Etang Raceway(Yadav *et al*., 2017).

D'autre part, les systèmes "ouverts" sont des installations extérieures qui peuvent être divisées en deux catégories: les étangs naturels (lacs etlagunes) et les étangs artificiels ou les conteneurs (Posten *et al*., 2009). Les bassins ouverts tels que le Raceway(Figure I.2), le réservoir d'étang circulaire et le grand étang peu profond, sont les plus couramment utilisés pour la culture de microalgues et pour la séquestration de CO_2 directement à partir de l'atmosphère ambiante (Parmar *et al*., 2011). En outre, les bassins circulaires (pivot central) sont les plus anciens étangs ouverts et ont été principalement utilisés pour la culture de *Chlorella* sp. à une grande échelle en particulier en Asie du Sud-Est (Lee *etal*., 2001). D'un point de vue économique, bien que la production de microalgues dans les systèmes "ouverts" est plus importante, les coûts de construction et d'exploitation sont réduits (Posten *et al*., 2009; Razzak *et al*., 2017). En revanche, ces systèmes sont plus sensibles à la diffusion de CO_2 dans l'atmosphère, aux pertes par évaporation de l'eau, aux contaminants et à la mauvaise utilisation de la lumière par les cellules (Posten *et al*., 2009).

I.1.2.2. Les paramètres de croissance

La croissance des microalgues peut être influencée par un certain nombre de facteurs biotiques ainsi que des facteurs abiotiques (Yadav *et al*., 2017). Les facteurs biotiques comprennent la présence d'agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons, les virus et la compétition avec d'autres microalgues, tandis que les facteurs abiotiques comprennent l'intensité lumineuse (qualité et quantité), la température, le pH, la salinité, le CO_2 dissous et la présence de composés toxiques (Gonçalves *et al*., 2017). La Figure I.3 présente un aperçu schématique des facteurs et des conditions affectant la croissance et la productivité de la biomasse des microalgues (Razzak *et al*., 2017).

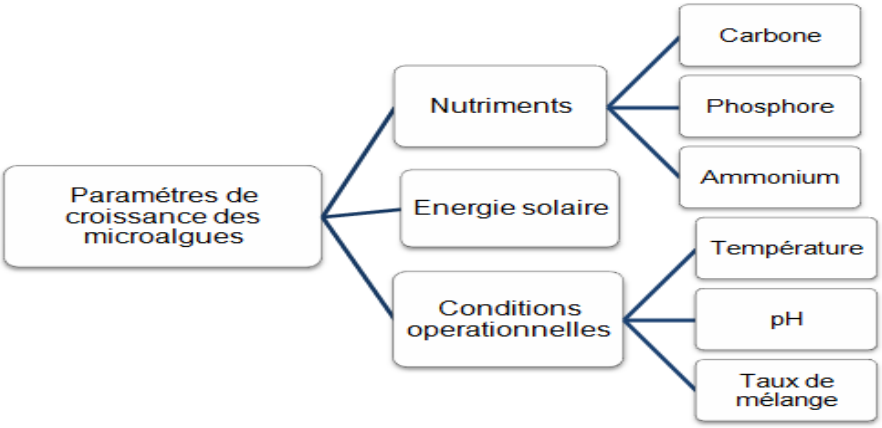


Figure I.3. Diagramme des paramètres de croissance des microalgues

La croissance photoautotrophique des microalgues se fait en présence de lumière qui représente la source d'énergie utilisée pour convertir le carbone inorganique (CO_2) en carbone organique (Gonçalves *et al*., 2017). La qualité et la quantité de la période de lumière (photopériode) sont indispensables pour le processus de photosynthèse (Yadav *et al*., 2017). Plusieurs études tels que Posadas et al. (2013), ont montré une performance importante des systèmes de traitement des eaux basés sur le couplage de la biomasse algale en adoptant des cycles de lumière/obscurité de 16h/8h. La température optimale pour la croissance des microalgues est spécifique à l'espèce et varie dans la gamme de 15-30°C (Yadav *et al*., 2017). En ce qui concerne l'effet du pH, la majorité des espèces de microalgues est cultivée dans un intervalle de pH compris entre 7 et 9 (Yen *et al*., 2014). Généralement, les milieux acides (pH 5-7) sont favorables à la croissance des algues eucaryotes dans l'eau douce tandis que les milieux alcalins (pH 7-9) sont bénéfiques pour la croissance des cyanobactéries (algues bleu-vert) (Razzak *et al*., 2013). En terme d'apport nutritionnel, le principal nutriment requis pour la croissance des microalgues autotrophes est le carbone inorganique, puisqu'il est le

précurseur des réactions photosynthétiques (Gonçalves *et al*., 2017). En effet, la croissance des microalgues dépend d'autres nutriments, tels que l'azote et le phosphore. Ces nutriments sont nécessaires à la synthèse des acides nucléiques et des protéines (Gonçalves *et al*., 2017). Leur présence à des concentrations limitées peut entraîner des taux de croissance réduits et des productivités faibles de biomasse (Gonçalves *et al*., 2017). Pour obtenir une culture active de microalgues, il est très important d'optimiser suffisamment les conditions opérationnelles, telles que le temps de séjour hydraulique, le taux d'aération et d'agitation dans le milieu pour que les nutriments, la lumière, la température et les gaz CO_2 et O_2 soient disponibles uniformément dans tout le réacteur (Cheah *et al*., 2015). En ce qui concerne l'élimination des nutriments et la capture du CO_2, les chercheurs ont étudié activement les effets des conditions de culture sur la croissance cellulaire des microalgues.

I.1.2.3. Les conditions de culture

Les microalgues peuvent se développer dans différentes conditions selon les sources d'énergie et de carbone utilisés. Le Tableau I.1 rapporte une comparaison entre les conditions de la croissance des microalgues basées sur le type de source d'énergie et de carbone (Razzak *et al*., 2017).

Tableau I.1. Conditions de culture des microalgues

Conditions de culture	**Source d'énergie**	**Source de carbone**
Phototrophique	Lumière	Carbone inorganique
Heterotrophic	Carbone organique	Carbone organique
Photoheterotrophique	Lumière	Carbone organique
Mixotrophique	Lumière et carbone organique	Carbone organique et inorganique

Culture photoautotrophie: La croissance des microalgues photoautotrophes se produit en présence de la lumière visible et du carbone inorganique dans le milieu de culture comme la seule source de carbone (Razzak *et al*., 2017).

Culture hétérotrophe: Dans la culture hétérotrophe, les microalgues utilisent de la matière organique carbonéeà la fois comme une source d'énergie et comme une source unique de carbone. Par conséquent, la lumièren'est plus nécessaire pour la croissance cellulaire (Huang *et al*., 2010) ce qui rend cette culture comme la moins chère. En culture hétérotrophe,la conception du réacteur et la mise à l'échelle pour le traitement des eaux sont relativement moins difficiles (Perez-Garcia *et al*., 2011).

Culture mixotrophique: Dans la culture mixotrophique, les microalgues peuvent se développer d'une manière autotrophie ou hétérotrophie en fonction de la disponibilité de la lumière et de la concentration en carbone (Mata *et al*., 2010).

I.1.3. Captage et stockage du CO_2 (CSC)

Diverses stratégies telles que la séparation physique et l'utilisation desolvants chimiques, ont été adoptées pour la fixation de CO_2 libéré par les centrales électriques, les unités de fabrication de ciment et les raffineries. En particulier, la méthode biologique a été considérée comme une nouvelle alternative prometteuse de captage et de stockage de CO_2 (CCS) (Yadav *et al*., 2015). Le dioxyde de carbone peut être converti par le processus de la photosynthèse à l'aide des microalgues en matière organique en utilisant la lumière comme source d'énergie (Razzak *et al*., 2017). De toute évidence, les microalgues possèdent une efficacité de fixation du CO_2 10 à 50 fois plus élevée que les plantes terrestres (Yadav *et al*., 2017; Razzak *et al*., 2017). Ce processus pourrait être combinée avec d'autres processus comme le traitement des eaux usées et serait avantageux pour offrir plus de faisabilité économique et de durabilité environnementale (Razzak *et al*., 2017).

I.1.3.1. Méthode biologique de capture et stockage de CO_2 par les microalgues

La conversion biologique du CO_2 par les microalgues photosynthétiques entraine également la production de précieux métabolites photosynthétiques ayant diverses applications industrielles (Yadav *et al*., 2015). L'avantage majeur de l'utilisation des microalgues dans ce processus est que leur biomasse contient environ 50% de carbone par matière sèche de cellulesavec 1,83 kg de CO_2 capturé par kg de biomasse produite (Chisti *et al*., 2007). Ainsi, il a été démontré que la production de 100 T de biomasse algale fixe environ 183 T de gaz carbonique (Chisti *et al*., 2007). En effet, la teneur en carbone peut fournir une estimation plus précise de la quantité de CO_2 consommée par les cellules de microalgues. Sur cette base, le taux de capture de CO_2 peut être estimé commesuite:(**Eq.1**)(Razzak *et al*., 2017)

$$R_{CO2} = P.\ C_{CO2}\ (M_{CO2}/M_C), \quad (1)$$

où R_{CO2} est le taux de fixation du CO_2 (g. L^{-1}.$jour^{-1}$), P est la productivité biomasse (g. L^{-1}. $jour^{-1}$), M_{CO2}est le poids moléculaire du dioxyde de carbone, et M_C est le poids moléculaire du carbone. C_{CO2} est le contenu de carbone dans la biomasse algale obtenue à partir de CO_2. Cependant, des études menées par Chiu et al. (2009) rapportent la variation de la concentration maximale de la biomasse entre 0,099 g. L^{-1} et 1,445 g. L^{-1} pour des concentration de 15% et 2% de CO_2, respectivement. Par conséquent, bien que les micro-algues puissent se développer dans une large gamme de concentrations de CO_2, elles préfèrent une concentration de CO_2 optimale pour maximiser leur biomasse. Pendant le temps de culture, il est fréquent d'observer une augmentation du pH due à l'absorption de CO_2 (Yen *et al*., 2014) en raison des équilibres chimiques établis entre les espèces suivantes: CO_2, H_2CO_3 , HCO_3^- et CO_3^{2-} (Van Den Hende *et al*., 2012; Yen *et al*., 2014): (**Eq. 2 et 3**)

$$CO_{2(g)} + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \Longleftrightarrow HCO_3^- + H^+ \quad (2)$$

$$HCO_3^- \Longleftrightarrow CO_3^{2-} + H^+ \quad (3)$$

Une fois le CO_2 gazeux réagit avec l'eau, l'acide carbonique H_2CO_3 se forme puis se dissocie instantanément pour former du carbonate d'hydrogène (HCO_3) et carbonate CO_3^{-2} (Kumar *et al*., 2011). L'absorption de CO_2 par les cellules de microalgues est principalement réalisée en ces deux formes autres que le CO_2 direct qui se produit avec un taux beaucoup plus réduit (Yadav *et al*., 2017).

I.1.3.2. Mécanisme de photosynthèse

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques qui sont capables de capter la lumière via l'absorption des photons par les unités photosynthétiques (PSU) et de convertir cette énergie lumineuse en énergie chimique à travers leurs pigments principaux (chlorophylle(a), chlorophylle(b), le carotène et xanthophylle) (Yadav *et al*., 2017) a photosynthèse se produit en deux phases: la lumière et l'obscurité comme a été illustrée dans la Figure I.4 suivante.Ainsi, lorsqu'il fait jour, les réactions dépendent de la lumière et sont principalement impliquées dans la synthèse de molécules riches en énergie telles que l'adénosine triphosphate (ATP) et le Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) dans les thylakoïdes. L'équation globale pour les réactions dépendantes de la lumière est (Razzak *et al*., 2013): (**Eq. 4**)

$$2H_2O + 2NADP^+ + 3ADP + 3P + light \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + 3ATP + O_2 \quad (4)$$

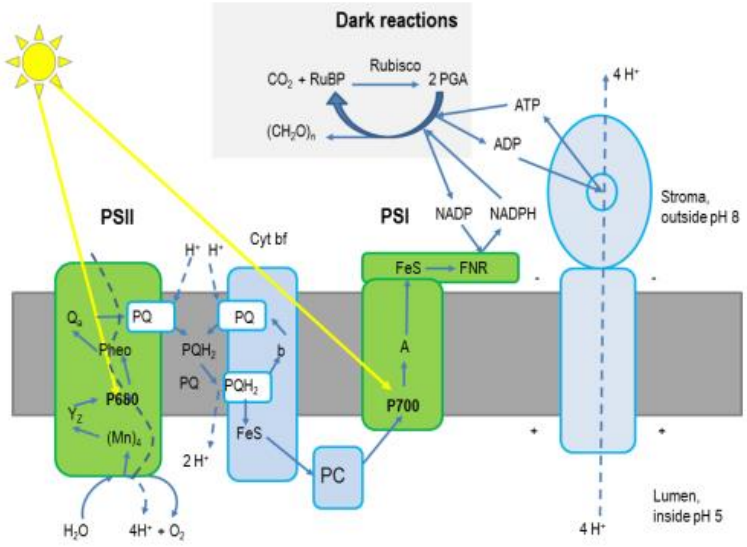


Figure I.4. Diagramme de processus de la photosynthèse: réactions dépendante de la lumière et réactions sombres (cycle Calvin-Benson) (d'après Van Den Hende, 2014)

D'autre part, la fixation du CO_2 se produit dans le stroma des chloroplastes pendant la phase sombre, où sont localisés toutes les enzymes et les intermédiaires du cycle de Calvin.Pendant cette réaction, le CO_2 provenant de l'atmosphère ou d'autres sources de gaz de combustion est converti en sucre à l'aide d'ATP par l'activité carboxylase de l'enzyme ribulose -1, 5-bisphosphate carboxylase (RuBP)/oxygénase (Rubisco). La réaction globale de la photosynthèse peut être décrite par une simple équation empirique (Zhao *et al*., 2014): (**Eq. 5**)

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{Lumière}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \quad (5)$$

Le mode le plus commun d'absorption du carbone inorganique (Ci) par les cellules *C. reinhardtii* (un organisme modèle chez les microalgues) passe directement par l'absorption du Ci à travers la membrane plasmique et l'enveloppe de chloroplaste via un transporteur actif ou diffusion passive de CO_2 (Yadav *et al*., 2017).

I.1.4. Assainissement des eaux usées par les microalgues

I.1.4.1.Les caractéristiques des eaux usées

Les eaux usées contiennent des quantités significatives de nutriments propices à la croissance des algues. Les nutriments peuvent être classés dans les catégories suivantes: (i) source de carbone issue du CO_2, (ii) une source d'énergie provenant de la lumière, (iii) une source

d'azote (par exemple de l'ammoniac, nitrates) des eaux usées ou d'autres milieux de culture, (iv) des minéraux provenant des milieux de culture et (v) des vitamines potentiellement ajoutées (Razzak *et al*., 2013). Pour évaluer l'utilisation des microalgues dans le traitement des eaux usées, les rapports molaires azote / phosphore (N: P) influencent fortement la production de biomasse microalgale et donc l'absorption des nutriments (Gonçalves *et al*., 2017). Ainsi, les rapports molaires N: P inférieurs à 5: 1 entraînent une limitation de l'azote, alors que les rapports molaires N: P supérieurs à 30: 1 entraînent une limitation du phosphore (Larsdotter *et al*., 2006).

I.1.4.2. Les mécanismes d'élimination des nutriments adoptés par les microalgues

Dans le but d'améliorer les processus d'assainissement des eaux usées en utilisant des microalgues, il est très important de comprendre les mécanismes impliqués dans l'élimination des nutriments. Le Tableau I.2 résume les mécanismes adoptés dans l'élimination du carbone, de l'azote et du phosphore par les microalgues (Gonçalves *etal*., 2017).

Tableau I.2. Mécanismes impliqués dans l'élimination des nutriments (carbone, ammonium, phosphore) par les microalgues (Gonçalves *et al*., 2017).

Nutriments	**Mécanismes**	**Incorporation cellulaire**
CO_2	Intégration du cycle de Calvin	Diffusion (5<pH<7) Transport actif (pH>7)
Carbone organique	Intégration de la respiration	Diffusion-Transport actif
Ammonium NH_4-N	Conversion directe en acide-aminé Transport actif Stripping dû à la volatilisation (valeurs de pH élevées ettempératures)	Transport actif
Phosphore PO_4-P	Phosphorylation Précipitation chimique (pH élevé et oxygène dissous)	Transport actif

Les microalgues jouent un rôle important dans la fixation et l'assimilation de l'azote. Les micro-algues procaryotes notamment les cyanobactéries sont capables de fixer l'azote moléculaire atmosphérique (N_2-N) et de le convertir en azote ammoniacal (NH_3-N), qui peut être incorporé dans les acides aminés et les protéines ou être excrété dans l'environnement (Cai *et al*., 2013) selon l'équation suivante:(**Eq. 6**)

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16\,ATP \xrightarrow{\text{Nitrogénase}} 2NH_3 + H_2 + 16\,ADP + 16P_i \qquad (6)$$

Les microalgues eucaryotes, à leur tour, sont capables d'assimiler l'azote fixé, tel que NH_4-N, NO_3-N et nitrite-azote (NO_2-N) (Gonçalves *et al*., 2017). Cependant, l'assimilation de cette source d'azote nécessite une réduction en NH_4-N, par un processus en deux étapes catalysées par les enzymes nitrate réductase et nitrite réductase (Crofcheck*et al*., 2012) (**Eq. 7 et 8**)

$$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{\text{Nitrate réductase}} NO_2^- + H_2O \qquad (7)$$

$$NO_2^- + 8H^+ + 6e^- \xrightarrow{\text{Nitrite réductase}} NH_4^+ + 2H_2O \qquad (8)$$

Puisque l'assimilation du NH_4-N ne nécessite pas des étapes de réduction on pense que c'est la forme préférée d'azote pour les microalgues. Par conséquent, en plus de l'absorption de micro-algues, l'élimination du NH_4-N peut se produire en réponse à une augmentationdu pH et de la température, où de grandes quantités de NH_4-N peuvent être volatilisées (Cai *et al*., 2013; Wang *et al*., 2014). L'élimination du PO_4-P peut également être influencée par les conditions environnementales, telles que le pH et la concentration d'oxygène dissous. Pour des valeurs de pH supérieures à 8,0 et des concentrations élevées en oxygène, une précipitation du phosphore peut se produire (Su *et al*., 2012; Cai *et al*.,2013). Ce nutriment pénètre dans les cellules de microalgues via un transport actif au niveau de la membrane plasmique sous forme de dihydrogène de phosphate ($H_2PO_4^-$) et de hydrogène de phosphate (HPO_4^{2-}).

I.1.4.3.Le rôle des consortiums de microalgues dans l'élimination des polluants

De nos jours, d'importants efforts de recherche sont orientés vers l'étudede la faisabilité économique des systèmes d'algues pour éliminer les composé d'azote et de phosphoreissus des rejets d'eaux usées (Razzak *et al*., 2017). Wang *et al*. 2010a, 2010b ont étudié l'utilisation potentielledes algues vertes *Chlorella* sp. pour éliminer les nutriments des eaux usées. Au cours de cette étude, les pourcentages d'élimination de l'azote etdu phosphore totaux étaient respectivement de 68,5% et 90,6%. D'autres investigations conduites par Wang et Lan (2011) ont trouvé que les taux l'élimination des composés azotés variaient de 78% à 99% selon le

rapport N / P à l'aide d'une micro-algue *Neochloris oleoabun* cultivée dans une eau usée municipale. Alors que les composés phosphoreux étaient complètement enlevés indépendamment du rapport N / P dans le milieu.En outre, un consortium mixotrophique de *Chlorella* sp. et*Scenedesmus* sp. a été efficacement appliqué dans l'élimination de l'azote et du phosphore d'une eau usée municipale par Koreivienė *et al*. (2014). Ces auteurs ont rapporté des taux d'élimination de l'azote total (TN) et du phosphore total (TP) comprises entre 88,6-96,4% et 99,7-99,9%, respectivement. Par conséquent, la combinaison entre la capture de CO_2 et l'élimination des nutriments (en particulier les composés d'azote et de phosphore) à partir des eaux usées, par l'utilisation des microalgues, représente une technologie verte assez développée (Wang *et al*., 2008). Ainsi, les avantages de cette technologie sont de permettre à la fois la capture du CO_2 par photosynthèse et l'élimination des polluants d'eaux usées.

I. 2. Evolution des bactéries et des microalgues

L'évolution des écosystèmes terrestres et aquatiques est généralement attribuée à la contribution des archées, des bactéries, des cyanobactéries et ensuite des algues eucaryotes (Ramanan *et al*., 2016). Les micro-organismes hétérotrophes et phototrophes, caractérisés par une large diversité microbienne et une croissance rapide, sont les plus actifs à tous les niveaux du réseau trophique (Hamdi, 2016). Il a été largement admis, selon Kawafune et ses collaborateurs (2014), que les bactéries hétérotrophes, associées aux algues dans la nature, ont joué un rôle majeur dans l'évolution d'algues vertes volvocines: unicellulaire (*Carteria cerasiformis*) et multicellulaire (*Pleodorina japonica*) à travers divers événements d'endosymbioses.

I.2.1. L'évolution de la multicellularité des algues- les bactéries jouent-elles un rôle?

Suites aux séries endosymbiotiques, les algues se sont déplacées d'un niveau plus élevé de complexité de l'autonomie cellulaire à la coopération cellulaire, à travers la division cellulaire (Ramanan *et al*., 2016). La multicellularité a évolué récemment chez les algues vertes volvocines qui appartiennent aux groupes des *Chlamydomonas*, *Volvox*, et d'autres membres de la famille des *Volvocaceae*.La famille des *Volvocaceae* comprend 8 genres et 60 espèces d'algues vertes multicellulaires qui varient en fonction de leur taille et leur complexité cellulaire. Il existe des espèces contenant de petites colonies identiques 8, 16 ou 32 de cellules de *Chlamydomonas* (*Gonium pectorale* et *Pandorina morum*), d'autres espèces avec plus de cellules et une tendance croissante à former des cellules somatiques (*Eudorina unicocca* et

Pleodorina californica) et sous forme d'un grand sphéroïde contenant des milliers de cellules (*Volvox carteri*, *Volvox tertius* et *Volvox globator*)(Figure I.5) (Hallmann, 2006).

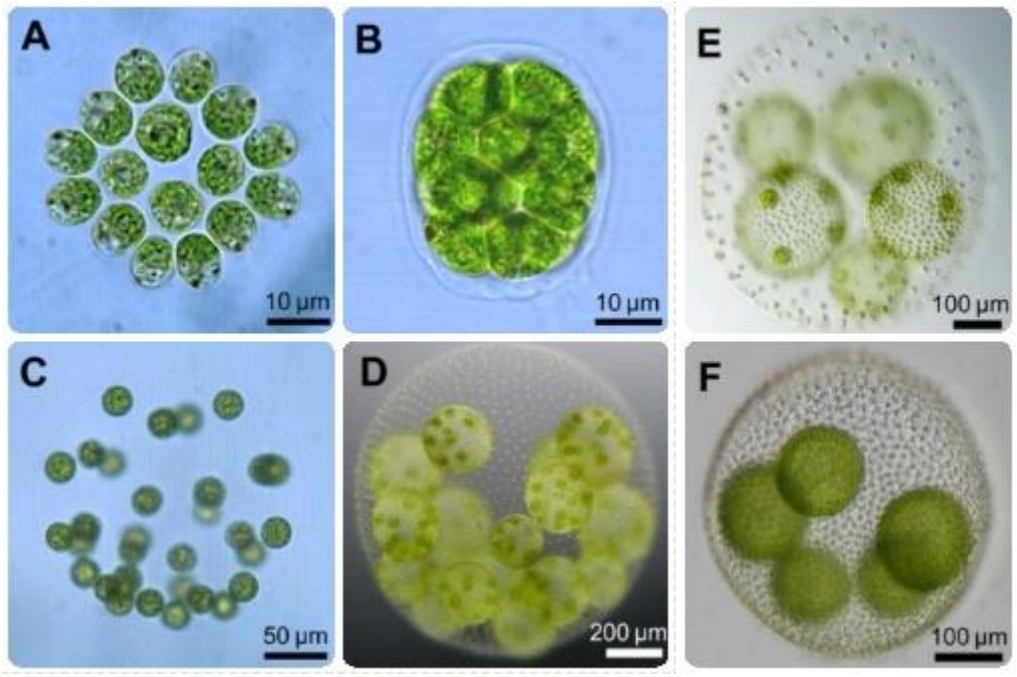


Figure I.5. Evolution multicellulaire des différentes espèces d'algues(Hallmann, 2006):A, Colonie rhomboïdale et plate de *Gonium pectorale* avec 16 cellules maintenues ensemble par une matrice; B, Colonie ellipsoïde de *Pandorina morum* avec 16 cellules rapprochées et entourées de très peu de matrice; C, Colonie sphérique d'*Eudorina unicocca* avec 32 cellules, dans une matrice distincte et volumineuse; D, Sphéroïde de *Volvox carteri* contenant environ 2000 petites cellules somatiques; E,Sphéroïde de *Volvox tertius* contenant environ 1000 petits cellules somatiques; F, Sphéroïde de *Volvox globator* contenant environ 3000 petites cellules somatiques

Pour cette raison, de nombreux chercheurs s'intéressaient à l'étude de l'évolution multicellulaire de ces algues qui offrent plus d'opportunités d'analyser la voie évolutive menée de l'unicellularité à la multicellularité à travers des divisions multiples (Hallmann, 2006). Ce phénomène de multicellulaire chez les microalgues a été adopté dans notre étude afin d'expliquer l'évolution cellulaire des flocs d'algues dans différents système de traitement des eaux usées.

I.2.2. Régulation du cycle cellulaire des microalgues

La régulation du cycle cellulaire est effectuée notamment chez les genres non apparentés d'algues vertes tels que *Chlorella*, *Chlamydomonas* et *Scenedesmus*, afin d'assurer leur division cellulaire à travers un mécanisme complexe appelé " fission multiple ". Ainsi, depuis

les années 1950, les algues vertes et leurs mécanismes ont été considérés comme un modèle unique pour étudier la régulation du cycle cellulaire (Bišová *et al*., 2014). Au cours de ce phénomène de fission multiple, le nombre de cellules filles varie généralement entre 4 à 16. En effet, les cultures d'algues sont synchronisées naturellement par l'alternance des périodes claires et sombres. Les algues se développent autotrophiquement pendant la journée et subissent des réplications d'ADN, des divisions nucléaires et cellulaires dans l'obscurité (Bišová *et al*., 2014). Le Genre d'algues *Scenedesmus*qui est caractérisé par la formation de cénobe, a été considéré comme un organisme modèle pour l'étude de la régulation du cycle cellulaire (Zachleder *et al*., 2002). Le cénobe est un assemblage spécial de colonie clonales issues les unes des autres de la même cellule mère par des divisions multiples et sont maintenues ensemble par une paroi cellulaire commune (mucilage). Les différentes phases multinucléaires du cycle cellulaire chez *S. quadricauda* ont été illustrées dans la Figure I.6 d'après Bišová et al. (2014).

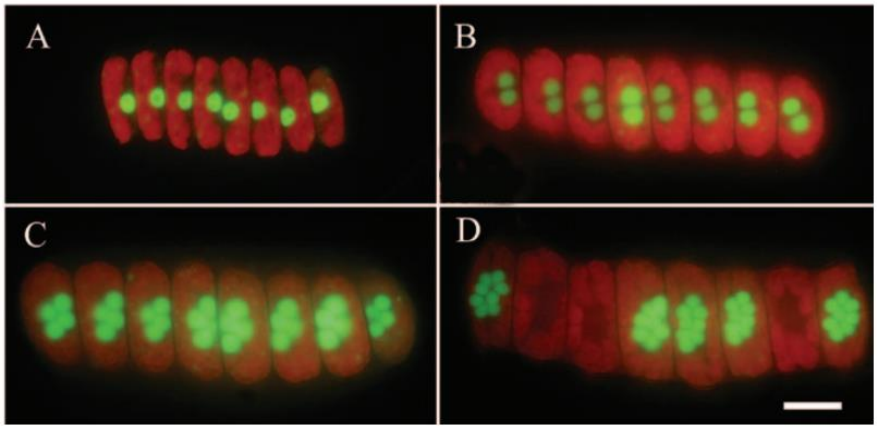


Figure I.6. Photomicrographies à fluorescence de la coénobie de *Scenedesmus quadricauda* au cours du cycle cellulaire colorées avec 0,3% de colorant SYBR vert.(A) cellule fille uninucléaire coénobium; les noyaux sont visibles comme des taches vertes; les chloroplastes sont visibles en couleur rouge qui est une autofluorescence de la chlorophylle; (B) Cénobium binucléaire; (C) Cénobium tétranucléaire; (D) Cénobium octonucléaire de la mère; les cellules en division sont restées non colorées. Bar = 10 µm.

De telles structures ont été observées aussi chez les algues vertes apparentées comme les genres *Gonium*, *Eudorina*, et *Pandorina* et sont représentées pendant les phases précoces de l'évolution multicellulaire (Kirk, 2004), impliquées par le processus de fission multiple. La division cellulaire chez la famille des *Volvocaceae* produit un embryon à l'envers à la fin du clivageembryonnaire. Un processus morphogénétique distinctif appelé «Inversion» était probablement défini pour atteindre la multicellularité volvocataire (Hallmann, 2006).

Avant l'étape d'inversion, les embryons sont transformés suite à une série de divisions de clivage rapides qui se lance lorsque les cellules reproductrices atteignent leur volume cellulaire maximal. Le clivage, décrit dans la Figure I.7, se déroule par des divisions longitudinales d'une manière similaire chez *Pandorina morum*, conduisant à 32 cellules carrées (Hallmann, 2006). A la fin du clivage, chaque embryon volvocacé contienttoutes les cellules présentes chez un adulte, alors que leurs extrémités flagellaires seront dirigées vers l'intérieur plutôt que vers l'extérieur où elles ont besoin de fonctionner en locomotion (Hallmann, 2006).

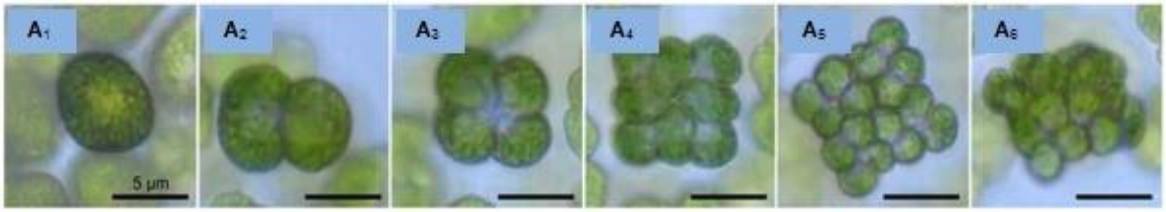


Figure I.7. Les étapes de la division pendant l'embryogenèse chez *Pandorina morum*. A_1: Cellule avant le début du clivage, $A_{2\text{-}5}$: 4 clivages de cellules longitudinales, une plakée à 16 cellules est formée; A_6: Vue latérale de la plakea à 16 cellules (Hallmann, 2006)

Hallmann, 2006 a comparé les processus d'inversion entre six espèces volvocacées différentes (*Gonium pectorale, Pandorina morum, Eudorina unicocca, Volvox carteri, Volvox tertius* et *Volvox globator*), afin d'illustrer la variation des modèles d'inversion existant dans cette famille. Il a démontré que le mécanisme d'inversion le plus simple s'est produit chez l'algue (*Gonium pectorale*) tout en transformant la forme concave-bol à une plaque légèrement convexe. D'autre part, l'algue sphérique (*Volvox globator*) se caractérise par un processus plus complexe. A partir de ces études bien détaillées, l'identification des espèces de microalgues sera facile à déterminer tout en se basant sur des observations microscopiquesdes écosystèmes. Cette évolution multicellulaire nous permettra dedétecter l'effet des conditions opératoiresà différents stades de croissance des flocs de microalgues.

I.3. Ecologie des interactions entre les microalgues-bactéries

I.3.1. Les types d'associations entre les microalgues-bactéries

Les bactéries et les microalgues ont co-évolué dans le même écosystème naturel et ont établiau fil du temps une diversité d'interactions inter-intraspécifiques et un réseau de relations symbiotiques, dont certaines définissent leurs habitats respectifs (Ashen et Goff, 2000). Pour cette raison, des études ont été menées pour expliquer les modes et les facteurs

influençant également les interactions microalgues-bactéries et ayant une signification écologique énormepour l'avenir, ainsi qu'une pertinence technologique pour la protection de l'environnement.

I.3.1.1. Mutualisme

Le mutualisme, comme le mot l'indique, n'est pas un échange à sens unique, mais plutôt un bénéfice réciproque entre les bactéries et les microalgues pour améliorer leur croissance. De nombreuses études ont révélé le rôle du mutualisme entre algues et bactéries pour le traitement des eaux usées dans des bassins d'oxydation à haut débit (HROP) qui est une technologie connue depuis les années 1960 (Oswald *et al*., 1957). Croft et al. (2005), ont validé l'importance du mutualisme lorsque les bactéries fournissent du vitamine B12 aux algues en échange pour fixer le carbone.L'étude menée par Bashan et ses collègues (2000) montre que les mécanismes de fixation de l'azote manquants chez les micro-algues seront complétés par des bactéries, notamment dans un milieu oligotrophie. En revanche, le mutualisme ne se limite pas à l'apport en micronutriments par les bactéries seules (Droop, 2007). Notamment, les bactéries ont largement bénéficié de l'association avec les algues dans un environnement oligotrophie. Pour conclure, récemment Kim et al. (2014a), ont souligné l'importance du mécanisme de mutualisme entre les bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) (*Rhizobium* sp) et les microalgues (*Chlorella vulgaris*). Les algues fixent du carbone organique à un consortium de PGPB mutualistes et les bactéries en retour fournissent du carbone inorganique dissous et du carbone organique de faible poids moléculaire pour la consommation des microalgues (Cho *et al*., 2015).

I.3.1.2. Commensalisme

Le commensalisme est une relation entre deux micro-organismes dans laquelle un seul partenaire tire profit de l'autre, contrairement au mutualisme. Le commensalisme révèle le rôle de la disponibilité des nutriments, du rapport N: P, du carbone et de l'intensité lumineuse sur la compétition microalgues-bactéries. De même, le rôle du phosphore dans la régulation de la croissance indique que les microalgues limités en phosphore se surpassent, ce qui permet aux bactéries commensales d'être plus nombreuses que les microalgues (Ramanan *et al*., 2016). Cette interaction de commensalisme entre les bactéries et les microalgues peut être appliquée pour la culture des microalgues en réduisant le coût de la source d'azote (Santos *et al*., 2014). Récemment, les bactéries *Azotobacter vinelandii* sont capables de fournir l'azote

nécessaire pour la croissance de deux souches d'algues vertes, *Neochloris oleoabundans* et *Scenedesmus* sp. BA032 (Santos *et al*., 2014).

I.3.1.3. Parasitisme

Contrairement au mutualisme et au commensalisme, le parasitisme est relativement bien étudié. Beaucoup de bactéries sont connues par leur effet négatif sur les microalgues et les cyanobactéries (Kim *et al*., 2008). De plus, les algues sont également parasitaires, souvent à leurstaxons supérieurs ou à leurs homologues. Parmi les formes de parasitisme, on peut citer la compétition pour les nutriments notamment les composés intracellulaires, ce qui entraine des taux de croissance plus faibles pour les microalgues. Pourtant, d'autres versions de parasitisme, nommées l'altruisme, l'auto-détermination ou la conduite par le bénéficiaire peuvent ressembler étroitement à la concurrence (Doncaster *et al*., 2013). La plupart des associations sont souvent localisées dans les proximités proches du micro-macro-environnement. Prenant l'exemple des bactéries parasitaires qui sont généralement présentes dans la paroi cellulaire algale, afin de faciliter leur dégradation (Wang *et al*., 2010a). D'où les habitats jouent un rôle important dans l'écophysiologie de ces organismes dans une association. En se basant sur ces types d'interactions, des hypothèses ont été adoptées dans notre étude afin d'expliquer la nature des associations présentes dans les flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB).

I.3.2. Les habitats

Il est largement connu que les microalgues, les bactéries et les cyanobactéries vivent dans presque toutes les niches sur Terre (Ramanan *et al*., 2016). Ainsi, cette section définira l'habitatle plus intéressant caractérisé par une interaction intime d'algues et de bactéries dans la «Phycosphère».

I.3.2.1.Phycosphère : un micro-environnement intime

Cet habitat " Phycosphère" est défini comme une large zone qui s'étend vers l'extérieur à partir d'une cellule micro-algale ou d'une colonie dans laquelle la croissance bactérienne est stimulée par les produits extracellulaires de microlague. La phycosphère est équivalente à une oasis pour les bactéries hétérotrophes, où les concentrations de carbone organique sont élevées. Des études indiquent que cet habitat est caractérisé par des interactions spécifiques à savoir le mutualisme, tout en favorisant la croissance et la survie de chacun d'entre eux (Kim *et al*., 2014a). Ces fonctions comprennent la capacité de dégradation des polysaccharides

complexes, pour éviter la compétition et de fournir des attributs bénéfiques pour les algues. Cette association étroite implique le partage du potentiel métabolique de chaque organisme.

I.3.3. Les mécanismes d'interaction

I.3.3.1.Rôle de l'état nutritionnel dans la structure des communautés bactériennes et algales, leur diversité et leur interaction

Le mécanisme d'interaction entre les microalgues et les bactéries, spécifique pour chaque espèce, a été exploité depuis longtemps dans les étangs d'eaux usées et décrit pour la première fois par Oswald en 1953 (Gutzeit *et al*., 2005). Ces associations bénéfiques entre microalgues photo-autotrophes et bactéries hétérotrophes sont maintenues par l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone. La compétition entre les bactéries et les microalgues est influencée par la disponibilité des nutriments pour la croissance des algues et la disponibilité du substrat organique pour la croissance bactérienne (Unnithan *et al*., 2014), comme indiqué dans la Figure I.8. Les microalgues peuvent faciliter la croissance bactérienne grâce aux échanges directs de nutriments, soit en fournissant des composés organiques libérés au cours de la croissance des cellules algales, soit en apportant des nutriments à partir de la décomposition des cellules algales (Unnithan *et al*., 2014).

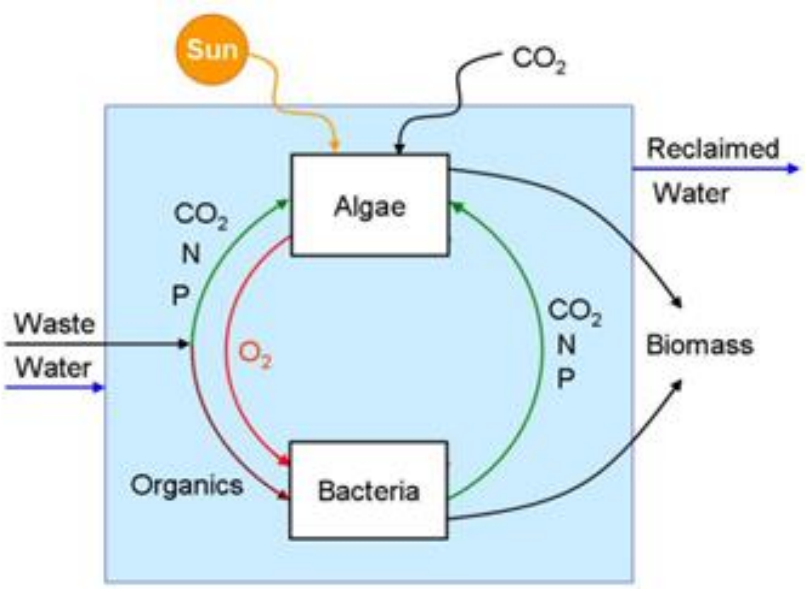
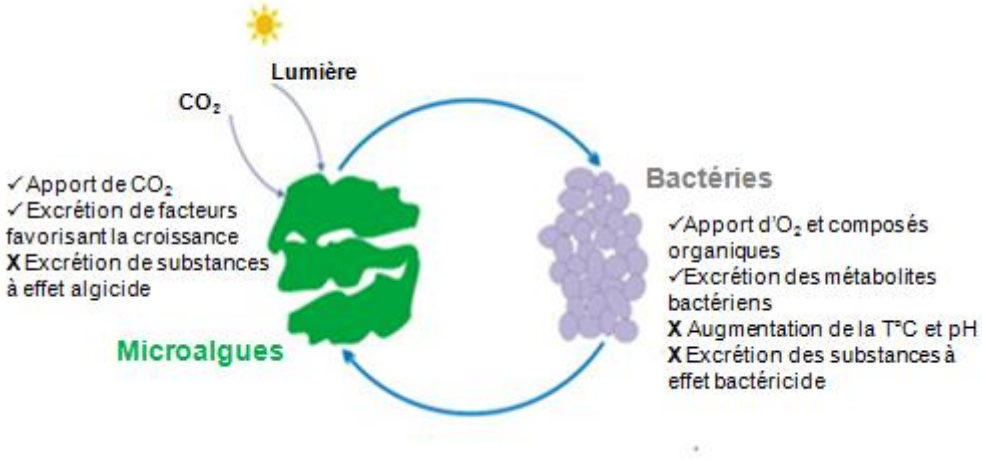


Figure I.8. Interaction microalgue-bactérienne dans un système à étang pour le traitement des eaux usées (Oswald *et al*., 1953)

D'autre part, dans des conditions eutrophies, la décomposition des exsudats d'algues représente également une contribution majeureà la DCO nécessaire à l'abondance des

bactéries (Crane *et al*., 2010). Par ailleurs, les interactions compétitives et coopératives entre les microalgues et les bactéries sont mises en évidence dans la Figure I.9. L'association phytoplancton-bactéries peut varier d'une interaction symbiotique à une relation parasite, avec des algues inhibant ou bénéficiant des bactéries ou bien des bactéries inhibant ou bénéficiant des algues (Croft *et al*., 2005; Unnithan *et al*., 2014).



FigureI.9. Interactions coopératives (✓) et compétitives (X) établies entre les micro-algues et les bactéries (adaptées par Munoz et Guieysse, (2006))

Les bactéries *Roseobacters* produisent des facteurs de croissance pour améliorerla croissance des microalgues grâce au recyclage des nutriments organiques (Amin *et al*., 2009), ou bien augmenter la lyse des microalgues par la production des phycotoxines bactériennes (Mayali *et al*., 2004). À leur tour, les microalgues synthétisentdes molécules bénéfiques pour les *Roseobacters* pendant le mutualisme et qui sont détournées en synthèse de toxines pendant le parasitisme (Ramanan *et al*., 2016). En ce qui concerne les interactions compétitives, les micro-algues et les bactéries peuvent avoir des effets indésirables les uns sur les autres. Par exemple, les microalgues sont capables de produire des exotoxines agissant comme des agents antimicrobiens, combinés avec un pH élevé induit par la photosynthèse (Awuah *et al*., 2006). Notre approche s'intéresse principalement à comprendre les mécanismes d'interactions établis entre les microalgues et les bactéries en terme d'échange de nutriments. L'optimisation des concentrations des composés organiques et des minéraux dans l'effluent, permettra d'améliorer les associations entre les micro-organismes multitrophiques et d'assurer ainsi un traitement durable des eaux usées.

I.3.3.2. Communication moléculaire "Quorum Sensing"

Bien que les bactéries et les microalgues soient très distincts sur le plan de l'évolution, des études ont révélé qu'une communication moléculaire "Quorum Sensing" (QS) se produitentre elles (Ramanan *et al*., 2016). Cette interférence avec la détection du Quorum Sensing, qui est la communication bactérienne de cellule à cellule réalisée via la génération, la libération et la détection de petits signaux moléculaires (Cooper et Smith, 2015). Différentes molécules de signal sont produites par des bactérieset impliquées dans la détection du QS,comme les acyl-homosérine-lactones (AHL) (Gram *et al*., 2002). AHL sont les signaux les plus connus pour influencer les traits phénotypiques des micro-organismes tels que la formation du biofilm, la production d'exoenzymes et la production d'antibiotiques (Gram *et al*., 2002). Des études ont évalué le rôle des bactéries dans les matrices de microalgues, leur capacité à produire des signaux QS et leur effet sur la croissance des microalgues *Botryococcus braunii*. Ainsi, deux espèces bactériennes, *Pseudomonas* sp. et *Rhizobium* sp., isolées du biofilm bactérien stimulent significativement la croissance de *B. braunii* via la production de deux signaux C4-AHL et C6-AHL (Rivas *et al*., 2010). De même, une interaction entre une microalgue modèle *Chlorophyta* sp. avec les AHL produites par les bactéries de boues activées a été observée et schématisée dans la Figure I.10. Cette détection de QS a facilité l'agrégation de cette algues en bioflocs de 200 µm en sécrétant des protéines aromatiques de 460-1 000 kDa et a améliorél'efficacité de décantation d'environ 41% (Zhou *et al*., 2017).

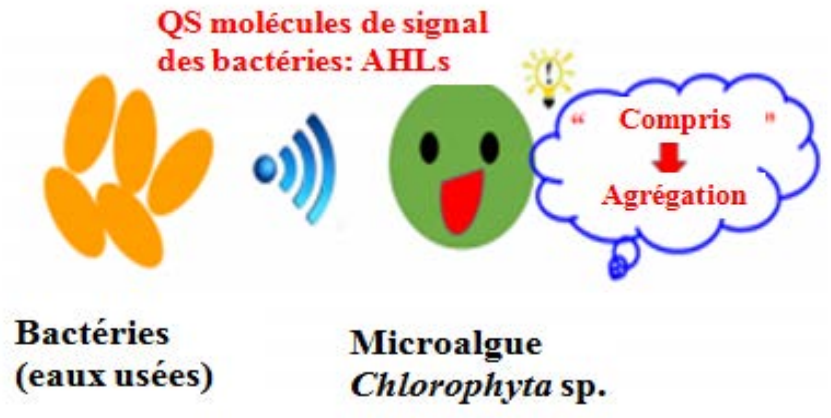


Figure I.10. Réponse de la micro-algue*Chlorophyta* sp. aux molécules de détection de QS bactérien (N-Acylhomoserine Lactones): Auto-agrégation (adaptée par (Zhou *et al*., 2017)

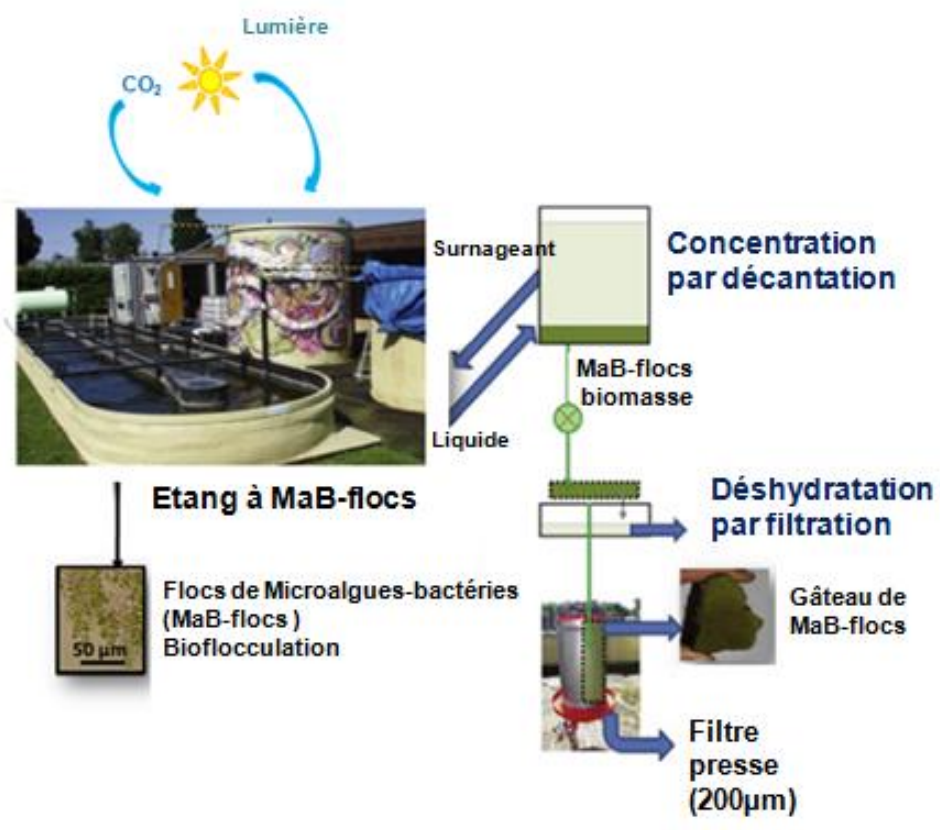
En revanche, les macroalgues marines sont également capables de perturber le QS (Natrah *et al*., 2011). Ainsi, la macroalgue marine *Delisea pulchra* a été largement étudiée pour sa

capacité à inhiber la colonisation bactérienne par la libération des molécules de furanones halogénées (Rasmussen et Givskov, 2006). De plus, la production de métabolites inhibiteurs de QS a été également rapportée chez différentes bactéries marines (Dobretsov *et al*., 2010). Comme la détection du QS a permis de réguler la virulence de nombreux agents pathogènes de l'aquaculture tel que *Vibrio harveyi* (Natrah *et al*., 2011), l'interférence du QS par les microalgues pourrait offrir des opportunités intéressantes pour la prévention des maladies bactériennes en aquaculture par l'expression des gènes QS-régulés. Ce phénomène de Quorum Sensing a été considéré dans notre travail comme une hypothèse expliquant la mise en place des interactions entre les bactéries et les microalgues et leur effet sur le traitement des eaux usées. Au cours de cette étude, la variation de la densité cellulaire des flocs-MaB mettra l'accent sur les échanges moléculaires de QS entre les micro-organismes.

I.4. Récupération de la biomasse des flocs-MaB par bio-floculation

La bio-floculation microalgue-bactérienne améliore la technologie des étangs tout en permettant une simple séparation de la biomasse algale par une sédimentation gravitaire et une efficacité élevée d'élimination des polluants (Gutzeit *et al*., 2005). Dans ce contexte, plusieurs études ont également prouvé que les bactéries aident à la floculation rapide des microalgues et une meilleure récolte de la biomasse algale-bactérienne, tout en réduisant les coûts (Kim *et al*., 2014b). Le potentiel économique des étangs de Raceway extérieurs contenant les flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB) en tant qu'une technologie de production de biomasse pour les engrais, l'alimentation de crevettes et les phycobiliprotéines dans le nord-ouest de l'Europe a été évalué (Vulsteke *et al*., 2017). Le coût de production desflocs-MaB dans les effluents de l'aquaculture et de l'industrie alimentaire est respectivement de 5,29 et 8,07 € kg^{-1} MES (Vulsteke *et al*., 2017). Cette étude montre que l'optimisation des étangs des flocs-MaB améliore suffisamment les perspectives économiques de cette technologie pour le traitement des eaux usées et la production de biomasse. A cet égard, une nouvelle approche basée sur la bio-floculation a développé des flocs de microalgues-bactériens dans des réacteurs semi-continus (SBR) (flocs-MaB SBR) (Van Den Hende *et al*., 2014b). Ainsi, l'avantage majeur des flocs-MaB SBR est la récolte d'une manière rentable en deux étapes illustrées dans la Figure I.11 afin d'obtenir une récupération élevée de MES de 99 ± 1%: (1) une concentration de la culture des flocs-MaB par sédimentation dans un décanteur sans addition de floculant et (2) une déshydratation par un filtre-presse avec une taille de pores variant de 150-250 µm, formant ainsi un gâteau de flocs-MaB à 43 ± 8% de matière sèche (Van Den Hende *et al*., 2014a). Ces consortiums de bactéries et de microalgues

se regroupent en flocs d'une taille d'environ 300 µm à 1000 µm via la bio-floculation en les cultivant dans un SBR (Van Den Hende *et al*., 2014a, 2014b). Les flocs formés à la suite d'une culture xénique présentaient des diamètres d'environ 100 mm, ce qui entraînait une sédimentation et une capacité de floculation plus élevées que la croissance d'une culture axénique de *C. vulgaris* seul avec un diamètre de flocs de 20 mm (Ummalyma *et al*., 2017). En outre, l'addition de bouillon bactérien à la culture de microalgues dans un stade de croissance ultérieur a montré une plus grande efficacité de floculation que la culture axénique. Ceci souligne que les cellules bactériennes et leurs métabolites extracellulaires jouaient un rôle important dans le processus de biofloculation (Lee *et al*. , 2013).



FigureI.11. Processus de récolte de la biomasse des flocs-MaB (Gerardo *et al*., 2015)

Dans ce contexte, une nouvelle approche de bio-floculation a été lancée en se basant sur les interactions multitrophiques entre les microalgues et les bactéries sans apport d'oxygène et sans libération de CO_2. Il s'agit d'un procédé durable à base des microalgues pour la bioremédiation des polluants organiques et minéraux. En présence de la lumière, cette biomasse multitrophique a été adoptée dans différents processus de traitement des eaux usées, inscrits dans le cadre de l'économie circulaire.

I.5. Applications potentielles des flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB)

I.5.1. Systèmes de traitement des eaux usées avec de cellules suspendues

Naturellement, les systèmes microalgue-bactériens ont été largement utilisés dans le traitement des eaux usées pour éliminer l'azote, le phosphore et la matière organique depuis les années 1950 (Ramanan *et al*., 2016). En tenant compte des échanges CO_2 / O_2 observés dans ces consortiums et des effets bénéfiques associés, le concept de «algues activées» est apparu comme une stratégie attractive pour le traitement des eaux usées (Gonçalves *et al*., 2017).

I.5.1.1. Systèmes "ouverts"

Ces systèmes ont d'abord été proposés par Oswald et al. (1957) en utilisant des étangs à micro-algues à haut débit (HRAP), des bassins à palettes mixtes peu profonds et des Raceway complètement oxygénés (Craggs *et al*., 2013), où la symbiose algues-bactéries aboutie au traitement des eaux usées avec l'échange d'O_2 et de CO_2, et d'ions NH_4^+ (Ramanan *et al*., 2016). En effet, l'avantage des étangs d'algues (HRAP) a augmenté l'efficacité du procédé avec un rendement fiable (Park *et al*.,2013). Les étangs de MaB-flocs présentent une performance économique de 0,25 à 0,50 €. m^{-3} d'eaux usées, similaire aux technologies conventionnelles de traitement des eaux usées (Vulsteke *et al*., 2017). Lors du traitement des eaux usées domestiques à l'aide d'un HRAP, Park et Craggs, (2011), ont rapporté des rendements d'élimination de NH_4-N et de PO_4-P d'environ 90% et 70%, respectivement.

I.5.1.2. Systèmes "fermés"

Plusieurs études ont proposé un traitement des eaux usées en utilisant les flocs-MaB dans des PBRs "fermés". Le Tableau I.3 (Gonçalves *et al*., 2017) illustre les différentes applications des consortiums symbiotiques algues-bactéries pour l'élimination de l'azote, carbone et phosphore à partir des eaux usées. Récemment, les réacteurs semi-continus SBR avec des flocs de microalgues-bactériens (flocs-MaB SBR) constituent une nouvelle approche pour le traitement photosynthétique des eaux usées à partir de la bio-floculation (Van Den Hende *et al*., 2014a, 2014b). Par conséquent, une nouvelle stratégie pour le traitement aérobie des effluents UASB de papeterie riches en calcium a été proposée dans un réacteur en SBR contenant des flocs-MaB, dans laquelle l'oxygène est fourni par photosynthèse et le calcium est éliminé par bio-minéralisation (Van Den Hende *et al*., 2017). Sur la base des résultats expérimentaux, le réacteur SBR supprimait 58 ± 21% de carbone organique, 27 ± 8% de

carbone inorganique, 77 ± 5% d'azote, 73 ± 2% de phosphore et 27-11% de calcium (Van Den Hende *et al*., 2017). En outre, Rada-Ariza et al. (2017) ont comparé un réacteur à panneau plat (FPR_1) contenant des consortiums de flocs-MaB et un réacteur à panneau plat à microalgues seulement (FPR_2) pour l'élimination de l'ammonium des eaux usées artificielles. Les flocs-MaB ont éliminé l'ammonium à des taux plus élevés (100 ± 18 mg NH_4^+-$NL^{-1}.d^{-1}$) que les microalgues (44 ± 16 mg NH_4^+-$NL^{-1}.d^{-1}$).

Ceci démontre l'efficacité du système symbiotique pour le traitement des eaux usées. En plus d'être efficaces dans l'élimination des nutriments, ces systèmes peuvent encore améliorer les procédés actuels de traitement des eaux usées en réduisant les coûts associés à l'oxygénation des boues activées et en négligeant les gaz à effet de serre. Dans ce cas, le CO_2 libéré par les bactéries sera transformé en matière organique par les microalgues (De Godos *et al*., 2009). Par conséquent, vu l'apport tant qu' écologique, la biomasse des flocs-MaB a été intégrée dans des systèmes symbiotiques fermés afin de rendre l'activité plus performante et de réduire l'impact des émissions de CO_2sur l'environnement.

Tableau I.3. Applications des consortiums de micro-algues/bactéries pour l'élimination de l'azote, du phosphore et du carbone dans différentes eaux usées et des rendements d'élimination respectifs (Gonçalves *et al*., 2017)

Microorganismes	**Nature des eaux usées**	**Mode opératoire**	**Temps (jours)**	**Azote**		**Phosphore**		**Carbone**		**Références**
				C_i(mg/L)	**%R**	**C_i(mg/L)**	**%R**	**C_i(mg/L)**	**%R**	
Chlorella vulgaris + bactéries issues des eaux usées primaires	Eaux usées municipales	PBR fermé tubulaire Suspendu Batch	8-20	17-207 NH_4-N	30.9 100	1.4-19.6 TP	65-98	n.a	n.a	He *et al*., 2013
Consortium de microalgues isolé d'un HRAP et de boues activées	Eaux usées synthétiques	PBR fermé Suspendu Continu	2-20	120 NH_4-N	75-96	n.a	n.a	200 TOC	86-90	Alcántara *et al*., 2015
Chlorella vulgaris +*Bacillus licheniformis*	Eaux usées synthétiques	PBRs fermé Suspendus Batch	6	20 NH_4-N	78	4 TP	92	n.a	n.a	Liang *et al*., 2013
Consortium de microalgues-bactéries isolé des eaux usées centrales	Eaux usées centrales	PBR tubulaires à biofilm "ouverts"	10	91 TN	70	7 PO_4-P	85	181 TOC	90	Posadas *et al*., 2013

Ci - concentration initiale (in mg L^{-1}); %R -Taux d'élimination; NH_4-N - ammonium; TN - Azote Total (mg N L^{-1}); PO_4-P - Phosphorus (mg P L^{-1}); TP - phosphores Total (mg PL^{-1}); TOC - carbone organique Total (mg C L^{-1}); COD (mg O2 L^{-1}); n.a: pas d'application

I.5.2. Systèmes de traitement des eaux usées avec des cellules immobilisées

Dans le but d'éviter les exigences relatives à la récolte de biomasse des flocs de microalgues-bactéries, certaines études ont signalé l'utilisation de ces consortiums dans des systèmes de croissance immobilisés. Ces technologies deviennent très populaires en raison de la facilité de culture avec un auto-ombrage par rapport aux systèmes suspendus (Lee *et al*., 2014). Le Tableau I.4 rapporte une comparaison entre les deux systèmes de culture fixe et libre pour le traitement des eaux usées en présentant les avantages et les limites de chaque technique (Gonçalves *et al*., 2017).

Tableau I.4. Avantages et limites des systèmes suspendus et immobilisés (Gonçalves *et al*., 2017).

Systèmes de culture	Avantages	Limites
Système de culture en suspension	- Grandes quantités d'eaux usées à traiter. - Opération à grande échelle.	- Récolte des microalgues après traitement.
Système de culture immobilisée	- Récolte des microalgues plus simples. - La matrice d'immobilisation plus haute résistanceaux environnements difficiles(salinité, la toxicité des métaux, pH) - Surface élevée requise (meilleure adhésion de microalgues + formation de biofilm)	- Coûts élevés associés aux matrices d'encapsulation. - La limitation de la lumière. - Applicable uniquement dans les petites opérations à l'échelle pilote

L'immobilisation des cellules vivantes est devenue une technologie prometteuse pour améliorer l'efficacité des bioprocédés, en particulier dans la production de métabolites et dans le traitement biologique des eaux usées (Takei *et al*.,2011). Récemment, l'une des techniques d'immobilisation la plus utilisée est l'encapsulation bactérienne. Ainsi, les cellules vivantes sont enfermées dans une matrice polymérique suffisamment poreuse. Cette matrice permet la diffusion des substrats nutritifs aux bactéries et la libération des métabolites produites par les bactéries (Van Pham *et al*., 2014).

I.5.2.1. Systèmes d'immobilisation des MaB-flocs dans des polymères: Matrices d'encapsulation

Dans ces systéme, la sélection d'une matrice appropriée pour l'immobilisation cellulaire est essentielle pour une application réussite au bioprocédé, en terme de durabilité élevée dans l'eau, de viabilité cellulaire élevée et de faible coût (Takei *et al*., 2011). Une classification des polymères d'encapsulation est représentée dans le Tableau I.5, ainsi que leurs inconvénients.

Tableau I.5. Classification des polymères d'encapsulation

	Polymères naturels	**Polymères synthétiques**
Polymères (Takei *et al*., 2011)	Agar, Agarose, Alginate, Chitosane, Kappacarréténane	Polyacrylamide, Polyuréthane et Poly (éthylène glycol) prépolymère, PVA
Inconvénients (Van Pham *et al*., 2014)	Faible résistance mécanique et durabilité	Toxicité sur les micro-organismes Coût élevé

En revanche, le poly (alcool vinylique) est un polymère synthétique, non toxique pour les microorganismes, à moindre coût, et ayant une grande durabilité dans l'eau. Ce polymère est considéré comme un matériau d'immobilisation cellulaire promoteur pour le traitement biologique des eaux usées (Takei *et al*.,2011). Plusieurs études ont utilisé le sulfate de sodium comme inducteur pour la réticulation des billes d'hydrogel PVA contenant des microorganismes. Ainsi, ces billes sont appliquées dans le traitement biologique des eaux usées afin d'éviter la diminution drastique de la viabilité cellulaire causée par une solution saturée d'acide borique (Takei *et al*.,2011; Van Pham *et al*., 2014). Dans notre étude, des matrices d'encapsulation à base de PVA-alginate ont été formulées afin d'immobiliser les flocs-MaB appliqués pour le traitement des eaux usées. Le choix de cette matrice de PVA a été justifié par plusieurs études antérieures (Zain *et al*., 2010; Van Pham *et al*., 2014).

En effet, l'idée d'empiéger des microalgues dans des gels sphériques a pris un élan important au cours de la dernière décennie, afin de séparer les microalgues de leur milieu de culture, ce qui rend cette technique plus rentable. De nombreux exemples sont disponibles dans le Tableau I.6 afin de montrer la capacité des micro-algues et des co-cultures algues-bactéries immobilisées pour l'élimination des nutriments des eaux usées.

Cependant, la matrice d'encapsulation a un effet indirect à son tour sur l'efficacité des micro-organismes immobilisés.

Tableau I.6. Application des consortiums d'algue et d'algue-bactérie dans des systèmes immobilisés

Micro-organismes	**Matrice d'immobilisation**	**Rejet + durée de traitement**	**Taux d'élimination (%)**	**Réf.**
Chlorella vulgaris	Billes d'alginate carraghénine	eaux usées domestiques primaires (3 jours)	95% ammonium 99% phosphates	Lau *et al.*,1997
co-culture d'*Azospirillum brasilense C. vulgaris* et *C.sorokiniana*	Billes d'alginate	eaux usées municipale (6 jours)	100% d'ammonium, 15% de nitrate 36% phosphore	De-Bashan *et al.*, 2004

I.5.2.2. Systèmes d'immobilisation des flocs-MaB dans des réacteurs à biofilm microalgal-bactérien

Les systèmes de croissance immobiliséespour le traitement des eaux usées dépendent de la formation de biofilms symbiotiques. Les biofilms microalgues-bactéries peuvent être plus attractifs par rapport aux systèmes suspendus, pour le traitement des eaux usées et pour l'élimination des nutriments (azote et phosphore). Dans ce biofilm symbiotique, les microalgues produisent simultanément l'oxygène nécessaire à la dégradation aérobie des polluants organiques par les bactéries hétérotrophes (Boelee *et al.*, 2014b). Généralement, la croissance des biofilms phototrophes suit un modèle à deux phases: la première phase de croissance commence par la colonisation du matériau support souvent par les diatomées et les algues vertes. Par la suite, la biomasse croît initialement de façon exponentielle puis linéaire, où la communauté évolue vers des algues vertes filamenteuses et cyanobactéries (Boelee et al., 2014a). Le potentiel des biofilms symbiotiques de microalgues-bactéries pour le traitement des eaux usées a été évalué dans différents systèmeset s'avère intéressant en raison de la capacité de production d'oxygène par les microalgues (Boelee *et al.*, 2012). Différentes

applications de biofilms microalgues-bactéries ont été testées dans desréacteurs à biofilm pour le traitement des eaux usées et ont été rapportées dans le Tableau I.3.

Il a été suggéré dans notre étude d'introduire desbiofilms symbiotiques dans des contacteurs biologiques à disques rotatifs (RBC) comme une application, peu couteuse pour le traitement des eaux usées. En effet, un contacteur biologique rotatif (RBC) est un bioréacteur à biomasse fixe constitué d'une série de disques recouverts d'un film microbien actif, partiellement immergé dans les eaux usées pour assurer une oxygénation efficace (Mukherji *et al*., 2012). Le bioréacteur à lit rotatif est un processus de traitement biologique à biomasse fixe basé sur un fonctionnement continu, un biofilm non colmatant à faible perte de charge, une haute spécificité de surface de biofilm, et sans lavage à contre-courant (Matsumoto, 2012). Dans ce contexte, Shayan et al. (2016) ont adopté ce type de réacteur RBC pour étudier l'effet de HRT sur l'élimination des nutriments des eaux usées avec l'accumulation de bioproduits par les algues cultivées. Ainsi, un HRT de 2 jours a significativement affecté l'élimination de l'azote avec une accumulation de lipides plus élevée (20% sur la base du poids sec). Alors que un HRT de 6 jours a affecté l'élimination du phosphore avec une production plus élevée d'amidon (27% sur le poids sec). Par ailleurs, d'autres réacteurs pouvaient être suggérés pour la culture d'une microalgue oléagineuse *Nannochloropsis* sp. immobilisée dans des billes d'alginate,à l'échelle d'un photobioréacteur à lit fluidisé de 3 L (FBPR), afin d'assurer la fixation du CO_2 et simultanément de produire des lipides (Cheirsilp *et al*., 2017).

Par ailleurs, un réacteur à lit fluidisé a été adopté dans notre projet comme une nouvelle alternative pour l'élimination du carbone et des nutriments (ammonium et phosphore) des eaux usées synthétiques, contenant des bioparticules biodégradables à base de granules d'olive, comme support d'immobilisation des flocs-MaB. Les réacteurs à lit fluidisé (FBR) sont une sorte de biofiltres à lit expansé dans lequel le support est immergé dans une colonne verticale (Matsumoto, 2012). La fluidisation dans les FBR permet de maintenir les supports en suspension par l'écoulement ascendant de l'eau.Les principaux avantages du FBR incluent le fait que les bioréacteurs à lit fluidisé sont très économiques vu que les matériaux sont construits à partir des médias filtrants bruts à une surface spécifique très élevée et à faible coût. Nam et al. (2000) estiment que dans les réacteurs à lit fluidisé, la taille du support, la vitesse d'écoulement et les propriétés hydrodynamiques du réacteur influencent le développement du biofilm et que la taille des grains affecte la structure du biofilm.

I.6. Valorisation des flocs-MaB par une co-digestion anaérobieet bioremédiation des digestats

La digestion anaérobie est considérée comme une technologie efficace pour la production de bioénergie, en absence d'oxygène, à partir de divers déchets tels que les résidus agricoles, les effluents industriels et les déchets solides municipaux (Prajapati *et al*., 2014; Ajeej *et al*., 2015). La production du méthane est un processus complexe, qui peut être divisé en quatre phases: hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse / déshydrogénation, et méthanisation (voir Figure I.12). Les étapes de dégradation individuelles sont réalisées par différents consortiums de microorganismes, qui se situent en partie en corrélation et imposent des exigences différentes à l'environnement (Ajeej *et al*., 2015). Par ailleurs, de nombreuses études ont proposé la co-digestion anaérobie comme étant une digestion simultanée d'autres sources de biomasse, telles que les microalgues et les boues activées, dans la même unité (Wágner *et al*., 2016). Les avantages de ce processus comprennent une meilleure digestibilité, une production améliorée de biogaz avec rendement en méthane plus élevé ainsi qu'une réduction des coûts (Ajeej *et al*., 2015). Dans ce contexte, la biomasse algale représenteune matière première potentielle de production de biométhane en raison de sa teneur élevée en composés biodégradables (lipides, protéines et amidon) (Hernandez *et al*., 2013; Wieczorek *et al*., 2014). Aussi, la co-digestion anaérobie de cette biomasse peut devenir commercialement rentable à condition de disposer de méthodes de culture à faible coût.

I.6.1. Co-digestion anaérobie des flocs-MaB pour la production du méthane

L'association du traitement des eaux usées par les micro-algues et de la digestion anaérobie semble être une technologie prometteuse pour la production durable de biomasse algale et de bioénergie sous forme de biogaz (Vasseur *et al*., 2012). En effet, les systèmes microalgues-bactéries appliqués pour le traitement des eaux usées évitent l'apport supplémentaire en oxygène externe par rapport aux procédés conventionnels. Ces systèmes permettent ainsi la récupération des nutriments dans la biomasse et réduisent les émissions de CO_2 dans l'atmosphère (Hernández *et al*., 2013 ; Wieczorek *et al*., 2015). Les avantages d'un tel couplage pour la production de biogaz sont basés sur l'utilisation directe des résidus organiquesissus de la digestion anaérobie tels que les acides gras volatils (acétate) et les composés phosphorés et azotés (phosphate et ammoniaque) essentiels pour la croissance de la biomasse photosynthétique (Vasseur *et al*., 2012).

La Figure I.12 montre un système intégré de combinaison entre la culture des flocs microalgue-bactéries pour le traitement des eaux usées avec la digestion anaérobie de la biomasse de flocs-MaB produite.A cet égard, la biomasse des flocs-MaB récupérée au cours de notre étude servira comme matière première pour la co-digestion anaérobie et contribuera à l'augmentation de la production de biogaz.Il aura essentiellement pour objectif d'optimiser et d'évaluer ce couplage entre le traitement des eauxpar la symbiose microalgues-bactéries et la digestion anaérobie des boues générées avec une production du méthane CH_4 et une réutilisation des eaux sécurisées.

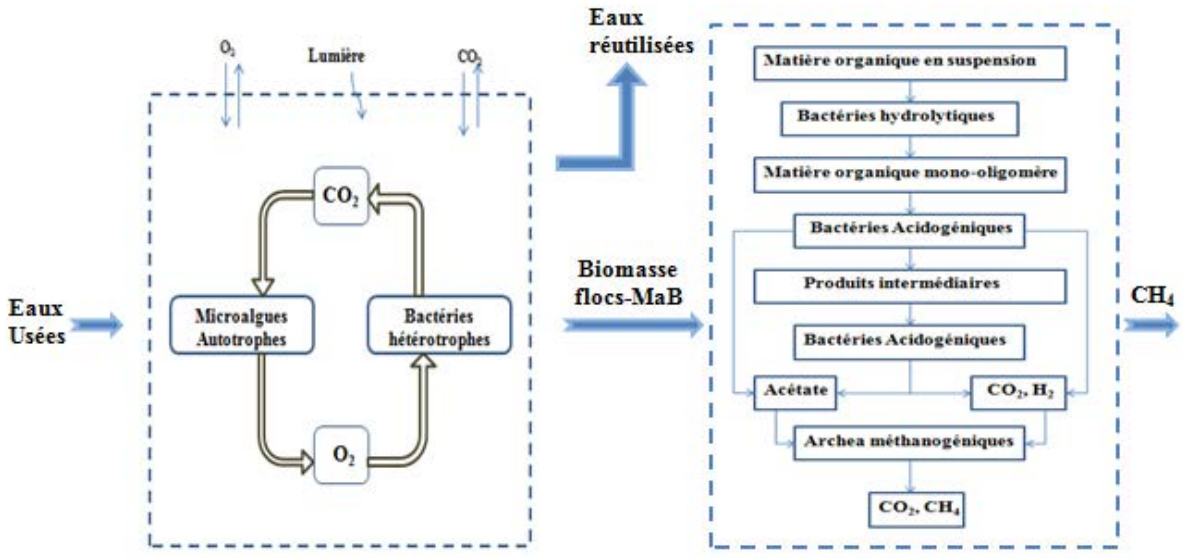


Figure I.12. Processus de traitement des eaux usées avec les flocs-MaB (1) et production de biogaz (2) (Wieczorek *et al*., 2015)

Des études récentes sur la production de biogaz à partir de la biomasse algale incluent la digestion anaérobie de *Chlorella* sp. (Prajapati *et al*., 2014), *Chroococcus* sp. (Prajapati *et al*., 2013) et la digestion mésophile / thermophile de *Scenedesmus obliquus* et *Phaeodactylum tricornutum* (Zamalloa *et al*., 2012). Récemment, Ras et al. (2011) ont réalisé des expériences sur *Chlorella vulgaris* dans un système intégré de culture et de digestion des algues pour la production de biogaz. En effet, la biomasse de flocs-MaB récoltée à partir d'un étang extérieur pour le traitement des eaux usées de l'aquaculture, a été valorisée par une co-digestion anaérobie en batch. Les résultats montrent un rendement biochimique en méthane (RBM) qui varie entre 128-226 NL CH_4 kg^{-1} VS, sachant que les RBM des boues activées non traitées vont de 129 à 380 NL CH_4 kg^{-1} VS (Van Den Hende *et al*., 2015). La co-digestion des flocs-MaB nécessite donc une étude plus approfondie pour optimiser les conditions d'exploitation

afin d'obtenir un rendement maximal en biogaz et notamment en méthane avec un faible coût d'exploitation.

I.6.1.1. Facteurs affectant la co-digestion anaérobie

Il existe des facteurs affectant la performance de la fermentation sombre, par exemple le pH, le rapport substrat-inoculum (rapport S / I), la température et la composition du substrat (Wieczorek *et al*., 2015). La température de fermentation peut affecter la production du méthane à partir du substrat MaB-flocs tout en affectant la composition des micro-organismes et l'activité des enzymes telles que les hydrogénases. Ainsi, le processus peut être classé en fonction de la température de fonctionnement: (i) mésophile, où le digesteur est chauffé entre 37 - 40°C, (ii) thermophile, où le digesteur fonctionne entre 50 - 65°C (Wieczorek *et al*., 2015). La production de biogaz à partir des flocs microalgues-bactéries (flocs-MaB) dans des réacteurs SBR a été réalisée en variant les rapports S/L de 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8: $VS_{substrat}$ (g) / $VS_{inoculum}$ (g) (Wieczorek *et al*., 2015). Les rendements maximaux en biogaz et en méthane ont été de 271,34 ± 6,65 mL CH_4 g. VS^{-1} pour un rapport S / L de 0,2 de $VS_{subtrat}$ (g) / $VS_{inoculum}$ (g) dans la gamme mésophile de températures (Wieczorek *et al*., 2015). En outre, le rapport entre la quantité de carbone et d'azote dans la charge d'alimentation est un paramètre de processus très important dans la co-digestion anaérobie. Un faible rapport peut provoquer une accumulation d'ammoniac et des valeurs de pH supérieures à 8,5, ce qui est toxique pour les bactéries méthanogènes (Ajeej *et al*., 2015). Alors qu'un rapport élevé entraînera une consommation rapide d'azote par les méthanogènes et une production faible de biogaz (Dioha *et al*., 2013). L' ajustement du rapport C/N doit se situer dans la plage optimale (25-30) et cela convient aux conditions optimales de co-digestion (Batstone *et al*., 2015) de différents flux de déchets (Dioha *et al*., 2013). D'autre part, différents prétraitements tels que mécanique, chimique, biologique et thermique peuvent être appliqués à la biomasse de flocs-MaB afin d'améliorer la production de CH_4. Le prétraitement enzymatique, comme la méthode la plus efficace, soutenait la productivité maximale du biogaz de 369,44 ± 6,36 mL de g. VS^{-1} desflocs-MaB (Wieczorek *et al*., 2015). Par conséquent, la co-digestion anaérobie des flocs-MaB obtenue à partir de systèmes de traitement des eaux usées flocs-MaB a un potentiel prometteur pour unegénération efficace de la bioénergie.

I.6.2. Valorisation des digestats anaérobies comme étant des sources nutritives utiles pour la culture des flocs-MaB

La digestion anaérobie (DA) de la biomasse crée un flux de déchets riche en nutriments (N et P), appelé Digestate Liquide (D_L). Ce rejet est considéré comme un engrais de culture et une source de nutriments pour la croissance des microalgues (Bjornsson *et al*., 2013). Les LD représentent une menace pour l'environnement en raison de leur potentiel d'eutrophisation; ils nécessitent donc des processus de traitement pour réduire la toxicité et pour éliminer les nutriments sans danger (Massa *et al*., 2017). De cette façon, la bioremédiation de ce flux nutritif (D_L) peut augmenter la charge d'alimentation pour le procédé sans entraîner des coûts élevés et des impacts environnementaux (Vasseur *et al*., 2012). Par conséquent, il existe une possibilité de développer un «processus en boucle fermée» en couplant la digestion anaérobie des microalgues, produisant du méthane, avec l'utilisation subséquente du Digestate Liquide comme source de nutriments (Prajapati *et al*., 2014). En effet, le Digestat Liquide résultant d'une digestion anaérobie a été exploré en tant qu'un complément nutritif pour la croissance d'une microalgue *Chroococcus* sp. et pour l'élimination des nutriments résiduels (Prajapati *et al*., 2014). La capacité des différentes souches de microalgues à se développer et à éliminer les nutriments (N) à partir des D_La montré l'efficacité élevée d'élimination de NH_4-N d'environ 99% pour les espèces cyanobactérie (*Arthrospira maxima*) et microalgue (*Tetradesmus obliquus*) (Massa *et al*., 2017). En outre, Wang et al. (2010b) ont observé une élimination efficace de l'azote et du phosphore à partir de Digestats anaérobies de fumier laitier en utilisant *Chlorella* sp. Le but de ce couplage est de développer un processus de production de bioénergie idéal avec un «rejet zéro déchet» dans les environnements comme illustré dans la Figure I.13.

L'optimisation de la digestion anaérobie des déchets d'origine animale (lisier) et le traitement du digestat grâce au développement des flocs microalgues-bactéries (flocs-MaB) s'inscrit dans un contexte de l'éco-conception et du développement durable. L'économie circulaire basée sur l'éco-conception et les recyclages permet d'améliorer la gestion des ressources, la préservation de l'environnement et la protection de la santé animale et humaine dans le secteur des industries.

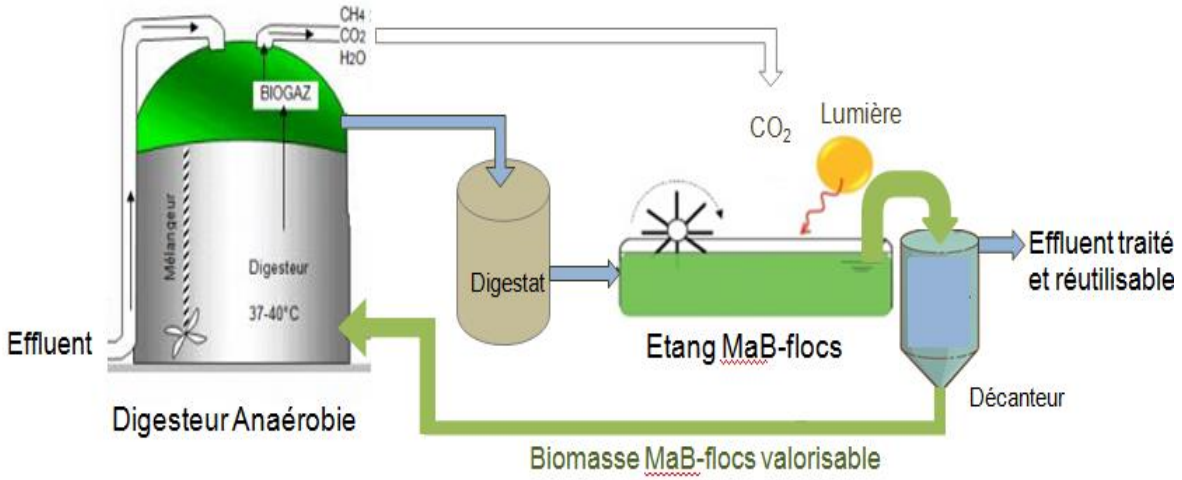


Figure I.13. Diagramme récapitulatif du processus en boucle fermée avec zéro déchet rejeté

I.7. Les défis actuels des consortiums de flocs-MaB et les besoins de recherche

Bien que plusieurs études aient été appliquées avec lesconsortiums de microalgues et de bactéries dans l'élimination des nutriments à partir de différentes eaux usées, d'autres recherches dans ce domaine restent nécessaires pour l'optimisation des paramètres de culture dans des unités à grande échelle. Des avancées importantes incluant (i) l'étude de l'effet de différents conditions (lumière, disponibilité des nutriments, pH et température) sur le comportement du consortium; (ii) la compréhension complète des interactions établies entre les micro-organismes; et (iii) le développement des modèles mathématiques décrivant correctement le comportement de ces consortiums, peuvent être utile dans la conception des processus et la détermination des conditions opératoires. Finalement, il est nécessaire d'examiner les interactions entre les microalgues et les bactéries pour les produitsà haute valeur ajoutée tels que les produits pharmaceutiques et cosmétiques, les produits alimentaires pour l'aquaculture et les aliments pour les animaux ainsi que les produits chimiques tels que les carburants. Une étude biomoléculaire sera proposée pour identifier les populations de microalgues et de bactéries présentes dans les flocs-MaB afin de mettre au point un inoculum multitrophique dans les photobiorécteurs.

I.8. Conclusion

La culture en symbiose de microalgues-bactéries pour le traitement des eaux usées a été largement décrite dans la littérature. L'utilisation de ce consortium dans ce domaine reste encore à un stade préliminaire de la connaissance, en raison de la grande variété de combinaisons possibles peuvent être obtenues. La présente étude se concentre sur l'application de ces consortiums symbiotiques (microalgues-bactériennes) dans différents systémes de traitement des eaux usées, mettant en évidence les mécanismes impliqués dans l'élimination des nutriments (carbone, azote et phosphore) et comment les interactions établies entre les micro-organismes amélioraient le processus de bioremédiation. Une application à grande échelle de ces consortiums nécessite toutefois des recherches plus approfondies en termes d'écologie des consortiums, d'ingénierie et d'optimisation des conditions opératoires de culture.

I.9. Positionnement et démarche expérimentale de la thèse

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'étape la plus importante dans le développement d'un système symbiotique à base de microalgues-bactéries consiste à comprendre les interactions cellulaires mises en jeu entre ces micro-organismes et qui sont dépendantes d'un ensemble de facteurs nutritionnels et environnementaux. En présence d'une lumière en continu, la boue de retour a été enrichie en flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB) sans aucun apport d'oxygène et dégagement de CO_2. Cette technologie multitrophique présente de multitudes avantages : elle permet depréserver l'environnement, ne consomme pas d'énergie, ne produit pas des boues, ne génère pas des nuisances olfactives et contribueà l'amélioration de l'hygiène. Les interactions multitrophiques entre les microalgues et les bactéries ayant fait l'objet de cette thèse n'ont été que peu étudiées jusqu'à nos jours. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'étudier la faisabilité de ces flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB) pour l'élimination des polluants et pour la production de bioénergie dans le cadre de l'économie circulaire.

La stabilisation des flocs-MaB a été obtenue après 26 jours de culture en batch et en présence d'une lumiére continue, sans aucun apport d'oxygène. Suite à cette étape, une étude biomoléculaire sera proposée ultérieurement afin d'identifier les souches de microalgues et de bactéries consituant les flocs-MaB. Avant chaque procédé de traitement des eaux usées, une pré-culture des flocs-MaB pendant 7 jours a été lancée afin d'enrichir les flocs et de fixer les propriétés de biomasse souhaitées en termes de TSS, VSS et concentration en Chl(a).

Une première application de ces flocs-MaB contribue au recyclage des polluants (organiques et minéraux) à partir des eaux usées dans des systèmes à base de biomasse multitrophique fixe. En se basant sur la littérature, les bioréacteurs à biomasse attachée représentent une alternative prometteuse afin de résoudre le problème de récupération de la biomasse. Cette approche s'intéresse à exploiter et à optimiser différents photobioréacteurs en favorisant les associations symbiotiques microalgues-bactéries afin d'assurer un traitement durable des eaux usées.

-La méthode d'encapsulation représente la méthode la plus fréquente utilisée pour l'immobilisation des cellules vivantes dans un réseau de gel tridimensionnel. Des billes de PVA-alginate ont été conçues pour l'immobilisation de la biomasse multitrophique (flocs-MaB) entre les réticulations dans cette matrice. PVA étant un polymère synthétique moins cher a été appliqué avec succès pour le traitement des eaux usées en utilisant des micro-

organismes piégés. Une étude à multi-échelle en phyto-bioremédiation des polluants organiques et minéraux a été lancée sans apport d'oxygène et sans dégagement de CO_2, d'où l'originalité de cette approche. La performance des flocs-MaB empiégés dans une bille de PVA-alginate a été testée en premier lieu dans un microréacteur en batch de 5mL de volume. L'étude de l'effet de certains facteurs opératoires (densité des flocs-MaB, concentration de DCO, temps d'incubation) sur l'évolution morphologique des flocs et sur le traitement des nutriments pourrait jouer un role déterminant pour la mise à échelle de ce processus. Ainsi, le recyclage des polluants a été intensifié dans des microréacteurs avec une recirculation de l'effluent et à méso-échelle dans une colonne 2D ce qui permet d'étudier l'impact de certains paramètres hydrodynamiques sur la phyto-bioremédiation.

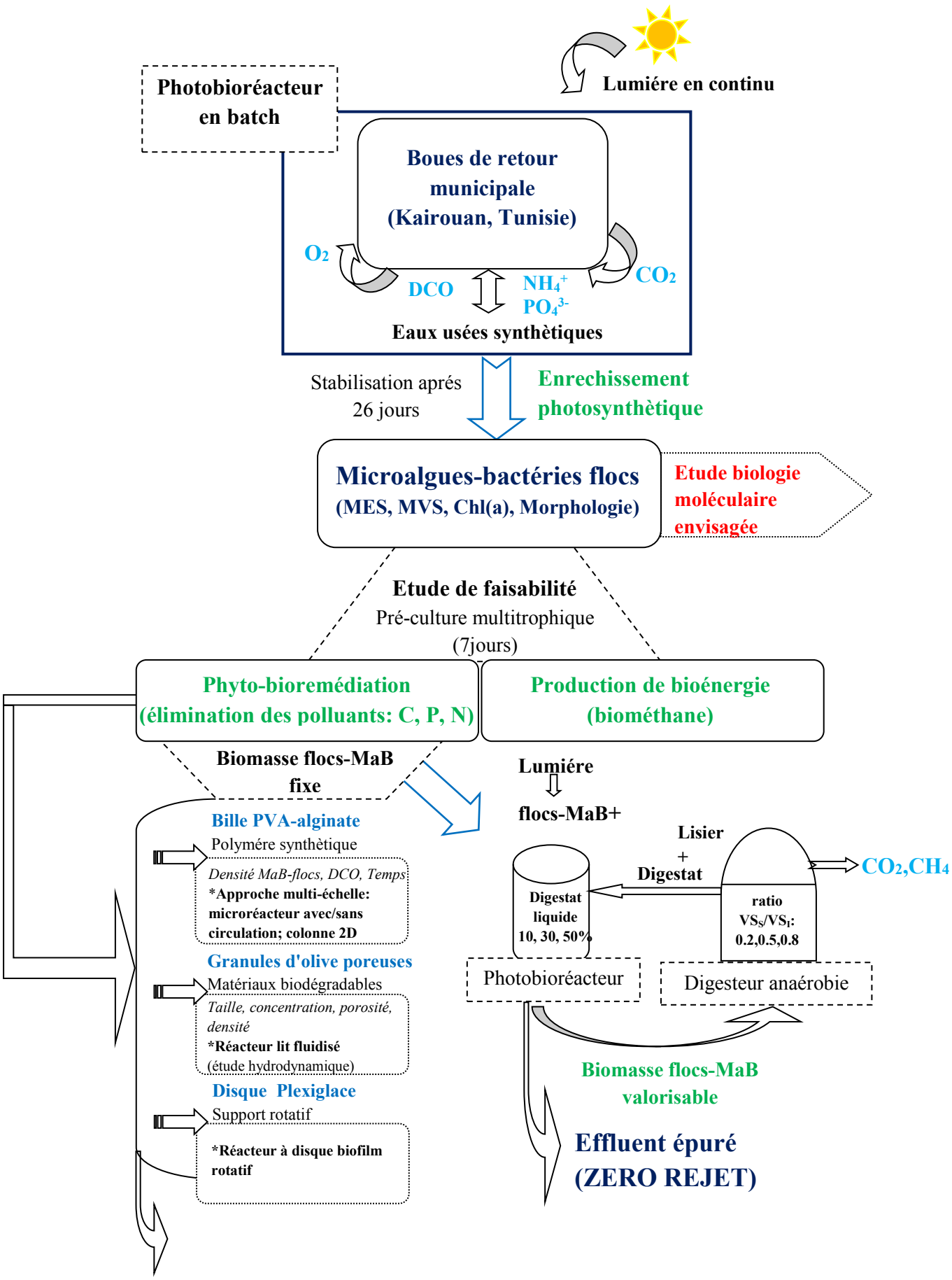
-Dans le but de mettre en place un processus de photobioremédiation durable sous l'angle de la protection et de la réutilisation de la biomasse piégée pour la production de bioénergie, une autre méthode d'immobilisation des flocs-MaB a été proposée en utilisant des poudres d'olives poreuses (OPP) comme étant de nouveaux supports biodégradables. Ces bioparticules biodégradables ont été intégrées dans un nouveau photobioréacteur à lit fluidisé et maintenus en suspension par une fluidisation en continu. L' effet des propriétés des poudres d'olives (taille, concentration, porosité et densité) a été étudié sur l'efficacité des flocs-MaB pour le traitement des eaux usées. Le comportement hydrodynamique du système gas-liquide-solide a été contrôlé afin d'assurer l'attachement du biofilm multitrophique sur les supports biodégradables. L'objectif principal de cette étude est de sélectionner un support adéquat et approprié en terme de taille et de concentration pour la fixation des flocs-MaB appliqués dans la bioremédition durable.

- L'importance des systèmes de croissance de biomasse attachée sous forme de biofilms donne l'idée de développer un réacteur à disque rotatif en utilisant des flocs-MaB pour étudier la performance de ce système d'immobilisation sur le traitement des eaux usées sans apport d'oxygène. Le développement de biofilms multitrophiques permettra d'étudier l'effet de ces interactions symbiotiques sur l'élimination des polluants organiques et minéraux.

Ces processus de traitement des eaux usées basés sur les interactions multitrophiques entre microalgues-bactéries sont capables d'éliminer les polluants en évitant l'apport supplémentaire en oxygène et en dioxyde de carbone et de produire simultanément de la biomasse valorisable.

Cette biomasse multitrophique récupérée suite aux différents systèmes de traitement des eaux à été utilisée comme substrat et valorisée par une co-digestion anaérobie. Etant donné que les flocs-MaB ne constituent pas une matière première mature pour la co-digestion, des investigations ont été lancées afin d'optimiser les conditions de fonctionnement de ce processus et d'améliorer la production de méthane. Par conséquent, la présente étude se concentre sur la détermination de la source optimale d'inoculum (digestat et lisier) en variant le ratio VS_S/VS_I. A la sortie du digesteur, le digestat riche en nutriment a été dilué et traité par le couplage microalgues-bactéries. Autrement, le lisier a été utilisé comme un autre milieu nutritif afin de vérifier la performance de ces interactions multitrophiques en bioremédiation. Ce procédé s'inscrit dans le cadre de l'économie circulaire d'où l'obtention de ZERO déchet à la sortie du processus. Ainsi, l'objectif ultime de ce travail est de proposer de nouvelles solutions de phyto-bioremédiation à base de biomasse multitrophique de flocs-MaB.

La démarche globale que nous avons menée nous a permis de travailler à l'échelle moléculaire, microscopique et macroscopique avec différentes méthodes analytiques pour suivre l'évolution morphologique de la biomasse et les concentrations des polluants comme indiqué dans le schéma suivant décrivant notre approche:


Photobioréacteur en batch
Lumiére en continu
Boues de retour municipale (Kairouan, Tunisie)
O2
DCO
NH4+
PO43-
CO2
Eaux usées synthètiques
Stabilisation aprés 26 jours
Enrechissement photosynthètique
Microalgues-bactéries flocs
(MES, MVS, Chl(a), Morphologie)
Etude biologie moléculaire envisagée
Etude de faisabilité
Pré-culture multitrophique (7jours)
Phyto-bioremédiation (élimination des polluants: C, P, N)
Production de bioénergie (biométhane)
Biomasse flocs-MaB fixe
Lumiére
flocs-MaB+
Bille PVA-alginate
Polymére synthètique
Densité MaB-flocs, DCO, Temps
*Approche multi-échelle: microréacteur avec/sans circulation; colonne 2D
Granules d'olive poreuses
Matériaux biodégradables
Taille, concentration, porosité, densité
*Réacteur lit fluidisé
(étude hydrodynamique)
Disque Plexiglace
Support rotatif
*Réacteur à disque biofilm rotatif
Lisier
+
Digestat
Digestat liquide 10, 30, 50%
ratio VSS/VSI: 0.2,0.5,0.8
CO2,CH4
Photobioréacteur
Digesteur anaérobie
Biomasse flocs-MaB valorisable
Effluent épuré (ZERO REJET)
Eaux traitées réutilisées
DCO, NH4+, PO43-

CHAPITRE II.

Approche à multi-échelle d'élimination des polluants en utilisant des flocs de microalgues-bactéries (flocs-MaB) immobilisés dans des polymères PVA-alginate

II.1. Introduction

La technologie du couplage entre les bactéries-microalgues (flocs-MaB) a été un exemple de procédés inventifs. De nos jours, cette technologie reçoit de plus en plus une attention globale étendue en tant qu'approche intégratrice d'écologie et d'économie pour le traitement biologique des eaux usées domestiques avec suffisamment de rayonnement solaire. Il s'agit d'un processus de traitement durable des eaux usées qui consiste à incorporer la totalité de la biomasse algale et à réaliser simultanément l'élimination du carbone organique et des nutriments des eaux usées. Ce procédé opérationnel est basé sur les interactions multitrophiques entre les microalgues et les bactéries qui font l'objet de plusieurs applications pour améliorer la durabilité des bioprocédés environnementaux en réduisant les émissions globales de dioxyde de carbone (CO_2) et en régénérant la biomasse et l'oxygène (O_2). Cette étude sera concentrée sur l'exploitation des caractéristiques essentielles de cet écosystème symbiotique, y compris l'assimilation des polluants, la connexion trophique entre les microorganismes, le recyclage et la rétention de la biomasse. Il a été démontré qu'un consortium de flocs-MaB pourrait être maintenu grâce à une optimisation des procédés, une bonne conduite et un recyclage d'une partie de la biomasse.

Dans cette étude, les systèmes de traitement des eaux usées à biomasse immobilisée ont adoptés comme étant les meilleures alternatives de bioremédiation afin de résoudre le problème de la récolte de la biomasse et d'améliorer l'efficacité de l'élimination des polluants à partir des eaux usées.

II.2. Microréacteur en batch pour l'élimination des polluants organiques et minéraux en utilisant de flocs de bactéries-microalgues immobilisées

Dans ce contexte, une étude à multi-échelle à été lancée pour le traitement des eaux usées en utilisant une technique d'immobilisation des flocs-MaB dans des polymères de polyvinyl alcohol (PVA)-alginate réticulés avec du sulfate de sodium.La présente étude porte sur l'efficacité d'un système simple d'encapsulation de cellules vivantes sous forme de billes de 3 mm. Cette technique permettra de gérer une forte densité de flocs dans un réacteur en batch à micro-échelle pour le traitement des eaux usées synthétiques sans l'apport d'oxygène. La faisabilité du processus d'immobilisation a été étudiée avec trois concentrations C_1(2%, v/v), C_2(5%, v/v) et C_3(10%, v/v) de flocs-MaB encapsulées dans des billes de PVA-alginate.

Dans le but d'étudier la performance de la culture multitrophique des flocs-MaB pour la bioremédiation, l'élimination simultanée des nutriments (ammonium et phosphore) et de la DCO a été évaluée. En outre, des analyses microscopiques ont été effectuées pour suivre l'évolution multicellulaire des flocs-MaB pendant différentes périodes d'incubation (2, 4 et 6 jours). Par conséquent, l'effet des conditions opératoires à micro-échelle sur l'efficacité d'élimination des polluants et la stabilité de la biomasse a été étudié en contrôlant les qualités physicochimiques des eaux usées (DCO) et la densité des flocs-MaB.

Les résultats présentés dans l'article soumis et accepté au journal " ***Environnemental Technology*** " montre que le microréacteur est conçu afin de mieux contrôler l'évolution des flocs-MaB à l'intérieur des billes et de sélectionner les conditions de fonctionnement appropriées (densité, temps d'incubation, DCO) pour une approche multi-échelles supplémentaire.

Article (I): Microscale multitrophic batch reactor (MMBR) for organic and mineral pollutants removal using microalgae bacterial-flocs

Olfa Beji[a,b], Nouceiba Adouani[a], Souhila Poncin[a], Moktar Hamdi[b] , Huai Z. Li[a,*]

[a]Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

[b]Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

*Corresponding author:

Pr. Huai Zhi LI

huai-zhi.li@univ-lorraine.fr

Abstract

Microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) immobilization technique using polyvinyl alcohol (PVA) crosslinked with sodium alginate represents a novel approach for sustainable pollutants removal.The present work was made in order to enhance the performance of a microscale multitrophic batch reactor (MMBR) for treating two synthetic wastewater solutions prepared with two different initial Chemical Oxygen Demand (COD): 200 $mg.L^{-1}$ and 450 $mg.L^{-1}$, respectively. Three MaB-flocs concentrations were entrapped into PVA-alginate beads: C_1 (2%, v/v), C_2 (5%, v/v) and C_3 (10%, v/v), without O_2 supply, during three periods 2, 4 and 6 days of batch incubation. PVA-alginate beads containing the highest concentration C_3 of MaB-flocs improved the performance of batch reactor at microscale to remove significantly ($p<0.05$) COD, NH_4^+ and PO_4^{3-} of about 63%, 61% and 82%, respectively, from wastewater more than the two other concentrations used. This result confirms that C_3 of MaB-flocs hasn't only a good potential for nutrients and organic compounds removals but also the highest MaB-flocs morphological progression after 6 days of wastewater treatment with the highest COD of 450 $mg.L^{-1}$. The feasibility of the PVA-alginate for cells immobilization, investigated through microscopy analysis, has shown, for all experiments, the evolution of multicellularity in MaB-flocs.

Key words: Microalgae-bacterial flocs; microscale multitrophic batch reactor; sustainable pollutants removal; PVA-alginate immobilization; multicellularity evolution.

1. Introduction

The wastewater treatment processes are not always efficient in reducing carbon emission because of their high energy consumption and carbon dioxide (CO_2) release (Pacheco et al., 2015). The biosequestration of CO_2 has been proposed by using the photosynthetic microalgae cultivation as a sustainable technology of Carbon Capture and Storage (CCS) (Lam et al., 2012). In this phycoremediation approach (Bawiec et al., 2018), the biomass of microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) helps in restoring the ecosystem and promoting green technology for the biological wastewater treatment in the term of the circular economy (zero discharge) (Chisti et al., 2007; Rawat et al., 2011). The use of MaB-flocs technology allows to replace a classical aeration by a photosynthetic aeration (Jia et al., 2016 ; Bawiec et al., 2018; Abinandan et al., 2018). Therefore, this phycoremediation system was applied firstly within a wastewater ponds process by Oswald since 1950s (Abinandan et al., 2018), by incorporating the entire algal biomass and simultaneously removing of organic carbon and nutrients from wastewater (Gutzeit et al., 2005). The synergies between photo-autotrophic algae and heterotrophic bacteria are determined by the exchange of oxygen (O_2) and carbon dioxide (CO_2) (Gutzeit et al., 2005). The consumption of CO_2 and nutrients (ammonium and phosphorus) by microalgae can enhance bacterial growth rate during photosynthetic phenomena and in return CO_2 release and some substances production by bacteria improves consequently microalgal growth (Jia et al., 2016). Hence, photosynthetic aeration by microalgae could be used for the degradation of organic contaminants, nitrogen and phosphorus based on algae–bacteria wastewater treatment (Jia et al., 2016;Pahazri et al., 2016). The phycoremediation process is adopted to recycle the wastewater for algae growth, with zero discharge, which is part of the circular economy and sustainable development (Efaq et al., 2015). In this context, immobilization of MaB-flocs for wastewater treatment was proposed to solve the problem of the biomass harvesting and to enhance the nutrients removal efficiencies from wastewater. The most widely used technique for microorganism immobilization is the entrapment method, based on the confinement of the living cells within a three-dimensional gel (Mallick, 2002). The porous matrix allows the sufficient retaining of cell abundance and tends to resolve the inherent biomass losses in outflows (Xiao et al., 2011). Recently, polyvinyl alcohol (PVA), a cheap and non-toxic synthetic polymer, was successfully applied for wastewater treatment using entrapped microorganisms (Zain et al., 2010 ; Van Pham et al., 2014). The agglomeration and swelling problems encountered in the PVA-boric matrix are eliminated by the addition of calcium alginate and sodium sulfate.

Simultaneously, this avoids the drastic decrease in microorganism viability, caused by the saturated boric acid solution (Zain et al., 2010 ; Van Pham et al., 2014). The present study focuses on the efficiency of multitrophic batch microreactor for the mineral pollutant removal without O_2 supply. This will provide a sustainable treatment process based on phycoremediation. A photosynthetic method was carried out to improve the natural bio-flocculation of algae-bacterial biomass. The obtained flocs were immobilized and incorporated into a batch photobioreactor. The design of the reactor was established at microscale and helped to solve the problem of biomass harvesting.The feasibility of the immobilization process was studied with three concentrations C_1, C_2 and C_3 of MaB-flocs in PVA-alginate matrix. To assess the potential of multitrophic MaB-flocs culture in wastewater treatment, simultaneous removal of nutrients (ammonium and phosphorus) and COD was evaluated. Moreover, morphological evolution of MaB-flocs during different periods (2, 4 and 6 days) of wastewater treatment was examined. Hence, the effect of the microscale operational conditions on the removal efficiency of pollutants was investigated by controlling both physicochemical wastewater qualities (COD) and MaB-flocs densities. The advantage of the immobilization process is related to the possibility of the scale-up wastewater treatment with an importance harvesting of biomass (Christenson et al., 2011). The present work can provide new insights into the multiscale applications of multitrophic interactions of microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) for the sustainable phycoremediation. The MaB-flocs could be reused in further treatment processes which will avoid any biomass discharge. Hence, the integration of this system in wastewater treatment process represents an economic and ecologic approach.

2. Materials and methods

2.1. Microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) preparation

MaB-flocs were pre-cultured in a batch reactor (Figure1.a) without O_2 supply and CO_2 release. The reactor was filled with 1.5L of activated sludge collected from a settling tank of a municipal sewage treatment plant in Kairouan city, Tunisia. The synthetic wastewater was added to obtain a working volume of 4.5 L, which composition was described by Huang et al. (2015) (Table 1). The homogenization of the culture was achieved by an external re-circulation rate of 0.855 $cm^3.s^{-1}$ of the headspace gas distributed at the reactor bottom without adding oxygen. Light was kept on continuously using two fluorescent lamps with a light

power of 1050 lm each (18W, Philips, France). The temperature inside the column was maintained at 27°C through a circulated hot water delivered by a thermostatic bath.

2.2. Preparation of chemical solutions

The matrices were prepared to encapsulate free cells using a 5%, (w/v) sodium alginate solution $(C_6H_7O_6Na)_n$ (Fisher Scientific, UK) in distilled water and then agitated (Heat-Stir, Stuart) overnight. Polyvinyl alcohol solution was prepared by adding 10 g of PVA $(C_2H_4O)_n$ to 70 mL of distilled water heated to around 80°C to dissolve PVA polymer, according to Van Pham et al. (2014). Samples were prepared by adding 20 mL of sodium alginate solution (5%, w/v) to the PVA solution. The PVA- alginate solution cooled at room temperature was used to entrap 10 mL of the MaB-flocs. In fact, this solution has PVA (10%, w/v), sodium alginate (1%, w/v), MaB-flocs (10%, v/v). The effect of MaB-flocs concentrations on wastewater treatment was studied by using a highest concentration C_3 (10%, v/v), as a reference of other study Van Pham et al. (2014) compared with two others concentrations of MaB-flocs C_1 (2%, v/v) and C_2 (5%, v/v). Thus, the concentration of microorganisms (10%, v/v) was fixed according to the formulation of the matrix adopted by the previous researchers (Zain et al., 2010 ; Van Pham et al., 2014). Moreover, a reference sample was prepared without MaB-flocs for comparison.

2.3. MaB-flocs matrix entrapped

The MaB-flocs PVA-alginate matrix was gelled in order to form beads of 3 mm of the diameter through a syringe needle (21G, Sterican, France). The PVA-boric beads were formed by immersing the matrix droplets into sterile solutions of H_3BO_3 (5%, w/v) and $CaCl_2$ (2%, w/v) under continuous stirring for 1 hour (Figure 2). After washing beads in pure water, PVA-sulfate beads were prepared by transferring the PVA-boric beads to a 0.5M Na_2SO_4 solution and immersing them for 1 hour (Van Pham et al., 2014). All beads were finally washed and stored in the pure water at 4°C until experiments. For the wastewater treatment with entrapped cells, several dilutions were performed from initial MaB-flocs suspension in Bold's Basal Medium (BBM) as described by Bohutskyi et al. (2015) in order to obtain differentconcentrations of MaB-flocs C_1 (2%, v/v), C_2 (5%, v/v), and C_3 (10%, v/v). The components of BBM media were as follows (per liter): 176 g KH_2PO_4, 75 mg K_2HPO_4, 75 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg tetrasodium EDTA, 31 mg KOH, 25 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 25 mg NaCl, 11.4 mgH_3BO_3, 10 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8.83 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.84 mg H_2SO_4,1.57 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.44 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.71 mg MoO_3, and 0.49 mg $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.

2.4. Microscale wastewater treatment with MaB-flocs into PVA beads

A multitrophic wastewater treatment in the micro-batch- reactor by using entrapped samples was performed in parallel in three microreactors of 5 mL working volume each (Figure 3). The microreactor was designed in order to better control the evolution of the flocs inside the beads and to investigate the suitable operating conditions for a further multiscale approach. In each micro-reactor, one PVA-alginate bead with one of three MaB-flocs concentrations C_1 (2%, v/v), C_2 (5%, v/v), and C_3 (10%, v/v) was filled in the center of the microreactor without the recirculation of the synthetic wastewater under a batch regime. PVA-alginate beads were incubated for three different periods: 2, 4 and 6 days of batch experiment and exposed under a fluorescent lamp with a light power of 1050 lm (18W, Philips, France), during a single light phase of 24 hours. Hence, the use of these periods of treatment was justified by the results obtained and discussed below (section 3.2). Synthetic wastewater used in this study was prepared with two initial COD concentrations of 200 and 450 $mg.L^{-1}$, respectively (Table 1). The pH value of the wastewater was adjusted between 7.0 and 8.3 by means of sodium bicarbonate. According to the previous studies Gutzeit et al.(2005), initial COD of 420 $mg.L^{-1}$ was suitable for the bioflocculation of MaB-flocs biomass into a lab-scale reactor. As used by Boelee et al. (2014), within symbiotic microalgae–bacterial biofilm reactors, the municipal wastewater contains 350 $mg.L^{-1}$ COD, 50 $mg.L^{-1}$ NH_4^+-N and 10 $mg.L^{-1}$ PO_4^{3-}-P. Thus, microalgae are ubiquitous and able to grow under several conditions of ecosystems (Diniz et al., 2017).

2.5. Analytical techniques

Every two days, effluent samples were filtered and analyzed for COD using HACH (51996-2000) method. The concentrations of phosphorus ($P\text{-}PO_4^{3-}$) and ammonium ($N\text{-}NH_4^+$) were measured using Nessler method and phosphate reagent for a 10 mL sample (HACH-LANGE GmbH, Germany), respectively, on a HACH DR2000 spectrophotometer. Total concentration of Chlorophyll(a) was extracted (Eq. 1) through a 1M methanol solution and measured using spectrophotometer (UV–Vis 2550, Shimadzu, Japan) at 652 nm and 665 nm (Porra et al., 1989):

$$\text{Chlorophyll(a)} = 16{,}29\ A_{665} - 8{,}54\ A_{652} \quad (1)$$

The pH value was measured using a pH meter (METTLER Toledo M300a, USA). Microscopic observations of MaB-flocs growth encapsulated into PVA-beads were measured by using LEITZ Dialux 20 (Leica, Germany) microscope (x2.5, x10 and x40) connected to a

monitor (Sony, Japan) color camera (3CCD). MaB-flocs images were analyzed by means of Visilog 6.3 software (ThermoFisher Scientific, France).

The data of biodegradation kinetics of both substrates (ammonium and phosphorus) werefitted to a single Michaelis-Menten equation (Hamdi, 1995):

$$V = -\frac{ds}{dt} = \frac{Vm\ Sf}{Km + Sf} \quad (2)$$

where V is the biodegradation rate ($mg.L^{-1}.H^{-1}$), S_f is the substrate concentration ($mg.L^{-1}$) in the effluent, V_m is the maximum biodegradation rate ($mg.L^{-1}.H^{-1}$), and K_m is the Michaelis constant ($mg.L^{-1}$).

2.6. Statistical analyses

The data were analyzed using an independent sample t-test with the statistical software SPSS 13.0 (SPSS Inc., USA). A standard deviation (p-value < 0.05) at the 95% confidence level was chosen to compare all the parameters analyzed (ammonium, phosphorus and MaB-flocs' size). Each analysis was repeated four times.

3. Results and discussions

3.1. Bio-flocculation of MaB-flocs in a batch reactor

The main objective of this study is to enhance the photosynthetic microorganism's development from return sludge without CO_2/O_2 supply and microalgae consortium addition. The activated sludge inoculated into the batch reactor settled initially after 30min giving 14.4 ± 0.01 g TSS.L^{-1} and 10.2 ± 0.3 g VSS.L^{-1} in order to give Sludge Volume Index 30 (SVI_{30}) of 91.5ml g^{-1} under permanent illumination (Table 2). After 26 days of enrichment under a continuous light exposing, a green layer was observed on the walls of the reactor which indicates the development of algae in the sludge (Figure 1.b, 1.c). Thus, MaB-flocs settled faster with SVI_{30} of 80 ml.g^{-1} reaching up to a density of 3.2 ± 0.05 g VSS.L^{-1} (Table 2). The decrease of the MaB-flocs settleability during synthetic wastewater feeding, could be explained through microscopic analysis as in other studies Van Den Hende et al. (2011b) by the abundance of filamentous species *Phormidium* sp. Furthermore, the Chl(a) concentration increased from 0.12 ± 0.15 mg Chl(a).g^{-1}VSS to 3.8 ± 0.24 mg Chl(a).g^{-1}VSS at day 26 (Table 2). This is of the same order of magnitude that the Chl(a) concentration obtained by Van Den Hende et al.(2014): 4.9 mg Chl(a).g^{-1} VSS after 7 days in a batch reactor treating

aquaculture wastewater with the addition of 0.090 g VSS MaB-flocs.L^{-1} cultivated previously. It has been suggested that the trophic state of microalgae-bacteria community depends on the Autotrophic Index (AI) (Van Den Hende et al., 2011a). Thus, the autotrophic colonization is due to lower AI values, while heterotrophic dominance is related to higher values of AI (APHA, 1985).In this case, the AI decreased from a high value of about 8325 ± 0.15, related to heterotrophic colonization into the sludge, to reach a low AI of 260.7 ± 0.16 after 26 days of pre-culture (Table 2). Thus, the lowest AI confirmed the autotrophic abundance of microalgae into the sludge inoculum. This result was verified by microscopic observations and that showed the enrichment of sludge inoculums with green unicellular and multicellular algae and filamentous cyanobacteria (Figures 4.a and 4.b). This observation confirmed the biological distribution of various species in the flocs such as bacteria, cyanobacteria, algae, diatoms, yeast zooplankton, according to Srivastava et al. (2018), which indicates a suitable media for culture.

3.2. Morphological evolution of microalgae-bacterial flocs

Observations by the microscopy of the entire shape of the bead shown in Figure 5 reveal that the immobilization process has only a few effects on the MaB-flocs morphology. Nevertheless, it maintains the density of MaB-flocs between the crosslinks of the PVA-alginate polymers. Then, the morphology of immobilized MaB-flocs was evolved temporarily during the wastewater treatment, in the same manner as activated sludge flocs (Gutzeit et al., 2005). Similarly, De-Bashan et al. (2008) mentioned that the immobilization of *C. vulgaris* and *C. sorokiniana* with Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), *Azospirillum brasilense,* within small alginate beads significantly enhances the growth kinetics of the microalgae, in terms of colony and cell sizes. Table 3 resumes the evolution of MaB-flocs' diameter, for all densities, after 2 and 6 days of wastewater treatment containing initial COD of 450 mg.L^{-1} and 200 mg.L^{-1} concentrations. After 2 days of batch incubation with initial COD of 450 mg.L^{-1}, PVA beads contained small colonies with diameters of 4.01 ± 0.21 µm, 8.5 ± 0.09 µm, and 12.09 ± 0.2 µm, respectively, for the three concentrations of MaB-flocs C_1, C_2, and C_3. Such cells differ significantly in their sizes and can produce different numbers of daughter cells with two-times increased in size. In addition, with the highest concentration C_3, the flocs' diameter increases significantly to achieve a maximum of 220.7 ± 0.67 µm after 6 days of wastewater treatment with initial COD of 450 mg.L^{-1}. This indicates the multicellularity evolution of algae cells. Whereas using the lowest concentration C_1, a slight evolution of

MaB-flocs morphology reached 87.95 ± 0.2 µm of diameter for the same period of incubation. Therefore, the MaB-flocs diameter increased more significantly ($p<0.05$) by using a high density C_3, during different periods of the operation, compared to the other two concentrations C_1 and C_2. Figures 6 and 7 combine several pictures taken by a camera connected to the optical microscope. After each treatment, PVA-alginate conserved its initial diameter of 3 mm without any swelling of bead volume. Figure 6 demonstrates that after wastewater treatment containing initial COD of 450 $mg.L^{-1}$, for all densities, MaB-flocs' size evolved from small to large colonies, respectively after 2 days and 6 days. This observation could be related to the multiple fissions when the breakup of a parent cell into more than two daughter cells increases their volume more than twice between 2 and 6 days of a single period of light. Thus, this phenomenon leads cells to grow under the entire light phase and to perform the rest of the DNA replication sequence in the dark (Bišová and Zachleder, 2014). As demonstrated by other studies De-Bashan et al. (2010), bacteria and microalgae microcolonies merged to form large and mixed colonies within the internal cavities. This gives the opportunity to analyze an evolutionary pathway leading from unicellularity to multicellularity of cells that evolved much more recently in the volvocine green algae (Hallmann, 2006). Otherwise, an optimal MaB-flocs concentration C_3 will be chosen for further multiscale experiments. The increase of cells' density in beads does not enhance necessarily the efficiency, and could even cause leakage problems. In addition, the size distribution of a population during the growth phase does not change dramatically since the bigger mother cells just divide more times and give rise to cells of approximately the same size. The similar behavior was previously reported by Bišová and Zachleder, 2014. However, during 8 days of batch incubation, the rapid evolution of the size of MaB-flocs caused a large diffusion of cells outside the bead. This is not the objective of the present work. Thus, this observation determines a maximum incubation period of 6 days for all MaB-flocs concentrations in order to obtain the efficient microscale wastewater treatment. During operation with a low concentration of COD (200 $mg.L^{-1}$), immobilized cells suffered from a growth limitation due to a lack of COD with a significant reduction of the size of flocs, compared to COD 450 $mg.L^{-1}$ (Figure 7). Thus, the decrease of the growth rate of immobilized cells in a matrix may be related to the restrictions in nutrients diffusivity to the immobilized cells (Moreno-Garrido, 2008). In this case, bigger sizes of the microalgae-flocs were obtained using the highest density C_3. Cells evolved from small dispersed colonies with a diameter of 6.2 ± 0.07 µm for the day 2 to a well-structured MaB-flocs with a diameter of

75.5 ± 0.26 µm after 6 days of wastewater treatment (Table 3). The dynamics of algae-bacteria communities within the immobilization materials were affected by the flexibility, the permeability of the matrix and the diffusivity of substrates and by-products to and from the cells (Pahazri et al., 2016 ; Wang et al., 2018). The biodegradation rate of the substrate was affected by three steps: the transfer of the substrate and products from the liquid medium to the flocs (external mass transfer), the diffusion of substrates within the matrix (internal mass transfer) and the microbial reactions (Hamdi, 1995 ; Pilkington et al., 1998). In photobioreactors containing immobilized cells, the biodegradation is limited by liquid and solid-phase substrate diffusion kinetics (Hamdi, 1995). Through the small crosslinks of PVA-alginate bead, nutrients diffuse to the entrapped cells in order to enhance its growth (Whitton et al., 2015). Thus, the diffusion of carbon could be explained by the concentration gradient between the external medium and the matrix (Jodra et al., 2003). Previous works were carried out concerning the transfer of external mass of substrate in the immobilized flocs per unit area and per unit time which corresponds to the flux (J_0) in the bulk liquid. The phenomenon was characterized by the mass transfer coefficient (k_L) (Hamdi, 1995 ;Pilkington et al., 1998). The transferred nutrients and organic compounds through the solid phase will affect the growth evolution of immobilized MaB-flocs. However, algae and bacteria formed aggregates from the surface area to the inside of beads in the bioreactor related to the competition for substrate (Li et al., 2009). Heterotrophic aerobic bacteria assimilated organic carbon and oxygen supplied by microalgae, and in return, released inorganic carbon (CO_2) essential for algal growth during photosynthetic metabolism (Chinnasamy et al., 2014 ; Nguyen et al., 2014 ; Jia et al., 2016). In the presence of high organic matter (COD 450 $mg.L^{-1}$), heterotrophic bacteria play a ubiquitous role in increasing the unicellular microalgae flocs when they are farmed massively as like C_3 of MaB-flocs by establishing mutualistic interactions (Ramanan et al., 2016). For instance, the importance of mutual mechanism was demonstrated by the beneficial exchange of carbon within co-immobilizing *Azospirillum brasilense* and *C. vulgaris* (Jia et al., 2016). In these cooperative interactions, QS mechanism is generally considered to facilitate carbon biodegradation only when the bacterial population reaches a sufficient cell density in the presence of high COD (450 $mg.L^{-1}$), via increasing QS signal molecules (Yabur et al., 2007). The removal efficiencies of carbon compounds, as a substrate, were calculated by the difference between the substrate concentrations before and after the wastewater treatment (results not shown in the paper).

3.3. Nutrients (ammonium and phosphorus) removal rates

Figure 8 displays the performance of the microreactor through the evolution of ammonium and phosphorus removal rates under three MaB-flocs concentrations C_1, C_2, and C_3. During the treatment, no nutrients removal rates were observed using the reference sample (PVA-beads without cells). The highest removal rates of ammonium and phosphorus were obtained after 6 days of wastewater treatment containing initial COD of 450 $mg.L^{-1}$ for all densities. Although the highest concentration of C_3 decreased more significantly ($p<0.05$) the total N-NH_4^+ and P-PO_4^{3-} contents than the other concentrations C_1 and C_2. Hence, the density of MaB-flocs affects strongly the remove of ammonium and phosphorus. The ammonium removal efficiency increased from 27.86 ± 0.4 % for the day 2 to achieve 60.92 ± 0.7 % after 6 days for C_3, which is higher than 57.9 ± 0.7 % obtained for C_2 for the same period in the batch treatment. Unlike C_3, beads containing low density of C_1 increased slightly the ammonium removal rate to reach 52.2 ± 0.4 % at the end of the experiment (Figure 8.a). The high assimilation of ammonium by entrapped cells could be caused by the ionic interactions which concentrate the ammonium (cation) onto the alginate gel (anion). This finding highlights the important role of the immobilized matrix for the biodegradation of inorganic nutrients (Swe et al., 2017). In this multitrophic system, the relationship between bacteria and microalgae could be competitive for nutrients (ammonium, nitrite, and nitrate) removal (Wang et al., 2018 ; Gonzalez-Camejo et al., 2018). The nitrification-denitrification processes adopted by bacteria could inhibit the microalgae growth owing to the reduction of ammonium concentration by nitrifying bacteria (Gonzalez-Camejo et al., 2018). Optimal algae growth conditions may have an inhibitory effect on nitrification-denitrification reactions. In the presence of a continuous light supply, microalgae dominate the competition for ammonium assimilation. Thus, for inorganic nitrogen, ammonium (NH_4^+) represents the preferred form assimilated by microalgae with less energy requirement than nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) (Whitton et al., 2015 ; Jia et al., 2016; Abinandan et al., 2018). However, the reduction of nitrate and nitrite into ammonium was carried out in two successive steps, during the assimilation of nitrogen, by using catalyzed enzymes nitrate reductase and nitrite reductase, respectively (Jia et al., 2016). Similar to the ammonium remove, for the highest density of C_3, the phosphorus removal efficiency raised up to 81.95 ± 0.5 % after 6 days in the microreactor. Whereas, the total P-PO_4^{3-} concentration weakly decreases with the lowest C_1 to achieve 52.3 ± 0.2% of removal rate for the day 6 (Figure 8.a). Previously, Su et al. (2011) obtained the removal efficiency of phosphate about of 64.8 ± 1.0 % after 8 days of municipal wastewater

with a suspension culture of wastewater-born and settleable algae-bacterial. By comparing to suspended systems, the immobilized biomass is able to remove high concentrations of nutrients during a treatment with low HRT of 1 day (Whitton et al., 2015). Hence, the present result confirms the feasibility of the immobilized process for MaB-flocs as compared to a free system. 450 $mg.L^{-1}$ of initial COD in the wastewater significantly enhances the ammonium and phosphorus removal as the density of MaB-flocs increases. On the other hand, by using wastewater with COD of 200 $mg.L^{-1}$, the highest nutrients' removal rates of ammonium and phosphorus reached 36.06 ± 0.4 % and 69.67 ± 0.5 %, respectively, after 6 days of batch incubation with C_3. For low density C_2, NH_4^+ and PO_4^{3-} removal rates increased less than with C_3 in order to obtain 27.8 ± 0.4 % and 47.6 ± 0.2 %, respectively, for the day 6 (Figure 8.b). These results confirm that despite the lowest COD 200 $mg.L^{-1}$, bacteria improve the growth of microalgae flocs and enhance its capacity for nutrients removal, especially phosphorus. Recently, the co-immobilization of cyanobacteria (*Synechococcus elongatus*) with PGPB (*A. brasilense*), in alginate beads, increased efficiency the phosphorus removal (44. 8%) more than immobilized cyanobacteria cells alone (32 %) from an initial concentration of PO_4 (8.35 $mg.L^{-1}$) after 7 days (Ruiz-Güereca et al., 2016). In the present study, the ammonium removal was a much slower process than that observed for phosphate as the latter showed an increase of about 50 % of the removal rate between 2 and 6 days of batch treatment. During this experiment, the pH values didn't exceed 7.3 and no significant effect on nutrients removals was observed. According to Huang and Wang, 2003, the highest phosphate removal efficiency of 73.97 % was obtained at a pH value around 7 by using a co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge into polyvinyl alcohol (PVA) gel. The mechanisms for phosphate removal through co-immobilized systems, such as precipitation, algae uptake, and absorption, were affected by the pH values (Huang and Wang, 2003; Larsdotter et al., 2007). In our case with pH = 7.3, the phosphate removal is probably due to the absorption phenomena across the porous of the carrier as reported by Huang and Wang, 2003. Otherwise, the role of nutrients could determine the mutual relationship between algae and bacteria by forming a stable ecosystem, as explained by Abinandan et al. (2018) and Ramanan et al. (2016). This interaction mechanism was also proposed to highlight the role of PGPB, *Rhizobium* sp. in enhancing *Chlorella vulgaris* biomass (Kim et al., 2014). It appears that the combination of MaB-flocs at C_3 density, encapsulated within one PVA-bead, was significantly successful ($p<0.05$) in reducing nutrients (NH_4^+ and PO_4^{3-}) of about 61 % and 82 %, respectively, from synthetic wastewater with initial COD 450 $mg.L^{-1}$. Therefore,

simultaneous nutrients (N and P) degradation by MaB-flocs entrapped in only one PVA-beads led to high rates of wastewater treatment and the stability of the flocs under batch conditions.

In this regard, kinetic models could be adopted to evaluate the efficiency of MaB-flocs in nutrients removal in batch reactors. As reported by previous researchers (Ruiz et al., 2013 ; Mennaa et al., 2017), the effect of algae growth on nutrients uptake has been validated according to the photobiotreatment model (PhBT) for nutrients biodegradation, coupled with the Verhulst kinetic model for biomass productivity, under batch conditions. However, in the current study, the population growth was determined in terms of flocs' size, which cannot be used in the Verhulst model to calculate the kinetic parameters of microalgae productivity (Ruiz et al., 2013 ; Mennaa et al., 2017). Measurements of MaB-flocs density from the dissolved bead will be conducted in further works in order to study the kinetic characteristics of the nutrients' biodegradation. Previous work has been performed by Hamdi et al. (1995), measuring bioflocs diameters and substrate biodegradation to determine kinetic constant using Michaelis Menten equation. The apparent kinetic constant (K_m) was calculated for the different MaB-flocs densities and initial COD concentrations for both substrates (ammonium and phosphorus) (Table 4). The highest K_m values of 5.156 $mg.L^{-1}$ and 3.502 $mg.L^{-1}$ for ammonium and phosphorus, respectively, were obtained for the highest MaB-flocs density and COD value. Floc diameter and hydrodynamic conditions affect enormously the apparent kinetic constant (K_m). As the floc diameter increases K_m increases (Hamdi, 1995), which is in accordance with the found results of this study.

3.4. COD removal rate

The variation of COD removal rates reveals a best treatment of wastewater containing initial COD (450 $mg.L^{-1}$)after 6 days for all MaB-flocs densities (Figure 9.a). The best COD removal rate was obtained using C_3 increasing from 49.38 ± 1.1 % after 2 days to 62.81 ± 1.4 % after 6 days of wastewater treatment. Furthermore, with low density C_1 of MaB-flocs, organic matters decreased from 450 $mg.L^{-1}$ to of about 242 $mg.L^{-1}$ in order to achieve 46.11 ± 1.1 % of COD removal efficiency for 6 days of batch experiment (Figure 9.a). As MaB-flocs concentration significant increases (C_3), as symbiosis communities consume more rapidly the organic compound present in the wastewater. Hence, the evolution of COD removal depends significantly ($p<0.05$) on the population density of the MaB-flocs affected by cultivation factors. It was supposed that both bacteria and algae are capable of reducing organic carbon

409 through either heterotrophic or mixotrophic metabolism (Gutzeit et al., 2005). Similar to
410 previous results, Figure 9.b shows that the COD removal efficiency increases from 22.78 ±
411 1.2 % for the day 2 until 47.51 ± 1.2 % for the day 6 using the highest density C_3, with initial
412 COD (200 $mg.L^{-1}$). As obtained by C_3, the COD removal rate achieved after 6 days a
413 maximum of 43.82 ± 1.8 % using C_2. It appears that the combination of MaB-flocs at C_3
414 density, encapsulated within one PVA-bead, was significant succeeded ($p<0.05$) in reducing
415 nutrients (NH_4^+ and PO_4^{3-}) and organic carbon of about 61 %, 82 % and 63 %, respectively,
416 from synthetic wastewater with 450 mg $COD.L^{-1}$. In parallel, it was demonstrated by Huang
417 et al. (2015) that despite the slight impact obtained for chemical oxygen demand (COD)
418 removal, the symbiosis algal–bacterial reactor remediated about of 40.7 % of total N and 44
419 % of total P of efficiency rates. This result emphasized the influence of the C/N ratio of about
420 14 on the efficiency of only one PVA-alginate bead for microscale bioremediation. Recently,
421 Mannina et al. (2017) showed that the highest removal efficiencies were achieved for C/N
422 ratio equal to 10, with an average removal of 98 % of nitrogen, 53 % of phosphorus and 67 %
423 of COD. In fact, algae and bacteria synergistically affect each other physiology and
424 metabolism (Ramanan et al., 2016). In the presence of high organic matter (COD 450 $mg.L^{-1}$)
425 in the wastewater, heterotrophic bacteria, as a decomposer of organic matter, plays a
426 ubiquitous role in algal growth enhancement by establishing mutualistic interactions
427 (Ramanan et al., 2016). For instance, the importance of mutual mechanism was demonstrated
428 by the beneficial exchange of carbon between PGPR, and *C. vulgaris* (Cho et al., 2015).
429 When bacteria consume fixed organic carbon supplied by microalgae, and in return, release
430 inorganic carbon and low molecular organic carbon essential for algal growth (Cho et al.,
431 2015). This observation could lead to a new inventive approach for wastes recycling. Thus,
432 the stability of the immobilization biomass in long-term operation plays an essential role to
433 scale-up the symbiotic application in multiscale bioreactors (Praveen et al., 2015). In this
434 way, different reactors could be suggested to improve the performance of immobilized MaB-
435 flocs adopted at microscale on sustainable bioremediation during a long period. This scale-up
436 could help to identify the effect of different hydrodynamic conditions such as flow rate, liquid
437 recirculation and reactor design on the morphological evolution of MaB-flocs.Consequently,
438 it is primordial to understand the relationship between phenomena observed at a small scale
439 and behavior obtained at a large scale.

440

4. Conclusion

The use of high MaB-flocs concentration C_3 demonstrated significant ($p<0.05$) higher nutrients removal rates about of 61 % (ammonium), 82 % (phosphorus) and 63 % (organic matter) after 6 days of microscale treatment without O_2 supply. For the same case, the size of algae flocs was evolved from small colonies to obtain a higher diameter (220.4µm) after a wastewater treatment with initial COD of 450 $mg.L^{-1}$. This study reveals the possibility to optimize the operating parameters such as MaB-flocs density, COD concentration and incubation period for further multiscale applications. Thus, PVA-sulfate beads containing of MaB-flocs density C_3 was chosen to study the treatment of wastewater (450 $mgCOD.L^{-1}$) during 6 days within the reactors at different scales with stable shapes and activities. Finally, we are currently exploring the way to extend the combination of the entrapment method with the symbiotic algae-bacteria interactions as an alternative to bioremediation techniques by recirculating the effluent in a 2D column at mesoscale approach.

Référence

Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K &Megharaj, M. (2018). Nutrient removal and biomass production: advances in microalgal biotechnology for wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology,*1-17.

APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater.16th edn. Washington, DC: *American Public Health Association*, p:1268.

Bawiec A. (2018). Efficiency of nitrogen and phosphorus compounds removal in hydroponic wastewater treatment plant. *Environmental Technology*, 1-11.

Bišová, K., Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journalof Experimental Botany*, 65, 2585-2602.

Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., Wijffels, R. H. (2014). Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors treating synthetic municipal wastewater. *Ecologoly Engineering*, 64, 213-221.

Bohutskyi, P., Liu, K., Nasr, L. K., Byers, N., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Bouwer, E. J. (2015). Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 6139-6154.

Chinnasamy S, Sood A, Renuka N, Prasanna R, Ratha S. K, Bhaskar S, Lewis D. M. (2014). Ecobiological aspects of algae cultivation in wastewaters for recycling of nutrients and biofuel applications. *Biofuels*, 5, 141-158.

Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*, 25:249–306.

Cho, D. H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B. H., Oh, H. M., Kim, H. S.(2015).Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, 175, 578-585.

Christenson L, Sims R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advance*, 29, 686–702.

De-Bashan, L. E., Antoun, H., Bashan, Y. (2008). Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium Azospirillum spp. in promoting growth of Chlorella vulgaris. *Journal of Phycology,* 44, 938-947.

De-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2010). .Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101, 1611-1627.

Diniz, G. S., Silva, A. F., Araújo, O. Q., & Chaloub, R. M. (2017). The potential of microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater resources. *Journal of Applied Phycology*, *29*, 821-832.

Efaq, A. N., Rahman, N. N. N. A., Nagao, H., Al-Gheethi, A. A., Shahadat, M., & Kadir, M. A. (2015). Supercritical carbon dioxide as non-thermal alternative technology for safe handling of clinical wastes. *Environmental Processes*, *2*, 797-822.

Gonzalez-Camejo J, Barat R, Pachés M, Murgui M, Seco A, Ferrer J. (2018). Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae–bacteria competition. *Environmental Technol*ogy, *39*, 503-515.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science of Technology*,52, 9-18.

Hallmann, A. (2006). Morphogenesis in the family Volvocaceae: different tactics for turning an embryo right-side out. *Protist*, 157, 445-461.

Hamdi M. (1995). Biofilm thickness effect on the diffusion limitation in the bioprocess reaction: Biofloc critical diameter significance. *Bioprocess engineering*, *12*, 193-197.

Huang, G., Wang, Y.(2003). Nitrate and phosphate removal by co-immobilized Chlorella pyrenoidosa and activated sludge at different pH values. *Water Quality Research Journal of Canada,* 38, 541-551.

Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015). Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.

Jia H, Yuan Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2, 1275089.

Jodra Y, Mijangos F. (2003). Phenol adsorption in immobilized activated carbon with alginate gels. *Separation Science and Technology*, 38, 1851-1867.

Kim, B. H., Ramanan, R., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. (2014).Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy*, 69, 95-105.

Lam MK, Lee KT, Mohamed AR. (2012). Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. Internationl Journal of Greenhouse Gas Control, 10, 456–469

Larsdotter K, Jansen JLC, Dalhammar G. (2007). Biologically mediated phosphorus precipitation in wastewater treatment with microalgae. Environmental Technology,28, 953-960

Li W. Y, Xu Y, Feng J. (2009).Treatment of coking wastewater by using an immobilized-microbial-cell anaerobic-aerobic system. Energy Sources, Part A, 31, 1397-1405.

Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*, 15, 377-390.

Mannina, G., Ekama, G. A., Capodici, M., Cosenza, A., Di Trapani, D., &Ødegaard, H. (2017). Moving bed membrane bioreactors for carbon and nutrient removal: The effect of C/N variation. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 31-40.

Mennaa F. Z, Arbib Z, Perales J. A. (2017). Urban wastewater photobiotreatment with microalgae in a continuously operated photobioreactor: growth, nutrient removal kinetics and biomass coagulation–flocculation. *Environmental Technology,*1-14.

Moreno-Garrido I.(2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99, 3949-3964.

Nguyen T. D. P., Frappart, M., Jaouen, P., Pruvost, J., Bourseau, P. (2014). Harvesting Chlorella vulgaris by natural increase in pH: effect of medium composition. Environmental Technology, 35, 1378-1388.

Oswald, W.J.,Gotaas, H.B., Ludwig, H.F. Lynch, V. (1953). Algae symbiosis in oxidation ponds, III.Photosynthetic Oxygenation.*Sewage and Industial Wastes*, 25, 692-705.

Pacheco, M.M., Hoeltz, M., Moraes, M.S., Schneider, R. C. (2015). Microalgae: cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *50*, 585-601.

Pahazri, N. F., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A. A., & Kassim, A. H. M. (2016). Production and harvesting of microalgae biomass from wastewater: a critical review. *Environmental Technology Reviews*, *5*, 39-56.

Pilkington, P. H., Margaritis, A., & Mensour, N. A. (1998). Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Critical reviews in biotechnology*, *18*, 237-255.

Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975, 384-394.

Praveen, P., Loh, K. C. (2015). Photosynthetic aeration in biological wastewater treatment using immobilized microalgae-bacteria symbiosis. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 99, 10345-10354.

Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. (2016). Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advance*, 34, 14-29.

Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411–3424.

Rivas, M.O., Vargas, P., Riquelme, C.E. (2010). Interaction of Botryococcus braunii cultures with bacterial biofilm. *Microbiology Ecology*, 60, 628–635.

583 Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P. D., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., Perales, J. A. (2013).
584 Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and
585 nutrient removal in wastewater. *Environmental Technology*, 34, 979-991.
586
587 Ruiz-Güereca, D. A., del Pilar Sánchez-Saavedra, M. (2016). Growth and phosphorus
588 removal by Synechococcus elongatus co-immobilized in alginate beads with Azospirillum
589 brasilense. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1501-1507.

590 Srivastava, A., Seo, S. H., Ko, S. R., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2018). Bioflocculation in
591 natural and engineered systems: current perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-
592 19.

593 Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass
594 accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water*
595 *Research*, 45, 3351-3358.

596 Swe Cheng, W., Wan Maznah, W. O., Convey, P. (2017. Nitrogen and phosphate removal by
597 free and immobilised cells of Scenedesmus bijugatus (Kützing) from the Pinang River
598 estuary, Penang, Malaysia. *Bioremediation Journal*, 21:138-148.

599 Van Den Hende, S., Carré, E., Cocaud, E., Beelen, V., Boon, N., Vervaeren, H.
600 (2014).Treatment of industrial wastewaters by microalgal bacterial flocs in sequencing batch
601 reactors. *Bioresource Technology*, 161, 245-254.

602 Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Desmet, S., Boon, N. (2011a). Bioflocculation of
603 microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New*
604 *Biotechnology*, 29, 23-31.

605 Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Saveyn, H., Maes, G., Boon, N. (2011b). Microalgal
606 bacterial floc properties are improved by a balanced inorganic/organic carbon
607 ratio. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 549-558.

608 Van Pham, D., Bach, L. T. (2014). Immobilized bacteria by using PVA (Polyvinyl alcohol)
609 crosslinked with Sodium sulfate. *International Journal of Science and Engineering*, 7, 41-47.

Wang, S., Liu, J., Li, C., Chung, B. M. (2018). Efficiency of Nannochloropsis oculata and Bacillus polymyxa symbiotic composite at ammonium and phosphate removal from synthetic wastewater. *Environmental Technology*, 1-10.

Whitton, R., Ometto, F., Pidou, M., Jarvis, P., Villa, R., & Jefferson, B. (2015). Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment. *Environmental Technology Reviews*, *4*, 133-148.

Xiao, J., Zhu, C., Sun, D., Guo, P., & Tian, Y. (2011). Removal of ammonium-N from ammonium-rich sewage using an immobilized Bacillus subtilis AYC bioreactor system. *Journal of Environmental Sciences*, *23*, 1279-1285.

Yabur, R., Bashan, Y., Hernández-Carmona, G., (2007).Alginate from the macroalgae Sargassumsinicola as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, 19, 43-53.

Zain, N. A. M., Suardi, S. M., & Idris, A. (2010). Hydrolysis of liquid pineapple waste by invertase immobilized in PVA–alginate matrix. *Biochemical Engineering Journal*, 50, 83-89.

Figure captions

Figure 1. Batch reactor design (a) and MaB-flocs culture after 26 days (b,c)

Figure 2. MaB-flocs immobilization into PVA-alginate (sulfate) beads.

Figure 3. Schema of the microreactor: 3D plan (a), transverse section (b) and dimensional plane of the internal device (c) using the inventor professional 2013 software.

Figure 4. Light microscopy images of MaB-flocs (10x; a) and (40x; b) showing uni-multicellular algae (ma), bacteria (ba), filamentous cyanobacteria (cb). Depicted scale bars measure 50µm in length.

Figure 5. Morphology of MaB-flocs(TIFF format) C_1(2%, v/v)(A), C_2(5%, v/v)(B) and C_3(10%, v/v)(C) entrapped into PVA-sulfate beads before wastewater treatment (T= 0 day) (objective X2.5).

Figure 6. Morphologic evolution of entrapped MaB-flocs (TIFF format) C_1(2%, v/v) (a), C_2 (5%, v/v) (b) and C_3(10%, v/v) (c) in PVA-sulfate beads after a wastewater treatment containing initial COD 450mg.L^{-1} (objective X10).

Figure 7. Morphologic evolution of entrapped MaB-flocs (TIFF format) C_2(5%, v/v) (a) and C_3(10%, v/v) (b) in PVA-sulfate beads after a wastewater treatment containing initial COD 200 mg.L^{-1} (objective x10).

Figure 8. Variation of NH_4^+ and PO_4^{3-} removal rates during the treatment of wastewater containing initial COD 450 mg.L^{-1}(a) and 200 mg.L^{-1} (b), with different MaB-flocs concentrations C_1(2%, v/v); C_2(5%, v/v); C_3(10%, v/v) entrapped into PVA-sulfate beads.

Figure 9. Variation of organic compounds (COD) removal rates during the treatment of wastewater containing initial COD 450 mg.L^{-1} (a) and 200 mg.L^{-1} (b), with different MaB-flocs concentrations C_1(2%, v/v); C_2(5%, v/v); C_3(10%, v/v) entrapped into PVA-sulfate beads.

Tables

Table 1. Synthetic wastewater composition.

Table 2. Biomass characteristics and settling of MaB-flocs from batch reactor

Table 3. Variation of diameter means of MaB-flocs after 2 and 6 days of wastewater treatment with initial COD 450 $mg.L^{-1}$ (a) and 200 $mg.L^{-1}$ (b), for three MaB-flocs concentrations C_1(2%, v/v); C_2(5%, v/v); C_3(10%, v/v) entrapped into PVA-sulfate beads.

Table 4. Michaelis-Menten kinetic parameter values (V_m and K_m) for three MaB-flocs concentrations C_1(2%, v/v); C_2(5%, v/v); C_3(10%, v/v) after wastewater treatment with initial COD 450 $mg.L^{-1}$ and 200 $mg.L^{-1}$.

687 **Figure 1.**

688



689

690

691

692

693

694

695

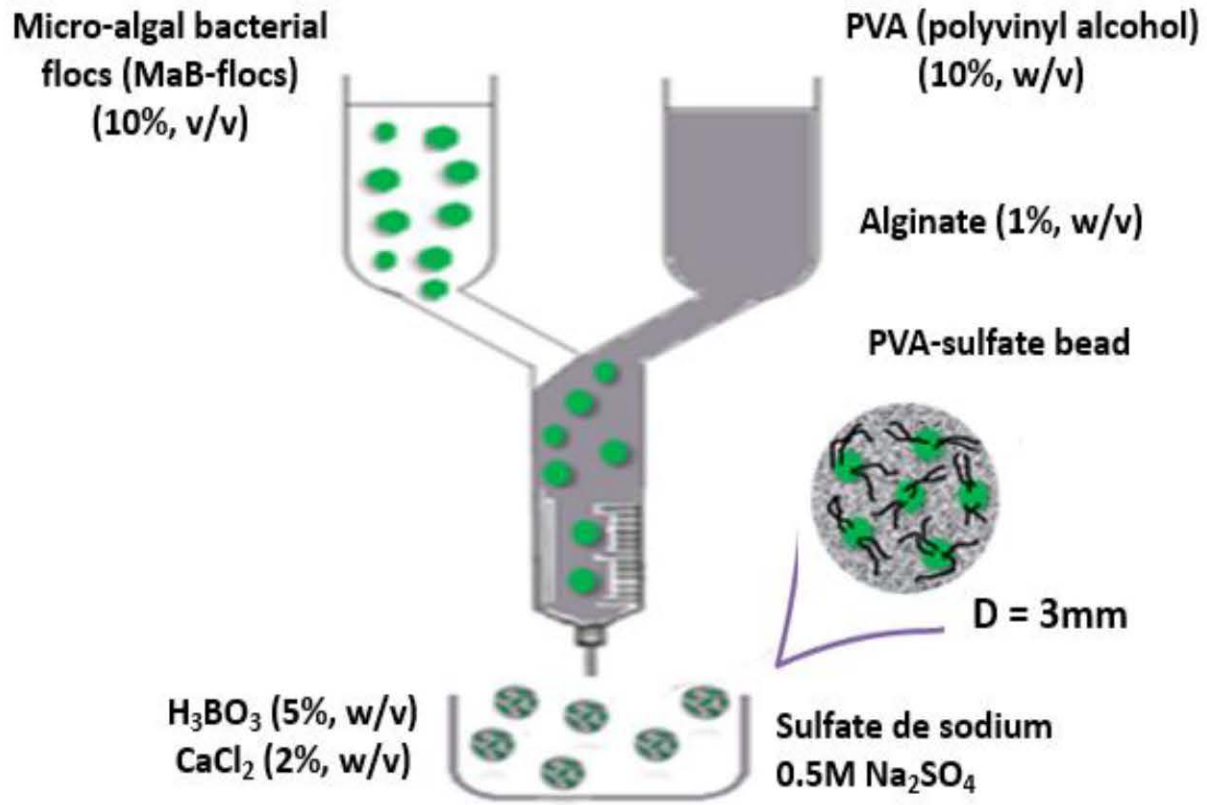
696

697

698

699 **Figure 2.**

700



701

702

703

704

705

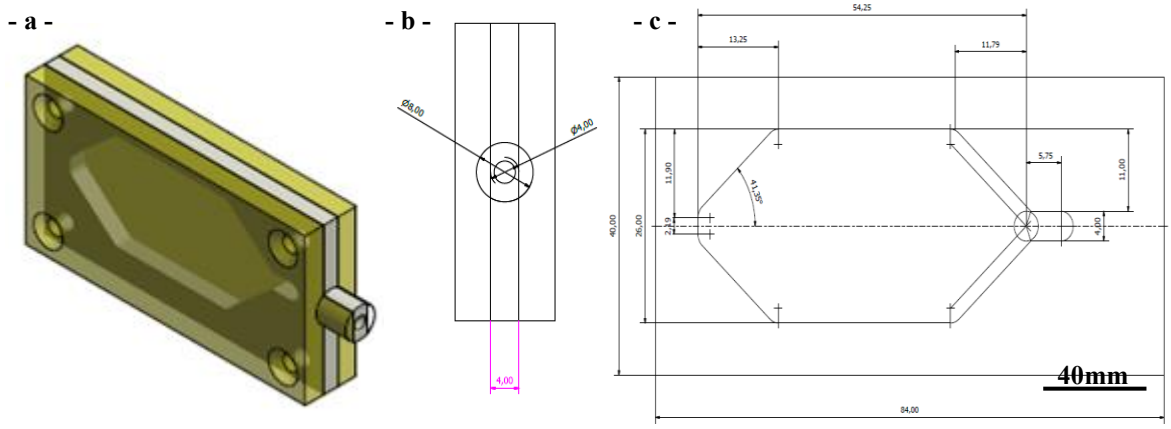
706

707

708

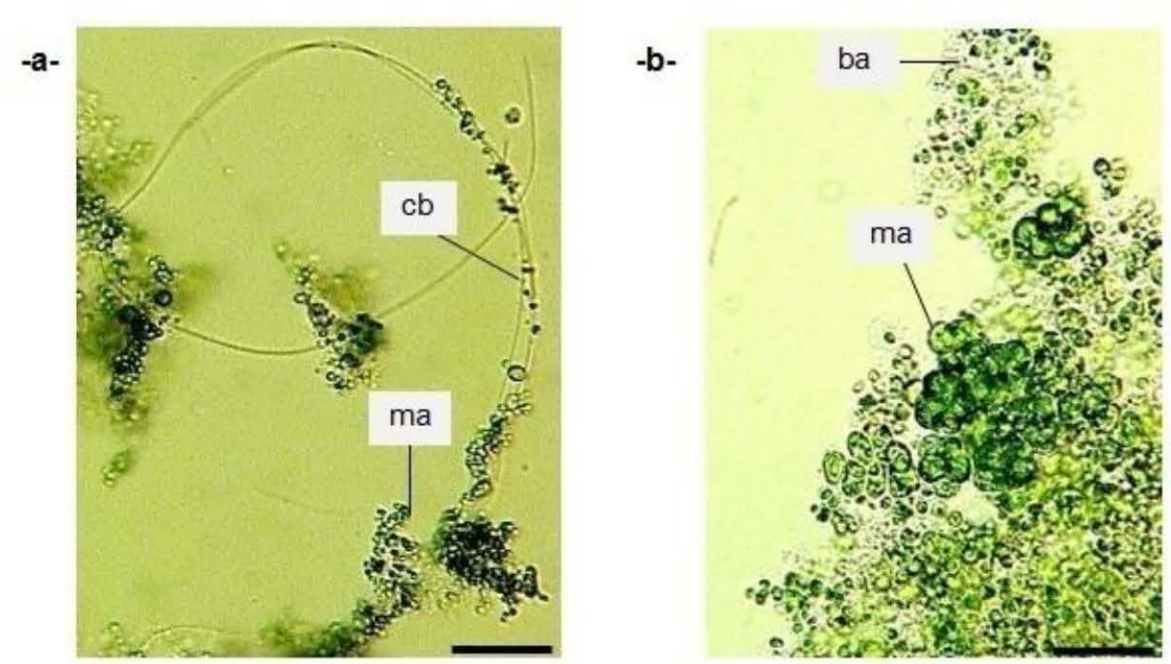
709

Figure 3.


- a -
- b -
- c -
54,25
13,25
11,79
5,75
11,00
11,00
41,35°
40,00
26,00
2,5
4,00
4,00
84,00
40mm

724 **Figure 4.**

725



726

727

728

729

730

731

732

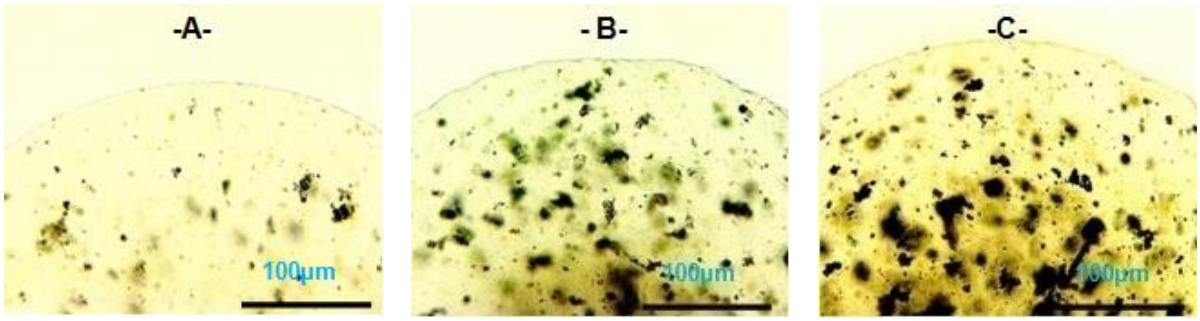
733

734

735

736 **Figure 5.**

737



738

739 **50µm** **50µm**

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755 **Figure 6.**

756

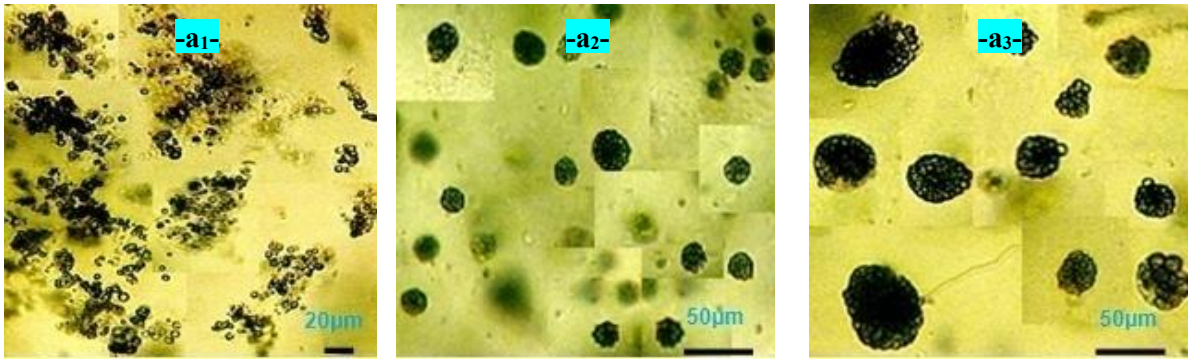


Fig. 6.a. C_1 MaB-flocs bead: a_1 after 2 days, a_2 after 4 days and a_3 after 6 days

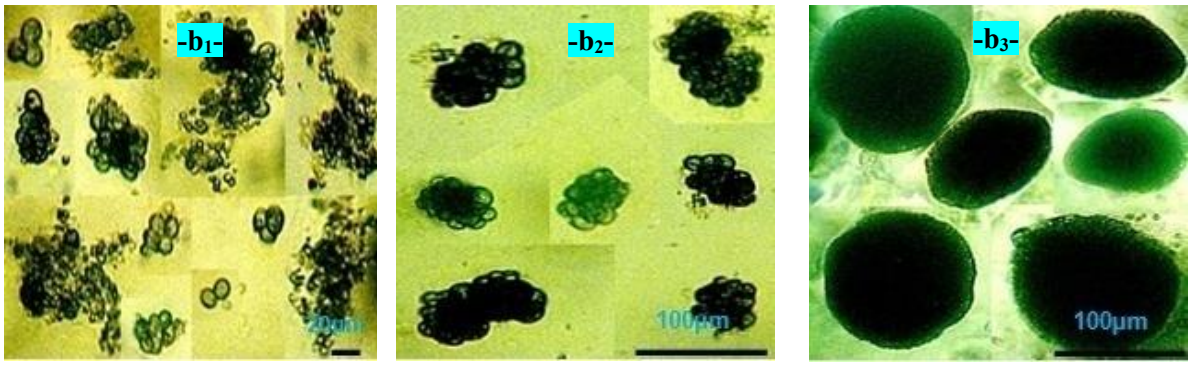
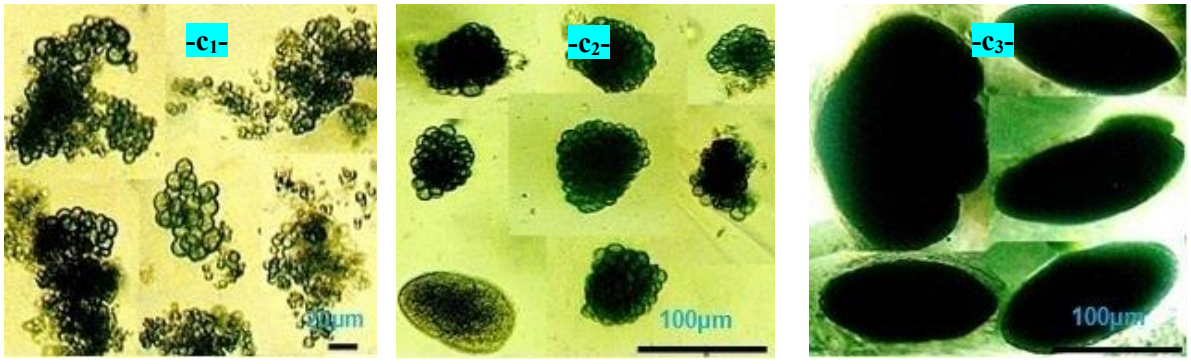


Fig.6.b. C_2 MaB-flocs bead: b_1 after 2 days, b_2 after 4 days and b_3 after 6 days



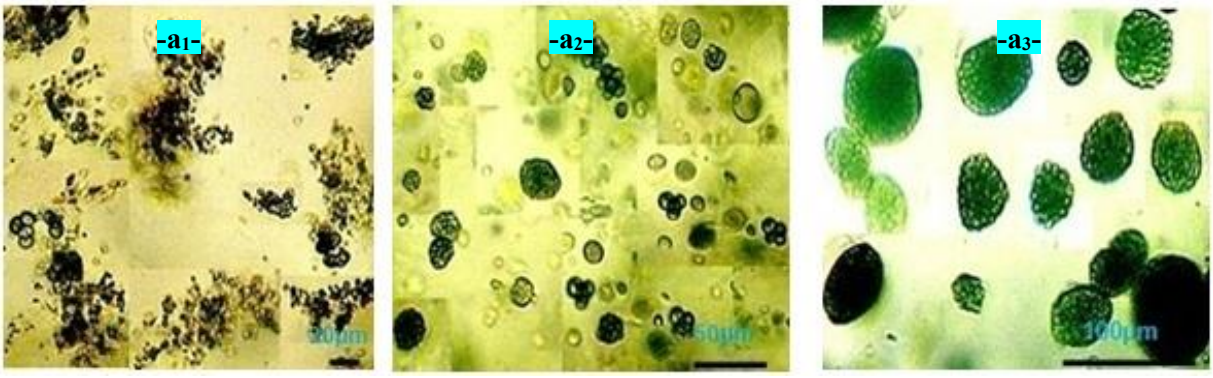
757 **Fig. 6.c. C_3 MaB-flocs bead: c_1 after 2 days, c_2 after 4 days and c_3 after 6 days**

758

759

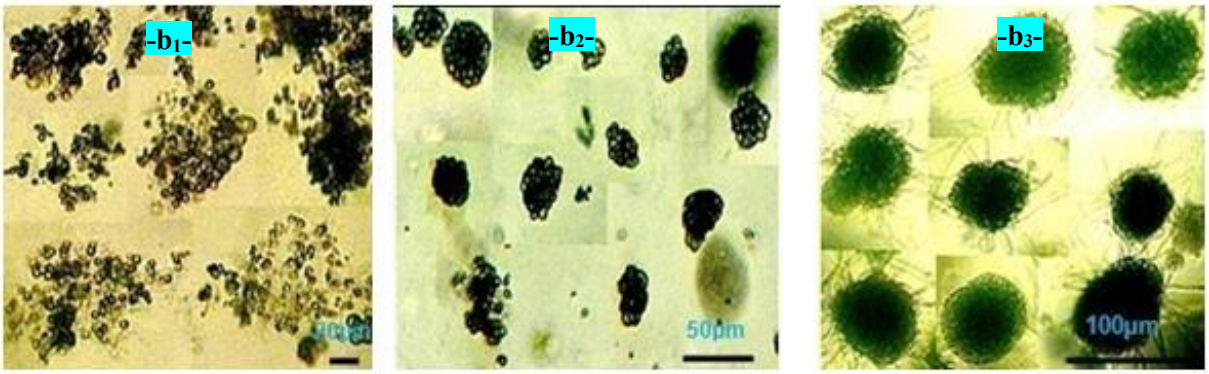
760 **Figure 7.**

761



762

763 **Fig.7.a. C_2 MaB-flocs bead: a_1 after 2 days, a_2 after 4 days and a_3 after 6 days**



764

765 **Fig.7.b. C_3 MaB-flocs bead: b_1 after 2 days, b_2 after 4 days and b_3 after 6 days**

766

767

768

769

770

771

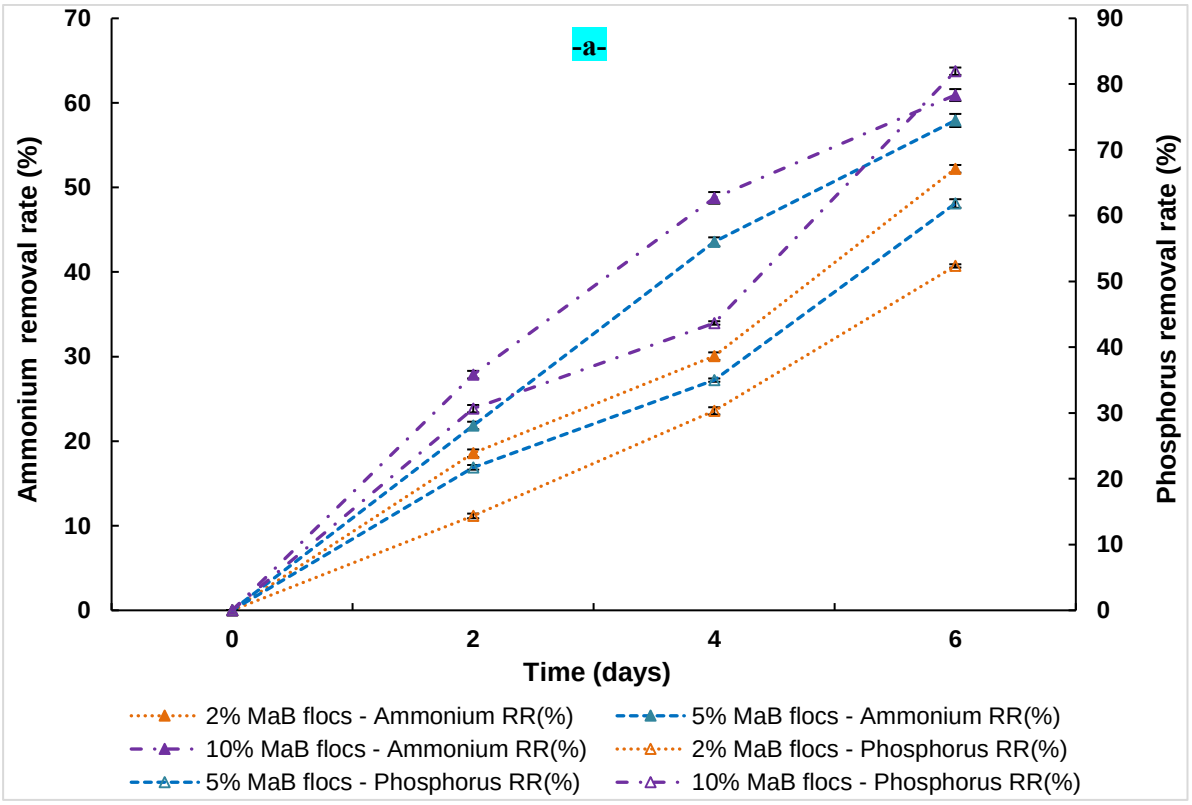
772

773

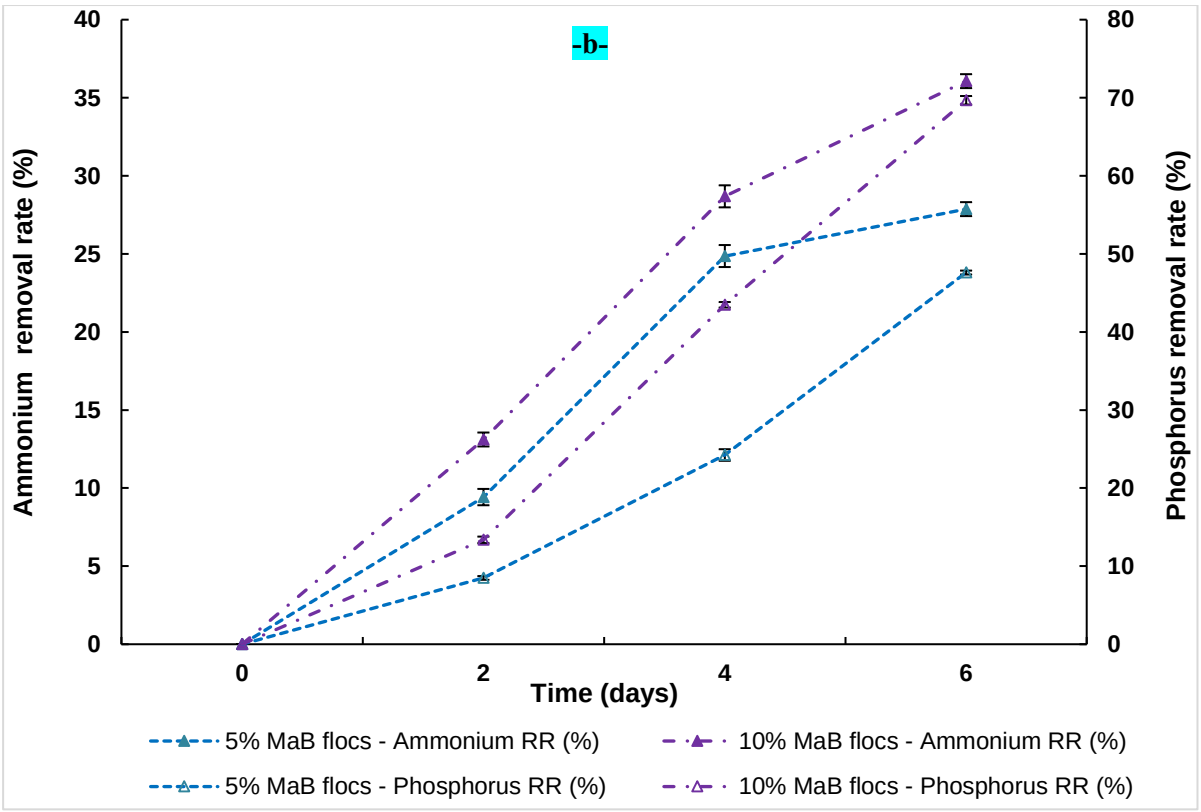
774

775 **Figure 8.**

776



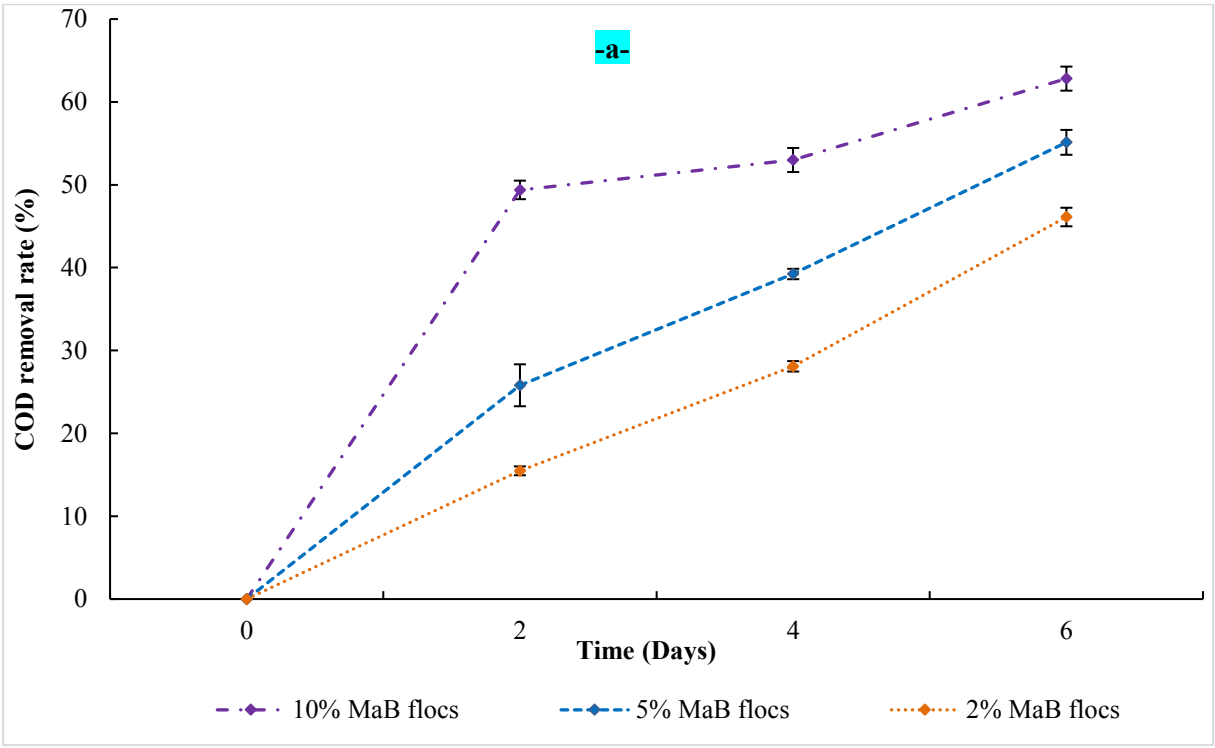
777



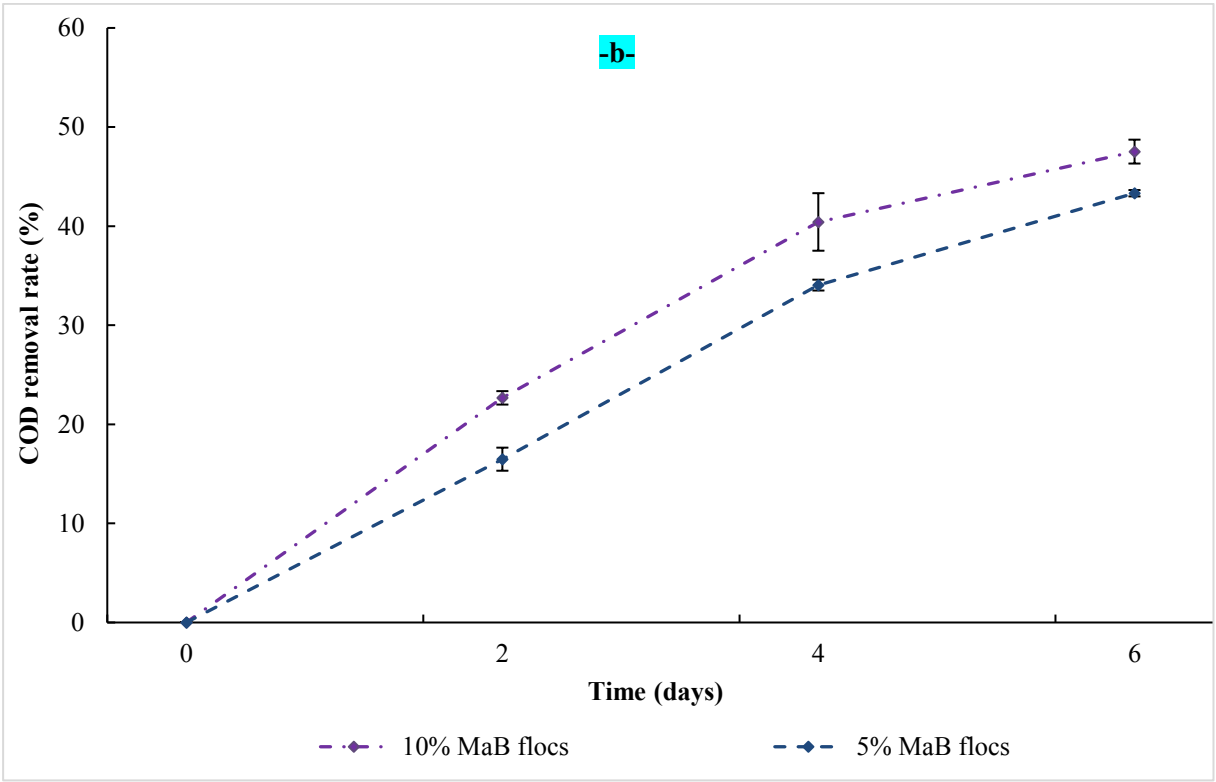
778

779 **Figure 9.**

780



781



782

783

784 **Tables**

785 **Table 1.**

786

Components		**Concentrations (mg.L^{-1})**	
Medium organic (O)(1L)	Glucose Acetate	450 mg COD L^{-1}	50%=223.8 50%=452.44
Medium nutrient (N)(1L)	NH_4Cl	100	
	KH_2PO_4	10	
	$CaCl_2.2H_2O$	10	
	$MgSO_4.7H_2O$	5	
	$FeSO_4.7H_2O$	5	
Trace elements (1mL.L^{-1})	H_3BO_3	50	
	$ZnCl_2$	50	
	$CuCl_2$	30	
	$MnSO_4.H_2O$	50	
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	50	
	$AlCl_3$	50	
	$CoCl_2$-$6H_2O$	50	
	$NiCl_2$	50	

787

788

789

790

Table 2.

Parameters	Unit	Initial preparation of sludge	26 days of MaB-flocs cultivation
Biomass			
TSS	g TSS.L^{-1}	14.4 ± 0.01	5.6± 0.2
VSS	g VSS.L^{-1}	10.2 ± 0.3	3.2 ± 0.05
Chl (a)	mgChl (a) g^{-1} VSS	0.12 ± 0.15	3.8± 0.24
AI*	mg VSS mg^{-1}Chl (a)	8325.2 ± 0.15	260.7 ± 0.16
Floc settling			
I_M	ML.L^{-1}	970	450
SVI_{30}	ML.g^{-1}	91.5	80

**Autotrophic index: represents the quotient between VSS and chlorophyll (a) values (Apha, 1985)*

Table 3.

Wastewater treatment conditions		MaB-flocs densities		
		C_1 (2%, v/v)	**C_2 (5%, v/v)**	**C_3 (10%, v/v)**
		d(MaB-flocs) ± SD	**d(MaB-flocs) ± SD**	**d(MaB-flocs) ± SD**
Initial COD 450 $mg.L^{-1}$	After 2 days	$4 \pm 0.2\ \mu m^{a,\alpha}$	$8.5 \pm 0.16\ \mu m^{b,\alpha}$	$12 \pm 0.3\ \mu m^{c,\alpha}$
	After 6 days	$87.8 \pm 0.18\ \mu m^{a,\beta}$	$126.8 \pm 0.3\ \mu m^{b,\beta}$	$220.4 \pm 0.24\ \mu m^{c,\beta}$
Initial COD 200 $mg.L^{-1}$	After 2 days	$1.6 \pm 0.03\ \mu m^{a,\alpha}$	$3.8 \pm 0.1\ \mu m^{b,\alpha}$	$6.2 \pm 0.06\ \mu m^{c,\alpha}$
	After 6 days	$42 \pm 0.2\ \mu m^{a,\beta}$	$65.3 \pm 0.2\ \mu m^{b,\beta}$	$75.5 \pm 0.05\ \mu m^{c,\beta}$

Values are given as diameter mean ± standard deviation. Means with the Arabic letter in the same line are significantly different at $p < 0.05$. Means with the Greek letter in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

818 **Table 4.**

819

		V_m (mg.L^{-1}.H^{-1})	K_m (mg.L^{-1})	R^2
Substrate(1): Ammonium				
Initial COD 450 mg.L^{-1}	MaB-flocs C_1 (2%, v/v)	0.987	2.295	0.824
	MaB-flocs C_2 (5%, v/v)	1.033	3.192	0.759
	MaB-flocs C_3 (10%, v/v)	2.178	5.156	0.956
Initial COD 200 mg.L^{-1}	MaB-flocs C_2 (5%, v/v)	0.482	2.562	0.791
	MaB-flocs C_3 (10%, v/v)	0.975	3.802	0.734
Substrate(2): Phosphorus				
Initial COD 450 mg.L^{-1}	MaB-flocs C_1 (2%, v/v)	0.364	2.147	0.836
	MaB-flocs C_2 (5%, v/v)	0.430	3.122	0.762
	MaB-flocs C_3 (10%, v/v)	0.385	3.502	0.745
Initial COD 200 mg.L^{-1}	MaB-flocs C_2 (5%, v/v)	0.150	1.432	0.905
	MaB-flocs C_3 (10%, v/v)	0.087	1.361	0.949

820

821

822

823

824

825

Cette étude pourrait conduire à une nouvelle approche inventive afin d'étudier divers phénomènes hydrodynamiques et d'intensifier le recyclage symbiotique des déchets dans des bioréacteurs à multi-échelle.

A partir de cette étude, les conditions les plus efficaces ont été choisis afin d'étre mise en échelle: à micro-échelle avec recirculation et à méso-échelle.

De cette manière, différents réacteurs pourraient être suggérés pour améliorer les performances des flocs-MaB immobilisés adoptés à l'échelle microscopique pour une bioremédiation durable. Ainsi, une comparaison a été faite entre le traitement en continu et le traitement en batch dans un microréacteur à trois frittés afin de montrer l'effet de gradient de vitesse de l'écoulement au niveau du canal sur la morphologie des flocs et sur les pourcentages d'élimination de l'ammonium, du phosphore et du DCO. En outre, le traitement à méso-échelle dans la colonne 2D avec recirculation interne des eaux usées permettra d'étudier l'effet la vitesse des bulles ainsi que le volume des billes introduit dans la colonne sur la morphologie des flocs-MaB encapsulés et sur l'efficacité d'élimination des polluants (N, P et C).

Cette mise à l'échelle, présentée lors d'une communication oral au **congrès national SFGP** à Nancy, permet d'identifierl'influence des différentes conditions hydrodynamiques telles que le débit, la recirculation des liquides et la conception du réacteur sur l'évolution morphologique des flocs-MaB. Par conséquent, il est primordial de comprendre la relation entre les phénomènes observés à petite échelle et les comportements obtenus à grande échelle.

II.3. Impacts des conditions hydrodynamiques sur l'élimination des polluants en utilisant des flocs de bactéries-microalgues immobilisés dans des réacteurs multitrophiques à multi-échelles

Short Communication (I): Impacts of hydrodynamic conditions on pollutants removal using immobilized microalgae-bacteria flocs in multiscale multitrophic reactors

Olfa Beji[a,b], Nouceiba Adouani[a], Souhila Poncin[a], Marie-Noëlle Pons[a], Moktar Hamdi[b], Huai Z. Li[a*]

[a]Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

[b]Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

*Corresponding author:

Pr. Huai Zhi LI

huai-zhi.li@univ-lorraine.fr

1. Introduction

Microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) are now receiving extensive global attention as an integrating ecology and economy approach for the bioremediation of wastewater sufficient solar radiation (Van Den Hende et al., 2016). Multitrophic (algae-bacteria) technology as a sustainable wastewater treatment process, incorporates the entire algal biomass and simultaneously accomplishes the removal of pollutants. In this context, immobilization of MaB-flocs into PVA-alginate matrix have been applied as a promising wastewater treatment (Van Pham et al., 2014). Under immobilized system, the sun-powered process is based on the multitrophic interactions between autotrophic microalgae and heterotrophic bacteria which are the subject of several applications by reducing organic and mineral compounds. The multitrophic interactions between algae and bacteria was supported by gas and nutrients exchange, while algae facilitate bacterial growth through direct nutrient exchange by providing organic compounds released during photosynthesis or by providing nutrients from decomposing algal cells (Gutzeit et al., 2005). The present work aims at developing an original approach to investigate various phenomena at different scales within a multitrophic bioreactor in order to intensify its performance for sustainable bioremediation. The role of hydrodynamic conditions on MaB-flocs morphological evolution and nutrients removal efficiency at both micro- and mesoscale are discussed from these results. From previous studies on micro-batch-reactor (without liquide recirculation) best conditions were selected in order to obtain a high wastewater treatment (section II.2). Hence, the use of PVA-alginate beads containing C_3 (10%, v/v) of MaB-flocs density for wastewater treatment with initial COD 450 $mg.L^{-1}$ during 6 days was applied into microscale and mesoscale reactors.During the process of cell immobilization, a high biomass density entrapped within the matrix allows the stability of the cells in a small size of the photobioreactor (Sagir et al., 2017).

2.Materials and methods

Microalgae bacterial-flocs (MaB-flocs) culture,prepared during previous study, had 5.62 g $TSS.L^{-1}$, 3.24 g $VSS.L^{-1}$ and 3.83 mg Chlorophyll (a).g^{-1} (VSS) was encapsulated by the addition of alginate crosslinked with boric acid solution, as described in section II.2. PVA-sulfate beads were prepared by transferring the PVA-boric beads to 0.5M sulfate sodium Na_2SO_4 solution to avoid the drastic decrease in microorganism viability caused by saturated boric (Van Pham et al., 2014). After the immobilization process, a multi-scale wastewater

treatment was undergone into a microreactor and column 2D during a single light phase of 24 h by using two fluorescent lamps with a light power of 1050 lm each (18W, Philips, France).During the microscale wastewater treatment, three PVA-sulfate beads containing C_3 (10%, v/v) of MaB-flocs were stacked between three grids in the microreactor, as shown in Figure 1.The micro-reactor was operated in batch mode by varying different internal liquid recirculation rates Q_1 (0.5 $mL.min^{-1}$), Q_2 (0.6 $mL.min^{-1}$) and Q_3 (0.7 $mL.min^{-1}$) of the wastewater containing 450 mg $COD.L^{-1}$, described by Huang et al. (2015). To circulate the liquid into the microreactor hermetically closed, nitrogen gas was injected at the bottum of the influent bottle.Otherwise, a mesoscale treatment was performed in a 2D column (Figure 2) by varying the volume of beads N_1:5 mL, N_2:2.5 mL, and N_3:1 mL for 50 mL of the wastewater that suspended at 28.23 $mL.min^{-1}$ flow rate. The main objective of this study was to investigate the effect of beads' volume on the bioremediation and the morphological evolution of flocs. In each case, same as the experiment in the microreactor, beads were incubated for three different periods of wastewater treatment: 2, 4 and 6 days under a continuous light phase. Both reactors were inoculated with synthetic wastewater containing initial NH_4^+-N, PO_4^{3-}-P and COD concentrations of 30 $mg.L^{-1}$, 15 $mg.L^{-1}$ and 450 $mg.L^{-1}$ respectively (Huang et al., 2015). The feasibility of this PVA-alginate immobilization technology was investigated by checking the growth of the MaB-flocs on a bead by microscopy observation. Every two days, organic and mineral nutrients (COD, NH_4^+ and PO_4^{3-}) concentration were analyzed to prove the performance of anaerobic reactors efficiency for multiscale bioremediation.

3. Results and discussions

3.1. Microreactor performance

3.1.1. Nutrients (COD, NH_4^+ and PO_4^{3-}) removal rates analysis

The performance of multitrophic wastewater treatment in the microreactor containing three grids has shown in Figure 3 the evolution of COD and nutrients (NH_4^+ and PO_4^{3-}) at different flow rates Q_1, Q_2 and Q_3 of influent recirculation using C_3 (10%, v/v) of MaB-flocs. The comportment of algae in terms of nutrients removal was strictly affected by the hydrodynamicfeatures (Huang et al., 2016). The best bioremediation was obtained after 6 days using a flow rate of Q_3 with significant ammonium, phosphorous and COD removal efficiencies of 61.87 ± 0.2 %, 92.45 ± 0.4 % and 82.37 ± 0.7 %, respectively. The lowest internal recirculation of effluent promotes bacteria-microalgae interactions in order to

facilitate removing of nutrients and to maintain the stability of PVA–sulfate beads during wastewater treatment. In this process, the recirculation of influent favorites the diffusion of substrates from the external medium to the matrix which increases the metabolic reactions between cells and affects the morphologic evolution of flocs.

3.1.2. Morphological evolution of MaB-flocs

The feasibility of the PVA-sulfate formulation was investigated by checking the growth of the MaB-flocs. Compared to the previous results on microreactor without liquid recirculation that shown high multicellularity evolution of algae, we obtain less cells transition and low diameter of flocs (Table 1). Thus, shear rates exerted on PVA-sulfate beads have shown the effect of the liquid flow fields on the morphological evolution of algae. The microalgae growth was affected by several hydrodynamic conditions such as flow velocity and shear stress. As the flow velocity decreased the growth of algae increased and the morphology of cells evolved (Song et al., 2018). Although the flow velocity cannot characterize the internal flow around the algae flocs, the shear stress could cause a deep effect on the cell morphology (Song et al., 2018).

3.2. Column 2 D performance

3.2.1. Nutrients (COD, NH_4^+ and PO_4^{3-}) removal rates analysis

During mesoscale multitrophic wastewater treatment in the 2D column, the two highest volumes of PVA-beads (N_1 and N_2) showed the increase of the carbon compound released from the hydrogel to the external medium due to the high collision frequency between beads. The lowest volume of beads (N_3:1 ml) characterized by a low collision frequency, has demonstrated a best COD, NH_4^+ and PO_4^{3-} removal rates of 72.07 ± 0.2 %, 78,26 ± 0.3 % and 90,56 ± 0.4 %, respectively after 6 days of wastewater treatment (Figure 4).For all analysis in both reactors, the faster removal process was observed for phosphate.This result confirms that PVA-sulfate beads are relatively easy to handle on a large scale in the 2D column and the collision frequency between beads affects the organic and mineral pollutants removal.

3.2.2. Morphological evolution of MaB-flocs

The main purpose of this work is to investigate the feasibility of the immobilization process into PVA-sulfate matrix on MaB-flocs growth under column 2D process. The colonial forming algae favorites the immobilization system in order to enhance the light absorption of light, compared to suspended cells (Calderon et al., 2018). Shear rates exerted on PVA-sulfate beads have shown the effect of the liquid flow fields and the relative motion of bubbles on the morphological evolution of algae. The use of the lowest volume of beads (N_3:1 mL)seems to

promote the improvement of the effluents' diffusion and the development of less stressing immobilization procedures for multicellularity evolution of algae. In this case, a cell transition of algae shown in Table 2 reveals the evolution of the size of flocs from small colonies after 2 days to a largest flocs after 6 days during a single light phase. Hence, collision frequency depending on beads' volume shown that the liquid flow fields cause stress effect on the morphological evolution of algae.

4. Conclusion

This study confirms that PVA-sulfate matrix seems to be a suitable immobilized system which maintains the morphological progression of microalgae-bacteria flocs during 6 days of experiences. For all experiments, high density of MaB-flocs C_3 (10%, v/v) has demonstrated the highest pollutants (C, N, and P) removals and the best multicellularity evolution of algae.PVA-sulfate beads are relatively easy to handle on a large scale in the 2D column and the collision frequency between beads affect the organic and mineral pollutants removal and the morphological evolution of algae.Mesoscale reactor (column 2D) shows a high COD and nutrients (N, P) removal rates of about 72 %, 78 %, and 90 % respectively, using a low beads' volume (1mL). Thus, the use of a low beads'volume causes low frequency of collision and affects less the morphological evolution of algae flocs. Than, the interaction particles-particles affects the nutrients diffusion to the matrix and the biological metabolisms within the crosslink of the bead.

For microreactor with 3 grids, the low recirculation of effluent with a flow rate Q_3: 0.7 mL. min^{-1} shows the highest removal rates in termes of COD (82 %) , NH_4^+ (62 %) PO_4^{-3} (92 %) than the others flow rates. By compared with the microreactor without a flow, the morphological evolution of the flocs shows a less cell transition.

References

Calderón, N. D. G., Bayona, K. C. D., & Garcés, L. A. (2018). Immobilization of the green microalga Botryococcus braunii in polyester wadding: Effect on biomass, fatty acids, and exopolysaccharide production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *14*, 80-87.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science Technology*, 52, 9-18.

Huang, J., Xi, B. D., Xu, Q. J., Wang, X. X., Li, W. P., He, L. S., & Liu, H. L. (2016). Experiment study of the effects of hydrodynamic disturbance on the interaction between the cyanobacterial growth and the nutrients. *Journal of Hydrodynamics*, *28*, 411-422.

Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015). Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.

Sagir, E., Alipour, S., Elkahlout, K., Koku, H., Gunduz, U., Eroglu, I., & Yucel, M. (2017). Scale-up studies for stable, long-term indoor and outdoor production of hydrogen by immobilized Rhodobacter capsulatus. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*, 22743-22755.

Song, Y., Zhang, L. L., Li, J., Chen, M., & Zhang, Y. W. (2018). Mechanism of the influence of hydrodynamics on Microcystis aeruginosa, a dominant bloom species in reservoirs. *Science of The Total Environment*, *636*, 230-239.

Van Den Hende, S., Beelen, V., Julien, L., Lefoulon, A., Vanhoucke, T., Coolsaet, C., Rousseau, D. P. (2016). Technical potential of microalgal bacterial floc raceway ponds treating food-industry effluents while producing microalgal bacterial biomass: An outdoor pilot-scale study. *Bioresource Technology*, 218, 969-979.

Van Pham, D., Bach, L. T. (2014). Immobilized bacteria by using PVA (Polyvinyl alcohol) crosslinked with Sodium sulfate. *International Journal of Science and Engineering*, 7, 41-47.

Figure captions

Figure 1. Wastewater treatment into microreactor with liquid recirculation (a) Image of batch microreactor with 3 grids (b)

Figure 2. Column 2D design

Figure 3. Variation of COD, NH_4^+ and PO_4^{3-} removal rates after 6 days of wastewater treatment by PVA-beads containing C_3(10%, v/v) at different flow rates Q_1, Q_2 and Q_3

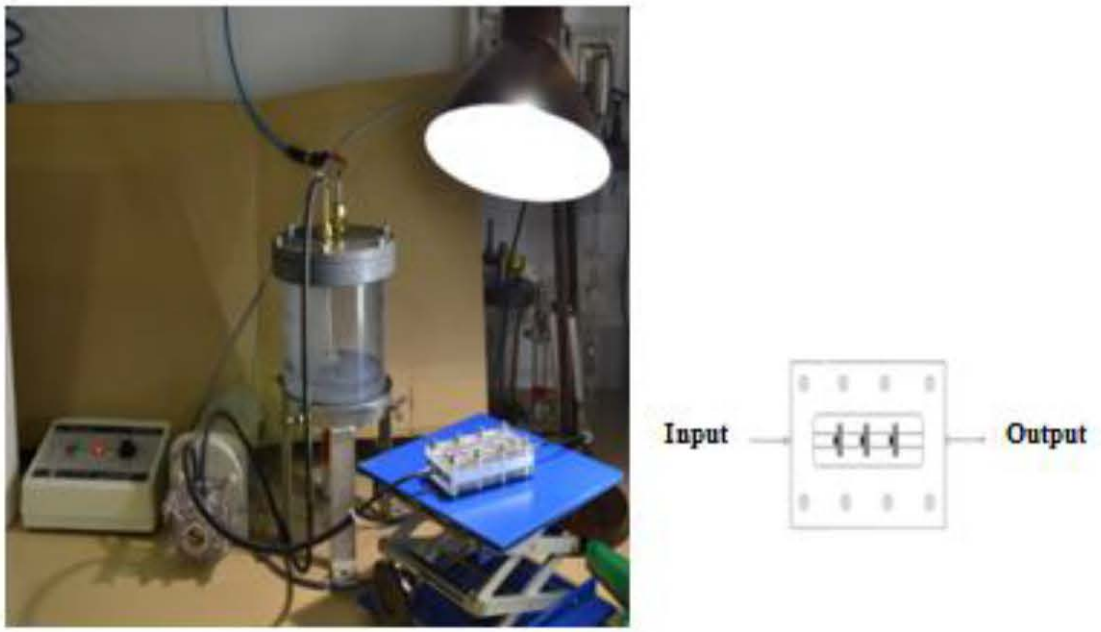
Figure 4. Variation of COD, NH_4^+ and PO_4^{3-} removal rates during wastewater treatment by using PVA-alginate (10% MaB-flocs) under Column 2D containing N_3:1mL

Tables.

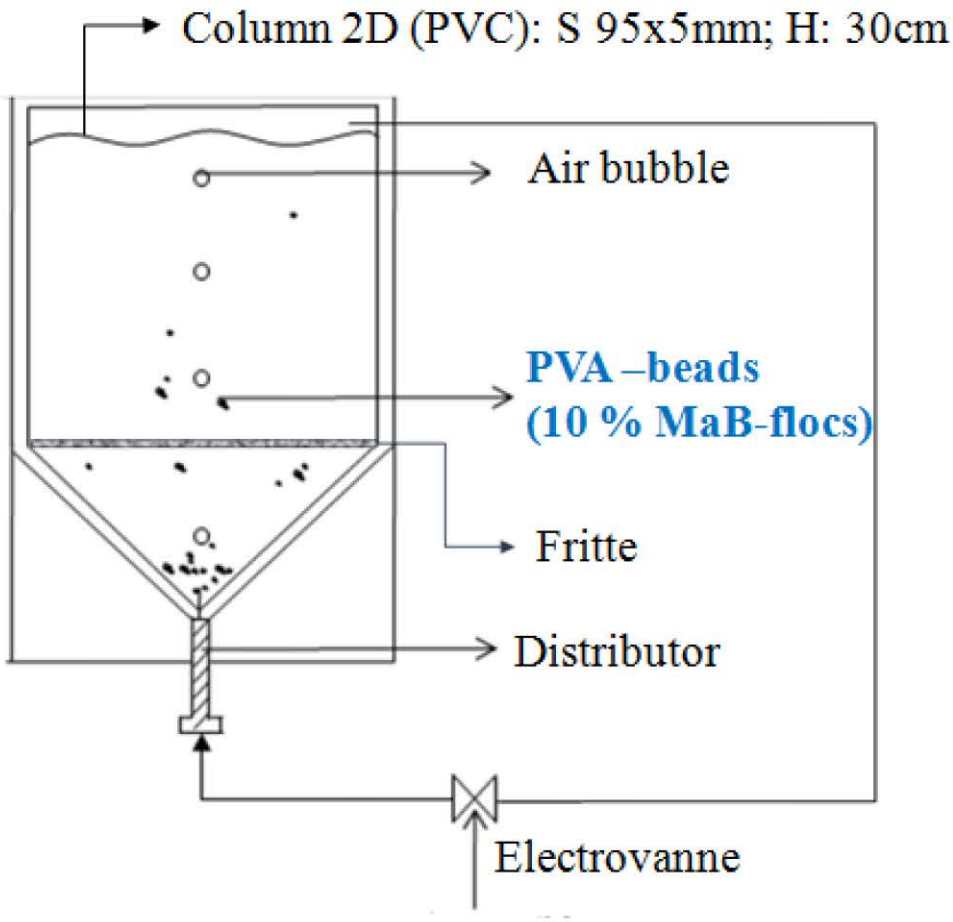
Table 1. Morphologic evolution of C_3(10%, v/v) of MaB-flocs entrapped in PVA-beads after 6 days of treatment into micro-reactor with different flow rates Q_1, Q_2 and Q_3 (objective X10).

Table 2. Morphologic evolution of C_3(10%, v/v) MaB-flocs entrapped in PVA- beads during wastewater treatment into column 2D containing volume of beads (N_3:1 ml) (objective X10).

Figure 1.



230 **Figure 2.**



231
232
233
234
235
236
237
238
239

Figure 3.

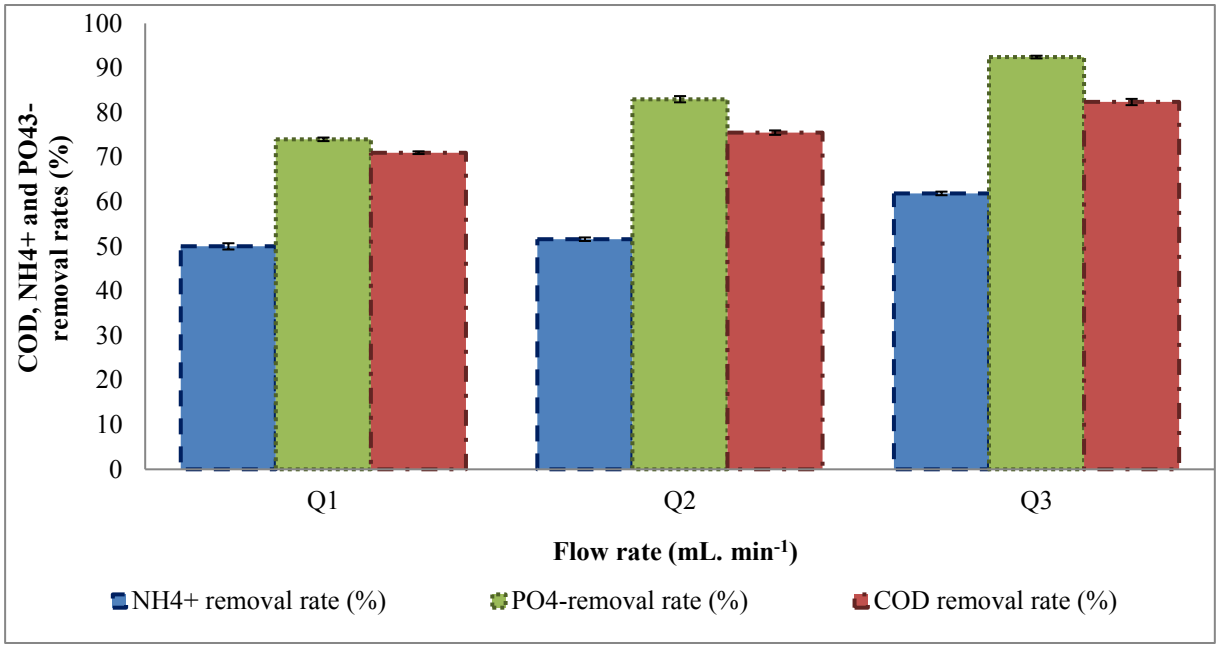

COD, NH4+ and PO43- removal rates (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Q1
Q2
Q3
Flow rate (mL. min-1)
NH4+ removal rate (%)
PO4-removal rate (%)
COD removal rate (%)

Figure 4.

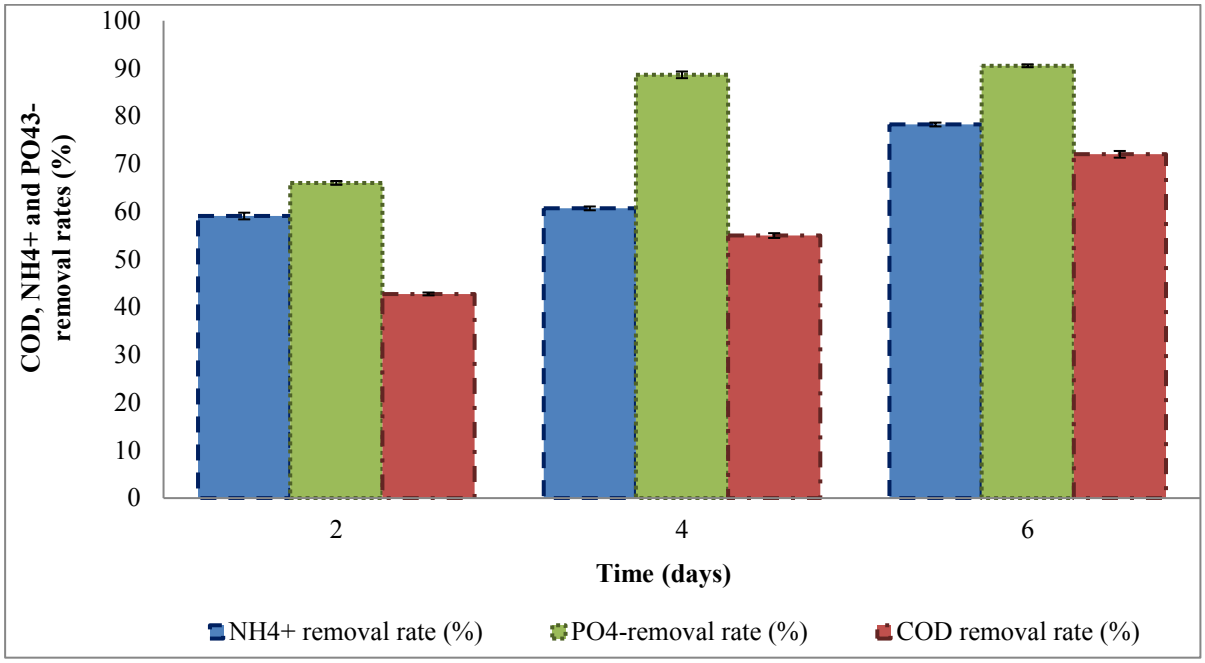
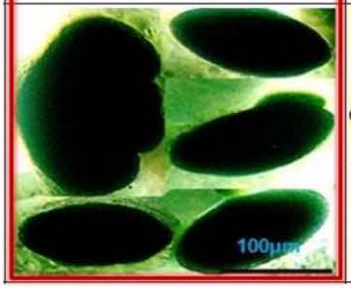
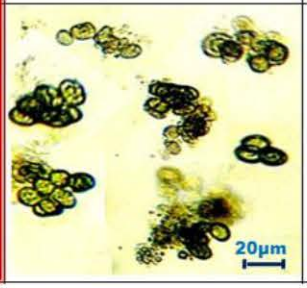
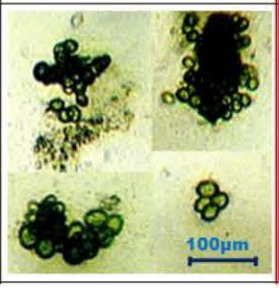
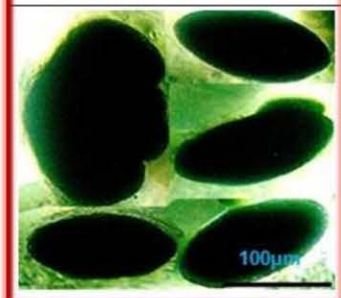
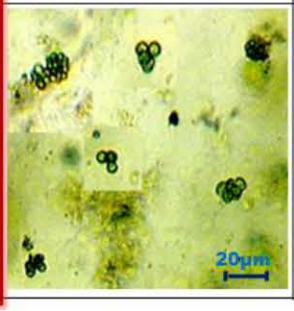
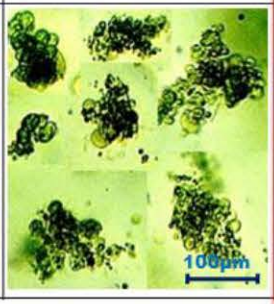
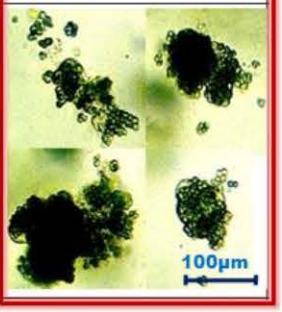

COD, NH4+ and PO43- removal rates (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
2
4
6
Time (days)
NH4+ removal rate (%)
PO4-removal rate (%)
COD removal rate (%)

Table 1.

Microreactor (Previous Study)	Microreactor with 3 grids (with recirculation rate)		
Without recirculation	Q_1: 0.5mL. min^{-1}	Q_2: 0.6mL. min^{-1}	Q_3: 0.7mL. min^{-1}
			

293 **Table 2.**

294

Microreactor (Previous Study)	Column 2D with volume of beads (N_3:1ml)		
After 6 days	After 2 days	After 4 days	After 6 days
			

295

296

297

II.4. Conclusion générale

L'utilisation d'une concentration élevée en MaB-flocs C_3 (10, v/v) encapsulée dans les matrices de PVA-alginate a montré des taux d'élimination des nutriments significativement élevés après 6 jours de traitement à l'échelle microscopique sans apport d'oxygène. Dans le même cas, une évolution multicellulaire des flocs-MaB a été observée afin d'obtenir un diamètre élevé de 220,4 µm après un traitement des eaux usées (DCO 450 $mg.L^{-1}$). Cette étude a permis d'optimiser les paramètres de fonctionnement tels que la densité de MaB-flocs, la concentration en DCO et la période d'incubation pour d'autres applications à plusieurs échelles. Ainsi, des billes de PVA-sulfate contenant une forte densité de MaB-flocs C_3 (10%, v/v) ont été choisies pour étudier le traitement des eaux usées (450 $mgCOD.L^{-1}$) pendant 6 jours au sein des réacteurs à multi-échelles avec des formes et des activités stables.

Cette étude de faisabilité des flocs-MaB dans les systèmes immobilisés avait pour objectif de donner une opportunité à la mise en échelle. Dans un microréacteur avec une recirculation interne du liquide, la vitesse du flux a affecté fortement l'évolution morphologique des flocs-MaB. Plus la vitesse d'écoulement est lente à l'intérieur du réacteur plus la transition multicellulaire des flocs est importante. En terme d'absorption des nutriments, un faible flux du liquide n'a pas une forte influence sur les taux d'élimination des polluants par rapport au régime statique. Des études plus profondes en hydrodynamique pour mesurer les vitesses de cisaillements au niveau du canal d'écoulement à l'intérieur du photo-microréacteur pourraient être suggérées ultérieurement avec la technique de micro-PIV.

D'autre part, cette méthode d'immobilisation a été optimisée à méso-échelle dans une colonne 2D, afin d'étudier l'effet du volume des billes sur le traitement des eaux usées. A l'intérieur de cette colonne, la fréquence de collision entre les billes affecte l'élimination des polluants organiques et minéraux et l'évolution morphologique des flocs d'algues. Ainsi, l'utilisation d'un faible volume de billes entraîne une faible fréquence de collision et affecte moins l'évolution morphologique des flocs-MaB. Dans ce cas, des taux d'élimination élevés de DCO et de nutriments (N, P) ont été observés. Par conséquent, les interactions particules-particules affectent la diffusion des nutriments vers la matrice et les réactions métaboliques au sein de la réticulation de la billes.

CHAPITRE III.

Etude de faisabilité des flocs de bactéries-microalgues fixés sur des poudres d'olives biodégradables pour le traitement des eaux usées

III.1. Introduction

Dans le but d'augmenter le volume du support d'immobilisation, un processus de photobioremédiation à biomasse fixe a été installé en utilisant un réacteur à lit fluidisé multitrophique (MFBBR) de taille plus élevée que les autres réacteurs utilisés dans la première section.L'objectif du présent travail est de préparer un support biodégradable d'immobilisation de biomasse à partir des granules d'olives pour mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la bioremédiation des polluants (DCO, ammonium et phosphore) sans apport d'oxygène et les interactions multitrophiques établies dans les flocs-MaB. À cet égard, l'intégration des granules d'olive broyées (OPP), comme matériaux biodégradables,en suspension au sein du réacteur MFBBR pourrait constituer une solution originale pour l'immobilisation des flocs de bactéries-microalgues (flocs-MaB). La présente étude visait donc à déterminer un support approprié pour la fixation des flocs-MaB et à examiner ses propriétés (taille, forme, porosité) en mettant l'accent sur la morphologie du biofilm produit. Au cours de ces travaux de recherche, deux tailles de biocarriers OPP (A): d = 1 mm et OPP (B): d = 1,5 mm à trois concentrations αs (1, 2 et 4 vol.%) ont été testées pour souligner leur effet sur le comportement hydrodynamique à différents débits de gaz (Ug) ainsi que l'efficacité du traitement. Le taux de rétention moyen des gaz, étant le principal paramètre hydrodynamique, a été déterminé dans un système biphasique (gaz-liquide) pris comme référence et dans un système triphasé gaz-liquide-solide en présence de particules OPP (A) et OPP (B) afin de comprendre l'effet de la taille et de la concentration des OPP sur l'hydrodynamique. Dans cette étude, les vitesses des gaz ont été choisies de manière à obtenir une bonne suspension solide et à limiter l'attrition des particules pouvant provoquer la détachement du biofilm. Les résultats présentés dans cette partie sous forme d'un article soumis au journal «**International Biodeterioration & Biodegradation**» visent à caractériser les propriétés des poudres d'olives (OPP) et à étudier leur effet sur l'élimination des polluants et la formation du biofilm multitrophique.

III.2. Effet des propriétés des granules d'olive contenant des flocs de bactéries-microalgues sur l'élimination des polluants dans un réacteur lit fluidisé-SBR à biofilm

Article (II): Influence of olive pit biocarriers properties on pollutants removal by microalgae-bacteria flocs (MaB-flocs) into SBR-Fluidized bed biofilm reactor

Olfa Beji[a,b], Nouceiba Adouani[a], Souhila Poncin[a], Huai Z. Li[a*], Moktar Hamdi[b]

[a]Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

[b]Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

*Corresponding author:

Pr. Huai Zhi LI

huai-zhi.li@univ-lorraine.fr

Abstract

This paper highlights a multitrophic fluidized bed biofilm reactor (MFBBR) to evaluate the attachment of MaB-flocs biomass on biodegradable olive pit powders (OPP) and to investigate its performances for pollutants biodegradation. A comparative investigation of two sizes of OPP biocarriers OPP (A): d=1 mm and OPP (B): d=1.5 mm at three solid concentrations α_s (1, 2 and, 4 vol. %) was made to emphasizes their effect on the hydrodynamic behavior at different gas upflow (Ug). The fluidization of MFBBR system at the highest Ug (2.1 $cm.s^{-1}$) has shown the highest potential of large size and concentration of OPP (B') for simultaneous COD (85 %), ammonium (57 %) and phosphorus (72 %) removal capacities after 14 days of SBR wastewater treatment. The characterization of bioparticles using SEM protocol, shown that the OPP (B) with high porosity (57 %) retained a fluffy biofilm unlike the OPP (A) with low porosity (38 %) for which a thin biofilm and lower nutrients removal efficiencies were obtained. Large-scale application of these biodegradable biocarriers should be investigated for further research in terms of the recycling of the attached biomass MaB-flocs on OPP for bioenergy production.

Key words: Multitrophic fluidized biofilm bed reactor, MaB-flocs, biodegradable olive pit powders, pollutants biodegradation, particles porosity

1. Introduction

Renewable energy in term of the circular economy is of major importance to maintain a large development of the society. The algae biomass production is considered as an economical and sustainable strategy for generating renewable energy. This energy-efficient covers about 33–50 % of the world energy needs by 2050 (Vassilev et al., 2013). A current problem of global warming via greenhouse gasses (GHG) emissions has triggered the combustion of green biomass for remediation through photosynthetic oxygenation (Maza-Márquez et al., 2014; Dahalan et al., 2015). The green technology of wastewater treatment has been applied for the first time into high rate algal ponds (HRAPs) (Oswald, 1988). Microalgae-bacteria flocs (MaB-flocs) ponds have received considerable interest as a potential feedstock for sustainable wastewater treatment through photosynthetic O_2 supply (Quijano et al., 2017). Most studies focus on the coupling between microalgae and activated sludge bacteria for the efficiency remove of carbon (C) through aerobic carbon oxidation and nutrients (N and P) via assimilation into biomass (Kang et al., 2018). A novel cultivation strategy of microalgae bacterial-flocs (MaB-flocs) was elucidate into sequencing batch reactors (SBR) system (MaB-flocs SBRs) to enhance the pollutants removal during wastewater treatment without O_2 supply. Recently, Van Den Hende et al. (2017) have evaluated the performance of MaB-flocs SBRs as an innovative technology for the treatment of paper mill UASB effluent via only photosynthetic aeration. This SBR system leads to significant organic carbon (58-21 %), inorganic carbon (27-8 %), nitrogen (77-5 %) and phosphorus (73-2 %) removal rates from the paper mill effluent (Van Den Hende et al., 2017). Although SBR operation can be permanently set for the separation of MaB-flocs biomass from treated wastewater during the settling phase (Van Den Hende et al., 2016), this operation mode may also be used during fluidized bed process. Therefore, the potential of the MaB-flocs SBR process for the treatment of synthetic wastewater was investigated by using multitrophic fluidized bed biofilm reactor (MFBBR) in the absence of additional O_2. Several investigations have shown the application of attached-growth system using bioparticles, such as the Circulating Fluidized Bed Biofilm Reactor (CFBBR) in order to reduce the sludge production and to enhance biological nutrient removal (Li et al., 2012). This strategy of immobilization of consortium could be a simple harvesting concept with low cost and a feasible application for wastewater treatment without energy supply (Cheirsilp et al., 2017 ; Bello et al., 2017). The carrier particles are among the key features of the fluidized bed reactor and widely involved in wastewater treatment process because of its large contact area between microorganisms and

the pollutant compounds. In this regard, the integration of olive pit powder (OPP), as a novel biodegradable carrier (Koutsomitopoulou et al., 2014), within the MFBBR may provide an original solution for the MaB-flocs immobilization. Another study emphasizes the possibility of solid olive wastes transformation into renewable materials in order to preserve environmental protection via waste treatment (Zyoud et al., 2015). The aim of this work focused on the preparation of olive pit powder (OPP) from olive solid wastes to highlight its mechanisms involved in nutrients removal (COD, ammonium, and phosphorus) and how the multitrophic interactions established within this ecosystem. Hence, the present investigation aimed to determine a suitable support for MaB-flocs and examine its particles properties (morphology and shape) with emphasis on the morphology of the biofilm produced. The MFBBR was handled for the treatment of synthetic wastewater at different sizes and concentrations of OPP bioparticles by starting the experiment with a MaB-flocs pre-culture in batch mode for 7 days and then switching to SBR operation for 14 days. The residuals of olives biocarriers immobilizing MaB-flocs biomass, after SBR wastewater treatment, may be better profited via a bioconversion into renewable energy through anaerobic co-digestion.

2. Materials and methods

2.1. Preparation and characterization of Olive Pit Powder (OPP) as a biocarriers

2.1.1. Olive Pit Powder (OPP) properties

The natural particles of olive pits (OP) adopted in the present work were provided from a regional olive manufacturer in the city of Kairouan, situated in the center of Tunisia. These novel biodegradable composites (OP) were recovered and valued from the solids waste at the final step of the olive oil extraction operation. According to Zyoud et al. (2015), the transformation of olive solid wastes to activated carbon (AC) contributes to the nitrite ions removal from water due to its large surface areas. For the powder preparation, a grinding the process was operated by using a machine (Retsch GmbH SM 2000, Germany) until producing crushed olive pits in several cuts and sizes. Then, the mixture was sieved via (Retsch AS 200, France) using Inoxmesh sieves (FicherScientific, Afnor, Paris) ranging between 1 to 2 mm. The size of the powders was measured using Mastersizer 2000 Laser Diffraction Granulometer (Malvern, UK), once the particles are dissolved in ethanol solution (96 %, w/w). Hence the olive pit powders OPP were divided into two groups in terms of mean diameter Dm of particles, one group with Dm of 1.07 ± 0.019 mm (OPP(A)) and another

group with Dm of 1.49 ± 0.029 mm (OPP(B)) (Table 1).Several measurements were handled in order to determine some features of OPP carriers such as the bulk density (ρ) and porosity (£). Thus, the bulk density (ρ) is the weight of dry particles (M_p) divided by the total particles volume (V_p), was determined for porous carriers as the combined density of the global volume of particles and the pore volume (Eq. 1) (Koutsomitopoulou et al., 2014).

$$\rho = \frac{Mp}{Vp}, (g.cm^{-3}) \quad (1)$$

The porosity (£) is a measure of the void spaces in a material previously dried. It is a fraction of the volume of voids over the total volume (Eq. 2):

$$£ = \frac{VL}{Vs}, (\%) \quad (2)$$

V_L (cm^3) is the volume of water added to fill the void space and the bulk volume; V_S is the total volume including the particles and the voice space. The result obtained is then expressed as a percentage. For this experience, the OPP composites were handled at three solid concentrations α_s for OPP (A): A'''(α_s, 1 vol. %), A''(α_s, 2 vol. %), A'(α_s, 4 vol. %) and for OPP (B): B'''(α_s, 1 vol. %), B''(α_s, 2 vol. %), B'(α_s, 4 vol. %). The morphological characteristics of the olive pit powder before and after the wastewater treatment using the MFBBR were observed by means of a Scanning Electron Microscope (SEM) (FE-SEM. JEOL JSM-6490LV) with a high resolution (3.0 nm). In addition, the formation of MaB-flocs and the attachment of biofilm on the surface area of OPP particles were closely monitored using SEM method.

2.1.2. Chemical activation with phosphoric acid

The step of chemical activation was realized using phosphoric acid solution H_3PO_4 (100 mL, 80 %, w/w) in order to create a porous biodegradable support. This technique of chemical activation increases the surface areas and enhances the adsorption property of composites (Velo-Gala et al., 2014). The acid solution was mixed with the pre-dried OPP samples for 24 h, then the solid part was separated from the acid residue, washed with distilled water to maintain a pH of 7-7.3 and dried during 24 h at 110°C into an oven.

2.2. Inoculation and reactor startup MaB-flocs culture in batch mode

Microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) culture has been prepared in a batch reactor with double envelope (Figure 1.a), using the previous pre-culture of MaB-flocs obtained from sludge (municipal sewage treatment plant in Tunisia, Kairouan city). Within the batch reactor, 350 mL of MaB-flocs with 4.48 $g.L^{-1}$ of total suspended solids (TSS), 2.75 $g.L^{-1}$ of volatile suspended solids (VSS) and 3.46 mg Chlorophyll (a).g^{-1} (VSS) were mixed with synthetic municipal wastewater (SMW) prepared as used by Dahalan et al. (2015) (Table 2) in order to obtain a working volume of 900 mL. The multitrophic culture was homogenized using a stirring speed of 100 rpm and exposed under a cycle of light/dark (16h/8h) using fluorescent lamps with a light power of 1050 lm (18W, Philips, France). The temperature inside the reactor was maintained at 27°C and water circulated through a thermostatic bath during 7 days of all operation.

2.3. Multitrophic Fluidization Biofilm Bed Reactor (MFBBR) configuration and process description

2.3.1. MFBBR description

Experiments were performed within a square bubble column (MFFBR) with a length of 6 cm and a height of 50 cm, corresponding to a total volume of 1.8 L, as shown in Figure 1.b. The MFBBR was designed in transparent Plexiglass material and allowed to visual observations of the behaviors of bubbles and particles, via the wall of the column. Nitrogen (N_2) gas was introduced at the bottom of the column. A stainless steel porous sparger plate (Sintertech, Poral) of 50 mm length (thickness of 3 mm and uniform perforations of 0.5 mm mean holes diameter) was used to sparge the nitrogen for the experiments. The air upflow rate was monitored by a mass flow controller (Smart Mass Flow, Serv Instruments, ZI Broteau-Nord) operated into the range air 4 $N.min^{-1}$. Thus, during the aeration phase, the air velocity was controlled via the connexion between an air-flow-meter (Brooks Instrument 0254, USA) and a timer (Evology, China).

2.3.2. SBR operation set-up

For the start-up SBR operation, approximately 400 mL of MaB-flocs pre-culture was inoculated in the bioreactor. The MFBBR bioreactor was powered with synthetic wastewater (Table 2) in SBR mode at a short hydraulic retention time HRT of 2.13 h and operated during

14 days for each type of media. The effluent was pumped at a flow rate of 25 mL.min^{-1} via a submerged tube, containing several holes of 0.5 mm of diameter in order to ensure a uniform feeding of the liquid inside the column. Each SBR cycle of six hours for a continuous operation of 24 h comprises five phases: aeration, settling, feeding, discharge and idle, as given in Table 3. After the filling-up of the column, the aeration phase was provided through the gas sparger at a gas upflow velocity of 2.1 cm.s^{-1} in order to obtain a uniform distribution of bubbles and a well mixing of the medium. The cycle of feeding/discharge with fresh synthetic wastewater of thirty minutes was controlled in order to ensure a ratio of 50% volume exchange (Table 3). At the end of the operation, the reactor was kept for an idle period of forty-five minutes. Illumination around the MFBBR was accomplished using 18W Phillips white tubes with a light power of 1050 lm under the continuous supply of light/dark cycles of 16h/8h. For each experiment, the MFBBR was charged with three volume fractions α_s (1, 2 and 4 vol. %) for both sizes (A and B) of OPP particles.

2.4. Experimental procedure and analytical Methods

Fluidization tests were carried out into the MFBBR for both cases before adding the particles and after charging the column with different sizes and volume fractions of OPP. The superficial gas velocity ranges from 0.5 to 2.5 cm.s^{-1}. The volume average gas holdup (ε) values were obtained by measuring the bed height before and after the shutting of the gas phase entrance in all cases (Eq. 3). The gas holdup is defined as follows (Temesgen et al., 2017). It is an important hydrodynamic parameter as it affects the mass transfer and gives useful information about the flow regime which prevails in the bed. Moreover, its knowledge is essential for design and scale-up purpose in bubble columns with and without suspended particles (Thobie et al., 2017).

$$\varepsilon = \frac{Vg}{Vs} = \frac{Vf - Vi}{Vf} = \frac{Hd - Hi}{Hd} \quad (3)$$

Thus, H_d represents the expanded height obtained after aeration and H_i yields the static height obtained in absence of gas bubbles (Eldyasti et al., 2012). At each gas upflow velocity Ug, successive images have been recorded using a high-speed camera (DantecDynamics, Denmark) in order to understand and characterize the bubbles-bed behaviors under different flow regimes.

205 *2.4.1. Analytical techniques*

206 Samples were taken from the effluent tank every 24 hours during the experimentation and
207 filtered through a 0.45 µm filter (Millex-LCR, Merck Millipore, USA). Chemical Oxygen
208 Demand (COD) was analyzed using HACH (51996-2000) method. The concentrations of
209 phosphorus ($P\text{-}PO_4^{3-}$) and ammonium ($N\text{-}NH_4^+$) were measured using Nessler method and
210 phosphate reagent for the 10 mL sample (HACH-LANGE GmbH, Germany), respectively, on
211 a HACH DR2000 spectrophotometer, USA. Total concentration of Chlorophyll(a) was
212 extracted through methanol solution (1M) and measured using a spectrophotometer (UV–Vis
213 2550, Shimadzu, Japan) at 652 nm and 665 nm (Porra et al., 1989): (Eq 4.)

214 $$\text{Chlorophyll(a)} = 16{,}29\ A_{665} - 8{,}54\ A_{652} \quad (4)$$

215 The autotrophic index (mg VSS mg^{-1} Chl (a)) was calculated in accordance to APHA (1985)
216 in order to determine the microorganism domination. The pH was measured using a pH meter
217 (METTLER Toledo M300a, USA). Microscopic observations of MaB-flocs pre-culture were
218 realized by using LEITZ Dialux 20 (Leica, Germany).

219 ***2.5. Statistical analyses***

220 The data were analyzed using an independent sample t-test with the statistical software SPSS
221 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A standard deviation (p-value < 0.05) at the 95 % confidence
222 level was used to compare all the parameters analyzed (COD, NH_4^+, and PO_4^{3-}). Each analysis
223 was repeated four times.

224 **3. Results and discussion**

225 ***3.1. Hydrodynamic characteristics of the MFBBR: Gas holdup***

226 The mean gas holdup, as the major hydrodynamic parameter, has been determined in gas-
227 liquid two-phase system taken as system reference and in gas-liquid-solid three phase system
228 in presence of both OPP (A) and OPP (B) particles in order to understand the effect of the size
229 and of the concentration of OPP on the hydrodynamics. It mainly depends on the operating
230 conditions such as the gas upflow velocity (Ug), the pressure and the temperature, the gas
231 distributor, the column dimensions, the liquid properties and the particles concentrations. In
232 this study, the gas velocities have been chosen so as to obtain a good solid suspension and to
233 limit the attrition of particles which could cause the biofilm destruction.

234 *3.1.1. Air/synthetic wastewater system*

235 At the beginning of the experiments, the MFBBR was operated at different gas velocities in
236 order to characterize the bubbles distribution of the gas-liquid system. At very low gas
237 flowrates, the bubble size depends on the size of the sparger perforations and on the balance
238 between the superficial tension, the viscous and inertia forces. The effect of the sparger holes
239 and the superficial tension force become negligible for higher gas flowrates. At low gas
240 upflow Ug_1 of about 0.6 $cm.s^{-1}$, the bubbles are almost spherical with globally small and
241 almost similar sizes. The bubbles size increases by increasing the gas velocity as shown in
242 Figures 2.a, 2.b and 2.c. This result has already been reported in literature (Saxena et al., 1990
243 ; Li and Prakash, 1999). Thus, the bubble-bubble interactions are neglected and the bubbles
244 move to the top of the column without coalescence (Camarasa et al., 1999). Furthermore, the
245 evolution of the gas holdup obtained at two phase flow with the gas velocity shows a linearity
246 of ε_G versus Ug which indicates the presence of a homogeneous regime and the absence of
247 bubble coalescence (Figure 3). This result is confirmed by the narrow bubble size distribution
248 (Figure 2) and is in good agreement with those previously reported in literature for gas-liquid
249 bubble columns. Indeed, the homogeneous regime generally prevails up to gas velocities of
250 about 5 to 6 $cm.s^{-1}$ for air-water systems when porous plates are used as gas distributors
251 (Camarasa et al., 1999).

252 *3.1.2. The effect of OPP properties on the gas holdup in MFBBR*

253 The gas holdup values measured in presence of OPP (A) and OPP (B) particles have shown a
254 similar evolution of ε_G with the superficial gas velocity and the solid concentration (Figure 3).
255 The gas holdup increases in all cases with Ug. The decrease of this hydrodynamic parameter
256 with the solid loading is negligible at low solid concentrations (α_s, 1 vol. %) but becomes
257 more important at the highest solid loading (α_s, 4 vol. %) used in this study. The negligible
258 influence of the small solid concentrations on the gas holdup has already been noticed by
259 numerous investigators who reported a slurry bubble behavior similar to that of a solid-free
260 bubble column for very low solid loading. For the highest volume fraction OPP (A'), one can
261 attribute the decrease of ε_G to the fact that the increase of solid loading expands the bubble
262 size of the largest bubbles, as shown on Figure 3.a, which may be due to bubble coalescence.
263 Indeed, the bubble rise velocities increase with the size of bubbles leading to the decrease of
264 the bubble residence times and consequently to the increase of the bubble velocity.

This behavior has already been reported by a number of researchers (Deckweret al.,1980 ; Kara et al., 1982 ; Hyndman et al., 1997) who explain this decrease by the increase of the slurry viscosity, the steric effect of particles or the decrease of small bubble holdup.The effect of the size of particles seems to present a small effect on Ug as a slight gas holdup augmentation is observed for the biggest particles size (OPP (B) particles) especially for the highest solid concentration OPP (B') (Figure 3.b). This trend may be related to the smaller bubble sizes obtained for the largest bubbles in presence of OPP (B) particles as compared to OPP (A) particles (Figure 3.a). However, an opposite effect of the particles size has generally been reported in literature (Saxena et al., 1990). The present work organizes the studies conducted on the effect of solid particles characteristics with a special emphasis on wastewater treatment with MaB-flocs at different operating conditions. Experiments have been conducted at the highest gas upflow velocity (2.1 $cm.s^{-1}$) in order to obtain a complete suspension of particles.

3.3. Generation of MaB-flocs biomass during batch culture

MaB-flocs biomass was harvested via a simple step of settling after 7 days of batch culture and has TSS (3.76 $g.L^{-1}$), VSS (2.35 $g.L^{-1}$) and 4.58 mg of Chlorophyll (a).g^{-1} (VSS) (Table 4). The autotrophic index (AI) decreased from 288.86 ± 0.5 to reach a low value of about 218 ± 0.3 after 7 days. Thus, this result confirmed the autotrophic abundance of microalgae suspension. This symbiosis biomass of MaB-flocs may generally offer a sustainable wastewater management technology due to its environmental performances related to carbon removals without an oxygen supply. Hence, the technology of microalgae-bacterial flocs into sequencing batch reactors (MaB-flocs SBRs) leads to the separation of MaB-flocs biomass from treated wastewater during the settling phase. This step promotes the cost-effective of the biomass recovery pollutants from effluent and overcomes the above harvesting limitations (Van Den Hende et al., 2016).

3.4. Performance of multitrophic fluidized bed biofilm reactor (MFBBR) for wastewater treatment and biofilm attachment

In the present work, the dynamics gas–MaB-flocs-OPP flow in MFBBR was investigated for the removal of organic pollutants (COD) at the highest nitrogen gas upflow Ug_3, which leads to the highest gas holdup (section 3.1.2). Moreover, the aeration into the circulating fluidized bed biofilm reactor at a flow rate of 50 $NL.min^{-1}$ maintains similar turbulence of the flow and

generates narrow bubbles size (Li et al., 2013). According to several studies, the type of the distributed gas (CO_2, air, He, and N_2) used into the fluidized bed affects the bubbles behavior because of the variation of its molecular weight (Temesgen et al., 2017). Thus, it was demonstrated that micro-bubbles were better generated by N_2, better than by air and He (Temesgen et al., 2017). However, the use of air and nitrogen for bubbles generation play a major role for the increase of bacteria activities in both anaerobic and aerobic operations (Ghadimkhani et al., 2016).

3.4.1. Effect of bioparticles (OPP) properties on organic compounds (COD) removal during SBR experiment

The MFBBR was tested during SBR wastewater treatment in order to evaluate the potential of each OPP carriers and its properties with respect to COD removal efficiencies. Figure 4 shows the significant ($p<0.05$) effect of both size and solid concentration of OPP on the performance of COD removals after 14 days of SBR operation. It seems obvious that COD removal efficiency increases with the increasing of the amounts' OPP during wastewater treatment. However, the highest COD performance was obtained for the bigger size of OPP(B) due to the less coalescing media compared to low OPP(A), as illustrated in Figure 4.For instance, by using zeolite, as carrier media, within FBBR, the COD efficiency was higher for the bigger diameter of particles (0.5 mm - 0.8 mm) compared to the finer composites (0.2 mm - 0.5 mm)(Fernandez et al., 2008). At the large weight (B'), the initial organics concentration of 612 $mg.L^{-1}$ in the wastewater decreases gradually to achieve about of 92 ± 6.08 $mg.L^{-1}$ (Table 5) after 14 days at HRT of 2.13 hours, corresponding to a high COD removal efficiency of 84.96 ± 0.8 %. Otherwise, the lowest amount of OPP (A'") and (B'"), for both sizes, shown a lowest COD removal efficiencies of 42 ± 0.9% and 54 ± 0.9 % at the end of the experiment (Figure 4). The symbiosis system of MaB-flocs shown the highest organic compounds removal rates at a short hydraulic retention time (HRT), in which MaB-flocs were cultivated before using as an inoculum. During the same condition, Boelee et al. (2014a) found that the total acetate concentration as an organic compound decreased at a removal rate of about 88 %. Moreover, as this system, the synthetic wastewater treatment has demonstrated a removal efficiency of organic carbon of about 86 % (Alcántara et al., 2015). Hence, the present result confirmed the successful use of support media (OPP) to enhance the MFBBR performance.

3.4.2. Effect of bioparticles (OPP) properties on nutrients (Ammonium and Phosphorus) removal during SBR experiment

The influence of OPP properties on bio-nutrient bioremediation was assessed based on the removal of ammonium and phosphorus during the SBR-MFBBR process. For both size of OPP particles, as shown in Figure 4, the remove of the total N-NH_4^+ and P-PO_4^{3-} depend significantly on the concentration of biocarriers. When the volume fraction of OPP increased from A''' (α_s, 1 vol. %) to A' (α_s, 4 vol. %), the NH_4^+ and PO_4^{3-} removal efficiencies reached 52.94 ± 0.5% and 68.4 ± 0.2%, respectively, after 14 days of SBR operation. Thus, the effective removal of nitrogen (N) could be contributed via ammonium assimilation and also phosphorus (P) through adsorption and precipitation (Boelee et al., 2014a). The highest removal efficiencies of nutrients (NH_4^+ and PO_4^{3-}) were significantly ($p<0.05$) attributed to the largest size of OPP (B) in comparison with the lowest size (A). At high size and concentration of OPP (B'), the ammonium and phosphorus removal performances are illustrated in Table 5. The total N-NH_4^+ concentrations in the effluent varied from 69.91 mg L^{-1} until 30.1 ± 0.8 mg.L^{-1} at day 14 with an ammonium removal efficiency of 56.94 ± 0.9% (Figure 4). Similar to ammonium remove, for the OPP(B'), the total P-PO_4^{3-} concentration continued to decrease from 33.62 mg.L^{-1} to 9.3 ± 0.47 mg.L^{-1} (Table 5) and reached a highest phosphorus removal rate at the end of the experience of about 72.33 ± 1.42 % (Figure 4). Hence, by comparing the effectiveness of pollutants removals, this study has demonstrated a significant difference ($p<0.05$) between a small and a large size of OPP into symbiotic biofilm reactor MFBBR. During this experiment, the pH values stayed stable at 7.5. Thus, according to the pH evolution, the remove of phosphorus could be explained by the biotic assimilation mechanism which is contributed by algae growth (Tang et al., 2018). Otherwise, the neutral pH could be obtained by the process of carbon dioxide consumption (González-Fernández et al., 2016).A similar study into flow cells of microalgae–bacterial biofilms has improved the removing of ammonium, phosphate, and an organic compound (acetate) from municipal wastewater, without oxygen requirement (Boelee et al., 2014a). As reported by Posadas et al. (2013), the efficiency of carbon, nitrogen and phosphorus removals achieved about of 91 ± 3 %, 70 ± 8 % and 85 ± 9 %, respectively, from domestic wastewater, using algal–bacterial biofilm bioreactors. The main conclusion of this study was the significant robustness of MFBBR using high size and concentration of OPP (B') at a ratio COD/N of 8.7 in terms of COD (85 %) ammonium (57 %) and phosphorus (72 %) removal efficiencies. Thus, as the ratio COD/N increases the nitrification phenomena was mostly affected by the heterotrophic

microorganisms than by the nitrifying organisms. Although, a low COD/N ratio leads to limit the processes of denitrification (Islam et al., 2009;Vergara et al., 2016). Consequently, the application of the symbiotic microalgae–bacterial relationship into fluidized biofilm bed reactors has a potential engineering aspect for wastewater treatment to uptake organic and mineral pollutants without an external O_2 supply.

3.4.3. Biofilm morphology and physical characteristics of OPP

The performance of MFBBR for biofilm attachment by using different sizes and concentrations of OPP was significantly ($p<0.05$) affected by the physical features of biocarriers. The bulk density ranged between 1014 $kg.m^{-3}$ and 1056 $kg.m^{-3}$ for OPP (A) and OPP (B), respectively. This result confirmed the influence of carriers' size on bulk density, when finer olive pit powders of 60 µm of diameter achieved about of 393 $kg.m^{-3}$ of bulk density (Koutsomitopoulou et al., 2014). Whereas, other natural supports such as lava rock have shown the higher bulk density of 1142 $kg.m^{-3}$. Therefore, it was demonstrated that due to its lowest physical parameters, compared to the other carriers adopted into fluidized bed, the husk olive granules are quickly fluidized via only aeration (Hamdi and Ellouz, 1993). In addition, the variation of porosity, yields a value of 38 % for OPP (A) which is significantly lower than that for OPP (B) with a value of 57 %. Through the scanning electron micrographs (SEM), olive pit powders at both sizes A and B shown a distribution with an almost irregular shape of granules (Figure 5.a). By analyzing the surface area of OPP biocarriers with SEM procedure, several porous were formed due to chemical activation which confirmed the porosity property of the material (Figures 5.b and 5.c). Various irregularly shapes of pores have been located over all OPP surface and elucidated the rough structure of particles. According to Bello et al. (2017), the surface roughness of materials is suitable for biofilm adhesion. This study demonstrates the feasibility of introducing porous OPP biocarriers within the MFBBR column for the formation of multitrophic biofilm and the MaB-flocs enrichment as well as successful bioremediation. However, inoculation of MaB-flocs into the OPP showed a greater attachment of biofilm-related to the decrease of COD and nutrients (N-NH_4^+ and P-PO_4^{3-}) concentrations in the effluent (section 3.4.1 and 3.4.2). MaB-flocs culture was quickly adapted to the micropores particles of OPP and its rough surface. The particles with high porosity are considered as a protective niche for microorganisms to survive and growth (Liang et al., 2009). Consequently, the pollutants removal would be important. The SEM analysis showed that the OPP (B) particles with large porosity (57 %) maintained a

filamentous and fluffy biofilm (Figure 5.d) and achieved higher nutrients removal efficiencies (section 3.4.2). In contrary, the OPP (A) particles with low porosity (38 %) exhibited a sloughing biofilm (Figure. 5e). As the high porosity of the bio-composites OPP, the surface contact increased to promote suitable environmental conditions for symbiosis biofilm growth and efficiency wastewater treatment. Moreover, for biological treatment via the fixed biomass system, the most used support media should have enough porous and rough surface to enhance the attachment of microorganisms (Nelson et al., 2017). Overall treatments, the large bioparticles OPP (B) showed a wide accumulation and adhesion of MaB-flocs (Figure 5.f) onto the surface material, compared to the finer ones OPP (A) (Figure 5.g). Therefore, based on the large diameter of the OPP, pollutants migrate into the highest micropores surface which increases its bioremediation capacities from the effluent. Thus, as confirmed by Sur et al. (2017), the biocarriers media handled for biofilm development were characterized by a large surface area and a high porosity in order to enhance microbes' colonization and organic contaminants recovery. The present study demonstrated the high performance of OPP (B) for biofilm adhesion. To valorize the biodegradables OPP, resulted from wastewater treatment, anaerobic co-digestion could be proposed to generate biomethane as a renewable bioenergy. In fact, according to several researches (Karantonis et al., 2008 ; Gianico et al., 2013 ; Katsoni et al., 2014), the olive solid residues are mostly characterized by considered concentrations of polysaccharides, proteins, volatile fatty acids (VFA), lignin, cellulose, hemicelluose, polyphenols and other pigments. Based on these considerations, a future work will be carried out to evaluate the feasibility of the composition of olive residues and to valorize the algal biomass for the energy production via anaerobic digestion.

4. Conclusion

The investigation of MFBBR highlighted the significant effect of OPP biocarriers properties on the synthetic wastewater treatment focusing on total pollutants removals and simultaneous biofilm adhesion. Based on 14 days of SBR experiments dealing with MaB-flocs cultures, high size and concentration (α_s, 4 vol. %) OPP (B') enhanced the highest bioremediation of organic compounds (COD), ammonium and phosphorus with about 85 %, 57 %, and 72.3 % removal efficiencies, respectively. SEM analysis shown a high MaB-flocs colonization among irregular pores onto the surface of the OPP (B), unlike the OPP (A) media. Thus, a filamentous and fluffy biofilm appeared in high porosity particles (57 %) for OPP (B) as compared to the lowest porosity (38 %) of OPP (A), which is characterized by a sloughing biofilm attachment and a low biodegradation performance. Hence, the porosity and the roughness surface of OPP materials played a significant role in biofilm morphology. Furthermore, this study may help the bioenergy valorizing of the biodegradables olive biocarriers, which fixed MaB-flocs biomass, via a further process of anaerobic co-digestion.

References

Alcántara, C., Domínguez, J. M., García, D., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P. A., Muñoz, R. (2015) . Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic–aerobic algal–bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances. *Bioresource Technology*, 191, 173-186.

APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edn. Washington, DC: *American Public Health Association*, p. 1268.

Bello, M. M., Raman, A. A. A., Purushothaman, M. (2017). Applications of fluidized bed reactors in wastewater treatment–A review of the major design and operational parameters. *Journal of Clean Production*, 41, 1492-1514.

Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., Wijffels, R. H. (2014). Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors treating synthetic municipal wastewater. *Ecology Engineering,* 64, 213-221.

Camarasa, E., Vial, C., Poncin, S., Wild, G., Midoux, N., Bouillard, J. (1999). Influence of coalescence behaviour of the liquid and of gas sparging on hydrodynamics and bubble characteristics in a bubble column. *Chemical Engineering and Process: Process Intensification,* 38, 329-344.

Cheirsilp, B., Thawechai, T., Prasertsan, P. (2017). Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. *Bioresource Technology*, 241, 787-794.

Dahalan, F. A., Najib, M. Z. M., Salim, M. R., Ujang, Z. (2015). Characteristics of developed granules containing phototrophic aerobic bacteria for minimizing carbon dioxide emission. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 102, 15-23.

Deckwer, W.D., Louisi, Y., Zaidi, A., Ralek, M. (1980). Hydrodynamic properties of the Fisher-Tropsch slurry process. *Industrial & Engineering Chemical Process Design and Development*, 19, 699-708

Eldyasti, A., Nakhla, G., Zhu, J. (2012). Influence of particles properties on biofilm structure and energy consumption in denitrifying fluidized bed bioreactors (DFBBRs). *Bioresource Technology*, 126, 162-171.

Fernandez, N., Montalvo, S., Borja, R., Guerrero, L., S anchez, E., Cort es, I., Colmenarejo, M.F., Travieso, L., Raposo, F. (2008). Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. *Renewable Energy* 33, 2458e2466. http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2008.02.002.

Ghadimkhani, A., Zhang, W., Marhaba, T. (2016). Ceramic membrane defouling (cleaning) by air nano bubbles. *Chemosphere*. 146, 379-384.

Gianico, A., Braguglia, C.M., Mescia, D., Mininni, G. (2013). Ultrasonic and thermal pretreatments to enhance the anaerobic bioconversion of olive husks. *Bioresource Technology*, 147:623e6.

González-Fernández, C., Mahdy, A., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2016). Impact of temperature and photoperiod on anaerobic biodegradability of microalgae grown in urban wastewater. *International Biodeterioration& Biodegradation*, 106, 16-23.

Hamdi, M., Ellouz, R. (1993). Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*, 14, 183-188.

Hyndman, C. L., Larachi, F., Guy, C. (1997). Understanding gas-phase hydrodynamics in bubble columns: a convective model based on kinetic theory. *Chemical Engineering Science*, 52, 63-77.

Islam, M., George, N., Zhu, J., Chowdhury, N. (2009). Impact of carbon to nitrogen ratio on nutrient removal in a liquid–solid circulating fluidized bed bioreactor (LSCFB). *Process Biochemical*, 44, 578-583.

Kang, D., Kim, K., Jang, Y., Moon, H., Ju, D., Jahng, D. (2018). Nutrient removal and community structure of wastewater-borne algal-bacterial consortia grown in raw wastewater with various wavelengths of light. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 10-20.

Kara, S., Kelkar, B.G., Shah, Y.T., Carr, N. L. (1982). Hydrodynamics and axial mixing in a three-phase bubble column. *Industrial & Engineering Chemical Process Design and Development,* 21, 584-594

Karantonis, H.C., Tsantila, N., Stamatakis, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Antonopoulou, S., Demopoulos, C.A. (2008). Bioactive polar lipids in olive oil, pomace and waste by-products. *Journal of Food Biochemical*, 32, 443–459.

Katsoni, A., Mantzavinos, D., Diamadopoulos, E. (2014). Sequential treatment ofdiluted olive pomace leachate by digestion in a pilot scale UASB reactor andBDD electrochemical oxidation. *Water Research*, 57, 76–86.

Koutsomitopoulou, A. F., Bénézet, J. C., Bergeret, A., Papanicolaou, G. C. (2014). Preparation and characterization of olive pit powder as a filler to PLA-matrix bio-composites. *Powder Technology*, 255, 10-16.

Li, H., Prakash, A. (1999). Analysis of bubble dynamics and local hydrodynamics based on instantaneous heat transfer measurements in a slurry bubble column. *Chemical Engineering Science*, 54, 5265-5271

Li, M., Nakhla, G., Zhu, J. (2012). Simultaneous carbon and nitrogen removal with enhanced bioparticle circulation in a circulating fluidized bed biofilm reactor. *Chemical Engineering Journal,* 181, 35-44.

Li, M., Nakhla, G., Zhu, J. (2013). Impact of worm predation on pseudo-steady-state of the circulating fluidized bed biofilm reactor. *Bioresource Technology*,8, 281-289.

Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., Li, G.(2009). Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 80-87.

Maza-Márquez, P., Martinez-Toledo, M. V., Fenice, M., Andrade, L., Lasserrot, A., Gonzalez-Lopez, J. (2014). Biotreatment of olive washing wastewater by a selected microalgal-bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 69-76.

Nelson, M. J., Nakhla, G., Zhu, J. (2017). Fluidized-Bed Bioreactor Applications for Biological Wastewater Treatment*: A Review of Research and Development Engineering*, 3, 330-342.

Oswald, W.J. (1988). Micro-algae and waste-water treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), Micro-Algal Biotechnology. *Cambridge University Press, Cambridge,* pp. 305–328.

Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E.(1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et BiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics*. 975, 384-394.

Posadas, E., García-Encina, P. A., Soltau, A., Domínguez, A., Díaz, I., Muñoz, R. (2013). Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal–bacterial biofilm bioreactors. *Bioresource Technology*, 139, 50-58.

Quijano, G., Arcila, J. S., Buitrón, G. (2017). Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 35, 772-781

Saxena, SC, Rao, NS, Saxena, AC. (1990). Heat transfer and gas holdup studies in a bubble column: air-water-glass bead system. *Chemical Engineering* Commun, 96, 31-55

Sur, D. H., Mukhopadhyay, M. (2017). Process aspects of three-phase inverse fluidized bed bioreactor: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 3518-3528.

Tang, C. C., Tian, Y., Liang, H., Zuo, W., Wang, Z. W., Zhang, J., He, Z. W. (2018). Enhanced nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater via algae-assisted sequencing batch biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 250, 185-190.

Temesgen, T., Bui, T. T., Han, M., Kim, T. I., Park, H.(2017). Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: *A Review Advance in Colloid and interface Science,* 246, 40-51.

Thobie, C., Gadoin, E., Blel, W., Pruvost, J., Gentric, C. (2017). Global characterization of hydrodynamics and gas-liquid mass transfer in a thin-gap bubble column intended for microalgae cultivation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification,*122, 76-89.

Van Den Hende, S., Beelen, V., Julien, L., Lefoulon, A., Vanhoucke, T., Coolsaet, C., Rousseau, D. P. (2016). Technical potential of microalgal bacterial floc raceway ponds treating food-industry effluents while producing microalgal bacterial biomass: An outdoor pilot-scale study. *Bioresource Technology*, 218, 969-979.

Van Den Hende, S., Rodrigues, A., Hamaekers, H., Sonnenholzner, S., Vervaeren, H., Boon, N. (2017). Microalgal bacterial flocs treating paper mill effluent: A sunlight-based approach for removing carbon, nitrogen, phosphorus, and calcium. *New Biotechnology.*

Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K., Vassileva, C. G. (2013). An overview of the composition and application of biomass ash. Part 1. Phase–mineral and chemical composition and classification. *Fuel*, 105, 40-76.

Velo-Gala, I., Lopez-Penalver, J.J., Sanchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J. (2014). Surface modifications of activated carbon by gamma irradiation. *Carbon*, 67, 236e249

Vergara, C., Muñoz, R., Campos, J. L., Seeger, M., Jeison, D. (2016). Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 116-121.

Zyoud, A., Nassar, H. N., El-Hamouz, A., Hilal, H. S. (2015). Solid olive waste in environmental cleanup: enhanced nitrite ion removal by ZnCl 2-activated carbon. *Journal of Environmental Management*, 152, 27-35.

590 **Figure captions**

591 **Figure 1.** Culture of microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) into batch column (1A).
592 Wastewater treatment within the multitrophic fluidization bed biofilm reactor (MFBBR) (1B)

593 **Figure2.** Photographs of bubble size and shape at various gas upflow velocities (2A, 2B and
594 2C)

595 **Figure 3.** Effects of the OPP properties on gas holdup at various upflow velocity
596 (3A): OPP(A) and (3B): OPP(B)

597 **Figure 4.** Variation of COD, ammonium and phosphorus removal efficiencies (%) in terms of
598 bioparticles (OPP) properties during SBR experiment

599 **Figure 5.** SEM micrographs of olive pit powders (OPP):Various shapes of OPP particles,
600 mag. 25x (5A);Various porous over OPP surface: mag. 800x (5B) and mag. 3000x (5C);
601 biofilm development on OPP(B) surface: mag. 85x (5D), mag. 1300x (5F); and OPP(A)
602 surface: mag. 85x (5E), mag. 1400x (5G).

603 **Tables**

604 **Table 1.** Characterization of olive pit powders

605 **Table 2.** Composition of synthetic wastewater for MaB-flocs cultivation

606 **Table 3.** SBR Operation phases for wastewater treatment process.

607 **Table 4.** MaB-flocs biomass characteristics after batch culture

608 **Table 5.** Influent and effluent characteristics after 14 days of SBR operation for OPP(B')
609 biocarriers

610

611

612

613

614

615

Figure 1.

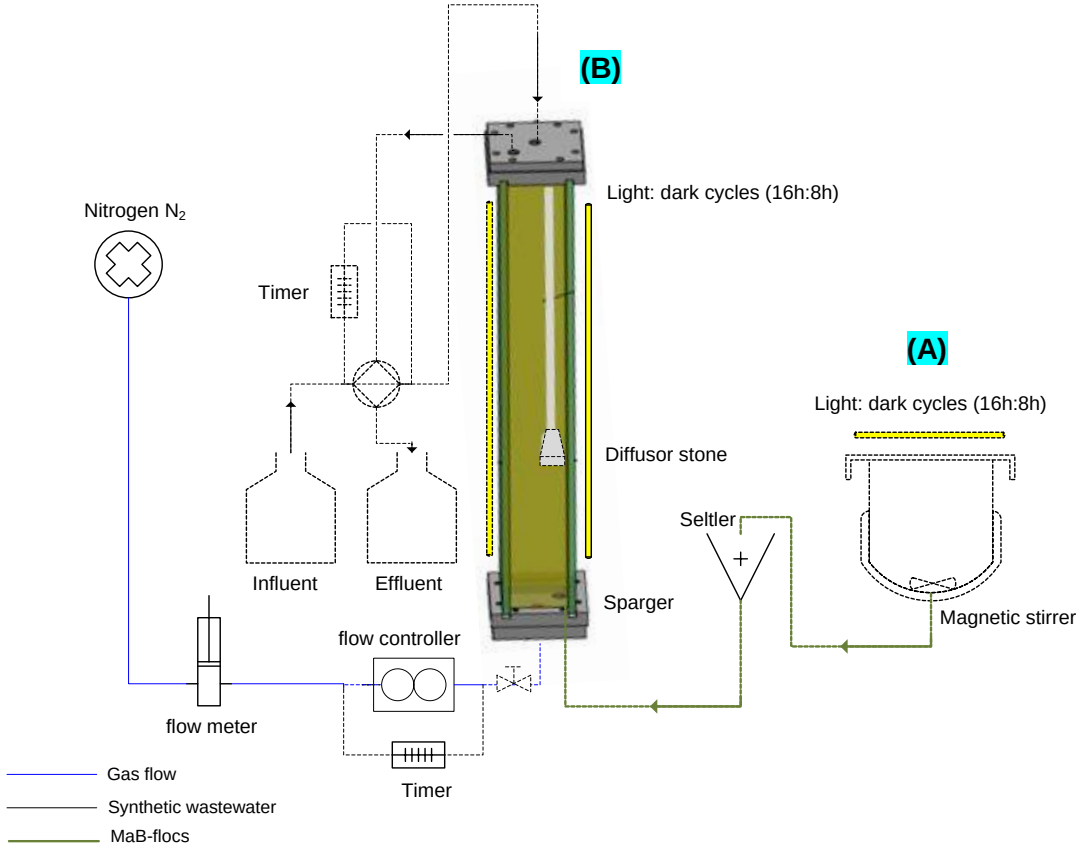
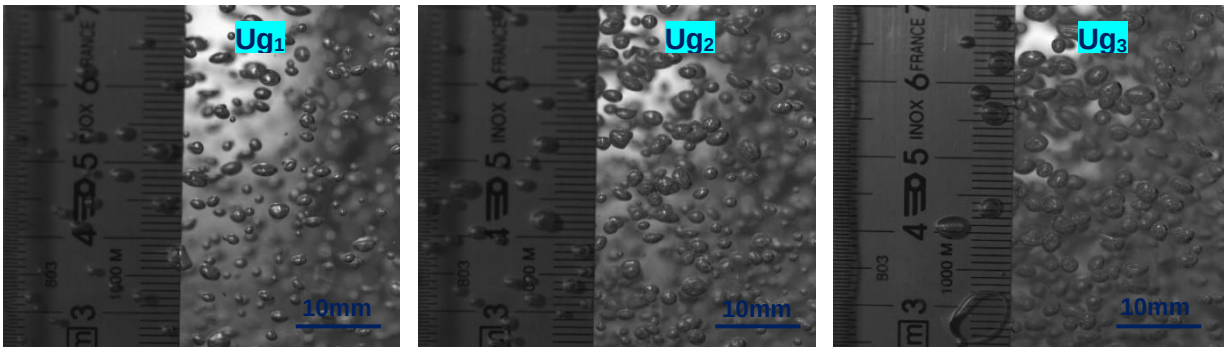

(B)
Light: dark cycles (16h:8h)
Nitrogen N_2
Timer
(A)
Light: dark cycles (16h:8h)
Diffusor stone
Seltler
Influent
Effluent
Sparger
Magnetic stirrer
flow controller
flow meter
Timer
Gas flow
Synthetic wastewater
MaB-flocs

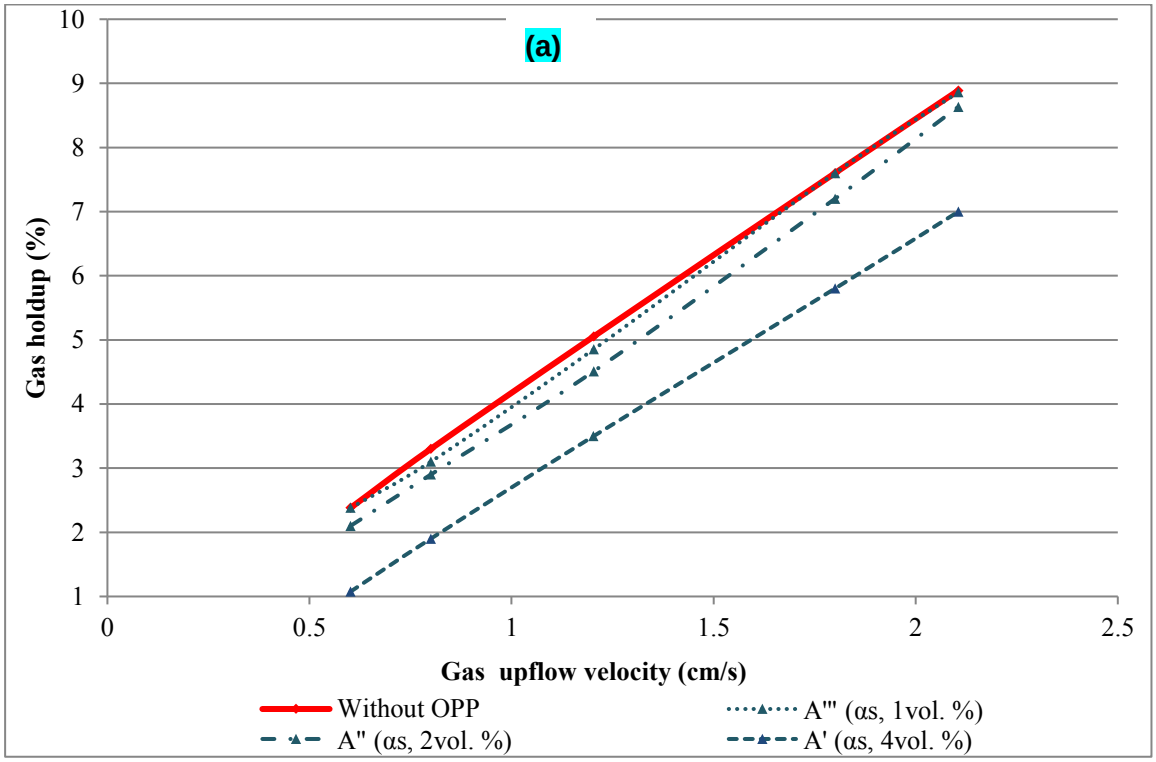
Figure 2.

(A) **(B)** **(C)**

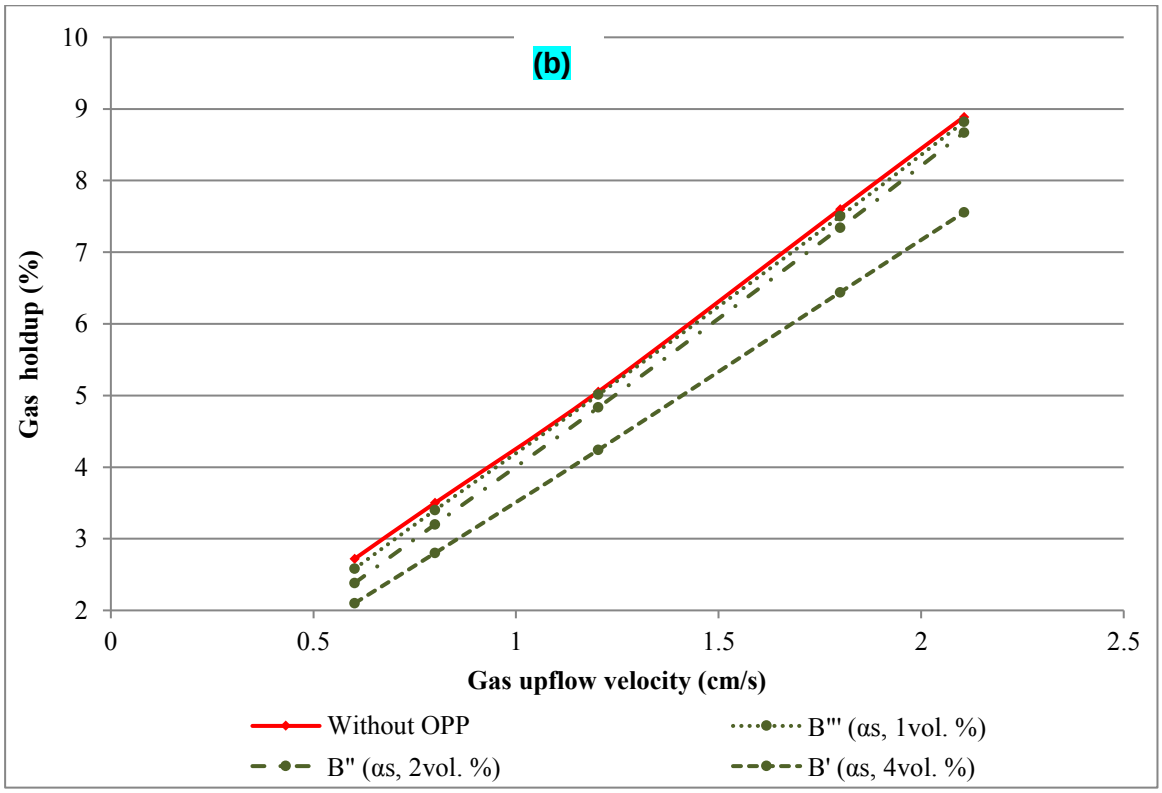


649 **Figure 3.**

650



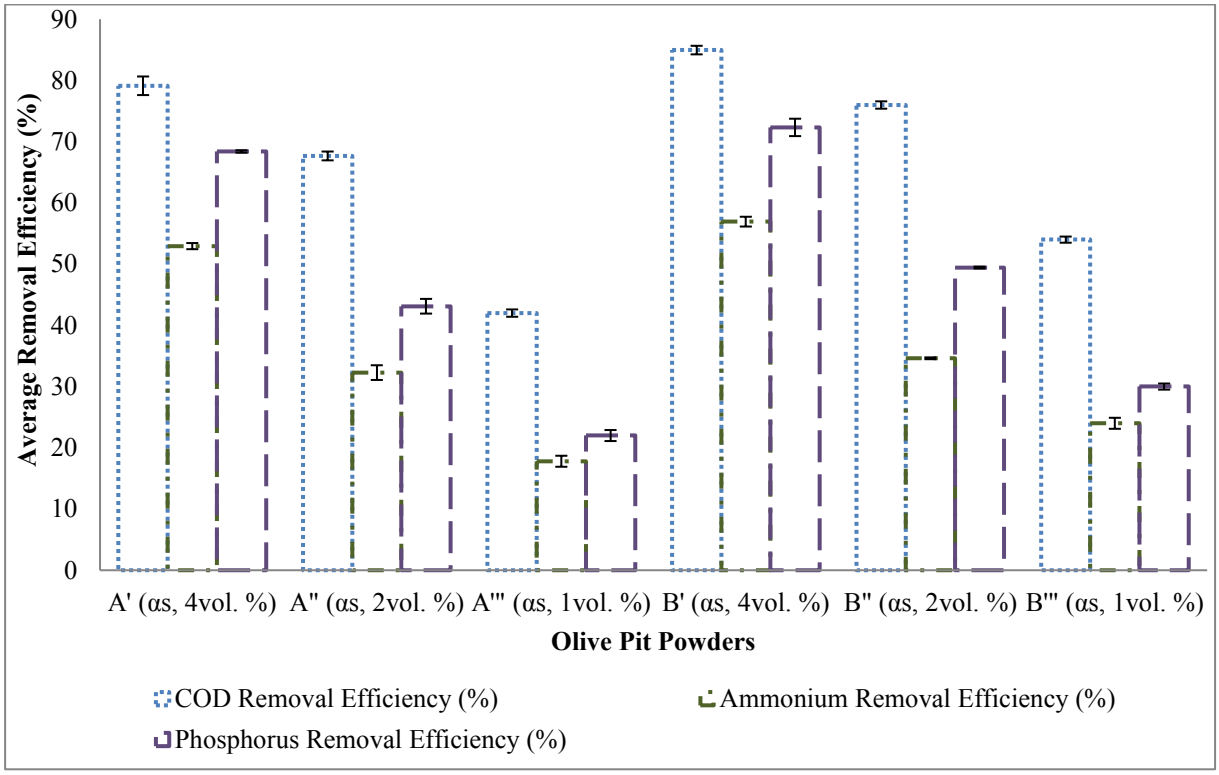
651



652

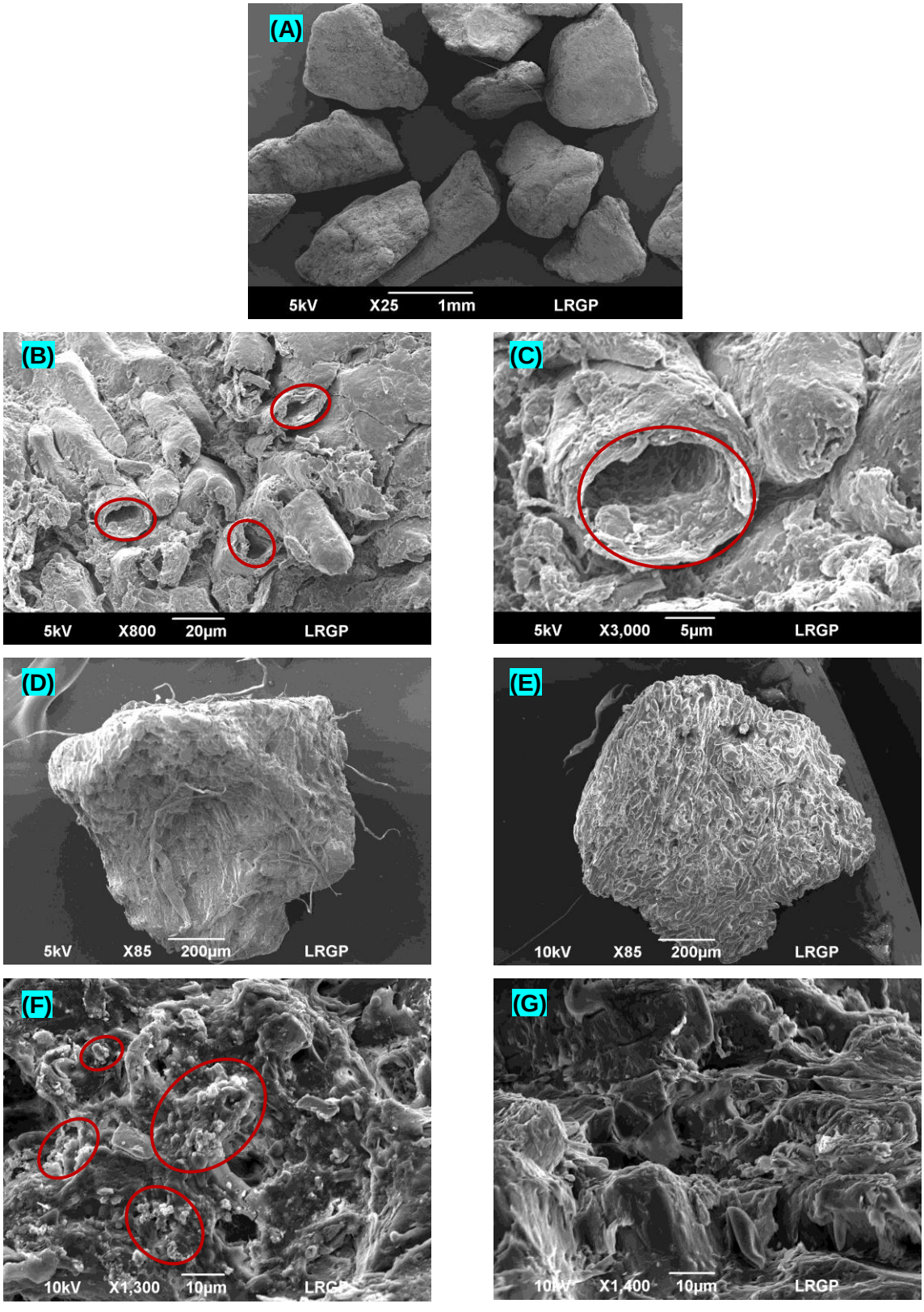
653

Figure 4.


Average Removal Efficiency (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
A' (αs, 4vol. %)
A" (αs, 2vol. %)
A"' (αs, 1vol. %)
B' (αs, 4vol. %)
B" (αs, 2vol. %)
B"' (αs, 1vol. %)
Olive Pit Powders
COD Removal Efficiency (%)
Ammonium Removal Efficiency (%)
Phosphorus Removal Efficiency (%)

668 **Figure 5.**

669



670

671 **Tables**

672 **Table 1.**

673

Olive pit powders properties	Mean diameter (mm)	Bulk density (g cm^{-3})	Porosity (%)
Olive pit powder (A)	1,075 ± 0,019	1.014	38
Olive pit powder (B)	1,495 ± 0,029	1.056	57

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687 **Table 2.**

688

Composant		**Concentration (mg.L^{-1})**	
Medium organic (O) (1 L)	Glucose	600mg COD.L	50%=298.4
	Acetate		50%=603.26
Medium nutrient (N) (1 L)	NH_4Cl	239	
	$CaCl_2.2H_2O$	45.9	
	$MgSO_4.7H_2O$	46.2	
	$Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$	26.5	
	K_2HPO_4	70.3	
Trace elements (10 mL L)	$EDTA.2H_2O$	4.78	
	$FeCl_3$	2.38	
	$CuSO_4.5H_2O$	$1.25\ 10^{-2}$	
	$ZnSO_4.7H_2O$	$2.75\ 10^{-2}$	
	$CoCl_2.6H_2O$	$12.5\ 10^{-3}$	
	$MnCl_2.2H_2O$	0.184	
	H_3NO_3	1.25	

689

690

691

692

693

694

695

696 **Table 3.**

697

MFBBR (operation phase)	Time (min)
Aeration	270
Settling	15
Discharge	15
Feeding	30
Idle	45

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711 **Table 4.**

712

MaB-flocs biomass Characteristics Unit		TSS g TSS.L^{-1}	VSS g VSS.L^{-1}	AI* mg VSS mg^{-1}Chl (a)	Chl (a) mgChl (a) g^{-1} VSS
Batch culture	T_0	4.48	2.75	288.86 ± 0.5	3.46 ± 0.5
	T_{7days}	3.76	2.35	218 ± 0.3	4.58 ± 0.3

713 **Autotrophic index: represents the quotient between VSS and chlorophyll (a) values (Apha, 1985)*

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729 **Table 5.**

730

Parameters	Influent (Synthetic Wastewater)	Effluent (Treated Wastewater)
		At day 14 SBR operation
pH	7.34	7.5
HRT (hours)	-	2.13
Feed flow ($mL.min^{-1}$)	-	25
$mgCOD.L^{-1}$	612	92 ± 6.08
NH_4^+-N ($mg.L^{-1}$)	69.91	30.1 ± 0.8
PO_4^{3-}-P ($mg.L^{-1}$)	33.62	9.3 ± 0.47
COD/N	8.7	3.05

731

732

733

734

735

736

737

738

739

III.3. Conclusion générale

Cette étude a montré l'efficacité des propriétés des biocarriers (OPP) sur le traitement des eaux usées synthétiques, en mettant l'accent sur l'élimination des polluants (C, N, P) et sur l'adhérence simultanée des biofilms. En se basant sur un traitement en SBR de 14 jours, les granules d'OPP, ayant une taille et une concentration élevées (αs, 4 vol.%) OPP (B'), ont montré le potentiel le plus élevé d'élimination de DCO (85 %), d'ammonium (57 %) et de phosphore (72 %) simultanément. La caractérisation des bioparticules à l'aide de la technique SEM a montré une forte colonisation des flocs-MaB à travers les pores irréguliers situés à la surface de la OPP (B), contrairement au support OPP (A). Ainsi, un biofilm filamenteux et pelucheux est apparu sur les particules OPP (B) à haute porosité comparé à la plus faible porosité (38 %) de l'OPP (A), qui se caractérise par une légère production de biofilm et une faible performance de biodégradation. Par conséquent, la porosité et la rugosité des surfaces des matériaux OPP ont joué un rôle significatif dans la morphologie des biofilms multitrophiques. Cette observationa montré la capacité des flocs-MaB de s'adhérer sur des supports de surfaces et de formes différentes, en formant un biofilm bien structuré. Dans cette partie du travail, une étude hydrodynamique plus profonde pourrait être suggérée afin de caractériser l'écoulement en fonction de la taille des bulles distribuées dans la colonne et d'étudier leur effet sur l'épaisseur du biofilm formé. Par ailleurs, une application à grande échelle de ces biofilms multitrophiques, en utilisant des supports d'immobilisation de surface plus large, devrait faire l'objet de nouvelles études plus poussées de recyclage de la biomasse de flocs-MaB pour une phytoremédiation durable.

D'autre part, dans le but de valoriser et de recycler les résidus de biocarriers d'OPP immobilisant la biomasse de flocs-MaB, suite au traitement des eaux usées, une bioconversion en énergie renouvelable par une co-digestion anaérobie pourrait être exploitée dans le concept de l'économie circulaire.

CHAPITRE IV.

Etude de faisabilité des flocs de bactéries-microalgues dans un réacteur à disques rotatifs pour le traitement des eaux usées

IV.1. Introduction

Dans le but d'augmenter la surface de contact entre les micro-organismes et le support d'immobilisation, la faisabilité des flocs-MaB à produire un biofilm multitrophique, où la minéralisation et la photosynthèse sont couplées sans aucun l'apport d'O_2, a été étudiée dans un réacteur à disques rotatifs (RDR) à l'échelle du laboratoire. Ainsi, des disques rotatifs en Plexiglasont été ajoutés au sein de ce réacteur afin d'étudier les phénomènes d'attachement-détachement des biofilms photosynthétiques. L'effet de la structure de ces disques sur l'adhésion du biofilm a été testé au cours d'un processus de traitement des eaux usées synthétiques en continu à HRT 1 jour. Au cours decette étude, l'opacité du biofilm développé sur les disques rotatifs a été évaluée et corrélée aux taux d'élimination des polluants. L'accumulation des couches de biofilms multitrophiques pourra justifier ainsi l'abondance des microalgues et des bactéries dans le réacteur pendant le traitement. Les résultats obtenus etprésentés lors d'une communication orale au congrès international aux USA, Miami "**7th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, Algae Research**", et ont été comparés aux travaux de recherche menés sur les biofilms classiques afin de montrer l'effet des associations symbiotiques sur l'évolution debiofilm.

Par conséquent, ce procédé photosynthétique représente une stratégie durable d'élimination des polluants organiques et minéraux, basée sur les interactions symbiotiques entre les microalgues et les bactéries.

IV.2. Traitement des eaux usées dans un réacteur à disques rotatifs à base de microalgues-bactéries flocs

Short Communication (II): Multitrophic rotating biofilm contactor with microalgae bacterial-flocs for pollution removal without O_2 supply (and/or) CO_2 release

Olfa Beji[a,b], Nouceiba Adouani[a], Souhila Poncin[a], Marie-Noëlle Pons[a], Moktar Hamdi[b], Huai Z. Li[a*]

[a]Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

[b]Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

*Corresponding author:

Pr. Huai Zhi LI

huai-zhi.li@univ-lorraine.fr

Abstract

Multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC) technology represents a way of sustainable wastewater treatment using microalgae-bacterial flocs that can contribute to limiting the climate change by the biosequestration of CO_2. MRBC was designed to study the attachment-detachment phenomena of biofilms after batch and continuous wastewater treatment at 1 day of HRT. During continuous mode, the opacity evolution indicated a stationary phase from day 36 corresponding to stable and mature biofilm, before a slight biofilm detachment at day 57. In the same period, ammonium, phosphorous and COD removal rates of 82 %, 76 % and 83 %, respectively have confirmed the best biofilm accumulation and justified the autotrophic dominance within MRBC, compared to batch test. Thus, in accordance to literature, the algae–bacterial biofilm is less sensitive to rotating velocity and supports nutrient removals from wastewater. Future research should investigate the dimensioning of an up-scaled MRBC for a post-treatment of a real wastewater.

Keywords: Multitrophic rotating biofilm contactor, opacity evolution, microalgae bacterial-flocs, sustainable wastewater treatment, climate change.

1. Introduction

It is currently admitted that classical wastewater treatment processes release CO_2 as a greenhouse gas (GHG) and then contribute to climate change (Dahalan et al., 2015). In this regard, various biological strategies using photosynthetic biomass have been applied as a sustainable way to reduce CO_2 emissions (Yadav et al., 2017) from wastewater treatment. The earliest algal–bacterial system was operated into high rate algal ponds (HRAPs) since 1950s (Ramanan et al., 2016) for nutrients treatment with the exchange of O_2 and CO_2. Thus this symbiosis technology provides a solution to GHG mitigation technologies, through the CO_2 biosequestration (Yadav et al., 2017). The multitrophic interaction between microalgae and heterotrophic bacteria is sustained by the production of O_2 by microalgae in the presence of light and CO_2 (Muñoz and Guieysse, 2006). This symbiosis connection is often required by heterotrophic bacteria to oxidize the organic pollutants present in the wastewater and to produce in return CO_2 essential for microalgae photosynthesis (Unnithan et al., 2014). Hence, algae-associated bacterial populations may play critical roles in algal adaption and survival by using trophic connections. Moreover, bacteria grow well in algal flocs and may be beneficial by either decomposing organic material or producing secondary metabolites which will become nutrients for the algal organisms during respiration (Grotkjær et al., 2016). In return, algae facilitate bacterial growth through direct nutrients exchange by providing organic compounds released during photosynthesis (Unnithan et al., 2014).One of the limitations in the application of multitrophic microalgae–bacterial systems is a cost-effective separation of the biomass from the treated wastewater (Posadas et al., 2014). In this context, it has been suggested by Babu et al. (2010) that phototrophic biofilms systems based on the symbiosis growth of microalgae-bacteria attached on surfaces, could be a solution for wastewater treatment. The use of multitrophic biofilms in wastewater treatment processes and their potential for algal biomass retention can play a significant role to reduce the harvesting costs and to improve the nutrient removal efficiency (Posadas et al., 2013). The present investigation deals with the incorporation of microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) culture into multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC), consisting of a series of Plexiglas (methyl methacrylate) discs covered with an active symbiotic film and partially submerged in a synthetic wastewater medium. A similar process using an open algal–bacterial photobioreactor has demonstrated high nitrogen NH_4^+ (75 %) and phosphorus PO_4^{3-} (80 %) removal capacities at 10 days of HRT, unlike bacterial biofilms (Posadas et al., 2013). Thus, it

was confirmed that a microalgal–bacterial biofilm can develop on wastewater and remove organic compounds without any external O_2 or CO_2 supply (Boelee et al., 2014b). The aim of this study is to compare the batch and the continuous-flow modes at a short hydraulic retention time (HRT) of 1 day without O_2 supply and CO_2 release. Hence, the main objectives are to assess the organic compounds and nutrients (NH_4^+ and PO_4^{3-}) removal capacities and the simultaneous production of the microalgae-bacterial biofilms. The functionality associated with this complex ecosystem will be critically derived from the synergistic activities of its microbial communities, which in return will be affected by the induced trophic status of the same system (Unnithan et al., 2014).

The MaB-flocs abundance, as well as the photosynthetic efficiency of the multitrophic biofilm process as a post-treatment system, were studied in order to reduce the emission of CO_2 to the environment. The aim of the present work is to study the behavior of multitrophic biofilm and its feasibility for wastewater treatment during 57 days without O_2 supply and CO_2 release.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental setup and operation

A lab-scale multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC) with a tank volume of 2.5 L was used (Figure 1). Six plexiglass discs with diameter of 10 cm were placed on the axle and separated by rubber spacers of 1cm. Five equally spaced concentric grooves (2x2 mm) have been engraved on each disc to facilitate the biofilm attachment (Alnnasouri et al., 2011a). The discs were rotated at a low velocity of 10 rotations per minute (rpm) and the waterline was situated at 40% of the disc radius. Inoculation was carried out in batch mode under anaerobic conditions by mixing 800 mL of the Microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) pre-culture prepared previously (see section II). MaB-flocs with 3.76 g of total suspended solids (TSS) L^{-1}, 2.35 g of volatile suspended solids (VSS).L^{-1} and 4.58 mg of Chlorophyll (a).g^{-1} (VSS) were mixed with the synthetic municipal wastewater (SMW) whose composition is reported on Table 1 (Dahalan et al., 2015). Anaerobic conditions were created by flushing nitrogen at the bottom of the tank during 15 min to reach a concentration of 0.29 mg O_2.L^{-1}. The inoculated mixture with an initial pH of 7.33 was suspended with an internal liquid recirculation rate of 28.23 mL.min^{-1}.

After 7 days of batch pre-culture of MaB-flocs, the re-circulation of the liquid at the bottom of the reactor was stopped and the MRBC was fed with synthetic wastewater. The feeding flow rate was maintained at 2.5 $L.day^{-1}$ during the experiment with a concentration of 500 $mgCOD.d^{-1}$ and a COD/N ratio of 8.3. The MRBC was illuminated using two fluorescent lamps with a light power of 1050 lm each (18W, Philips, France) under light: dark cycles of 16/8 hours. The temperature of the system was maintained between 21°C and 22°C during the treatment. Every two days, maintenance consisting of cleaning the reactor walls and bottom was performed to avoid biofilm accumulation.

2.2. Nutrient removal analysis

Samples were taken from the effluent tank every 24 hours during the experimentation and filtered through a 0.45 µm filter (Millex-LCR, Merck Millipore, USA). Chemical Oxygen Demand (COD), $N\text{-}NH_4^+$ and $P\text{-}PO_4^{3-}$were analyzed using HACH (51996-2000) method, Nessler method and phosphate reagent for 10mL sample (Hach-Lange GmbH, Germany), respectively, on a HACH DR 2000 spectrophotometer, USA. pH was measured using a pH meter (Mettler Toledo M300a, USA).

2.3. Biomass growth analysis

MaB-flocs biomass was collected from the medium of the MRBC and was analyzed for TSS ($g.L^{-1}$), VSS ($g.L^{-1}$) and Chlorophyll (a) concentration (mg Chl(a).g^{-1} VSS). Chlorophyll(a) was extracted (Eq 1.) using a solution of methanol (2 M) and its total concentration was determined using UV–Vis spectrophotometer (UV–Vis 2550, Shimadzu, Japan) at 652nm and 665nm (Porra et al., 1989):

$$\text{Chlorophyll(a)}\ (mg.L^{-1}) = 16.29\ A_{665} - 8.54\ A_{652} \quad (1)$$

The autotrophic index (mg VSS.mg^{-1}Chl (a)) was calculated according to APHA (1985) in order to determine the microorganism domination. Microscopic observations of MaB-flocs morphology were performed by using LEITZ Dialux 20 (Leica, Germany) microscope (X10 and X40) connected to a monitor (Sony, Japan) color camera (3CCD) using Visilog 6.3 software (Thermo Fisher Scientific, France). Then, light microscopy images were analyzed in order to observe the microalgae communities present into the samples.

2.4. Image acquisition and analysis: Opacity measurement

Biofilm growth on the discs was monitored by scanning the discs every four days using an Epson Perfection 4490 (Epson, Nagano, Japan)flatbed scanner. This operation takes less than one minute. The parameters were set to 24-bits (RGB) color image with a resolution of 800 dpi. The images were saved in TIFF format and analyzed by an in-house program developed in Fortran (Pons et al., 2009). The red channel was used for the analysis. The biofilm occupies a ring-shape zone on the disc, which is first mapped into a rectangular image (1024 x 720). The opacity is the difference between the average red level at any time and the average red level at t=0 and is used to estimate the amount ofbiomass.

3. Results and Discussions

3.1. Performance of rotating biological contactor (RBC) for wastewater treatment

3.1.1. MaB-flocs characterization into the MRBC medium

MaB-flocs biomass within the MRBC tank was analyzed in order to understand the effect of the inoculums on the biofilm development. Batch pre-culture revealed the increase of TSS and VSS values up to 13.44 $g.L^{-1}$ and 9.02$g.L^{-1}$, respectively, after 7 days under light/dark (16/8h) cycles. The mean Chl(a) was reduced from 4.58 ± 0.1 mg Chl(a).g^{-1} VSS to reach 0.65 ± 0.2 mg Chl(a).g^{-1} VSS at day 7 (Table 2). This decrease could be explained by the intolerance of photosynthetic micro-organisms to the moderate toxicity of the chemical substrates release from wastewater and the lack of nutrients (Van Den Hende et al., 2014), which affect the biofilm growth (see section 3.1.4).

During continuous operation, a global identification of the main microalgae species was done using microscopic analysis with 40X magnification (Figure 2.a and Figure 2.b), based on the algal key and previous works (Bellinger et al., 2015). This observation has shown the domination of several populations of Diatoms (*Diatoma* sp., *Nitzschia* sp., *Navicula* sp.), green algae (*Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp.) and Cyanobacteria (*Klebsormidium* sp., *Pseudanabaena* sp., *Phormidium* sp.) at days 29 and 33 (Figure 2.a and Figure 2.b).

Thus, the variation of microalgae communities was confirmed through the autotrophic colonization of the biofilm surface obtained in this study (see section 3.1.4).

3.1.2. Removal of organic carbon COD in batch and continuous operation

The first step of batch reaction has shown the increase of dissolved oxygen of about 6.26 $mg.L^{-1}$ which promotes the reduction of organic compounds from initial concentration of 504 $mg\ COD.L^{-1}$ down to 73.5 ± 3.7 $mgCOD.L^{-1}$ with a COD removal rate of 85.4 ± 0.7 % (Figure 3). This observation could be explained by the photosynthetic contribution of oxygen which is essential for the heterotrophic bacteria for the organic matter biodegradation. It has also been suggested that the biomass algal could contribute as a source of dissolved carbon organic (COD) which is essential for heterotrophic bacteria assimilation depending on their COD affinity and the kinetic of their growth (Takemura et al., 2014). Afterwards, during 26 days of continuous mode at HRT of 1 day, the concentration of total organic compounds decreased and stabilized at about 132 ± 6.4 $mg.L^{-1}$ corresponding to 74 ± 1.3 % COD removal rate (Figure 4). Besides, the most important decreasing of total COD concentration was obtained between 29 days and 57 days. Hence, the highest COD removal rate achieved 82.5 ± 0.7 % on day 57 of continuous wastewater treatment (Figure 3) which is similar to the test in batch.

3.1.3. Removal of ammonium and phosphorus in batch and continuous operation

During the seven days of batch operation without O_2 supply, the total $N\text{-}NH_4^+$ and $P\text{-}PO_4^{3-}$ concentrations were gradually decreased down to 34.8 ± 0.25 $mg.L^{-1}$ and 7.5 ± 0.7 $mg.L^{-1}$, respectively corresponding to ammonium and phosphorus removal rates of 47.2 ± 0.4% and 77.2 ± 2.1 %, respectively (Figure 4). No significant variation of pH values was detected during the batch pre-culture in the MRBC. Su et al. (2016) have shown high nitrogen ($N\text{-}NH_4^+$) and phosphorus ($P\text{-}PO_4^{3-}$) removal efficiencies of 42.95 ± 5.11 % and 97.97 ± 1.12 %, respectively, into a reactor wall attached biofilm. While low removal efficiencies of nitrogen and phosphorus of 38.06 ± 5.80 % and 83.14 ± 8.16 %, respectively, have been observed in the reactor without biofilm (Su et al., 2016). This result confirmed the performance of attached and multitrophic system for ammonium and phosphorus removals. As reported by Liang et al. (2013), a co-culture of *C. vulgaris* and *B. licheniformis* has shown a higher ammonium (NH_4^+) and TP removal of 78 % and 92 %, respectively, after six days of treatment, which were 2.7 and 1.6 times higher than the algae system alone.During the continuous wastewater treatment a slight reduction of ammonium removal rate was observed until obtaining a stabilization after 26 days at about 28.5 ± 0.4 % (Figure 4). Afterwards, a significant decrease of total $N\text{-}NH_4^+$ concentration was obtained from 29 days. At the end of the continuous operation, the MRBC at a flow rate of 2500 $mL.day^{-1}$ has shown an

ammonium removal rate of 82 ± 0.5 % after 50 days (Figure 4). This ammonium efficiencyis higher than the 57 % of N-NH_4^+ removal rate which is obtained through the algal rotating disks working at a flow rate of 2400 mL.day^{-1} (Przytocka-Jusiak et al., 1984). In this work a spontaneous inoculum of MaB-flocs cultivated naturally from sludge, without algae supply, registered a high NH_4^+ removal rate of 82%.Although, a symbiosis interaction between filamentous blue-green algae and activated sludge with a ratio of 5:1 reaches about 99 % of NH_4^+ removal efficiency with an initial concentration of N-NH_4^+ (39.4 mg.L^{-1})(Su et al., 2012). The symbiotic development of a microalgae–bacterial biofilm reactor suggested that about 70 % of nitrogen removal could be obtained via heterotrophic bacteria capacities of nitrification and denitrification with light supply (Boelee et al., 2014a) while 30 % of NH_4^+ could be mainly assimilated by microalgae with light supply (Boelee et al., 2012). The total N-NH_4^+ concentration was completely depleted throughout the continuous operation compared to the batch experiment,under 16/8h light cycle, by algae assimilation. During this experiment, a slight increase of pH value up to 7.5 occurred after 26 days owing to microalgae growth and CO_2 sequestration. According to Gutzeit et al. (2005), the pH value did not exceed 7.6 within the algae-bacteria aggregates according to the symbiotic interactions between *Chlorella vulgaris* (Strain Hamburg) and activated sludge. On the other hand, during the first eight days of continuous treatment, the total P-PO_4^{3-} concentration decreased slightly from 32.8 mg.L^{-1} to 29.1 ± 0.4 mg.L^{-1} to obtain a low phosphorus removal rate of 11.4 ± 1.4 %. Hereafter, the phosphorus concentration considerably decreased for 19 days to attain maximum phosphorus removal rate of 76.04 ± 2.6 % at day 47 of wastewater treatment (Figure 4). Hence, a better phosphorus removal was recorded by assimilation into algae-bacterial biofilm than in bacterial biofilm (Boelee et al., 2014b). The above results indicated that the highest phosphorus removal performance at day 47 of continuous treatment was similar to that obtained after seven days of batch experiment. In this context, the phosphorus removal could be maintained by both adsorption and photosynthesis mechanisms of algae. Unlike algae, bacteria removed phosphorus essentially by over-intake (Shi et al., 2004). At the end of the experiment, phosphorus and ammonium removal rates were suddenly reduced to 18.63 ± 0.7 % and 38.03 ± 0.7 %, respectively after 57 days of rotating disk operation. This result was explained by the opacity evolution discussed in section 3.1.4. The main conclusion of this study was the highest performance of MRBC in terms of nutrients and organic compounds removal during continuous wastewater treatment at a HRT of one day unlike the batch operation. In addition, a similar study into Rotating Algal Biofilm Reactor (RABR) has

demonstrated the influence of different HRTs on nutrients removals with a higher nitrogen removal in 2 days HRT and a best phosphorus removal in 6 days HRT (Shayan et al., 2016). Moreover, continuous treatment at a short HRT of 1 day reports a significant ammonium, phosphorous and COD removal rates of about 82 %, 76 % and 83 %, respectively, whereas other researches obtained better organic carbon (89 ± 2 %), nitrogen NH_4^+ (92 ± 5 %) and phosphorus PO_4^{3-} (96 ± 2 %) removal rates, in the open biofilm photobioreactor at a HRT of 10 days (Posadas et al., 2014). Furthermore, the performance of MRBC processwas obtained at the C/N ratio of 8.3 with a high COD removal rate of 83 %. In another study Mannina et al. (2017) argued the effect of higher C/N ratio of 10 in sludge-MBR performance with an excellent total COD_T removal (98 %). Therefore, these results confirmed the influence of the wastewater C/N ratio on the MRBC performance in terms of organic carbon, ammonium and phosphorus removals.

3.1.4. Opacity and biofilm thickness growth

The scanned images of discs have shown the biofilm development, characterized by distinct stages consisting of attachment, maturation, and detachment (Figure 5). A global observation of the biofilm after batch operation, shows that the grooves on discs surface were completely covered with thin and light green layers, corresponding to the phototrophic pre-mature biofilm (Figure 5.a). After seven days of batch pre-culture, a stable biofilm (Figure 5.b and Figure 5.c) was maintained during continuous treatment. As reported by Gross et al. (2015), the phenomena of algal attachment depends on the physiochemical properties of the material and the surface roughness. The scratched surfaces containing zones with low shear stress enhance strongly the bacteria attachment better than flat surfaces on which a thin biofilm is formed (Alnnasouri et al., 2011b). The stability of the biofilm structure proves the robustness of the treatment which depends on the operating mode. The evolution of biofilm was influenced by the microbial communities cohabiting the reactor (section 3.1.1), the presence of ionic forces, the hydrodynamic conditions (Hamdi, 1995) and the nutrients availability from the surrounding aqueous medium (Donian et al., 2002). Thus, microscopic analysis (section 3.1.1) gives an idea of algae populations able to colonize the surface of disks and affect the biofilm growth kinetics during the continuous operation more than during the batch test. This observation suggested that the first colonization of the phototrophic biofilm could be with unicellular and small colonial green algae like *Chlorella* (Sekar et al., 2002). Following, a late colonization covered the biofilm with slow growing communities of

cyanobacteria (*Pseudanabaena*), diatom (*Nitzschia*), and green microalgae (*Scenedesmus*) (Boellee et al., 2014b). Otherwise, at day 57, a slight biofilm detachment (Figure 5.d) was observed on disc 1. This occurred due to several factors such as environmental change, oxygen availability and the most common depletion in nutrients (Cohn, 2010). In this case, the biofilm detachment leads to the loss of biomass and thus to a fall of the yields of elimination of $N\text{-}NH_4^+$ and $P\text{-}PO_4^{3-}$ (section 3.1.3). As has been shown by Alnnasouri et al. (2011a), the loss of large portions of biofilm via detachment and sloughing at day 57 induced the increase of NH_4^+ concentration in the reactor. Hence, the detachment of biofilm from the discs increases at high disc rotation speed because of the increase of the shear force and withdisc speed (Griffin et al., 2000). The opacity evolution (Figure 6) shows that the first step of the MRBC treatment was characterized by a rapid increase of the biofilm opacity from day 0 to day 7 for all discs. During this initial growth phase (seven days), the opacity increased more on disc 1, due to its position on the rotatif axle, to achieve the highest value of 59.76 ± 23.27, than on disc 3 which shows a low opacity value of 24.6 ± 25.73 (Figure 6). After this period, the opacity evolved on disks 2, 3 and 4 in a similar manner during a continuous treatment, except for disc 1 where the development was higher. All discs opacities continued to increase from day 11 but at a slightly slower rate than for disc 1. Besides, the opacity stabilized from day 36 until day 57 corresponding to a stationary phase (Figure 6). Thus, disc 1 resumed its accumulation of biofilm for reaching a best increase in opacity of 135.8 which was observed on day 57 with a standard deviation equal to 22.58 (Figure 6). According to the studies (Alnnasouri et al., 2011a) using the same biofilm reactor (RBC), the increase of the biofilm opacity on rough discs was continued until day 60, followed by a biofilm detachment only at the end of the experiment.

During the stationary phase between days 36 and 57, the standard deviation increases to indicate the heterogeneity of the macrostructure biofilm. Although, the grey level distribution explained the heterogeneity of biofilm. This distribution constitutes two cases: the lightest grey levels which correspond to holes within biofilm, while the darkest grey levels indicate the biofilm folding (Alnnasouri et al., 2011a). In terms of nutrients, the most important increase of ammonium and phosphorus removal rates occurs during the stationary phase from day 36 (section 3.1.3). Others studies have demonstrated by using bacteria RBC, that the ammonia levels decreased from a maximum of 36.02 mg $N.L^{-1}$ on day 23 to 0.18 mg $N.L^{-1}$ on day 35 depending on the time progression and the biofilm development (Cohn, 2010). In conclusion, a continuous wastewater treatment using low HRT (1 day) has shown a biofilm

growth inoculated with natural MaB-flocs better than during the batch operation (seven days), because it favors the enrichment of the reactor with nutrients.

4. Conclusion

This study focuses on the valorization of natural MaB-flocs obtained from a wastewater sludge within MRBC without O_2 supply and CO_2 release. The obtained data emphasize the influence of the highest COD (83 %), ammonium (82 %) and phosphorus (76 %) removal rates and microalgae communities'abundance (diatoms and cyanobacteria) on the biofilm development, during continuous treatment compared to the batch operation. Thus, the opacity evolution of the biofilm confirms a continuous increase until 57 days, corresponding to a stable biofilm attachment as reported in previous studies. This work allows to prepare multitrophic biomass of MaB-flocs, in more efficient conditions, as a feedstock for anaerobic digestion.

352 **References**

353 Alnnasouri, M., Dagot, C., Pons, M. N. (2011a).Comparison of four methods to assess
354 biofilm development. *Water Science and Technology*, 63, 432-439.

355 Alnnasouri, M., Lemaitre, C., Gentric, C., Dagot, C., Pons, M. N. (2011b). .Influence of
356 surface topography on biofilm development: Experiment and modeling. *Biochemical*
357 *Engineering Journal,*57, 38-45.

358 APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edn.
359 Washington, DC: *American Public Health Association*. p. 1268.

360 Babu, M. A., Hes, E. M. A., Van Der Steen, N. P., Hooijmans, C. M., Gijzen, H. J.(2010).
361 Nitrification rates of algal–bacterial biofilms in wastewater stabilization ponds under light and
362 dark conditions. *Ecology Engineering*, 36, 1741-1746.

363 Bellinger, E.G., Sigee, D.C. (2015). Freshwater Algae: Identification and Use as
364 Bioindicators. *John Wiley and Sons*.
365
366 Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., Wijffels, R. H. (2011).Nitrogen
367 and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal
368 biofilms. *Water Research.* 45, 5925-5933.
369
370 Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J., Wijffels, R. H. (2012).Scenario
371 analysis of nutrient removal from municipal wastewater by microalgal biofilms. *Water*,4, 460-
372 473.
373
374 Boelee, N. C., Janssen, M., Temmink, H., Taparavičiūtė, L., Khiewwijit, R., Jánoska, Á.,
375 Wijffels, R. H. (2014a). The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal
376 in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing. *Journal Applied Phycology*, 26, 1439-
377 1452.

378 Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., Wijffels, R. H. (2014b).
379 Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors
380 treating synthetic municipal wastewater. *Ecology Engineering*, 64, 213-221.

Cohn, S., Hayes, A., Renault, K. (2010).The Effect of Substrate Variation on Biofilm Growth for Use in Wastewater Treatment. *Degree of Bachelor of Science*.

Dahalan, F. A., Najib, M. Z. M., Salim, M. R., Ujang, Z. (2015). Characteristics of developed granules containing phototrophic aerobic bacteria for minimizing carbon dioxide emission. *International Biodeteration and Biodegradation*, 102, 15-23.

Donian, R.M.(2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg. Infect. Disea. 8, 881.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 52, 9-18.

Griffin, P., Findlay, G. E. (2000). Process and engineering improvements to rotating biological contactor design. *Water Science and Technology, 41*, 137-144.

Gross, M., Jarboe, D., Wen, Z.Y. (2015). Biofilm-based algal cultivation systems. *Applied Microbiology Biotechnology*, 99, 5781–5789

Grotkjær, T., Bentzon-Tilia, M., D'Alvise, P., Dierckens, K., Bossier, P., Gram, L. (2016).Phaeobacterinhibens as probiotic bacteria in non-axenic Artemia and algae cultures. *Aquaculture*, 462, 64-69.

Hamdi, M. (1995). Biofilm thickness effect on the diffusion limitation in the bioprocess reaction.biofloc critical diameter significance. *Bioprocess Engineering*, 12, 173 –179.

Hamdi, M. (2016).Lessons from rhizosphere and gastrointestinal ecosystems for inventive design of sustainable wastes recycling bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*,105, 62-70.

Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015).Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.

Kesaano, M., Sims, R. C. (2014). Algal biofilm based technology for wastewater treatment. *Algal Research*, 5, 231-240.

412 Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F., Wong, M. (2013). Efficiency assessment
413 and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of
414 Chlorella vulgaris and Bacillus licheniformis. *Chemosphere*, 92, 1383-1389.
415
416 Mannina, G., Ekama, G. A., Capodici, M., Cosenza, A., Di Trapani, D., Ødegaard, H. (2017).
417 Moving bed membrane bioreactors for carbon and nutrient removal: The effect of C/N
418 variation. *Biochemical Engineeering Journal*, 125, 31-40.

419 Muñoz, R., Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment ofhazardous
420 contaminants: a review. *Water Research*, 40, 2799–2815.

421 Pons M.N., Milferstedt K., Morgenroth E. (2009). Biofilm monitoring on rotating discs by
422 image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 105-116.
423
424 Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate
425 extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted
426 with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by
427 atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *975*,
428 384-394.
429
430 Posadas, E., García-Encina, P. A., Domínguez, A., Díaz, I., Becares, E., Blanco, S., Munoz,
431 R. (2014).Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and
432 nutrient removal from domestic wastewater. *Ecology Engineering*, 67, 156-164.
433
434 Posadas, E., García-Encina, P. A., Soltau, A., Domínguez, A., Díaz, I., Muñoz, R.
435 (2013).Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal–
436 bacterial biofilm bioreactors. *Bioresource Technology*, 139, 50-58.
437
438 Przytocka-Jusiak, M., Baszczyk, M., Kosińska, E., Bisz-Konarzewska, A. (1984). Removal of
439 nitrogen from industrial wastewaters with the use of algal rotating disks and denitrification
440 packed bed reactor. *Water Research*, 18, 1077-1082.
441
442 Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. (2016). Algae–bacteria
443 interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechology advance*, 34, 14-29.

Sekar, R., Nair, K. V. K., Rao, V. N. R., Venugopalan, V. P. (2002). Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology*, 47, 1893-1907.

Shayan, S. I., Agblevor, F. A., Bertin, L., Sims, R. C. (2016). Hydraulic retention time effects on wastewater nutrient removal and bioproduct production via rotating algal biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 211, 527-5330.

Shi, X.L., Yang, L.Y., Wang, F.P., Xiao, L., Jiang, L.J., Kong, Z.M., Gao, G., Qin, B.Q. (2004). Growth and phosphate uptake kinetics of Microcystis aeruginosa under various environmental conditions. *Journal of Environmental Science*, 16, 288–292.

Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*. 45, 3351-3358.

Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource Technology*, 105, 67–73.

Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2016). The long-term effects of wall attached microalgal biofilm on algae-based wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 218, 1249-1252.

Takemura A.F., Chien D.M., Polz M.F. (2014). Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiology*, 5, 38.

Unnithan, V., Unc, A., Smith, G. B. (2014). Mini-review: a priori considerations for bacteria–algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. *Algal Research*, 4, 35-40.

Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Desmet, S., Boon, N., 2011a. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnology*, 29, 23-31.

Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Saveyn, H., Maes, G., Boon, N.(2011b). Microalgal bacterial floc properties are improved by a balanced inorganic/organic carbon ratio. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 549-558.

Van Den Hende, S., Carré, E., Cocaud, E., Beelen, V., Boon, N., Vervaeren, H. (2014).Treatment of industrial wastewaters by microalgal bacterial flocs in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 161, 245-254.

Yadav, G., Sen, R. (2017). Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological advances in climate research. *Journal of CO_2 Utilization*,17, 188-206.

Figure captions:

Figure 1. Wastewater treatment within the multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC)

Figure 2. Light microscopy images of microalgae species (40X) at day 29 (b) and at day 33 (a). (1-*Bracteacoccu*s sp., 2-*Chlamydomonas*. sp., 3-*Klebsormidium* sp., 4-*Nitzschia* sp., 5-*Phormidium* sp.,6-*Pseudanabaena* sp.,7-*Chlorella* sp., 8-Navicula sp.,9-*Diatoma* sp.). Depicted scale bars measure 10µm in length.

Figure 3. Variation of COD concentration ($mg.L^{-1}$) and removal rate (%) during batch and continuous wastewater treatment into MRBC.

Figure 4. Variation of ammonium ($N\text{-}NH_4^+$) and phosphorus ($P\text{-}PO_4^{3-}$) removal rates (%) during batch and continuous wastewater treatment into MRBC.

Figure 5. Scanned images (TIFF format) from biofilm of disc 1 on day 7(a), day 26(b), day 40 (c), and day 57(d), respectively during the batch and continuous wastewater treatment.

Figure 6. Biofilm growth over time on discs 1 through 4 during batch and continuous operations.

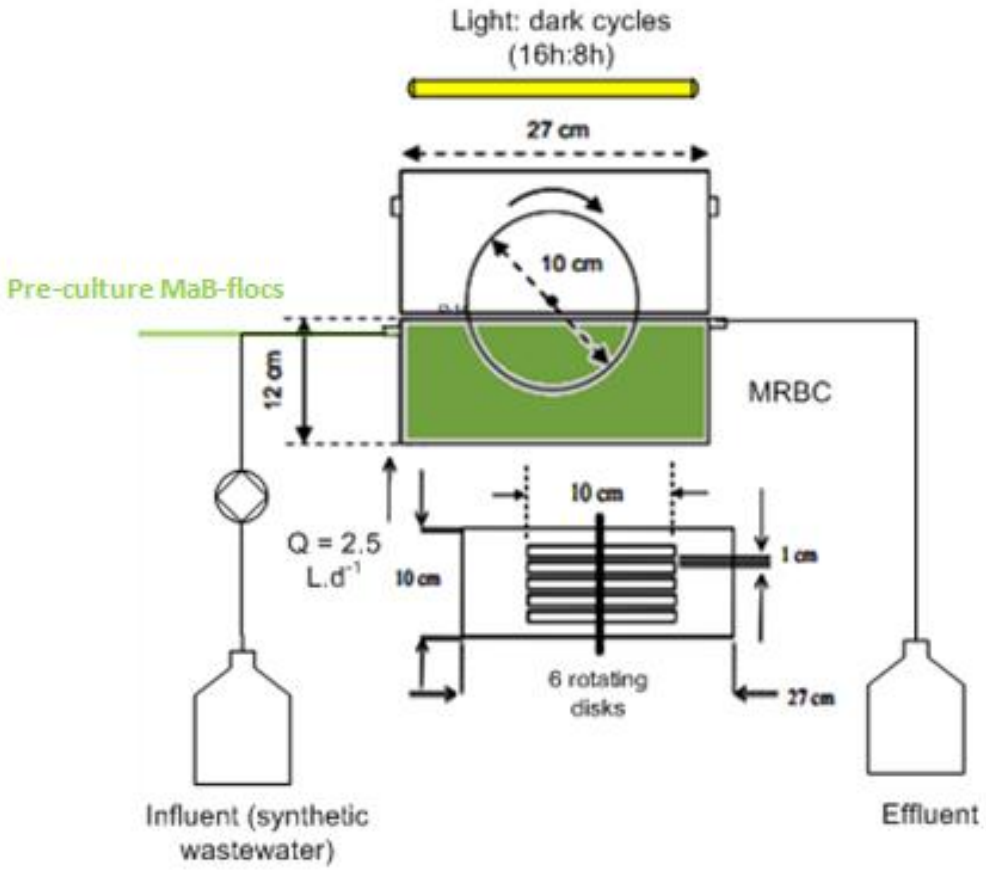
Tables

Table 1. Composition of the urban synthetic wastewater

Table 2. MaB-flocs biomass characteristics after batch pre-culture

522 **Figure 1.**

523



524

525

526

527

528

529

530

531

532

Figure 2.

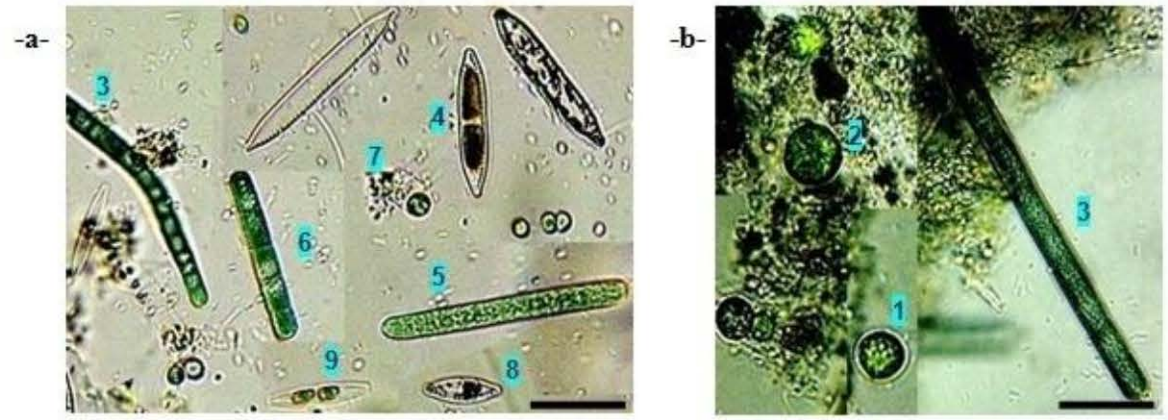


Figure 3.

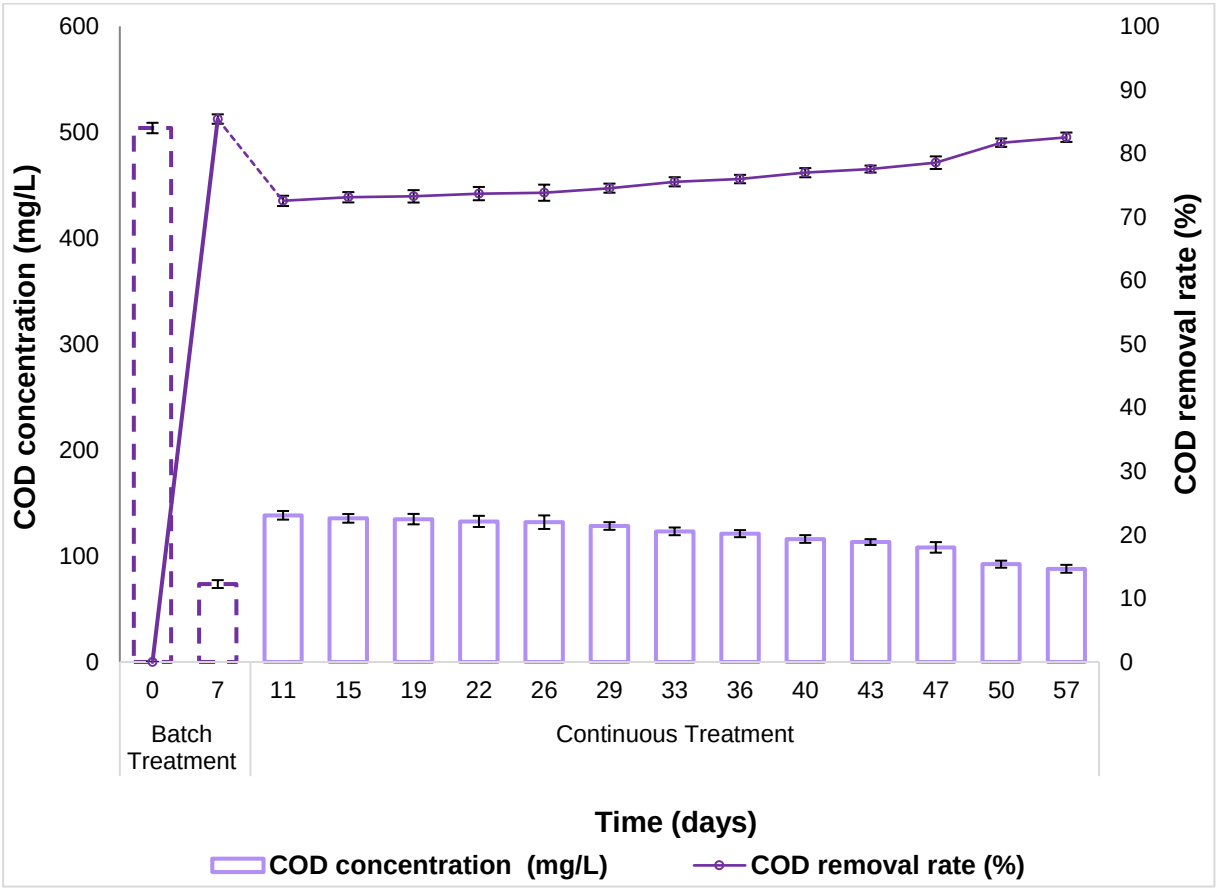
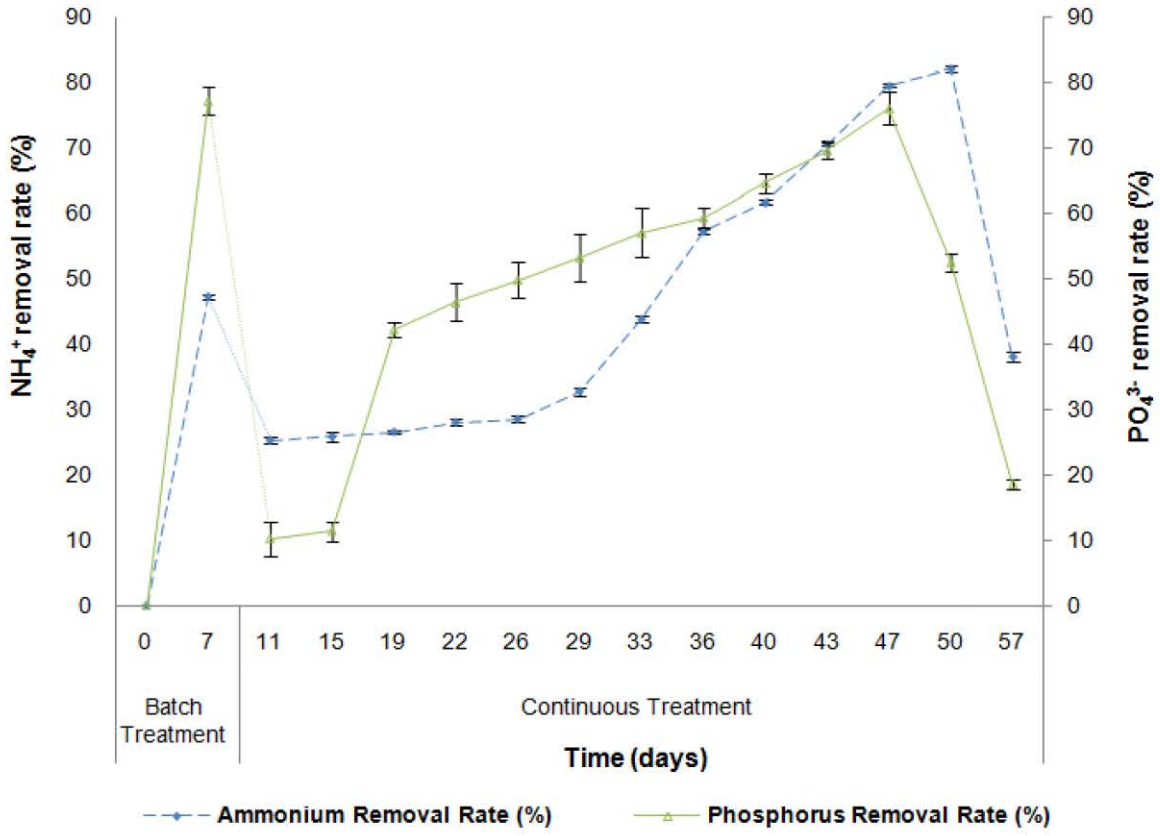
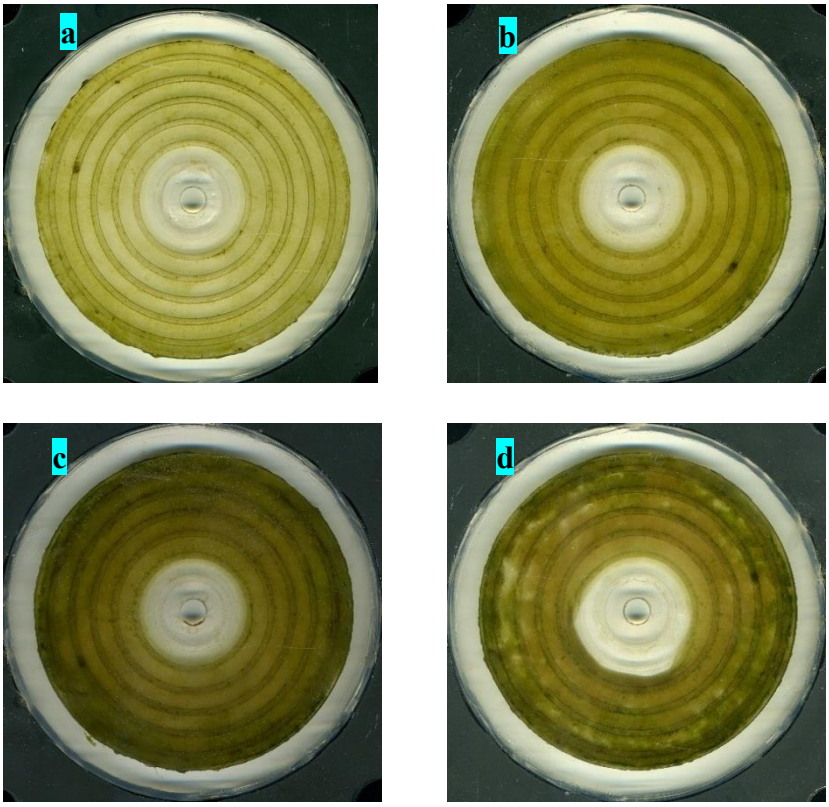

600
500
400
300
200
100
0
COD concentration (mg/L)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
COD removal rate (%)
0
7
11
15
19
22
26
29
33
36
40
43
47
50
57
Batch Treatment
Continuous Treatment
Time (days)
COD concentration (mg/L)
COD removal rate (%)

Figure 4.


NH_4^+ removal rate (%)
PO_4^{3-} removal rate (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0
7
11
15
19
22
26
29
33
36
40
43
47
50
57
Batch Treatment
Continuous Treatment
Time (days)
Ammonium Removal Rate (%)
Phosphorus Removal Rate (%)

582 **Figure 5.**

583



584

585

586

587

588

589

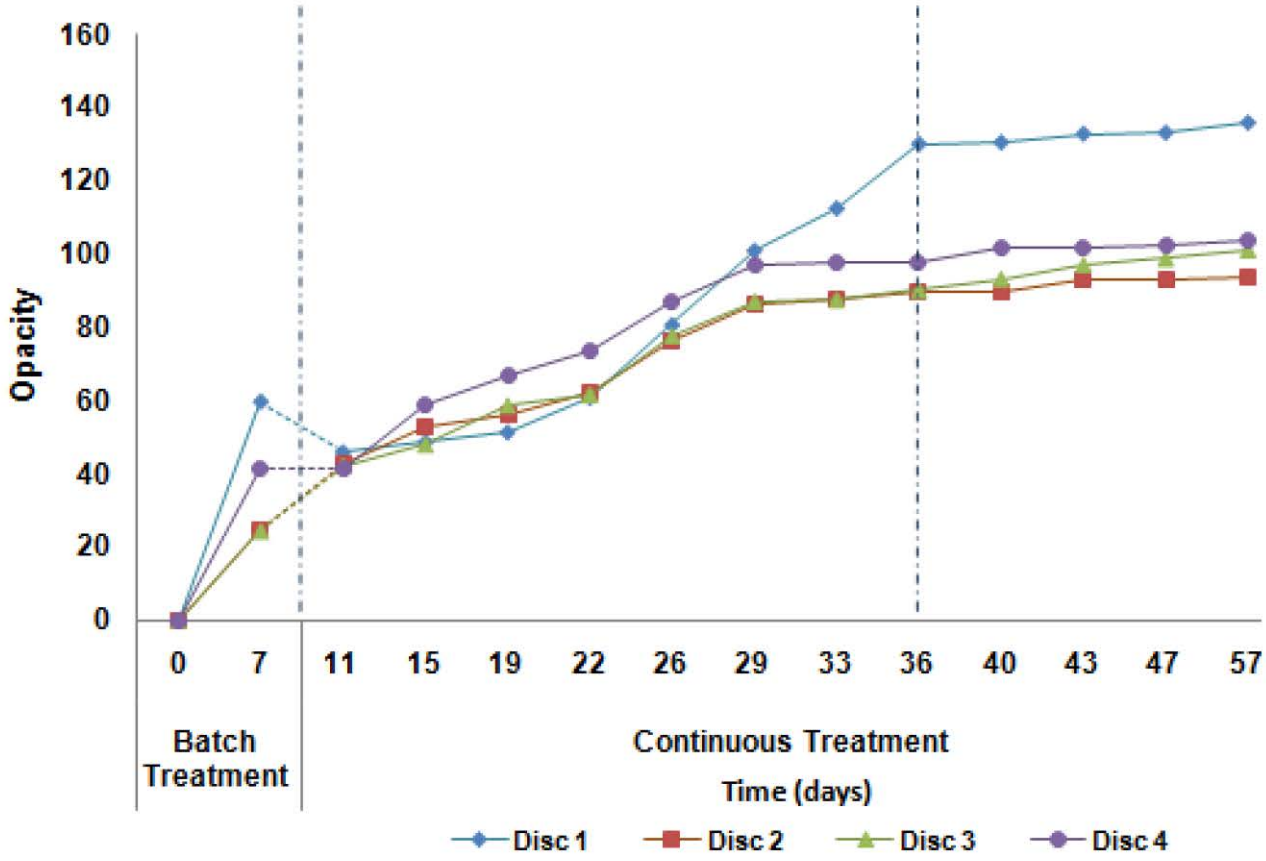
590

591

592

593

Figure 6.


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Opacity
0
7
11
15
19
22
26
29
33
36
40
43
47
57
Batch Treatment
Continuous Treatment
Time (days)
Disc 1
Disc 2
Disc 3
Disc 4

606 **Tables:**

607 **Table 1.**

608

Composant		Concentration	
Medium organic (O)(1L)	Glucose	600mg COD.L^{-1}	50%=298.4 mgL.$^{-1}$
	Acetate		50%=603.26 mg.L^{-1}
Medium nutrient (N)(1L)	NH_4Cl	239 mg.L^{-1}	
	$CaCl_2.2H_2O$	45.9 mg.L^{-1}	
	$MgSO_4.7H_2O$	46.2 mg.L^{-1}	
	$Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$	26.5 mg.L^{-1}	
	K_2HPO_4	70.3 mg.L^{-1}	
Trace elements (10 mL.L^{-1})	EDTA.$2H_2O$	4.78 mg.L^{-1}	
	$FeCl_3$	2.38 mg.L^{-1}	
	$CuSO_4.5H_2O$	1.25 10^{-2} mg.L^{-1}	
	$ZnSO_4.7H_2O$	2.75 10^{-2} mg.L^{-1}	
	$CoCl_2.6H_2O$	12.5 10^{-3} mg.L^{-1}	
	$MnCl_2.2H_2O$	0.184 mg.L^{-1}	
	H_3NO_3	1.25 mg.L^{-1}	

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619 **Table 2.**

620

Biomass Characteristics Unit		**TSS** g TSS.L^{-1}	**VSS** g VSS.L^{-1}	**VSS/TSS** **%**	**Chl (a)** mgChl (a).g^{-1} VSS
Batch pre-culture	T_0	3.76	2.35	62.5	4.58 ± 0.1
	T_{7days}	13.44	9.02	67.08	0.65 ± 0.2

IV.3. Conclusion générale

Cette étude consiste à valoriser les flocs microalgues-bactéries (flocs-MaB) sous forme de biofilms comme une approche innovante du traitement des eaux usées dans un réacteur MRBC sans rejet de CO_2. Nos données ont souligné l'influence de la disponibilité en DCO et en nutriments (N, P) et l'abondance des communautés d'algues sur les capacités d'absorption des nutriments par les biofilms multitrophiques. À la fin du traitement en continu, les taux d'élimination étaient les plus élevés pour la DCO (83 %), l'ammonium (82 %) et le phosphore (76 %). En outre, en utilisant une analyse microscopique et en comparant nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons constaté que la domination autotrophique de la biomasse avec des diatomées et des cyanobactéries était bien maintenue pendant le traitement continu des eaux usées. Ce résultat justifie l'efficacité de l'absorption continue des nutriments par rapport aux tests en batch. De plus, l'évolution de l'opacité du biofilm confirme une augmentation continue jusqu'à 57 jours, correspondant à une fixation stable du biofilm comme les études précédentes. Par conséquent, l'augmentation de la surface d'échange entre la biomasse fixée sur les disques et le milieu réactionnel (eaux usées) permet de favoriser la maturation de biofilm. Des recherches futures devraient porter sur le dimensionnement d'un réacteur à biofilm symbiotique amélioré pour un post-traitement d'une véritable eau usée.Une variation de la vitesse de rotation pourrait étre proposée dans ce processus afin d'étudier l'incidence de l'hydrodynamique (nombre de Reynolds, containe de cisaillement…) sur l'épaisseur du biofilms.

En effet ce processus d'assainissement durable permet une élimination à faible coût des nutriments présents dans les eaux usées et une accumulation de la biomasse multitrophique valorisable comme matière première pour la production de bioénergie (biométhane).Ce procédé intégré améliore la performance économique de cette technologie et contribue à l'atténuation des effets du changement climatique.

CHAPITRE V.

Valorisation de la biomasse des flocs-MaB par une co-digestion anaérobie pour la production de biogaz

V.1. Introduction

Suite aux différents processus de traitement des eaux usées basés sur le couplage de microalgues et de bactéries sans apport d'O_2 et sans libération de CO_2, un procédé innovant de valorisation de cette biomasse multitrophique sera suggérépour la production de biogaz. Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'économie circulaire et du développement durable en se basant sur un traitement par (i) une co-digestion anaérobie pour transformer la pollution organique en biogaz et par (ii) un traitement du digestat issu du digesteur dans un bioréacteur multitrophique à base de flocs-MaB pour générer une biomasse valorisable et une eau réutilisable. La co-digestion anaérobie de deux inoculums (digestat et lisier)a été testée avec la biomasse algale, comme matière première, en variant le ratio VS_S/VS_I (0.2, 0.5 et 0.8) afin d'améliorer la production du biométhane. Notre approche basée sur les interactions multitrophiques entre les microalgues photo-autotrophes et les bactéries hétérotrophes permet de résoudre la problématique des coûts élevés de production du biogaz.

Le traitement du digestat est une phase importante vu l'impact de la digestion anaérobie sur l'environnement (odeurs, bactéries pathogènes, virus, minéraux). Il s'agit d'une fraction liquide contenant de l'azote ammoniacal et peu de matière organique utilisable comme engrais liquide en remplacement des engrais minéraux azotés. Nous proposons au cours de ce projet de thèse une étape écologique de traitement en présence de lumière basée sur les interactions symbiotiques tout en assurant une dégradation simultanée du carbone organique par les bactéries hétérotrophes et des nutriments (azote et phosphore) par les microalgues autotrophes à travers la biomasse algale-bactérienne biofloculante (MaB-flocs). Ce substrat nutritif sera dilué avec de l'eau (10 %, 30 %, et 50 %) afin de favoriser la croissance des flocs-MaB. Une optimisation des conditions de culture sera effectuée par le suivi des concentrations des polluants éliminés au cours du processus. Au cours de cette étude, le lisier à été testé et comparé au digestat comme étant des milieux nutritifs pour la croissance des algues. L'avantage de ce procédé est d'atteindre ZERO émissions grâce à une récupération d'énergie, une réutilisation des eaux et un recyclage des flocs-MaB et du CO_2 issu de la combustion du biogaz.

V.2. Valorisation de la biomasse multitrophique MaB-flocs pour la production de biogaz par une co-digestion anaérobie et recyclage des nutriments à partir du digestat

Short communication (III): Microalgae-bacterial flocs growth for nutrient recycling from Liquid Digestate and Slurry and methane production by anaerobic co-digestion

Olfa Beji[a,b], Nouceiba Adouani[a], Souhila Poncin[a], Moktar Hamdi[b] , Huai Z. Li[a,*]

[a]Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

[b]Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

*Corresponding author:

Pr. Huai Zhi LI

huai-zhi.li@univ-lorraine.fr

Abstract

Digestate has already been a subject of numerous studies as part of microalgal culturing because it is rich in nutrients. This study wants to use it as reference to investigate on the possibility to exploit Slurry for the same applications. This work is divided into two parts. The first one is proposed to the evaluation of the Microalgae-bacterial flocs growth for nutrient recycling from Liquid Digestate and Slurry, working on three different dilution (10 %, 30 %, 50 %) of the two substrates, in order to understand which was the best one in terms of nutrients and pollutants removal (ammonium and COD removal rate) and biomass production (Autotrophic Index). The best dilution was 30 % for Digestate and 10 % for Slurry, which allows to obtain the highest ammonium and COD removal rates.The second part consisted on the evaluation of biomethane production during the co-digestion at different ratio of $VS_{substrate}/VS_{inocum}$ (0.2; 0.5; 0.8), using MaB-flocs as a substrat and Digestate or Slurry as inoculum. The simple digestion (without flocs) showed best performance than the co-digestionafter 30 days (726,72 mL $CH_4.g^{-1}$ VS Slurry, 245.66 mL $CH_4.g^{-1}$ VS Digestate), whereas,for the co-digestion, the best ratio for both inoculums was 0.2 $VS_{substrate}/VS_{inoculum}$ with 317.18 mL $CH_4.g^{-1}$VS Slurry and 165,73 mL $CH_4.g^{-1}$ VS Digestate.

Slurry showed more satisfactory results than Digestate but its application needs more studies.

Keywords: Liquid Digestate, Anaerobic co-digestion, MaB-flocs, Biomethane production

1. Introduction

The climate change is a worldwide issue demanding constant novel alternatives for renewable energy production. In this context, the biogas production via anaerobic digestion represents the major beneficial process for energy generation (Ajeej et al., 2015). Thus, biogas is considered as a promising source of bioenergy, which can replace the fossil fuels and gaseous vehicle fuel (Ajeej et al., 2015). Several researchers have adopted the algal biomass as a sustainable feedstock for the production of renewable energy (Wieczorek et al., 2015), with regard to the high efficiency of their photosynthetic mechanism in CO_2 mitigation and biomass growth (Franchino et al., 2016). The cultivation of microalgae is a potentially green concept that enhances the biodegradation of organic matter for biogas production (Ajeej et al., 2015). The production of biomethane by using anaerobic digestion from microalgae, as a substrate, was adopted firstly in the 1950s by Golueke et al. (1957). As highlighted by Wieczorek et al. (2015), microalgae play a major role in the bioremediation of wastewater to reduce high amounts of essential nutrients (ammonia and phosphate). Thus, the potential of the cultivation system of microalgae for anaerobic digestion should be integrated with wastewater treatment regarding nutrients recovery (De˛bowski et al., 2013 ; Mahdy et al., 2015), to overtake the high cost of biomass production (Franchino et al., 2016). Microalgae–bacterial process applied for industrial wastewater treatment has been currently submitted to a special attention (Hernandez et al., 2013). Under these systems, symbiotic connections between photo-autotrophic algae and heterotrophic bacteria were maintained through the exchange of simultaneous gas (oxygen and carbon dioxide) and nutrients (Gutzeit et al., 2005).Thus, during wastewater treatment, the use of coupled microalgae with aerobic bacteria allows to avoid the external O_2/CO_2 supply and tends to remove nutrients as well as to reduce CO_2 sequestration from the atmosphere (Hernandez et al., 2013). With this regard, microalgae-bacteria flocs have been considered as an alternative for simultaneous removal of pollutants from wastewater and methane production (Wieczorek et al., 2015 ; Van Den Hende et al., 2015). The aim of the following work is to evaluate the coupled system of the symbiotic MaB-flocs process for Liquid Digestate treatment with anaerobic digestion. The study starts for the first time the potential of MaB-flocs biomass to improve methane yields. Various investigations have been conducted for biogas production from MaB-flocs in order to enhance a maximum biomethane production with efficiency-cost of this operation (Wieczorek et al., 2015). The present work is focused on the determination of the optimum inoculum source and of the effect of the substrate/inoculum ratio, for improving biogas yields from MaB-flocs.

However, the anaerobic batch experiments were carried out by testing two inoculums: Digestate and Slurry. Actually, the biomethane production is strongly influenced by the choice of the inoculum such as municipal sludge, soil extracts (sediment), industrial treatment plants, rumen and animal manures, which contains various bacterial populations (Elbeshbishy et al., 2012). Various studies have demonstrated the efficiency of methane production through the co-digestion of algae with different substrates. Recently, according to Prajapati et al. (2014), several species of algae such as *Chlorella* spp., and *Chroococcus* spp., have been adopted for methane bioconversion. As the result of the anaerobic co-digestion from algae, the ‘‘Liquid Digestate’’, containing nutrients (N and P), is essential for the cultivation of microalgae (Prajapati et al., 2014). As reported by previous researchers, the "Liquid Digestate" collected from the anaerobic digestion of paper industry bio-sludge and of cow dung have been examined for the growth of *Scenedesmus acuminatus* (Hidaka et al., 2017) and *Chroococcus* sp. (Prajapati et al., 2014), respectively. Furthermore, according toMassa et al. (2017), the vegetable Liquid Digestate, used as a nutrient media, leads to a high potential for the growth of various photosynthetic microorganisms such cyanobacterium (*Arthrospira maxima*), the freshwater microalgae (*Tetradesmus obliquus* ; *Botryococcus braunii*) and the marine diatom (*Phaeodactylum tricornutum*). The purpose of the second part of this study aims to compare two Liquid substrates (Digestate and Slurry) for the MaB-flocs growth. The performance of the photobioreactors was evaluated in terms of organic matter and ammonium removal efficiencies coupled with phototrophic biomass production. Hence, in the context of "closed-loop process", researches were made to produce biomethane through the co-digestion of MaB-flocs previously cultivated on the Liquid Digestate as a growth media.

2. Materials and Methods

2.1. Inoculation and reactor startup MaB-flocs culture in batch mode

Microalgae-bacterial flocs (MaB-flocs) culture has been prepared under a jacketed batch reactor (Figure 1), using previous pre-culture of MaB-flocs obtained from sludge (municipal sewage treatment plant in Tunisia, Kairouan city). Within the batch reactor, 350 mL of MaB-flocs with 4.48 g total suspended solids (TSS).L^{-1}, 2.75 g volatile suspended solids (VSS).L^{-1} and 3.46 mg Chlorophyll (a).g^{-1} (VSS) were mixed with a synthetic municipal wastewater (SMW) in order to obtain a working volume of 900 mL. The multitrophic culture was homogenized through a stirring of 100 rpm and exposed under a cycle of light/dark (16h/8h)

using fluorescent lamps with a light power of 1050 lm (18W, Philips, France), without O_2supply. The temperature inside the reactor was maintained at 27°C and circulated through a thermostatic bath during 7 days of all operation. As shown in the previous study, these conditions of culture maintain a stable algae growth.Synthetic wastewater employed for the MaB-flocs growth was prepared as used by Dahalanet al. (2015) with initial COD 600 $mg.L^{-1}$, as described in the previous studies (Sections III and IV).

2.2. Liquid Digestate and Slurry characterizations

Digestate and Slurry were collected from a farm near Nancy, France, where cows and sheep were raised for the production of milk and their derivatives. The Digestate withdrawn from farm anaerobic digester, as well as the Slurry samples were stocked at 4°C. Supernatant samples called "Liquid Digestate (D_L)" and "Liquid Slurry (S_L)", were obtained by filtration with coffee filters of 100 g of Digestate and Slurry in 1 L of distilled water, in order to remove suspended particules that risk blocking the microorganism's activities and their growth (dark). It was considered that the initial $(D_L)_0$ and $(S_L)_0$ solutions were very rich in ammonium more than synthetic wastewater, used as reference. Thus, the need for diluted samples is related to a suitable algae growth. For both substrates D_L and S_L,the determination of Chemical Oxygen Demand (COD) was realized using HACH (51996-2000) method. The total ammonium ($N\text{-}NH_4^+$) was measured using Nessler method and phosphate reagent for 10mL sample (HACH-LANGE GmbH, Germany), respectively, on a HACH DR2000 spectrophotometer, USA. The pH was measured using a pH meter (METTLER Toledo M300a, USA).

2.3. Algal growth and nutrient recycling from Liquid Digestate and Liquid Slurry

The first set of experiments was elaborated into batch conditions in order to monitor algal performance to remove nutrients from diluted samples of Slurry and Digestate without oxygen supply. Starting from the samples of initial Liquid Slurry and Liquid Digestate, other dilutions were prepared: 10 %, 30 %, and 50 %. During this experiment, Erlenmeyers flasks of 200 mL working volume and containing liquid substrate, were inoculated with 10 % (v/v) of MaB-flocs content as inoculum. The Erlenmeyers were incubated thermostatically at 25°C, under 16/8 hours of light/dark cycles, and mixed by an orbital shaker at 250 rpm (Figure 2), during 14 days. All the experiments were carried out in duplicate. The liquid effluents were daily analyzed for COD and $N\text{-}NH_4^+$ concentrations.The algae growth was estimated in

termsof chlorophyll (a) concentration (mg Chl(a).g^{-1} VSS).Total concentration of Chlorophyll(a) was extracted (Eq. 1) through methanol solution (1M) and measured using spectrophotometer (UV–Vis 2550, Shimadzu, Japan) at 652 nm and 665 nm (Porra et al., 1989):

$$\text{Chlorophyll(a)} = 16{,}29\ A_{665} - 8{,}54\ A_{652} \quad (1)$$

The autotrophic index (mg VSS mg^{-1} Chl (a)) was calculated in accordance to APHA (1985) in order to determine the microorganism domination. The specific growth rates (μ), were calculated using the following equation (Eq. 2)

$$\mu = \frac{\ln(\frac{Xt}{X0})}{t-t0}\ , d^{-1} \quad (2)$$

Where X_0 is the concentration of algal biomass measured as the chlorophyll (a) content (mg Chl(a). g^{-1} VSS) at initial time (t_0) and X_t is the concentration of algal biomass at a specific time (t). Finally, microscopic observations of MaB-flocs morphology were performed by using LEITZ Dialux 20 microscope connected to a SONY color camera (3CCD). Then, MaB-flocs images were analyzed using Visilog 6.3 software in order to identify the microalgae communities present into the samples.

2.4. Co-digestion of MaB-flocs for biogas production

2.4.1. Sample preparation and working conditions

For the biomethane production step, batch anaerobic co-digestion of MaB-flocs was carried out into 1 L glass bottles. This step of the experiments was conducted by varying 3 different Volatile Solids ratios (VS) between substrate (Microalgal-bacterial flocs) and inoculum (Slurry or Digestate): 0.2 $VS_{substrate}/VS_{inoculum}$, 0.5 $VS_{substrate}/VS_{inoculum}$, 0.8 $VS_{substrate}/VS_{inoculum}$, as reported by Wieczorek et al. (2015). The substrate concentration (MaB-flocs) was fixed at 12.21 g VS.g^{-1} with substrate to inoculum ratio (S/I ratio) of 0.2 on VS basis. Both inoculums (D_g) and (S_L) were first aseptically introduced into the glass bottle, then MaB-flocs substrate was added and the bottle was finally filled up to 800 mL with distilled water. The control associated was composed only by inoculum, without the addition of flocs. The glass bottles, tightly closed, are kept in the thermostated cabin at 40°C, for 30 days of experiment period.

2.4.2. Measurement of biomethane production

The biogas volume and composition measurements were conducted every day to monitor the evolution of the biogas production. Biogas volume production was measured using acidic water (pH ≈4.0) with a displacement method each 24 hours. The acidic water is used to avoid the loss of CO_2 due to its high solubility in water, which means that some amount of CO_2 could however be lost in the water itself. Biogas composition was analysed using a gas chromatograph (chromatograph Varian 430-GC) with a Thermal Conductivity Detector (TCD), provided by air injector, capillary column and a column oven of 23 cm (w) x 11 cm (d) x 28 cm (h).Gas phase samples of 100 µL of synthetic biogas were extracted from the bottles by a syringe and injected in the gas chromatograph. The biomethane production was measured in terms of cumulative and daily biomethane production, given by the quotient between gas volume in milliliters and grams of VS of fed, for all the incubation period.

2.5. Statistical analysis

All tests were conducted in triplicates and results are presented as means of the replicates along with standard deviation (represented as mean ± SD or error bars).

3. Results and Discussions

3.1. Generationof MaB-flocs biomass during batch culture

MaB-flocs biomass was harvested via a simple step of settling after 7 days of batch culture and has 3.76 g of total suspended solids (TSS).L^{-1}, 2.35 g of volatile suspended solids (VSS).L^{-1} and 4.58 mg of Chlorophyll (a).g^{-1} (VSS) (Table 1). The autotrophic index (AI) decreased from 288.86 ± 0.1 to reach a low value of about 218 ± 0.2 after 7 days. Thus, this result confirmed the autotrophic abundance of microalgae suspension. As shown through microscopic observation in Figure 3, several species of phototrophic microorganisms such as green unicellular and multicellular algae were strongly incorporated into the multitrophic MaB-flocs. This symbiosis biomass of MaB-flocs may generally offer a sustainable wastewater management technology due to its environmental performances related to carbon and nutrients removals without oxygen supply.

3.2. Liquid Digestate and Slurry characteristics and utilization for MaB-flocs growth

3.2.1. Nutrients and pollutants level of Liquid Digestate and Slurry

Before phytoremediation experiments, Liquid Digestate (D_L) and Slurry (S_L) were analyzed for its nutrients (NH_4-N) and organic compounds (COD) values (Table 2). The total NH_4-N and COD_S concentrations were evaluated depending of the dilution ratios (10 %, 30 %, and 50 %) as shown in Table 2. After dilution, the highest $(NH_4\text{-}N)_T$ concentration of about 86.2 $mg.L^{-1}$ was obtained at D_L concentration of 50 % (Table 2). Thus, the initial characteristics of D_L of 50 % are similar to those of the synthetic wastewater. As well as nutrients availability, COD_S level of the Liquid Slurry was also highest of about 1337 $mg.L^{-1}$, without dilution. Therefore, MaB-flocs biomass is successfully used for nutrient recycling and treating the Liquid Digestate and Slurry.

3.2.2. Phytoremediation of Liquid Digestate and Slurry: COD and ammonium removals

The ammonium removal efficiency was evaluated for each substrate between the day 2 and day 14, as shown in Figures 4.a and 4.b. After fourteenth days of MaB-flocs growth, for all cases, the level of total NH_4-N in the effluent decreased quickly to obtain the highest ammonium removal rate. Furthermore, in comparison to the synthetic wastewater, for both initial substrates without dilution $(D_L)_0$ and $(S_L)_0$, low ammonium removal efficiencies of about 50.25 ± 1 % and 62.38 ± 0.5 %, respectively, were observed at the end of the culture. These significant decreases are due to the high level of total NH_4-N concentrations which varied between 192.6 and 129.1 $mg.L^{-1}$ (Table 2) for Liquid Digestate and Slurry, respectively, which induce a toxic effect for MaB-flocs growth. As demonstrated by Massa et al. (2017), microalgae suffers in the presence of high abundance of ammonium, despite its high tolerance to NH_4-N. The use of the optimal nitrogen concentration essentiallydepends onalgae species. According to Collos and Harrison (2014), different communities of microalgae have been adapted to various optimal ammonium concentrations such as*Chlorophyceae* (140 $mg.L^{-1}$), *Cyanophyceae* (45 $mg.L^{-1}$) and *Diatomophyceae* (6 $mg.L^{-1}$). The removal of ammonium occurs by several mechanisms (nitrification, denitrification and ammonia volatilization) through the microalgae-bacterial populations. The pH values strongly affect the process of ammonium removal. In this case, the pH value was around 7–8 during 14 days of batch culture which caused the ammonia volatilization. The results achieved demonstrated the high ability of MaB-flocs to remove ammonium from diluted D_L at 30 %,

especially with initial NH_4-N concentration of 51.1 $mg.L^{-1}$, while the removal rate reached up 93 ± 1.1 %, after 14 days (Figure 4.a). It is interesting to notice that the highest removal rate corresponding to the day 14 is reached by the 30 % Digestate, confirming the results obtained by Prajapati et al. (2014). These researchers have found an optimal growth of *Chroococcus* sp. cultivated on diluted Liquid Digestate at 30 % concentration and a high removal rate of total ammoniacal nitrogen (TAN) obtained after 12 days (Prajapati et al., 2014). Thus 30 % Liquid Digestate is used as an efficiency growth media for algae which enhances its ability to reduce nutrients. Recent investigations made by Massa et al. (2017), show the high performance of a freshwater microalgae (*Botryococcus braunii*) and a marine diatom (*Phaeodactylum tricornutum*) cultivation on Liquid Digestate to remove respectively, 88.5 % and 79 % of NH_4-N. However, MaB-flocs have shown the best NH_4-N removal efficiency with a value up to 84 ± 2.9 % for S_L diluted at 10% concentration, after 14 days (Figure 4). Hence, the data confirmed thata lowest concentration of substrates is consumed faster by microalgae, with the higher values of ammonia removal rate. The composition of substrate sources (D_L and S_L) strongly affected nitrogen transformation taking place into batch reactor inoculated with microalgae–bacteria flocs (MaB-flocs). It was suggested by González-Fernández et al. (2011), that various mechanisms for ammonium removal from the Slurry substrate such as algal uptake, ammonia evaporation, bacterial growth, and nitrification could be applied in microalgae-bacteria process. As the ammonium removal rate, the COD removal efficiencies were higher for all cases after 14 days of batch incubation, compared to 2 days. Figure 5, illustrated the lowest organic compounds removal performances present on initial $(D_L)_0$ (14.76 ± 2.9 %) and $(S_L)_0$ (20 ± 1.3 %), which is due to its high COD content of 1184 $mg.L^{-1}$ and 1337 $mg.L^{-1}$, respectively (Table 2). Contrary to diluted Digestate and Slurry, the initial solutions $(D_L)_0$and $(S_L)_0$ could be toxic to the MaB-flocs owing to the municipal organic waste discharged into the anaerobic digester which contains several impurities (Massa et al., 2017). In this case, MaB-flocs suffer from organic compounds inhibition. After 14 days, a high reduction in COD removal efficiencies were observed for diluted Slurry at 10 % and 30 % concentrations of about 83.1-82.3 %, respectively, while only a decrease of COD removal of about 37.7 % for 30 % D_L was noticed. As previously mentioned, the removal of the soluble COD depended also on the dilution ratio of the substrate. For MaB-flocs, highly diluted Liquid Slurry represents a suitable growth medium, despite the COD concentrations were lower than the respective synthetic wastewater (WWS). The best results achieved by Slurry samples could be attributed to a simple visual consideration. The Slurry taken from the

farm had a liquid consistency against the viscosity and less dense composition than the Digestate. This aspect could affect the performances because the nutrients are easier to assimilate by MaB-flocs. Therefore, the biodegradation of the organic compounds by heterotrophic bacteria enhance CO_2 release which is essential for microalgae growth and phytoremediation through nutrients removal (González-Fernández, 2011 ; Bohutskyi et al., 2015). In this case, the nutrients and gas exchange between bacteria and algae could be explained by mutualistic relationships. Otherwise, microalgae can consume organic carbon matters via mixotrophic and heterotrophic metabolisms to improve their growth (Bohutskyi et al., 2015). Hence, according to Marazzi et al. (2017), organic matter can play a double role on mixotrophic growth of algae (*Chlorella* sp.) as carbon source and growth factors.

3.2.3. MaB-flocs growth and biomass productivity on Liquid Digestate and Slurry

Microalgae-bacteria flocs (MaB-flocs) culture were tested via the evolution of growth rate (d^{-1}), for Liquid Digestate and Slurry solutions, considered as a growth media (see Table 3). The comparison of MaB-flocs productivity values, based on the variation of g $VSS.L^{-1}$, was realized at different D_L and S_L dilutions (10 %, 30 % and 50 %) for 14 days of batch culture. The lowest productivities were observed for initial solutions of Liquid Digestate and Slurry, without dilution, with values of 0.011 ± 0.03 d^{-1} and 0.017 ± 0.01 d^{-1} (Table 3), respectively. Thus, the high ammonium and organic compounds concentrations (Table 2) seem to represent the majority cause of the productivity reduction owing to their toxic effect. The current data, reported on the MaB-flocs growth in Liquid Digestate, have shown at 30 % dilution a growth rate of 0.024 ± 0.02 d^{-1} corresponding to a higher value than in the initial $(D_L)_0$ used without dilution. Indeed, the Liquid Digestate collected from anaerobic digestion of zootechnical wastes, enhanced the photosynthetic algae (*Tetradesmus obliquus*) and cyanobacterium (*Arthrospira maxima*) cultivation on account of the N availability (Massa et al., 2017). Another study has shown that by using Liquid Digestate at 30 % dilution, the biomass concentration of microalgae *Chroococcus* sp. reaches its optimal value of 0.79 ± 0.064 $g.L^{-1}$ (Prajapati et al., 2014). For the batch reactor fed with Liquid Slurry, the biomass productivity attained 0.028 ± 0.02 d^{-1} for S_L at 10 % dilution, which is higher than the ones fed with D_L and with others dilutions. Hence, increasing dilution resulted in higher productivities. Of greater interest, the two dilutions are 10 % and 30 %, because the 50 % behavior is closer to the WWS trend. The comparison between microalgal biomass productivity as indicated by the variation of mg Chl(a).g^{-1} VSS in 30 %D_L, 10 % S_L, initial $(D_L)_0$ and $(S_L)_0$ and the synthetic

wastewater was shown in Figures 6.a and 6.b. When the algae grows up at 30 % D_L, containing 51.1 mg NH_4-N.L^{-1}, the total Chl(a) content increased from 1.4 ± 0.01 mg Chl(a).g^{-1} VSS to reach 2.67 ± 0.01 mg Chl(a).g^{-1} VSS (Figure 5) after 14 days of batch culture. However, doubling the ammonium concentration in $(D_L)_0$, without dilution, resulted in a decrease in biomass productivity (Table 3) and less mg Chlorophyll (a).g^{-1} VSS value of 1.87 ± 0.02, which is lower than synthetic wastewater. According to Ayre et al. (2017), increasing ammonium concentration in the digestate of piggery effluent had an inhibiting effect on chlorophyll (a) production by algae. This observation could be the same as that obtained for the slurry of cattle used in this study. Thus, as the total NH_4-N concentration decreased (14.4 mg.L^{-1}), the algae biomass achieved its optimal with 2.98 ± 0.04 mg Chl(a).g^{-1} VSS at day 14, in Liquid Slurry at 10 % dilution. Hence, the maximal growth rate (0.028 $days^{-1}$) and the maximal Chl (a) abundance (2.98 mgChl(a).g^{-1}VSS) were observed with high diluted substrate (10 %S_L). Currently, the potential of algae in phytoremediation, including a sufficient decrease of nitrogen and phosphorus concentrations, improved algal growth performance (Bohutskyi et al., 2015). Further, the trophic state of microalgae-bacteria community depends on the Autotrophic Index (AI). Thus, AI identifies the community abundance: autotrophic or heterotrophic domination. The predominance of autotrophic organisms is given by the lower values of AI while heterotrophic dominance is related to higher values of AI (APHA, 1985). In batch conditions, the lower value was obtained after 14 days for almost all the samples (S_{L0}, D_{L0}, 30 %D_L, and 10 %S_L) as with synthetic wastewater. The AI decreased from a high value of about 711.8 related to heterotrophic colonization into the MaB-flocs suspension to reach lower AI of 374.2 after 14 days of culture into 30 %D_L, than the obtained value with $(D_L)_0$ (AI: 532.6) (Figure 6). Thus, the lowest AI confirmed the autotrophic abundance of microalgae into the MaB-flocs inoculum. Similar to D_L, the Liquid Slurry diluted at 10 % achieved the lowest AI of 335.3, corresponding to the high autotrophic dominance. In this case, the media S_L enhanced more the algae growth in MaB-flocs, which improved the ammonium and organic compounds removal efficiencies. therefore, the lower content of ammonium and COD on Liquid Digestate and Slurry resulted in higher algal biomass productivity and Autotrphic Index. As reported by Hernández et al. (2013), the availability of carbon and nutrients in wastewater was contributed by algal biomass assimilation and organic macromolecules conversion.

3.3. Biomethane production from the microalgae-bacteria flocs

The variation of daily and cumulative biomethane production under batch experience, displayed in Figures 7 and 8, was conducted for two inoculums Digestate and Slurry, in terms of mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed. The cumulated methane production profiles have been reported at substrate/inoculum ratio of 0.2, 0.5,and 0.8 g $VS_{substrate}$/g $VS_{inoculum}$ during anaerobic digestion carried out at 38°C (Figures 7.a and 8.a). For all cases, the methane production was followed for 30 days from the beginning of the anaerobic digestion. The cumulative methane yield for initial biomass (Digestate) achieved the highest value of 245.66 mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed, after 30 days of operation. However, under mesophilic co-digestion with MaB-flocs as a substrate, the CH_4 production achieved 165.73, 30.99 and 14.3 mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed for the S/I ratio of 0.2, 0.5, and 0.8, respectively, at the end of the treatment. According to these data, the highest methane yields were observed at 0.2 g $VS_{substrate}$/g $VS_{inoculum}$. This result shows that the CH_4 production evolved differently and decreased with increasing ratios. Similar to that, Passos et al. (2013) reported that as the S/I ratio increased from 0.2 to 0.8 g$VS_{substrate}$/g $VS_{inoculum}$, the cumulative methane production with MaB-Flocs biomass decreased from 206.92 ± 7.81 to 171.54 ± 6.67 mL $CH_4.g^{-1}$ VS, respectively. Hence, several studies tested the biodegradability of MaB-flocs and its performance for biogas production. Recently, Van Den Hende et al. (2015) supported biochemical methane yield of 226 NL CH_4 kg^{-1} VS from MaB-flocs biomass harvested and adopted for batch anaerobic digestion. However, as seen in Figure 7.b, the daily biomethane production started from day 0 and increased up to 32.25 and 21.96 mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed, respectively, for classic digestion (D_{g0}) and co-digestion of MaB-flocs using the ratio of 0.2 g $VS_{substrate}$/g $VS_{inoculum}$, after 4 days. Batch reactors via slurry as inoculum were adopted to emphasize the impact on anaerobic co-digestion of different ratio of $VS_{MaB\text{-}flocs}$:$VS_{Inoculum}$. In the case of the Slurry alone (S_{L0}), the methane production increased from 35.17 mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed to reach 726.72 mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed, after 30 days, which is significantly higher than the values reported for biomass (Digestate) (Figure 8.a). Hence, this inoculum (Slurry) constitutes a suitable biomass as a nutritive source for anaerobic bacteria which enhance it biodegradability ability. Under co-digestion of MaB-flocs, the highest cumulative biochemical methane yield of 317.18 mL $CH_4.g^{-1}$ VS fed was given by Slurry biomass according to a $VS_{substrate}$ (g):$VS_{inoculum}$ (g) ratio of 0.2. Otherwise, due to the higher addition ratio of MaB to Slurry and Digestate (0.8 g $VS_{substrate}$/g $VS_{inoculum}$), lower yields of cumulative methane were observed (Figures 7.a and 8.a). Therefore, as confirmed by Hernández et al. (2013), the variation of the substrate/inoculum ratio affected the methane

production during anaerobic digestion of microalgal–bacterial biomass. From the daily biomethane production profiles, various fluctuations were noted in Figure 8.b, for the inoculum Slurry. As supposed by Prajapati et al. (2014), these fluctuations could be related to the insufficient contact between the anaerobic microbial flora and the substrate. The biomethane productivity is influenced by the features and thickness of the cell wall as well as the macromolecular distribution of the substrate (Mahdy et al., 2015). Thus, the thin structure, the high cytoplasmic content and the low resistance to biological degradation of microalgae cells' wall lead to increase methane volume through anaerobic digestion (Tijani et al., 2015). In conclusion, Slurry gave better results as compared to the good values obtained for Digestate. It is difficult to find a satisfying explanation for the best performance of slurry, especially because the Slurry composition is not more different than that of the Digestate. As reported by Koblenz et al. (2015), the only significant difference is about the dry matter, 9% of cattle Slurry against 4.9 % of Digestate. Dry matter is considered as an indicator of nutrients available because it includes fibres, proteins, ash, water soluble carbohydrates and lipids etc. That means Slurry contains more nutrients essential for the growth of MaB-flocs.

4. Conclusion

For the first part of the study, the best performances are achieved by Diluted Digestate at 30 % concentration, and Diluted Slurry at 10 % concentration. A greater dilution seems to give the advantageously effect for future applications, probably due to an easier achievement of MaB-flocs to nutrients, as previously discussed. Regarding the co-digestion part, for both Slurry and Digestate, the best conditions are reached by the ratio 0.2 VS_S/VS_I, where the results for Slurry are considerably higher than the values reported for Digestate. Compared to the simple digestion, however, the co-digestion with MaB-flocs doesn't reach high values in terms of cumulative biomethane production (mL/ g VS). Future studies would evaluate this phenomenon in greater deep, to understand if digestion is a better choice than the co-digestion or if the conditions of this experiment weren not favorable to the MaB-flocs action.

References

APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edn. Washington, DC: *American Public Health Association*, p. 1268.

Ajeej, A., Thanikal, J. V., Narayanan, C. M., Kumar, R. S. (2015). An overview of bio augmentation of methane by anaerobic co-digestion of municipal sludge along with microalgae and waste paper. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *50*, 270-276.

Ayre, J. M., Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A. (2017). Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Research*, *24*, 218-226.

Bohutskyi, P., Liu, K., Nasr, L. K., Byers, N., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Bouwer, E. J. (2015). Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*, 6139-6154.

Collos Y, Harrison PJ .(2014). Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine Pollution Bulletin*, 80, 8–23.

De¸ bowski, M., Zielin´ ski, M., Grala, A., Dudek, M. (2013). Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies – review. Renewable Sustainable Energy Reviews. 27, 596–604.

Elbeshbishy, E., Nakhla, G., Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. Bioresource Technology, 110, 18–25

Franchino, M., Tigini, V., Varese, G. C., Sartor, R. M., Bona, F. (2016). Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggery digestate. *Science of the Total Environment*, *569*, 40-45.

Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotass, H.B. (1957). Anarobic digestion of algae. *Applied Microbiology,* 5, 47–55.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science Technology*,52, 9-18.

González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, M. C. (2011). Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae–bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresource Technology*, *102*, 960-966.

Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015). Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.

Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M. C. (2013). Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresource Technology*, *135*, 598-603.

Hidaka, T., Takabe, Y., Tsumori, J., Minamiyama, M. (2017). Characterization of microalgae cultivated in continuous operation combined with anaerobic co-digestion of sewage sludge and microalgae. *Biomass and Bioenergy*, *99*, 139-146.

Koblenz Barbara, Sabine,Rücknagel Jan, Christen Olaf .(2015). Influence of biogas digestate on density, biomass and community composition of earthworms, *Industrial Crops and Products*, Volume 66, Pages 206-209

Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C. (2015). Algaculture integration in conventional wastewater treatment plants: anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresource Technology*, *184*, 236-244.

Marazzi, F., Sambusiti, C., Monlau, F., Cecere, S. E., Scaglione, D., Barakat, A. Ficara, E. (2017). A novel option for reducing the optical density of liquid digestate to achieve a more productive microalgal culturing. *Algal Research*, *24*, 19-28.

Massa, M., Buono, S., Langellotti, A. L., Castaldo, L., Martello, A., Paduano, A.,Fogliano, V. (2017). Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for Tetradesmus obliquus, Botryococcusbraunii, Phaeodactylumtricornutum and Arthrospira maxima. *New Biotechnology*, *36*, 8-16.

Passos, F., Solé, F., García, J., Ferrer, I. (2013). Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, 168–175.

Prajapati, S. K., Kumar, P., Malik, A., Vijay, V. K. (2014). Bioconversion of algae to methane and subsequent utilization of digestate for algae cultivation: a closed loop bioenergy generation process. *Bioresource Technology*, *158*, 174-180.

Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics. 975, 384-394.

Tijani, H., Abdullah, N., Yuzir, A. (2015). Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *52*, 1610-1622.

Van Den Hende, S., Laurent, C., Bégué, M. (2015). Anaerobic digestion of microalgal bacterial flocs from a raceway pond treating aquaculture wastewater: need for a biorefinery. *Bioresource Technology*, *196*, 184-193.

Wieczorek, N., Kucuker, M. A., Kuchta, K. (2015). Microalgae-bacteria flocs (MaB-Flocs) as a substrate for fermentative biogas production. *Bioresource Technology*, *194*, 130-136.

Figure captions

Figure 1. Batch reactor for MaB-flocs pre-culture

Figure 2. MaB-flocs culture into Liquid Digestate and Liquid Slurry

Figure 3. Light microscopy images of MaB-flocs magnitude 10x (5.b) and 40x (5.a) after 7 days of culture, showing microalgae (ma), bacteria (ba), and filamentous cyanobacteria (cb). Depicted scale bars measure 50µm in length

Figure 4. Ammonium removal rates (mean value ± SD) evaluated after 2 and 14 days of MaB-flocs cultivation for each diluted substrate (DL: Liquid Digestate (4.a); SL: Liquid Slurry (4.b)) and Synthetic Wastewater (WWS), as reference.

Figure 5. COD removal rates (mean value ± SD) evaluated after 2 and 14 days of MaB-flocs cultivation for each diluted substrate (DL: Liquid Digestate (5.a); SL: Liquid Slurry (5.b)) and synthetic wastewater (WWS), as reference.

Figure 6. MaB-flocs biomass in terms of mg Chl(a). g^{-1}VSS (mean value ± SD) and autotrophic Index evaluated after 7 and 14 days of batch cultivation for each substrate: DL, Liquid Digestate (6.a); SL, Liquid Slurry (6.b) (with and without dilution) and synthetic wastewater (WWS), as reference.

Figure 7. (a) Cumulative biomethane production from Digestate used as an inoculum for testing different substrate ratio of MaB-flocs (b) Variation of daily and cumulative biomethane production for classic digestion and co-digestion of 0.2g $VS_{MaB\text{-}flocs}$:$VS_{Inoculum}$

Figure 8. (a) Cumulative biomethane production from Slurry used as an inoculum for testing different substrate ratio of MaB-flocs (b) Variation of daily and cumulative biomethane production for classic digestion and co-digestion of 0.2g $VS_{MaB\text{-}flocs}$:$VS_{Inoculum}$

503 **Tables**

504 **Table 1.** MaB-flocs biomass characteristics after batch culture

505 **Table 2.** Initial characteristics of Liquid Digestate and Slurry after different dilutions and
506 before MaB-flocs growth

507 **Table 3.** Specific growth rate (day^{-1}) (mean value ± SD) of batch culture for MaB-flocs by
508 using Liquid Digestate and Slurry (with and without dilution) as a culture media, compared to
509 synthetic wastewater

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

Figure 1.

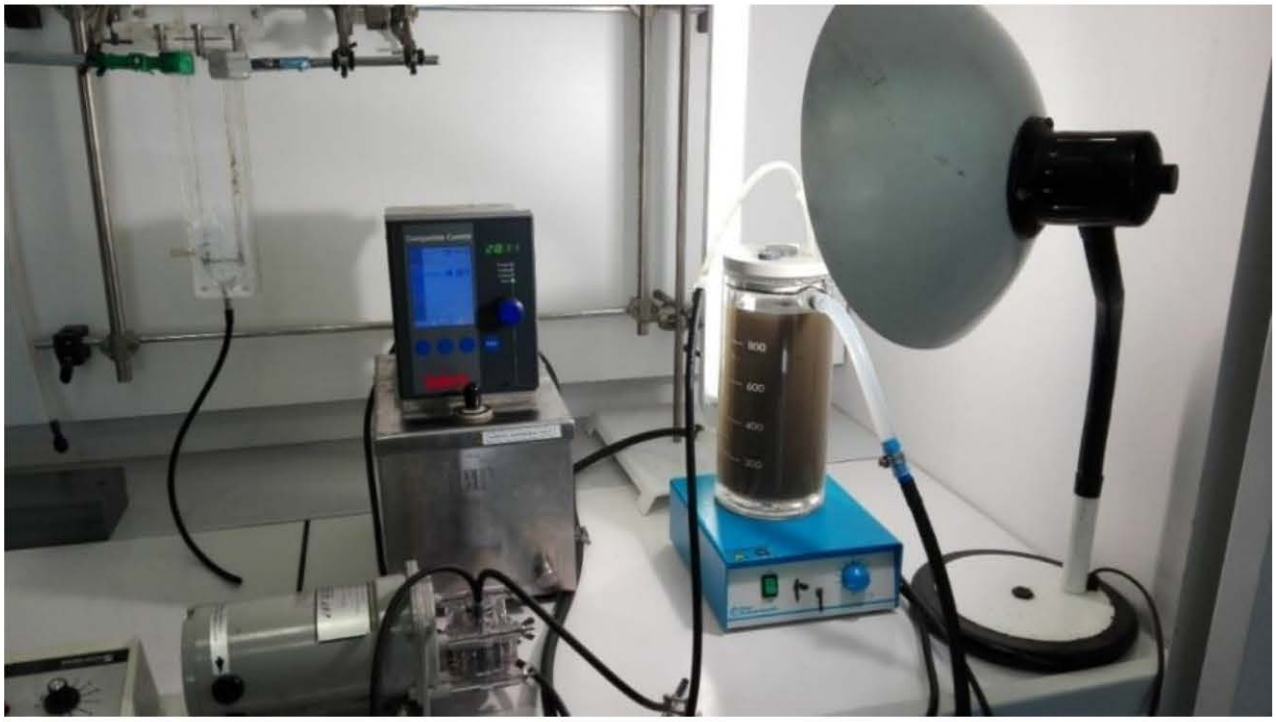
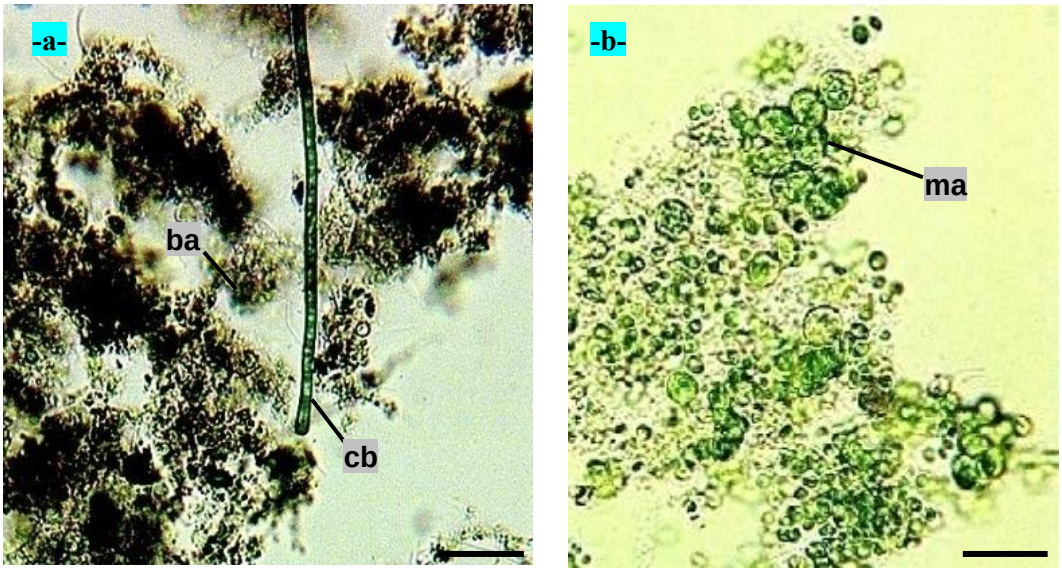


Figure 2.



559 **Figure 3.**

560



561

562

563

564

565

566

567

568

569

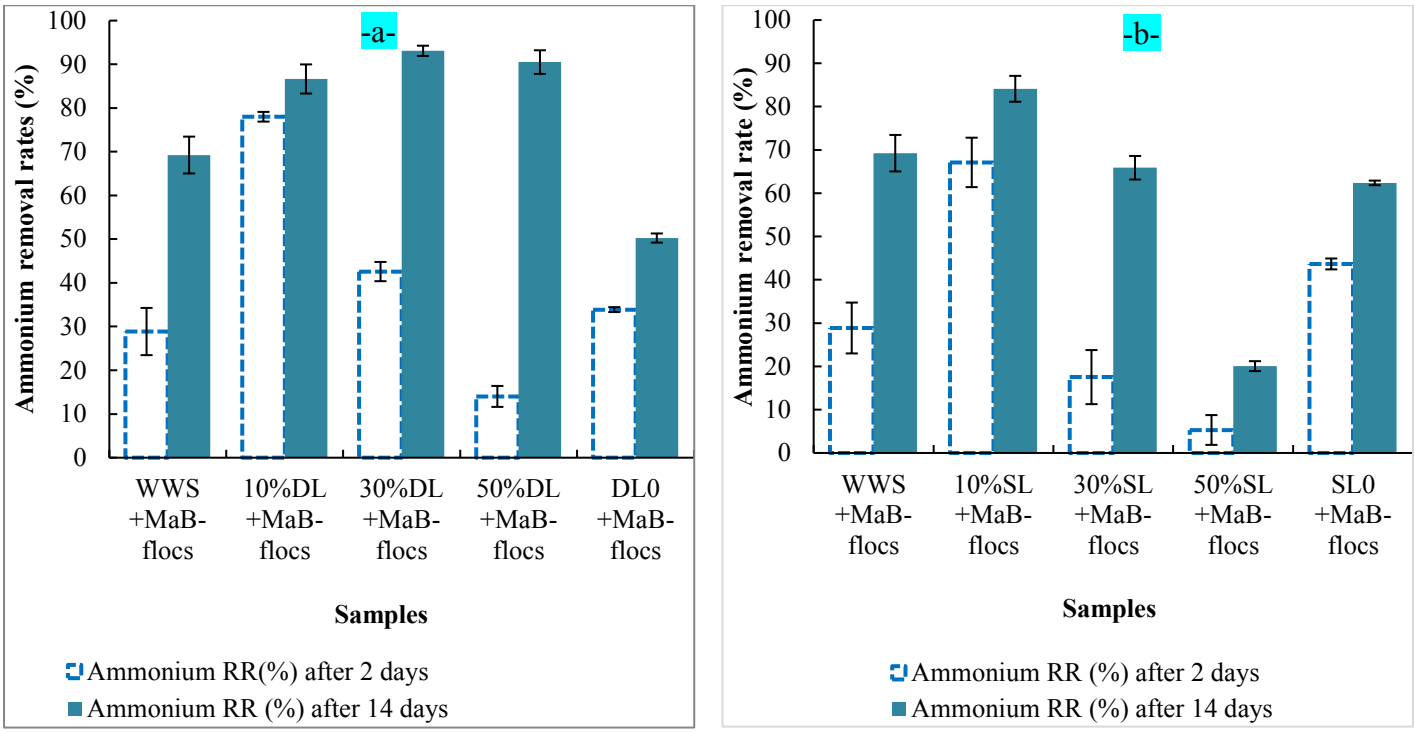
570

571

572

573 **Figure 4.**

574



575

576

577

578

579

580

581

582

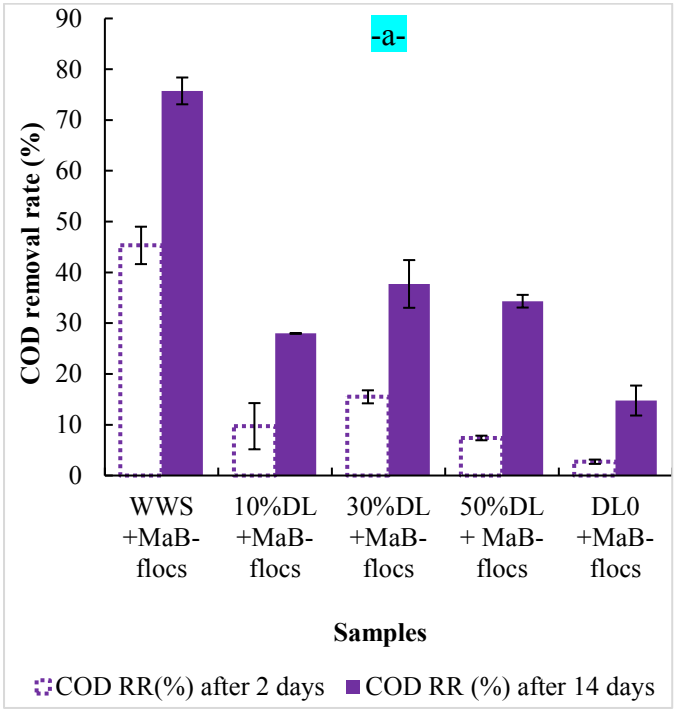
583

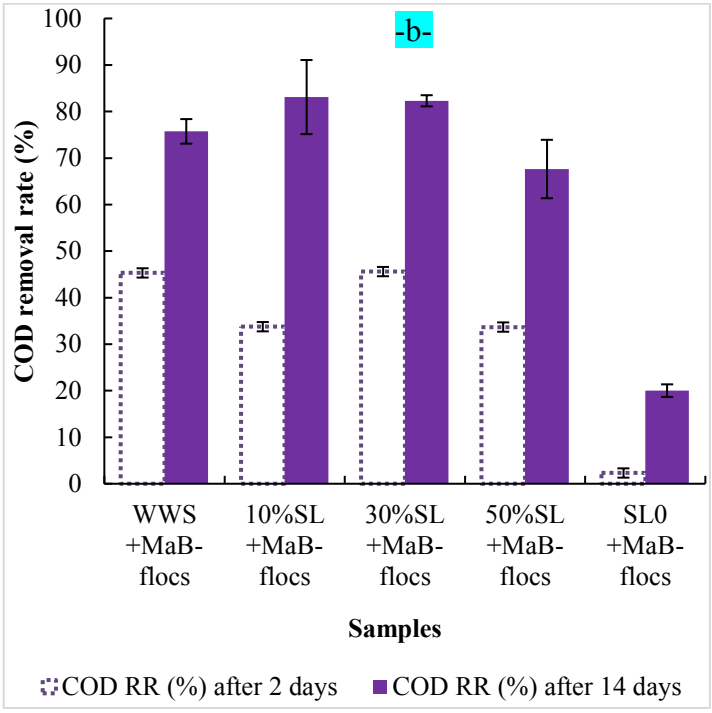
584

585

586 **Figure 5.**

587





588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

Figure 6.

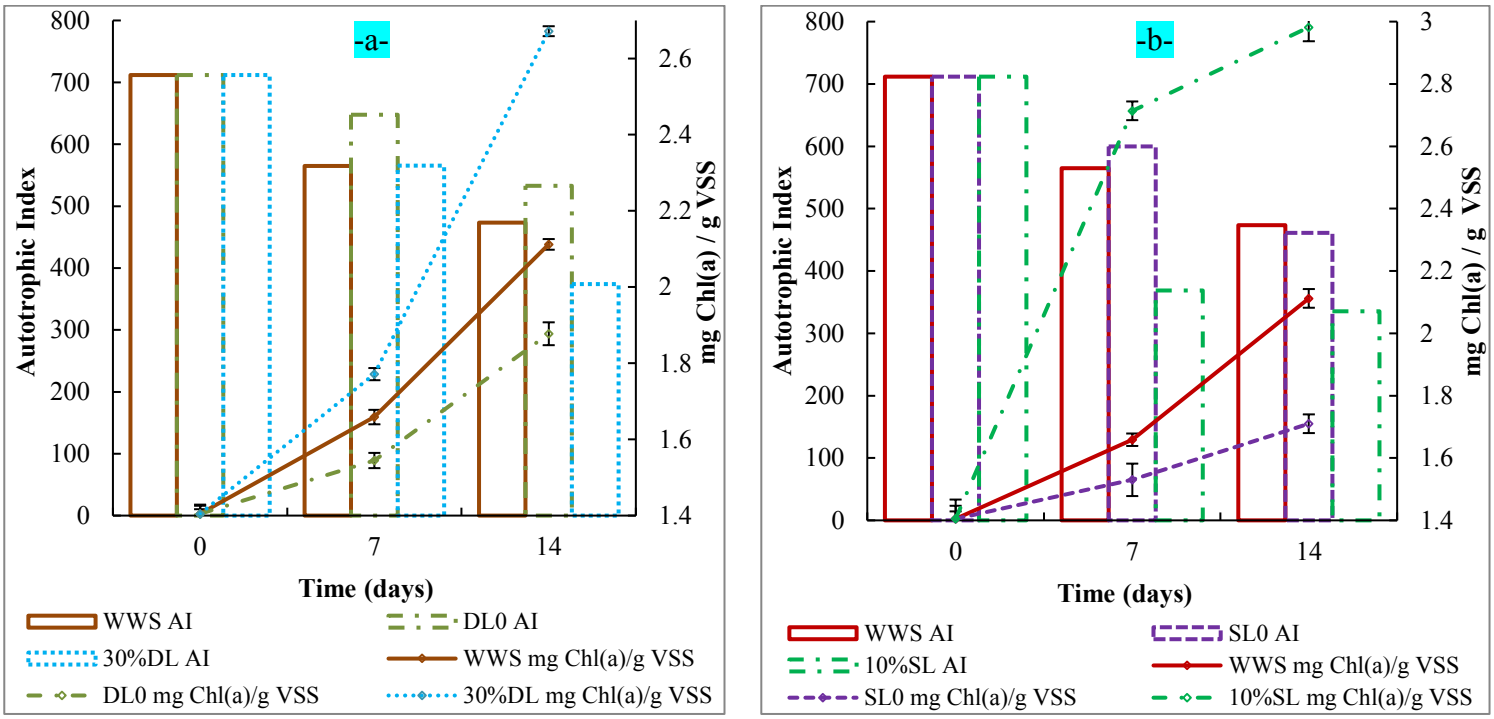

-a-
Autotrophic Index
mg Chl(a) / g VSS
Time (days)
WWS AI
DL0 AI
30%DL AI
WWS mg Chl(a)/g VSS
DL0 mg Chl(a)/g VSS
30%DL mg Chl(a)/g VSS
-b-
Autotrophic Index
mg Chl(a) / g VSS
Time (days)
WWS AI
SL0 AI
10%SL AI
WWS mg Chl(a)/g VSS
SL0 mg Chl(a)/g VSS
10%SL mg Chl(a)/g VSS

Figure 7.

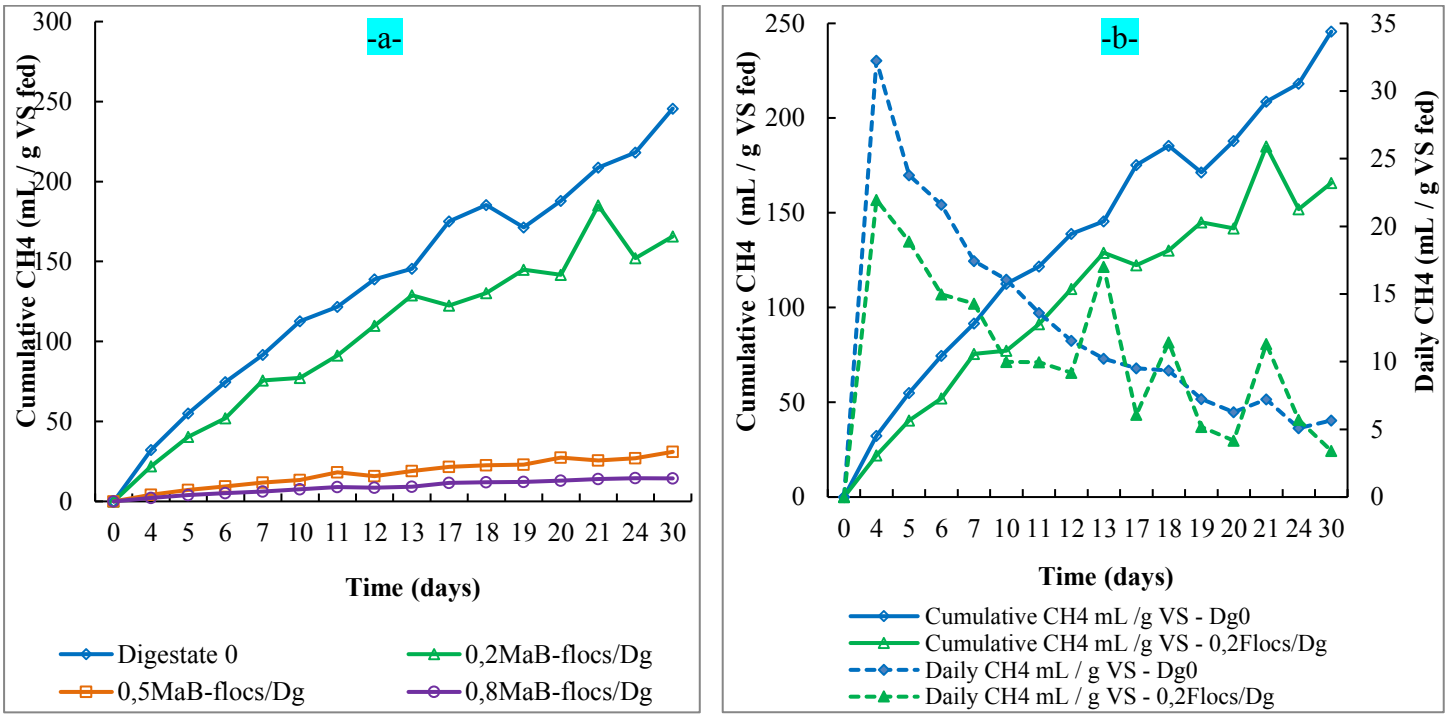
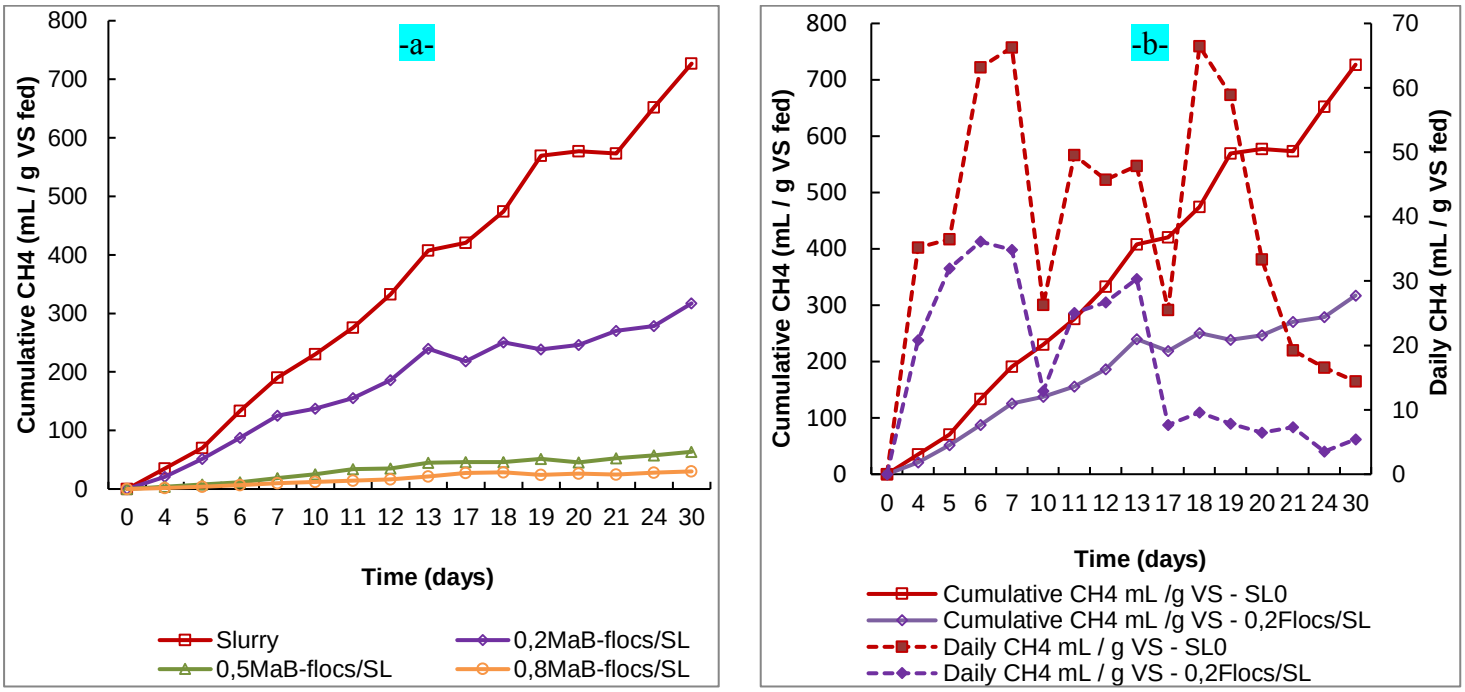

-a-
Cumulative CH4 (mL / g VS fed)
Time (days)
Digestate 0
0,2MaB-flocs/Dg
0,5MaB-flocs/Dg
0,8MaB-flocs/Dg
-b-
Cumulative CH4 (mL / g VS fed)
Daily CH4 (mL / g VS fed)
Time (days)
Cumulative CH4 mL /g VS - Dg0
Cumulative CH4 mL /g VS - 0,2Flocs/Dg
Daily CH4 mL / g VS - Dg0
Daily CH4 mL / g VS - 0,2Flocs/Dg

Figure 8.


-a-
Cumulative CH4 (mL / g VS fed)
Time (days)
Slurry
0,2MaB-flocs/SL
0,5MaB-flocs/SL
0,8MaB-flocs/SL
-b-
Cumulative CH4 (mL / g VS fed)
Daily CH4 (mL / g VS fed)
Time (days)
Cumulative CH4 mL /g VS - SL0
Cumulative CH4 mL /g VS - 0,2Flocs/SL
Daily CH4 mL / g VS - SL0
Daily CH4 mL / g VS - 0,2Flocs/SL

Tables

Table 1. MaB-flocs biomass characteristics after batch culture

MaB-flocs biomass Characteristics / **Unit**		**TSS** g TSS.L^{-1}	**VSS** g VSS.L^{-1}	**AI*** mg VSS .mg^{-1}Chl (a)	**Chl (a)** mg Chl (a) .g^{-1} VSS
Batch culture	T_0	4.48	2.75	288.86 ± 0.1	3.46 ± 0.1
	T_{7days}	3.76	2.35	218 ± 0.2	4.58 ± 0.2

**Autotrophic index: represents the quotient between VSS and chlorophyll (a) values (Apha, 1985)*

665 **Table 2.**

666

Parameter	Liquid Digestate (D_L)				Liquid Slurry (S_L)				Synthetic wastewater
	$(D_L)_0$	10% (D_L)	30% (D_L)	50% (D_L)	$(S_L)_0$	10% (S_L)	30% (S_L)	50% (S_L)	
COD_s ($mg.L^{-1}$)	1184	137	383.6	550	1337	195	562	1034	601
NH_4-N ($mg.L^{-1}$)	192.	19.5	51.1	86.2	129.1	14.4	37	58.4	86.75
pH	7.46				8.3				7.01

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680 **Table 3.**

681

Medias		MaB-flocs Growth rate (d^{-1})(mean value ± SD)
Synthetic wastewater		0.032 ± 0.02
Liquid Digestate	**$(D_L)_0$**	0.011 ± 0.03
	10%D_L	0.015 ± 0.04
	30%D_L	0.024 ± 0.02
	50%D_L	0.018 ± 0.01
Liquid Slurry	**$(S_L)_0$**	0.017 ± 0.01
	10%S_L	0.028 ± 0.02
	30%S_L	0.021± 0.03
	50%S_L	0.018 ± 0.04

682

683

684

685

V.3. Conclusion générale

Les consortiums de microalgues-bactéries ont démontré une efficacité élevée en matière d'élimination des composés organiques (DCO) et des éléments nutritifs (ammonium) au cours du traitement du Digestat et du Lisier dilué. Les meilleures performances sont obtenues avec le Digestat dilué à une concentration de 30 % et le Lisier dilué à une concentration de 10 %. Une dilution plus importante semble avoir un effet avantageux sur les applications futures, probablement en raison de la possibilité d'apporter plus facilement les éléments nutritifs aux flocs-MaB. L'utilisation des D_L pourrait être l'une des clés importantes pour améliorer la durabilité économique et environnementale des processus de production de biomasse multitrophique. Des enquêtes complémentaires sur la qualité des flocs-MaB produits et sur la caractérisation du digestat liquide (D_L) en micronutriments et en résidus de matière organique seront nécessaires pour définir leur application finale dans la production d'énergie via la digestion anaérobie. Cette étude a validé le processus hypothétique en boucle fermée (ZERO déchet).

En ce qui concerne la partie de la co-digestion, à la fois pour Slurry et Digestate, les meilleures conditions sont atteintes par le ratio 0,2 VS_S / VS_I, où les résultats pour Slurry sont considérablement supérieurs aux valeurs indiquées pour le Digestate. Cependant, par rapport à la digestion simple, la co-digestion avec les flocs MaB n'atteint pas des valeurs élevées en termes de production cumulée de biométhane (mL CH_4 / g de VS).

Des études ultérieures évalueraient ce phénomène plus en profondeur afin de comprendre si la co-digestion était un meilleur choix que la digestion classique ou si les conditions de cette expérience n'étaient pas favorables à l'action MaB-flocs.

Conclusion générale et perspectives

Suite à l'exposition à une lumière en continue, les boues aérobies deviennent riches en biomasse verte. Cet enrichissement photosynthétique permet d'introduire des innovations au sein des procédés de traitement des eaux usées tout en remplaçant l'étape aérobie (boue activée) par un procédé multitrophique à base de microalgues-bactéries (flocs-MaB) pour éviter l'apport d'oxygène et éliminer les GES et les odeurs. Ainsi, cette solution innovante a été apportée face à plusieurs défis de manque en ressources énergétiques, hydriques, changements climatiques et une réglementation de plus en plus sévère.

Ce projet de thèse, qui vise à concevoir des bioréacteurs multitrophiques pour le traitement des eaux usées en intégrant le couplage entre les microalgues et les bactéries, a permis de mieux comprendre les relations symbiotiques misent en jeu entre ces micro-organismes. Il s'agit d'un processus de phytobioremédiation ayant pour objectif l'élimination des polluants organiques et minéraux à partir des eaux usées, sans l'apport d'oxygène et sans la libération de CO_2. La biomasse multitrophique des flocs-MaB produite comme étant un substrat ayant un potentiel énergétique considérable, sera par la suite valorisée en biométhane moyennant un procédé de co-digestion anaérobie. Ainsi, le projet intègre à la fois l'élimination des polluants (organiques et minéraux) et la génération de biomasse valorisable en énergie renouvelable. Il permet ainsi de mettre en œuvre un procédé à boucle fermé qui représente bien le concept de l'économie circulaire. Ainsi, le concept d'économie circulaire par lequel la réutilisation et le recyclage des déchets s'est émergé comme alternative attractive pour la préservation des ressources naturelles et la séquestration du dioxyde de carbone. Par conséquent, le présent projet vise à établir un procédé innovant en combinant plusieurs apports positifs, notamment la réduction des émissions du dioxyde de carbone, la bioremédiation des eaux usées et la production de biométhane renouvelable.

Ce travail permet d'élaborer des processus d'immobilisation de la biomasse multitrophique dont les fonctions principales, la protection cellulaire et la phytobioremédiation des polluants, dépendent à la fois des propriétés des matériaux et d'un ensemble de facteurs nutritionnels et environnementaux (DCO, temps d'incubation, mode opératoire, densité des flocs…). Dans ce contexte bien précis, plusieurs aspects ont été étudiés dans le cadre de cette thèse dont l'objectif principal est de former des biofilms multitrophiques en favorisant la récupération des éléments nutritifs et la réduction des émissions de CO_2 dans l'atmosphère.

Dans un premier temps, un système simple d'encapsulation des flocs-MaB sous forme de billes a été lancé afin d'optimiser certains paramètres opératoires (DCO, densité des flocs et temps) pour une application à multi-échelle de traitement des eaux usées. Cette approche a montré la faisabilité des flocs-MaB immobilisés pour l'élimination des composés organiques et des nutriments (N et P) dans un photobioréacteur à micro-échelle en statique. En présence d'écoulement, une faible recirculation du liquide a favorisé l'évolution morphologique des flocs dans un microréacteur. D'autre part, l'étude à méso-échelle dans une colonne 2D a montré la faisabilité de cette technique d'encapsulation des flocs même à faible volume de particules, ce qui est à la faible fréquence de collision. La démarche adopée dans ce travail se base sur l'étude de l'influence des différents conditions hydrodynamiques comme le volume des particles, fréquence de collision et vitesse de cisaillement entre les particules.

L'étude de faisabilité des flocs-MaB a été poussée vers un traitement des eaux usées dynamique à macro-échelle dans un réacteur à lit fluidisé moyennant un volume élevé de bioparticules en suspension. Parmi les points originaux de ce travail, on peut citer l'utilisation des poudres d'olives OPP comme support biodégradable pour développer des biofilms multitrophiques à base de flocs-MaB. Il a été montré que les taux d'élimination des polluants (DCO, NH_4^+ et PO_4^{3-}) et les biofilms formés ont été dépendants de la taille et la concentration des granules d'olives (OPP). De plus, l'adhésion du biofilm a été maximale pour une taille et une concentration élevées (αs, 4 vol.%) d'OPP caractérisés par une haute porosité et rugosité des surfaces. Toutefois, l'épaisseur de biofilm qui détermine ses activités et sa fixation sur les supports est fortement influencé par les conditions hydrodynamiques. Les vitesses de gaz ont été choisies de manière à obtenir une bonne suspension des solides et à limiter l'attrition des bioparticules qui pouvant provoquer la destruction du biofilm. En outre, le comportement hydrodynamique en terme de taux de rétention du gaz et taille des bulles a été légèrement affecté par les propriétés physicochimiques des poudres d'olive. Ces résultats confirment la haute performance des flocs-MaB de se fixer sur des surfaces rigoureuses et poreuses avec un accent particulier sur le traitement des eaux usées sans l'apport d'oxygène et sans la libération de CO_2.

Par ailleurs, l'augmentation de la surface de contact entre les micro-organismes et les supports favorise une meilleure croissance et stabilité du biofilm multitrophique à base des interactions au sein des flocs-MaB. Dans cette expérience, la méthode de mesure d'opacité a permis de suivre la cinétique de développement du biofilms dans un réacteur à disques rotatifs. La structure des disques avec des rainures concentriques sur les surfaces et la faible

vitesse de rotation (10 tours par minute) ont montré un phénomène d'attachement continu du biofilms sur une durée de 57 jours, ce qui favorise l'élimination des polluants par les micro-organismes. Dans ce cas, les biofilms symbiotiques se développent sur les surfaces structurées en remplissant les creux ce qui limite les phénomènes de détachement/décrochement. La performance du processus à biomasse fixe dépends des interactions entre les micro-organismes, de la présence de forces externes, des conditions hydrodynamiques (taux de mélange), de la disponibilité des éléments nutritifs et de la nature du support. Par conséquent, la combinaison entre la géométrie du réacteur et la vitesse superficielle représente le facteur le plus prometteur pour l'extrapolation dans les photobioréacteurs et facilite la mise à l'échelle pilote des systèmes symbiotiques à base des interactions multitrophiques microalgues-bactéries.

L'intégration du couplage microalgues-bactéries dans les procédés de phytobioremédiation a été suivie par une valorisation et réutilisation de biomasse multitrophique pour la production de bioénergie. Ce concept a été validé par des étapes de co-digestion anaérobie dans le but d'améliorer la production de biométhane. En premier temps, le recyclage du Digestat à la sortie du digesteur permet d'obtenir les meilleures performances d'élimination de DCO et d'ammonium suite à une dilution de 30 %. Cette étape de dilution demeure importante pour le développement des flocs-MaB. Ainsi, une forte concentration en nutriments (N) et en composés organiques (C) inhibent la croissance des flocs et par la suite ralentissent les échanges de substrats et de gaz établis entre les microalgues et les bactéries. Au cours de la co-digestion anaérobie des flocs-MaB en présence à la fois du Lisier et du Digestate, les meilleures taux de production cumulée de méthane (mL / g de VS) sont atteintes par le ratio 0,2 VS_s / VS_I. Néanmoins, ces valeurs restent comparables par rapport à la digestion simple. Les MaB-Flocs ne constituent pas une matière première mature pour la co-digestion anaérobie. Par ailleurs, d'autres investigations pourraient être proposées pour améliorer les rendements de production de méthane en introduisant des techniques de prétraitements (mécaniques, chimiques et biologiques) de la biomasse algale.

Durant toutes les expériences menées avec les flocs-MaB, on a pu estimer les mécanismes d'élimination des polluants conduits par les microalgues et les bactéries en corrélation avec la composition du milieu nutritif et l'évolution du pH. La disponibilité du DCO dans les eaux usées et l'apport photosynthétique en oxygène sont essentielles pour les bactéries hétérotrophes pour dégrader la matière organique et libérer le carbone inorganique nécessaire pour la croissance des microalgues autotrophes, qui à leur tour assimilent les

nutriments (ammonium et phosphores). Pour une valeur du pH environ 7.3, les éliminations des phosphates et des ammoniums sont probablement dues aux phénomènes d'adsorption à travers les matrices et de volatilisation, respectivement. En se basant sur les observations microscopiques des consortium, la dominance autotrophique de la population flocs-MaB inhibe les réactions de nitrification/dénitrification assurées par les bactéries hétérotrophes. En lumière continue, les microalgues dominent la compétition pour l'assimilation de l'ammonium. Des hypothèses ont été proposées pour désigner la nature des interactions cellulaires dans les flocs-MaB. L'échange bénéfique des nutriments entre les microalgues et les bactéries confirme le mécanisme de mutualisme. Cette association pourrait être justifiée par un échange de gènes lors de la communication moléculaire "Quorum Sensing" médiée par des signaux de détection. En revanche, à l'issue de cette étude, plusieurs questions se posent, et des analyses supplémentaires apparaissent nécessaires pour une meilleure compréhension de la nature des associations mises en jeu entre les microalgues et les bactéries.

Ce projet vise à mettre en œuvre une technologie innovante à l'échelle laboratoire, puis les résultats obtenus pourrait être explorés à l'échelle pilote tout en garantissant que la technologie soit économiquement compétitive, techniquement viable et applicable sur l'échelle industrielle. De plus, les résultats du projet permettront d'apporter de nouvelles perspectives pour la valorisation des déchets, la réduction de l'impact environnementale des procédés industriels, et à la promotion de l'économie verte et circulaire.

Parmi les voies d'exploration et les applications qui peuvent être envisagées à l'issue de ce travail on peut citer :

-Analyse métagénomique des bioflocs-MaB pour une meilleure compréhension et maîtrise de l'inoculum des photobioréacteurs. Parmi les techniques envisageables on peut citer la TRFLP, le séquençage génomique et la technique de DGGE.

- Optimisation des conditions de culture des microalgues-bactéries (flocs-MaB) sans apport d'O_2 et sans libération de CO_2. Il s'agit de mettre en place une approche rationnelle basée sur l'utilisation des outils de la recherche expérimentale (les plans d'expériences) pour suivre la cinétique de croissance de la biomasse et la biodégradation des substrats. Une étude de la combinaison entre différents facteurs physiques (lumière, température, pH, débit) et chimiques (carbones, phosphates, nitrogènes) pourrait être menée en vue de modéliser la diffusion des substrats (K_S) et d'optimiser la production de la biomasse.

- Caractérisation hydrodynamique des écoulements polyphasiques (champs de vitesse, vitesse de cisaillement…) sur la culture de flocs-MaB dans différents types de photobioréacteur à biomasse fixe et leurs effets sur l'élimination de la pollution et la séquestration du CO_2.

- Amélioration de la conception des bioréacteurs multitrophiques tels que le réacteur à lit fluidisé (FBR) en fonction des résultats des tests hydrodynamiques et de l'attachement du biofilms.

- Les paramètres affectant les performances globales des réacteurs FBR seront examinés en se concentrant sur le traitement des eaux usées. L'influence du temps de la rétention hydraulique, les caractéristiques physico-chimiques des bioparticules, la vitesse superficielle des gaz, la vitesse superficielle des liquides, l'expansion du lit et les caractéristiques de transfert de masse seront bien focalisées sur la performance du processus.

- L'effet de la dominance autotrophique des diatomés et des cyanobactéries dans le consortium devrait être mieux analysé, afin d'expliquer la répartition en couches de ces micro-organismes sur les surfaces notamment au cours des phases d'attachement du biofilms.

- Développement des techniques de récolte de la biomasse algale dans les photobioréacteurs. Des essais de concentration par des systèmes de filtration sous vide, par floculation et par une nouvelle technique basée sur les membranes seront également envisagés. L'objectif final est l'élaboration de protocoles expérimentaux appropriés et non couteux pour la récolte de la biomasse algale.

- Amélioration de la performance des flocs-MaB par des méthodes de prétraitement (thermique, mécanique et enzymatique) dans le but d'optimiser la co-digestion anaérobie et augmenter les taux de biogaz produits.

- Extrapolation des résultats obtenus à l'échelle laboratoire afin de construire une installation pilote intégrante un digesteur anaérobie et le procédé multitrophique à base de flocs-MaB pour le traitement des eaux usées, ou éventuellement améliorer un système d'épuration existant dans les industries.

Références bibliographiques

Ajeej, A., Thanikal, J. V., Narayanan, C. M., & Kumar, R. S. (2015). An overview of bio augmentation of methane by anaerobic co-digestion of municipal sludge along with microalgae and waste paper. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *50*, 270-276.

Alcántara, C., Domínguez, J. M., García, D., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2015). Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic–aerobic algal–bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances. *Bioresource Technology*, *191*, 173-186.

Amin, S. A., Green, D. H., Hart, M. C., Küpper, F. C., Sunda, W. G., & Carrano, C. J. (2009). Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*, 17071-17076.

Ashen, J. B., & Goff, L. J. (2000). Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *Applied and environmental microbiology*, *66*, 3024-3030.

Awuah, E. (2006). Pathogen removal mechanisms in macrophyte and algal waste stabilization ponds.

Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, *30*, 1225-1228.

Batstone, D. J., Hülsen, T., Mehta, C. M., & Keller, J. (2015). Platforms for energy and nutrient recovery from domestic wastewater: A review. *Chemosphere*, *140*, 2-11.

Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Kumar, R. R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., & Palani, S. (2015). Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *47*, 634-653.

Bišová, K., & Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 2585-2602.

Bjornsson, W. J., Nicol, R. W., Dickinson, K. E., & McGinn, P. J. (2013). Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, *25*, 1523-1528.

Boelee, N. C., Janssen, M., Temmink, H., Taparavičiūtė, L., Khiewwijit, R., Janoska, A., & Wijffels, R. H. (2014a). The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing. *Journal of Applied Phycology*, *26*, 1439-1452.

Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., & Wijffels, R. H. (2014b). Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors treating synthetic municipal wastewater. *Ecological Engineering*, *64*, 213-221.

Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J., & Wijffels, R. H. (2012). Scenario analysis of nutrient removal from municipal wastewater by microalgal biofilms. *Water*, *4*, 460-473.

Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360-369.

Cheah, W. Y., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., & Juan, J. C. (2015). Biosequestration of atmospheric CO2 and flue gas-containing CO2 by microalgae. *Bioresource Technology*, *184*, 190-201.

Cheirsilp, B., Thawechai, T., & Prasertsan, P. (2017). Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. *Bioresource Technology*, *241*, 787-794

Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., & Chen, J. (2015). Macroalgae for biofuels production: progress and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *47*, 427-437.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, *25*(3), 294-306.

Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, C. H., Kuan, T. C., Ong, S. C., & Lin, C. S. (2008). Reduction of CO2 by a high-density culture of Chlorella sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, *99*, 3389-3396.

Cho, D. H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2015). Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, *175*, 578-585.

Cooper, M. B., & Smith, A. G. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*, *26*, 147-153.

Craggs, R. J., Lundquist, T. J., & Benemann, J. R. (2013). Wastewater treatment and algal biofuel production. In *Algae for biofuels and energy* (pp. 153-163). Springer Netherlands.

Crane, K. W., & Grover, J. P. (2010). Coexistence of mixotrophs, autotrophs, and heterotrophs in planktonic microbial communities. *Journal of Theoretical Biology*, *262*, 517-527.

Crofcheck, C. L., Monstross, M., Xinyi, E., Shea, A. P., Crocker, M., & Andrews, R. (2012). Influence of media composition on the growth rate of Chlorella vulgaris and Scenedesmus acutus utilized for CO_2 mitigation. In *2012 Dallas, Texas, July 29-August 1, 2012* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B 12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, *438*(7064), 90.

De Godos, I., González, C., Becares, E., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2009). Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*, 187-194.

De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Morey, T., & Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, *38*, 466-474.

Demirbas, M. F. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, *88*, 3473-3480.

Dioha, I. J., Ikeme, C. H., Nafi'u, T., Soba, N. I., & Yusuf, M. B. S. (2013). Effect of carbon to nitrogen ratio on biogas production. *International Research Journal of Natural Sciences*, *1*, 1-10.

Dobretsov, S., Teplitski, M., Alagely, A., Gunasekera, S. P., & Paul, V. J. (2010). Malyngolide from the cyanobacterium Lyngbya majuscula interferes with quorum sensing circuitry. *Environmental Microbiology Reports*, *2*, 739-744.

Doncaster, C. P., Jackson, A., & Watson, R. A. (2013). Manipulated into giving: when parasitism drives apparent or incidental altruism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *280*, 20130108.

Droop, M. R. (2007).Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging?. *Journal of Plankton Research*, *29*, 107-113.

Gerardo, M. L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T., & Skill, S. C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: a review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, *11*, 248-262.

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

Gram, L., Grossart, H. P., Schlingloff, A., & Kiørboe, T. (2002). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by Roseobacter strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 4111-4116.

Chiu S-Y, Kao C-Y, Tsai M-T, Ong S-C, Chen C-H, Lin C-S. (2009). Lipid accumulation and CO_2 utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO_2 aeration. Bioresource Technollogy,100, 833–8.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., & Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*, *52*, 9-18.

Hallmann, A. (2006). Morphogenesis in the family Volvocaceae: different tactics for turning an embryo right-side out. *Protist*, *157*, 445-461.

Hamdi, M. (2016). Lessons from rhizosphere and gastrointestinal ecosystems for inventive design of sustainable wastes recycling bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, *105*, 62-70.

He, P. J., Mao, B., Lü, F., Shao, L. M., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). The combined effect of bacteria and Chlorella vulgaris on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, *146*, 562-568.

Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. (2013). Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresource Technology*, *135*, 598-603.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, *87*, 38-46.

Kawafune, K., Hongoh, Y., & Nozaki, H. (2014). A rickettsial endosymbiont inhabiting the cytoplasm of Volvox carteri (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia*, *53*, 95-99.

Kim, B.H., Kang, Z., Ramanan, R., Choi, J.E., Cho, D.H., Oh, H.M., et al., (2014b). Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond (HRAP) using real municipal wastewater. Journal of Microbiologyand Biotechnology, 24, 1123–1132

Kim, B.-H., Ramanan, R., Cho, D.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S., (2014a). Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. Biomass Bioenergy 69, 95–105

Kim, M.-J., Jeong, S.-Y., Lee, S.-J., (2008). Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against Cochlodinium polykrikoides. Journal of Applied Phycology, 20, 1069–1078.

Kirk DL. (2004). Volvox. Current Biology 14, 599–600.

Koreivienė, J., Valčiukas, R., Karosienė, J., & Baltrėnas, P. (2014). Testing of Chlorella/Scenedesmus microalgae consortia for remediation of wastewater, CO_2 mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, *22*, 105-114.

Kumar, K., Dasgupta, C. N., Nayak, B., Lindblad, P., & Das, D. (2011). Development of suitable photobioreactors for CO_2 sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, *102*, 4945-4953.

Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae-a literature review. *Vatten*, *62*, 31.

Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1997). Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized Chlorella vulgaris. *Environmental Technology*, *18*, 945-951.

Lee, J., Cho, D. H., Ramanan, R., Kim, B. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2013). Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of Chlorella vulgaris. *Bioresource Technology*, *131*, 195-201.

Lee, S. H., Oh, H. M., Jo, B. H., Lee, S. A., Shin, S. Y., Kim, H. S., ...& Ahn, C. Y. (2014). Higher biomass productivity of microalgae in an attached growth system, using wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 1566-1573.

Lee, Y. K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, *13*, 307-315.

Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F., & Wong, M. (2013). Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of Chlorella vulgaris and Bacillus licheniformis. *Chemosphere*, *92*, 1383-1389.

lien photos(cyano)http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/fedor_kara/gallery.htm

Massa, M., Buono, S., Langellotti, A. L., Castaldo, L., Martello, A., Paduano, A., ...& Fogliano, V. (2017). Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for Tetradesmus obliquus, Botryococcus braunii, Phaeodactylum tricornutum and Arthrospira maxima. *New Biotechnology*, *36*, 8-16.

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 217-232.

Matsumoto, T. (2012). Hydrodynamic characterization and performance evaluation of an aerobic three phase airlift fluidized bed reactor in a recirculation aquaculture system for Nile Tilapia production. *Aquacultural Engineering*, *47*, 16-26.

Mayali, X., & Azam, F. (2004). Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *51*, 139-144.

Mukherji, S., & Chavan, A. (2012). Treatment of aqueous effluents containing non-aqueous phase liquids in rotating biological contactor with algal bacterial biofilm. *Chemical Engineering Journal*, *200*, 459-470.

Munoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, *40*, 2799-2815.

Nam, T.K., Timmons, M.B., Montemagno, C.D., Tsukuda, S.M. (2000). Biofilm characteristics as affected by sand size and location in fluidized bed vessels. Aquaculture Engineering, 22, 213–224.

Natrah, F. M. I., Kenmegne, M. M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Aquaculture*, *317*, 53-57.

Oswald, W.J., Gotaas, H.B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. Transaction of the American Society of Civil Engineers, 122, 73–105.

Oswald, W.J., Gotaas, H.B., Ludwig, H.F. and Lynch, V. (1953). Algae symbiosis in oxidation ponds, III. Photosynthetic Oxygenation. Sewage and Industrial Wastes 25, 692-705.

Park, J. B. K., & Craggs, R. J. (2011). Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Science and Technology*, *63*, 2403-2410.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N. (2013). Enhancing biomass energy yield from pilotscale high rate algal ponds with recycling. Water Research, 47, 4422–4432.

Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, *102*, 10163-10172.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, *45*, 11-36.

Posadas, E., García-Encina, P. A., Soltau, A., Domínguez, A., Díaz, I., & Muñoz, R. (2013). Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal–bacterial biofilm bioreactors. *Bioresource Technology*, *139*, 50-58.

Posten, C., & Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—a process view. *Journal of Biotechnology*, *142*(1), 64-69.

Rada-Ariza, A. M., Lopez-Vazquez, C. M., van der Steen, N. P., & Lens, P. N. L. (2017). Nitrification by microalgal-bacterial consortia for ammonium removal in flat panel sequencing batch photo-bioreactors. *Bioresource Technology*, *245*, 81-89.

Raheem, A., Azlina, W. W., Yap, Y. T., Danquah, M. K., & Harun, R. (2015). Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *49*, 990-999.

Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, *34*, 14-29.

Ras M, Lardon L, Sialve B, Bernet N, Steyer J-P. (2011) Experimental study on a coupled process of production an anaerobic digestion of Chlorella vulgaris. Bioresource Technology, 102, 200–206

Rasmussen, T.B., Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology, 152, 895–904

Razzak, S. A., Ali, S. A. M., & Hossain, M. M. (2017). Biological CO_2 fixation with production of microalgae in wastewater–A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *76*, 379-390.

Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S., & de Lasa, H. (2013). Integrated CO_2 capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 622-653.

Rivas, M.O., Vargas, P., Riquelme, C.E. (2010). Interaction of Botryococcus braunii cultures with bacterial biofilm. Microbiology Ecology, 60, 628–635.

Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. Nature Reviews Microbiology, 5, 355–362.

Sambusiti, C., Bellucci, M., Zabaniotou, A., Beneduce, L., & Monlau, F. (2015). Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *44*, 20-36.

Santos, C. A., & Reis, A. (2014). Microalgal symbiosis in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*, 5839-5846.

Shayan, S. I., Agblevor, F. A., Bertin, L., & Sims, R. C. (2016). Hydraulic retention time effects on wastewater nutrient removal and bioproduct production via rotating algal biofilm reactor. *Bioresource Technology*, *211*, 527-533.

Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource Technology*, *105*, 67-73.

Takei, T., Ikeda, K., Ijima, H., & Kawakami, K. (2011). Fabrication of poly (vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization. *Process Biochemistry*, *46*, 566-571.

Ummalyma, S. B., Gnansounou, E., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., Pandey, A., & Sahoo, D. (2017). Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae–An overview. *Bioresource Technology*, *242*, 227-235.

Unnithan, V. V., Unc, A., & Smith, G. B. (2014). Mini-review: a priori considerations for bacteria–algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. *Algal Research*, *4*, 35-40.

Van Den Hende, S., 2014. Microalgal bacterial flocs for wastewater treatment: from concept to pilot scale. Ph.D. dissertation. Ghent University, Ghent, Belgium.

Van Den Hende, S., Beelen, V., Bore, G., Boon, N., & Vervaeren, H. (2014b). Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: from lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresource Technology*, *159*, 342-354.

Van Den Hende, S., Carré, E., Cocaud, E., Beelen, V., Boon, N., & Vervaeren, H. (2014a). Treatment of industrial wastewaters by microalgal bacterial flocs in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, *161*, 245-254.

Van Den Hende, S., Laurent, C., & Bégué, M. (2015). Anaerobic digestion of microalgal bacterial flocs from a raceway pond treating aquaculture wastewater: need for a biorefinery. *Bioresource Technology*, *196*, 184-193.

Van Den Hende, S., Rodrigues, A., Hamaekers, H., Sonnenholzner, S., Vervaeren, H., & Boon, N. (2017). Microalgal bacterial flocs treating paper mill effluent: A sunlight-based approach for removing carbon, nitrogen, phosphorus, and calcium. *New Biotechnology*, *39*, 1-10.

Van Den Hende, S., Vervaeren, H., & Boon, N. (2012). Flue gas compounds and microalgae:(Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnology Advances*, *30*, 1405-1424.

Van Pham, D., & Bach, L. T. (2014). Immobilized bacteria by using PVA (Polyvinyl alcohol) crosslinked with Sodium sulfate. *International Journal of Science and Engineering*, *7*, 41-47.

Vasseur, C., Bougaran, G., Garnier, M., Hamelin, J., Leboulanger, C., Le Chevanton, M., ... & Fouilland, E. (2012). Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae–bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: first step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, *119*, 79-87.

Vassilev, S. V., & Vassileva, C. G. (2016). Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: an overview. *Fuel*, *181*, 1-33.

Vulsteke, E., Van Den Hende, S., Bourez, L., Capoen, H., Rousseau, D. P., & Albrecht, J. (2017).Economic feasibility of microalgal bacterial floc production for wastewater treatment

and biomass valorization: A detailed up-to-date analysis of up-scaled pilot results. *Bioresource technology*, *224*, 118-129.

Wágner, D. S., Radovici, M., Smets, B. F., Angelidaki, I., Valverde-Pérez, B., & Plósz, B. G. (2016). Harvesting microalgae using activated sludge can decrease polymer dosing and enhance methane production via co-digestion in a bacterial-microalgal process. *Algal Research*, *20*, 197-204.

Wang, B., &Lan, C. Q. (2011). Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga Neochloris oleoabundans in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology*, *102*, 5639-5644.

Wang, B., Li, Y., Wu, N., &Lan, C. Q. (2008). CO_2 bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*, 707-718.

Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., & Ruan, R. R. (2010b). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae Chlorella sp. *Bioresource Technology*, *101*, 2623-2628.

Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., ...& Ruan, R. (2010a). Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*, 1174-1186.

Wang, M., Kuo-Dahab, W. C., Dolan, S., & Park, C. (2014). Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, Chlorella sp. and Micractinium sp., in wastewater treatment. *Bioresource technology*, *154*, 131-137.

Wieczorek, N., Kucuker, M. A., & Kuchta, K. (2015). Microalgae-bacteria flocs (MaB-Flocs) as a substrate for fermentative biogas production. *Bioresource Technology*, *194*, 130-136.

Wieczorek, N., Kucuker, M.A., Kuchta, K. (2014). Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (Chlorella vulgaris) in a twostage combined process. Applied of Energy, 132, 108–117.

Yadav, G., & Sen, R. (2017). Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological advances in climate research. *Journal of CO_2 Utilization*, *17*, 188-206.

Yadav, G., Karemore, A., Dash, S. K., & Sen, R. (2015). Performance evaluation of a green process for microalgal CO_2 sequestration in closed photobioreactor using flue gas generated in-situ. *Bioresource Technology*, *191*, 399-406.

Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2014). Design of photobioreactors for algal cultivation. In *Biofuels from algae*(pp. 23-45).

Zachleder, V., Bišová, K., Vítová, M., Kubín, Š.,& Hendrychová, J. (2002). Variety of cell cycle patterns in the alga Scenedesmus quadricauda (Chlorophyta) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors. *European Journal of Phycology*, *37*, 361-371.

Zamalloa, C., Boon, N., & Verstraete, W. (2012). Anaerobic digestibility of Scenedesmus obliquus and Phaeodactylum tricornutum under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, *92*, 733-738.

Zhao, B., & Su, Y. (2014). Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *31*, 121-132.

Zhou, D., Zhang, C., Fu, L., Xu, L., Cui, X., Li, Q., & Crittenden, J. C. (2017). Responses of the Microalga Chlorophyta sp. to Bacterial Quorum Sensing Molecules (N-Acylhomoserine Lactones): Aromatic Protein-Induced Self-Aggregation. *Environmental science & Technology*, *51*, 3490-3498.

Zain, N. A. M., Suardi, S. M., & Idris, A., 2010. Hydrolysis of liquid pineapple waste by invertase immobilized in PVA–alginate matrix. Biochemical Engineering Journal, 50, 83-89.

Résumé

Le traitement biologique des eaux usées urbaines et industrielles reste une activité ayant un impact négatif sur l'environnement et sur le changement climatique par l'émission des gaz à effet de serre (GES), notamment le CO_2. Les changements innovants au niveau des procédés de traitement des eaux usées par l'intégration des flocs de microalgues-bactéries ont abouti à des procédés multitrophiques sans apport d'O_2 et sans dégagement du CO_2. Il s'agit d'une étude de faisabilité de ces flocs-MaB pour la photobioremédiation des polluants (organiques et minéraux) et pour la production de biomasse valorisable en bioénergie dans le cadre de l'économie circulaire. En présence de la lumière, les flocs-MaB ont été intégrés dans des photobioréacteurs à biomasse fixe afin d'assurer un traitement durable des eaux usées grâce aux échanges symbiotiques entre les micro-oragnismes en terme de nutriments et de gaz. L'encapsulation des flocs-MaB dans des billes de PVA-alginate a montré l'effet des conditions physico-chimiques et hydrodynamiques sur l'élimination des polluants et l'évolution multicellulaire des flocs au sein des réacteurs à multi-échelles. Par ailleurs, la biomasse multitrophique immobilisée sur des supports biodégradables d'olive (OPP) et sur des disques en Plexiglace a assuré une meilleure performance des bioréacteurs à lit fluidisé et à disques rotatifs, respectivement, pour la bioremédiation des eaux usées. Les propriétés des supports (porosité, rugosité et structure) et les comportements hydrodynamiques ont été contrôlés pour favoriser l'attachement des biofilms multitrophiques. Le développement de biofilm montre l'effet des interactions multitrophiques entre les microalgues et les bactéries sur l'élimination des composés organiques (DCO) et nutriments (ammonium et phosphore). La biomasse des flocs-MaB a été récupérée et réutilisée pour le traitement du digestat liquide à l'issu du digesteur et pour améliorer la production de biométhane par une co-digestion anaérobie. Ce procédé multitrophique et intégré permet d'obtenir Zéro déchet à la sortie du processus.

Mots clés: Flocs de microalgues-bactéries, bioréacteurs multitrophiques, interactions symbiotiques, support biodégradables, économie circulaire, encapsulation, approche multi-échelle, bioremédiation des eaux usées.

Abstract

The biological treatment of urban and industrial wastewaters represents a process with a negative impact on the environment and on climate change through the emission of greenhouse gases (GHG), particularly CO_2. In the presence of light, microalgae-bacteria flocs (MaB-flocs) have been integrated into photobioreactors with fixed biomass to ensure a sustainable wastewater treatment without O_2 supply and CO_2 release. The entrapment of flocs in PVA-alginate beads has shown the effect of physicochemical and hydrodynamic conditions on the elimination of pollutants and the multicellularity evolution within multi-scale bioreactors. In addition, the immobilization of biomass on biodegradable olive carriers and on PVC disks provided a better performance of fluidized bed and rotating discs bioreactors, respectively, for the bioremediation of wastewater. The properties of the supports (porosity, roughness, and structure) and the hydrodynamic behaviors have favored the attachment of multitrophic biofilms. Biofilm development shows the effect of multitrophic interactions between microalgae and bacteria on the organic compounds (COD) and nutrients (ammonium and phosphorus) removals. The MaB-flocs biomass was recovered and reused for the treatment of the digestate and to improve the production of biomethane by anaerobic co-digestion. This integrated multitrophic technology makes it possible to obtain zero wastes at the end of the process.

Keywords: Microalgae-bacteria flocs, multitrophic bioreactors, symbiotic interactions, biodegradable supports, circular economy, encapsulation, multi-scale approach, bioremediation of wastewater.