



## 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](mailto: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.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 floccs 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

<b>Mme Kenza BENZADOK</b>	Professeure, Univ. USTHB - Algérie	Rapporteure
<b>Mme Fatma HAMAËID</b>	Maître de conférences, CNSTN , Technopole Sidi Thabet - Tunis	Rapporteure
<b>M. Christophe VIAL</b>	Professeur, Polytech, Univ. UBP - Clermont-Ferrand	Examineur
<b>M. Huai Zhi LI</b>	Professeur, LRGP, ENSIC, Univ. Lorraine - Nancy	Directeur de thèse
<b>M. Moktar HAMDI</b>	Professeur, LETMi, INSAT, Univ. Carthage - Tunisie	Directeur de thèse
<b>Mme Nouceiba ADOUANI</b>	Maître de conférences, LRGP, ENSIC, Univ. Lorraine - Nancy	Invitée
<b>Mme Souhila PONCIN</b>	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 congrès 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 11<sup>ème</sup> 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: "30<sup>ème</sup> 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) à l'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'aimerais 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 rapporteuses de ce projet de thèse. Mes remerciements s'adressent aussi à Christophe Vial, professeur à Polytechnique Clermont Ferrand, pour avoir accepté 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

<b>MaB-flocs</b> : Microalgae-Bacteria flocs	<b>R<sub>CO2</sub></b> : Taux de fixation du CO <sub>2</sub>
<b>PBR</b> : Photobioréacteur	<b>P</b> : Productivité Biomasse
<b>CSC</b> : Captage et stockage du CO <sub>2</sub>	<b>M<sub>CO2</sub></b> : Poids moléculaire du dioxyde de carbone
<b>CO<sub>2</sub></b> : Dioxyde de carbone	<b>M<sub>C</sub></b> : Poids moléculaire du carbone
<b>SBR</b> : Sequencing Batch Reactor	<b>C<sub>CO2</sub></b> : Contenu de CO <sub>2</sub> .
<b>MMBR</b> : Microscale multitrophic batch reactor	<b>H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> : Acide carbonique
<b>PVA</b> : Polyvinyl Alcohol	<b>HCO<sub>3</sub></b> : Carbonate d'hydrogène
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> : Acide borique	<b>CO<sub>3</sub><sup>-2</sup></b> : Carbonate
<b>(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na)<sub>n</sub></b> : Solution d'alginate	<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b> : Dihydrogène de Phosphate
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> : Solution de sulfate	<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> : Hydrogène de Phosphate
<b>HRT</b> : Hydraulic Retention Time	<b>TN</b> : Azote Total
<b>WWs</b> : Synthetic wastewater	<b>TP</b> : Phosphore Total
<b>BBM</b> : Bold's Basal Medium	<b>HRAPs</b> : High Rate Algal Ponds
<b>QS</b> : Quorum Sensing	<b>GHG</b> : Greenhouse Gasses
<b>AHL</b> : Acyl-Homosérine-Lactones	<b>SEM</b> : Scanning Electron Microscope
<b>DCO</b> : Chemical Oxygen Demand	<b>TSS</b> : Total Suspended Solids
<b>DA</b> : Digestion Anaérobie	<b>VSS</b> : Volatile Suspended Solids
<b>RBM</b> : Rendement Biochimique en Méthane	<b>Chl(a)</b> : Chlorophyll (a) concentration
<b>CH<sub>4</sub></b> : Méthane	<b>AI</b> : Autotrophic Index
<b>DL</b> : Liquid Digestate	<b>MRBC</b> : Multitrophic Rotating Biofilm Contactor
<b>SL</b> : Liquid Slurry	<b>α<sub>s</sub></b> : Solid fraction
<b>MFBBR</b> : Multitrophic Fluidization Biofilm Bed Reactor	<b>U<sub>g</sub></b> : Débits de gaz
<b>OPP</b> : Olive Pit Powder	<b>ε</b> : Gas holdup
<b>Chl(a)</b> : Chlorophylle(a),	<b>ρ</b> : Bulk density
<b>PO<sub>4</sub>-P</b> : Phosphore	<b>£</b> : Porosity
<b>NH<sub>4</sub>-N</b> : Ammonium NH <sub>4</sub> -N	<b>K<sub>m</sub></b> : Kinetic constan
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> : Nitrite	<b>D<sub>m</sub></b> : Mean diameter des floes
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> : Nitrate	

## SOMMAIRE

<b>Introduction générale et objectifs.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. Les acquis scientifiques.....</b>	<b>4</b>
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
<b>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.....</b>	<b>47</b>
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

<b>CHAPITRE III. Etude de faisabilité des floes de microalgues-bactéries fixés sur des poudres d'olives biodégradables pour le traitement des eaux usées.....</b>	<b>101</b>
III.1. Introduction.....	102
III.2. Effet des propriétés des granules d'olive contenant des floes de bactéries-microalgues sur l'élimination des polluants dans un réacteur lit fluidisé-SBR à biofilms.....	102
III.3. Conclusion générale.....	134
<b>CHAPITRE IV. Etude de faisabilité des floes de microalgues-bactéries dans un réacteur à disques rotatifs pour le traitement des eaux usées.....</b>	<b>135</b>
IV.1. Introduction.....	136
IV.2. Traitement des eaux usées dans un réacteur à disques rotatifs à base de microalgues-bactéries floes.....	136
IV.3. Conclusion générale.....	162
<b>CHAPITRE V. Valorisation de la biomasse des floes-MaB par une co-digestion anaérobie pour la production de biogaz.....</b>	<b>163</b>
V.1. Introduction.....	164
V.2. Valorisation de la biomasse multitrophique MaB-floes pour la production de biogaz par une co-digestion anaérobie et recyclage des nutriments à partir du digestat.....	164
V.3. Conclusion générale.....	194
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>195</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>201</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>213</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>214</b>

## 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, entraîne la prolifération 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-bioremediation, 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<sub>2</sub>.

Le projet de thèse en cotutelle intitulé "Traitement des eaux usées dans des bioréacteurs multitrophiques grâce à des flocons 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 biogaz moyennant 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 et des 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-bioremediation 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 floccs-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 floccs 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 floccs-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 multitrophique de floccs-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**

---

<b>Chapitre I: Les acquis scientifiques.....</b>	<b>4</b>
<b><u>I.1. Valorisation de la biomasse algale.....</u></b>	<b>9</b>
<b>I.1.1. Classification taxonomique des algues.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1.2. Systèmes de culture des microalgues - Technologies de photobioréacteurs.....</b>	<b>10</b>
<i>I.1.2.1. Types de réacteurs.....</i>	<i>10</i>
<i>I.1.2.2. Les paramètres de croissance.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.3. Les conditions de culture.....</i>	<i>13</i>
<b>I.1.3. Captage et stockage du CO<sub>2</sub> (CSC).....</b>	<b>14</b>
<i>I.1.3.1. Méthode biologique de capture et stockage de CO<sub>2</sub> par les microalgues.....</i>	<i>14</i>
<i>I.1.3.2. Mécanisme de photosynthèse.....</i>	<i>15</i>
<b>I.1.4. Assainissement des eaux usées par les microalgues.....</b>	<b>16</b>
<i>I.1.4.1. Les caractéristiques des eaux usées.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.4.2. Les mécanismes d'élimination des nutriments adoptés par les microalgues.....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.4.3. Le rôle des consortiums de microalgues dans l'élimination des polluants.....</i>	<i>18</i>
<b><u>I. 2. Evolution des bactéries et des microalgues.....</u></b>	<b>19</b>
<b>I.2.1. L'évolution de la multicellularité des algues - les bactéries jouent-elles un rôle?..</b>	<b>19</b>
<b>I.2.2. Régulation du cycle cellulaire des microalgues.....</b>	<b>20</b>
<b><u>I.3. Ecologie des interactions entre les microalgues-bactéries.....</u></b>	<b>22</b>
<b>I.3.1. Les types d'associations entre les microalgues-bactéries.....</b>	<b>22</b>
<i>I.3.1.1. Mutualisme.....</i>	<i>23</i>
<i>I.3.1.2. Commensalisme.....</i>	<i>23</i>
<i>I.3.1.3. Parasitisme.....</i>	<i>24</i>
<b>I.3.2. Les Habitats.....</b>	<b>24</b>

---

<i>I.3.2.1. Phycosphère : un micro-environnement intime</i> .....	24
<b>I.3.3. Les mécanismes d'interaction</b> .....	<b>25</b>
<i>I.3.3.1. Rôle de l'état nutritionnel dans la structure des communautés bactériennes et algales, leur diversité et leur interaction</i> .....	25
<i>I.3.3.2. Communication moléculaire "Quorum Sensing"</i> .....	26
<b><u>I.4. Récupération de la biomasse des floccs-MaB par bio-floculation</u></b> .....	<b>28</b>
<b><u>I.5. Applications potentielles des floccs de microalgues-bactéries (floccs-MaB)</u></b> .....	<b>30</b>
<b>I.5.1. Systèmes de traitement des eaux usées avec de cellules suspendues</b> .....	<b>30</b>
<i>I.5.1.1. Systèmes "ouverts"</i> .....	30
<i>I.5.1.2. Systèmes "fermés"</i> .....	30
<b>I.5.2. Systèmes de traitement des eaux usées avec des cellules immobilisées</b> .....	<b>33</b>
<i>I.5.2.1. Systèmes d'immobilisation des MaB-floccs dans des polymères: Matrices d'encapsulation</i> .....	34
<i>I.5.2.2. Systèmes d'immobilisation des floccs-MaB dans des réacteurs à biofilm microalgal-bactérien</i> .....	35
<b><u>I.6. Valorisation des floccs-MaB par une co-digestion anaérobie et bioremédiation des digestats</u></b> .....	<b>37</b>
<b>I.6.1. Co-digestion anaérobie des floccs-MaB pour la production du méthane</b> .....	<b>37</b>
<i>I.6.1.1. Facteurs affectant la co-digestion anaérobie</i> .....	39
<b>I.6.2. Valorisation des digestats anaérobies comme étant des sources nutritives utiles pour la culture des floccs-MaB</b> .....	<b>40</b>
<b><u>I.7. Les défis actuels des consortiums de floccs-MaB et les besoins de recherche</u></b> .....	<b>41</b>
<b><u>I.8. Conclusion</u></b> .....	<b>42</b>
<b><u>I.9. Positionnement et démarche expérimentale</u></b> .....	<b>43</b>

## 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](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
- 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](#)).....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 petites 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<sub>1</sub>: Cellule avant le début du clivage, A<sub>2-5</sub>: 4 clivages de cellules longitudinales, une plakée à 16 cellules est formée; A<sub>6</sub>: Vue latérale de la plakée 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 microalgues 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 floccs-MaB (Gerardo *et al.*, 2015).....29

**Figure I.12.** Processus de traitement des eaux usées avec les floccs-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

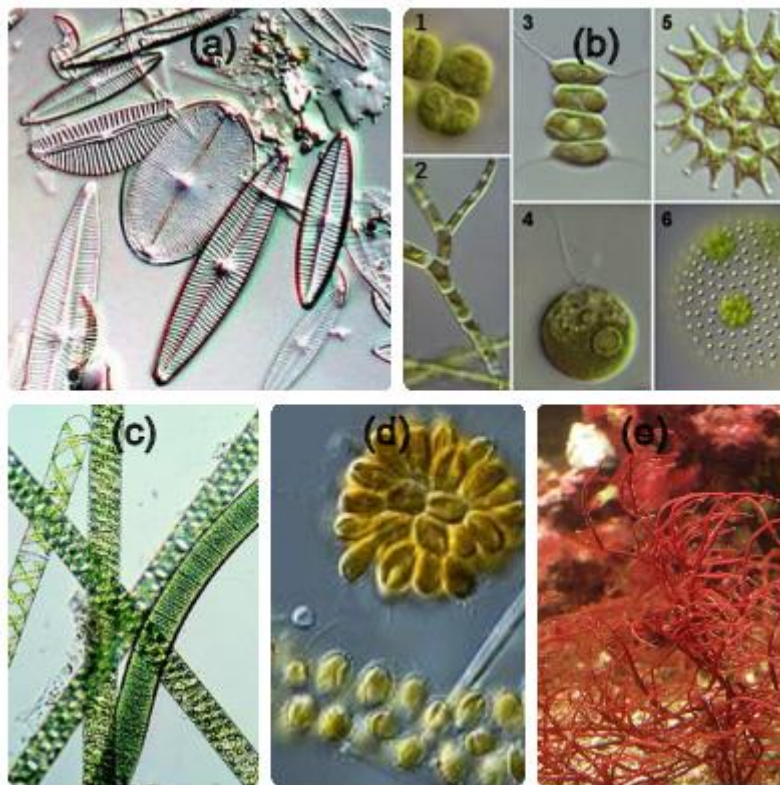
**Tableau I.5.** Classification des polymères d'encapsulation.....34

**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  $\mu\text{m}$  et dont le diamètre est normalement compris entre 1 et 30  $\mu\text{m}$  (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, bleu-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. *Pediatrum*, 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](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



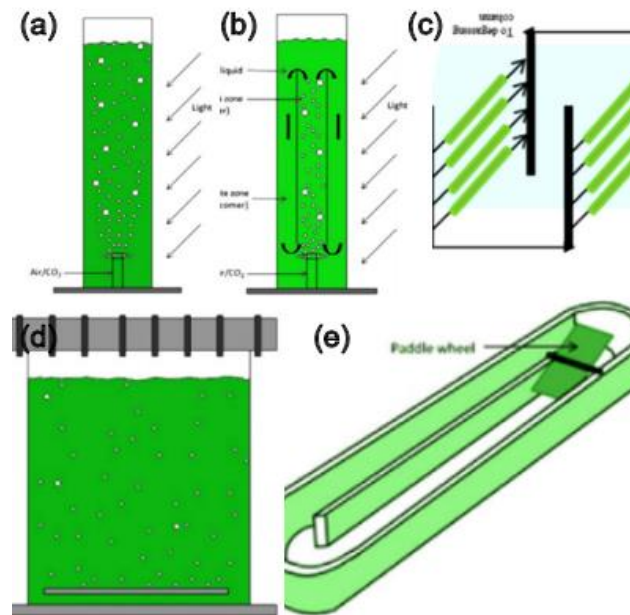
cyanobactéries bleues et bleue-verte (*Cyanophyceae*); (d) doré (*Chrysophyceae*); et (e) des algues rouges (*Rhodophyceae*) (Vassilev *et al.*, 2016). En effet, les diatomées représentent la forme de vie la plus dominante et le groupe le plus producteur de biomasse sur Terre (Demirbas *et al.*, 2011). 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 photosynthétiques, 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<sub>2</sub> 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 mis 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 et la 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 culture sont 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 industrielle causées par l'accrochage de la biomasse et des coûts de construction plus élevés (Posten *et al.*, 2009).

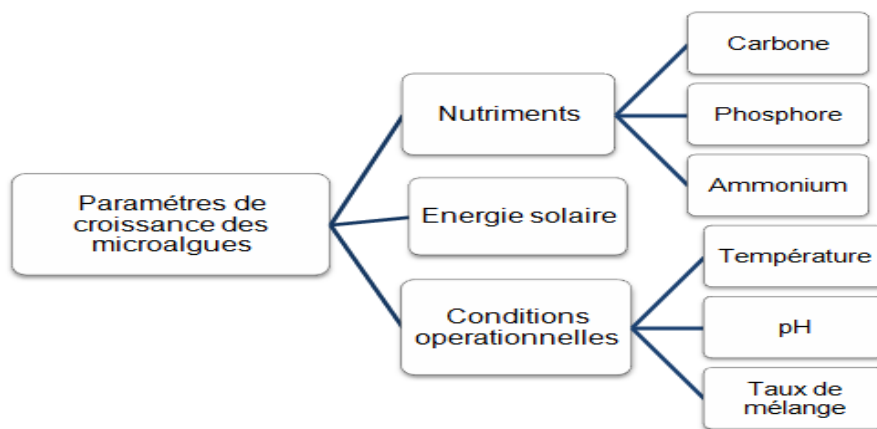


**Figure I.2.** Principales configurations des PBRs: (a) Colonne à bulles; (b) Air-lift; (c) PBR tubulaires, (d) Plaque plane, (e) Etang Raceway (Yadav *et al.*, 2017).

D'autre part, les systèmes "ouverts" sont des installations extérieures qui peuvent être divisées en deux catégories: les étangs naturels (lacs et lagunes) 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<sub>2</sub> 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 *et al.*, 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> soient disponibles uniformément dans tout le réacteur (Cheah *et al.*, 2015). En ce qui concerne l'élimination des nutriments et la capture du CO<sub>2</sub>, les chercheurs ont étudié activement les effets des conditions de culture sur la croissance cellulaire des microalgues.

### *1.1.2.3. 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 carbonée à la fois comme une source d'énergie et comme une source unique de carbone. Par conséquent, la lumière n'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<sub>2</sub> (CSC)**

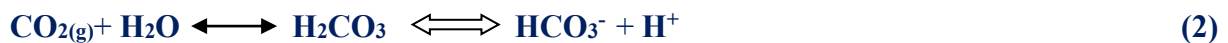
Diverses stratégies telles que la séparation physique et l'utilisation des solvants chimiques, ont été adoptées pour la fixation de CO<sub>2</sub> libéré par les centrales électriques, les unités de fabrication de ciment et les raffineries. En particulier, la méthode biologique a été considérée comme une nouvelle alternative prometteuse de captage et de stockage de CO<sub>2</sub> (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<sub>2</sub> 10 à 50 fois plus élevée que les plantes terrestres (Yadav *et al.*, 2017; Razzak *et al.*, 2017). Ce processus pourrait être combiné 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<sub>2</sub> par les microalgues*

La conversion biologique du CO<sub>2</sub> par les microalgues photosynthétiques entraîne 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 cellules avec 1,83 kg de CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> consommée par les cellules de microalgues. Sur cette base, le taux de capture de CO<sub>2</sub> peut être estimé comme suit: (Eq.1) (Razzak *et al.*, 2017)

$$R_{CO_2} = P \cdot C_{CO_2} (M_{CO_2}/M_C), \quad (1)$$

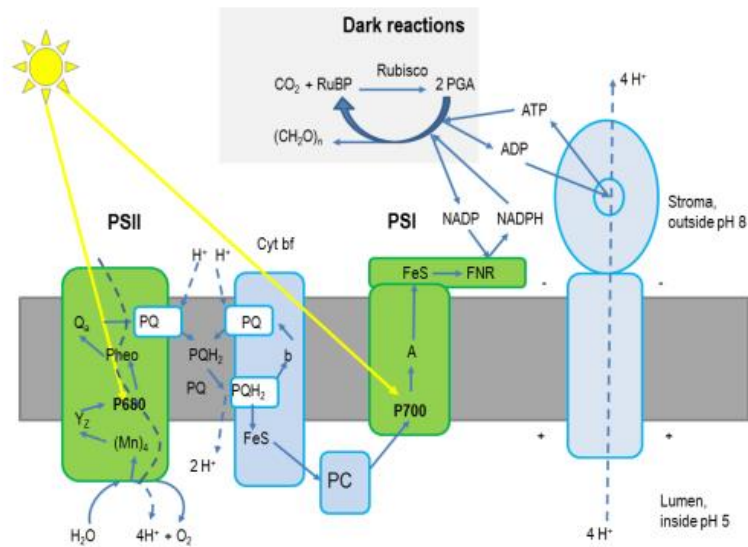
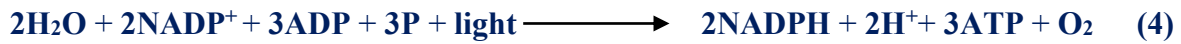
où  $R_{CO_2}$  est le taux de fixation du  $CO_2$  ( $g \cdot L^{-1} \cdot jour^{-1}$ ),  $P$  est la productivité biomasse ( $g \cdot L^{-1} \cdot jour^{-1}$ ),  $M_{CO_2}$  est le poids moléculaire du dioxyde de carbone, et  $M_C$  est le poids moléculaire du carbone.  $C_{CO_2}$  est le contenu de 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  $0,099 g \cdot L^{-1}$  et  $1,445 g \cdot L^{-1}$  pour des concentrations de 15% et 2% de  $CO_2$ , respectivement. Par conséquent, bien que les microalgues 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)



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](#)).

### 1.1.3.2. 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)



**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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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)



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<sub>2</sub> ([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<sub>2</sub>, (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 *et al.*, 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 <sub>2</sub>	Intégration du cycle de Calvin	Diffusion (5<pH<7) Transport actif (pH>7)
Carbone organique	Intégration de la respiration	Diffusion-Transport actif
Ammonium NH <sub>4</sub> -N	Conversion directe en acide-aminé Transport actif Stripping dû à la volatilisation (valeurs de pH élevées et températures)	Transport actif
Phosphore PO <sub>4</sub> -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<sub>2</sub>-N) et de le convertir en azote ammoniacal (NH<sub>3</sub>-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)



Les microalgues eucaryotes, à leur tour, sont capables d'assimiler l'azote fixé, tel que NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N et nitrite-azote (NO<sub>2</sub>-N) (Gonçalves *et al.*, 2017). Cependant, l'assimilation de cette source d'azote nécessite une réduction en NH<sub>4</sub>-N, par un processus en deux étapes catalysées par les enzymes nitrate réductase et nitrite réductase (Crofcheck *et al.*, 2012) (Eq. 7 et 8)



Puisque l'assimilation du NH<sub>4</sub>-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<sub>4</sub>-N peut se produire en réponse à une augmentation du pH et de la température, où de grandes quantités de NH<sub>4</sub>-N peuvent être volatilisées (Cai *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). L'élimination du PO<sub>4</sub>-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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) et de hydrogène de phosphate (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

#### 1.1.4.3. Le rôle des consortiums de microalgues dans l'élimination des polluants

De nos jours, d'importants efforts de recherche sont orientés vers l'étude de la faisabilité économique des systèmes d'algues pour éliminer les composés d'azote et de phosphore issus des rejets d'eaux usées (Razzak *et al.*, 2017). Wang *et al.* 2010a, 2010b ont étudié l'utilisation potentielle des algues vertes *Chlorella* sp. pour éliminer les nutriments des eaux usées. Au cours de cette étude, les pourcentages d'élimination de l'azote et du phosphore totaux étaient respectivement de 68,5% et 90,6%. D'autres investigations conduites par Wang et Lan (2011) ont trouvé que les taux d'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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> par photosynthèse et l'élimination des polluants d'eaux usées.

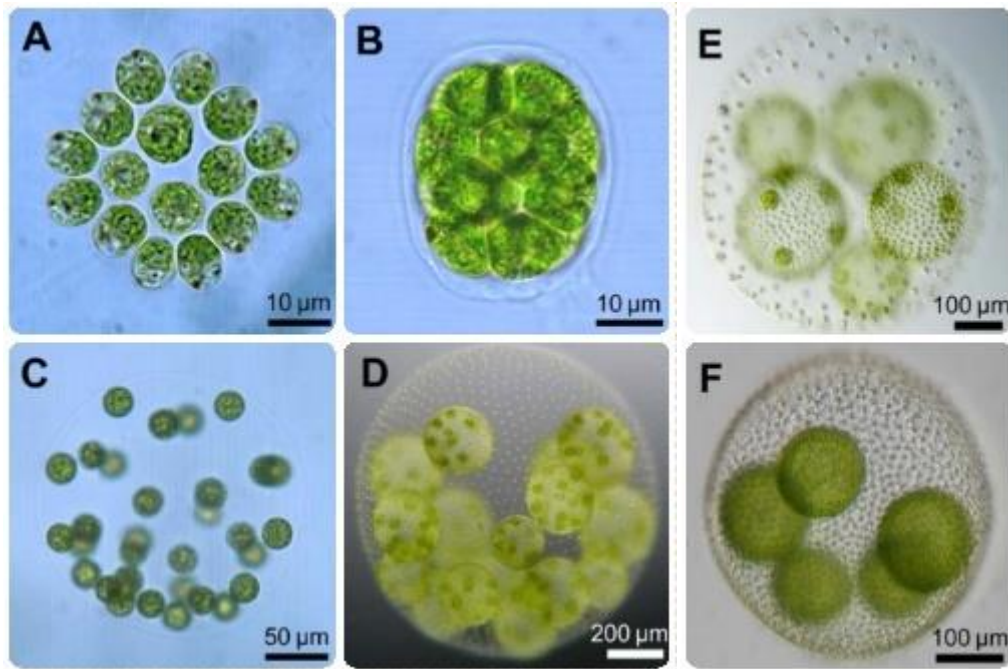
## **I. 2. Evolution des bactéries et des microalgues**

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).



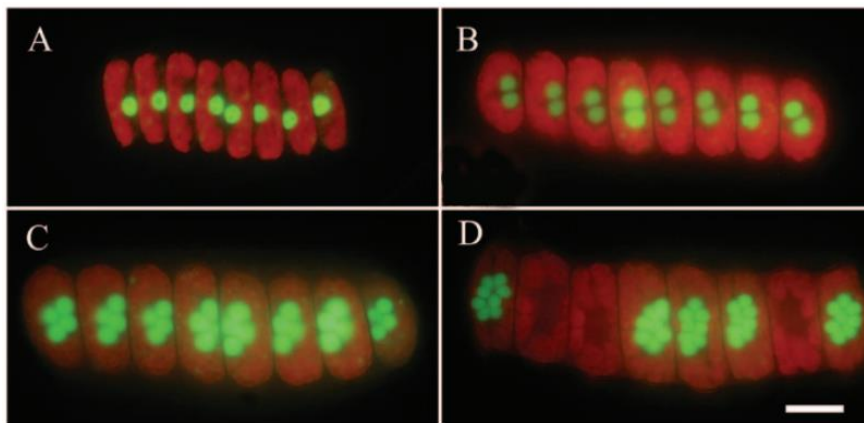
**Figure I.5.** Evolution multicellulaire des différentes espèces d'algues(Hallmann, 2006):A, Colonie rhomboïdale et plate de *Gonium pectorale* avec 16 cellules maintenues ensemble par une matrice; B, Colonie ellipsoïde de *Pandorina morum* avec 16 cellules rapprochées et entourées de très peu de matrice; 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 floes 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

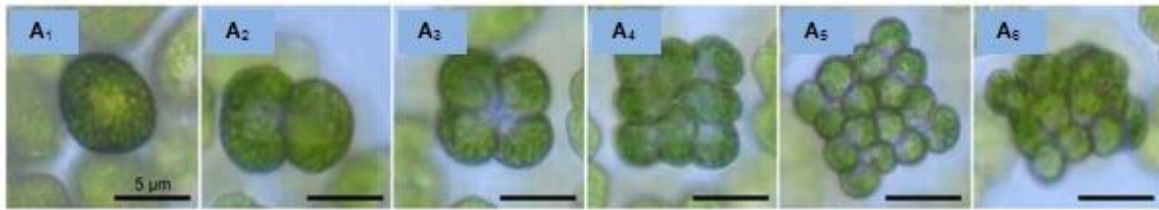
les années 1950, les algues vertes et leurs mécanismes ont été considérés comme un modèle unique pour étudier la régulation du cycle cellulaire (Bišová *et al.*, 2014). Au cours de ce phénomène de fission multiple, le nombre de cellules filles varie généralement entre 4 à 16. En effet, les cultures d'algues sont synchronisées naturellement par l'alternance des périodes claires et sombres. Les algues se développent autotrophiquement pendant la journée et subissent des réplifications 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 clivage embryonnaire. Un processus morphogénétique distinctif appelé «Inversion» était probablement défini pour atteindre la multicellularité volvocaire (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 contient toutes 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<sub>1</sub>: Cellule avant le début du clivage, A<sub>2-5</sub>: 4 clivages de cellules longitudinales, une plakée à 16 cellules est formée; A<sub>6</sub>: Vue latérale de la plakée à 16 cellules (Hallmann, 2006)

Hallmann, 2006 a comparé les processus d'inversion entre six espèces volvocacées différentes (*Gonium pectorale*, *Pandorina morum*, *Eudorina uniccoca*, *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 microscopiques des écosystèmes. Cette évolution multicellulaire nous permettra de détecter l'effet des conditions opératoires à 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 établi au fil du temps une diversité d'interactions inter-intraspecifics 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 énorme pour l'avenir, ainsi qu'une pertinence technologique pour la protection de l'environnement.

#### *1.3.1.1. 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).

#### *1.3.1.2. 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 entraîne 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'écophysologie 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*

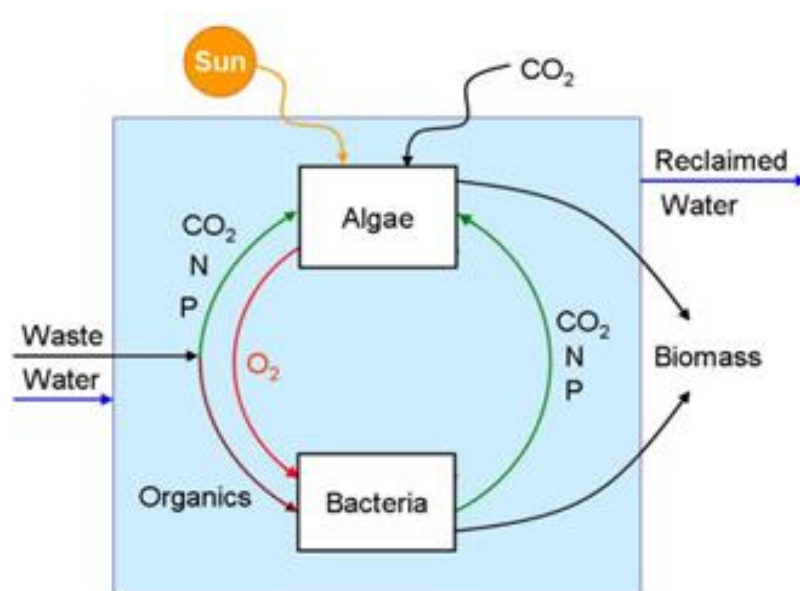
Cet habitat " Phycosphère" est défini comme une large zone qui s'étend vers l'extérieur à partir d'une cellule micro-algale ou d'une colonie dans laquelle la croissance bactérienne est stimulée par les produits extracellulaires de microalgue. La phycosphère est équivalente à une oasis pour les bactéries 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).

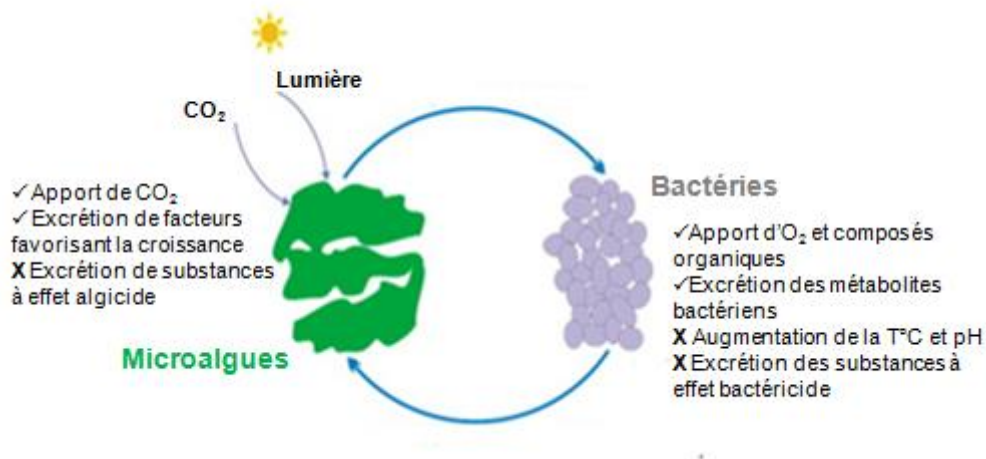


**Figure I.8.** Interaction microalgue-bactérienne dans un système à étang pour le traitement des eaux usées (Oswald *et al.*, 1953)

D'autre part, dans des conditions eutrophiques, la décomposition des exsudats d'algues représente également une contribution majeure à 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; Ummithan *et al.*, 2014).

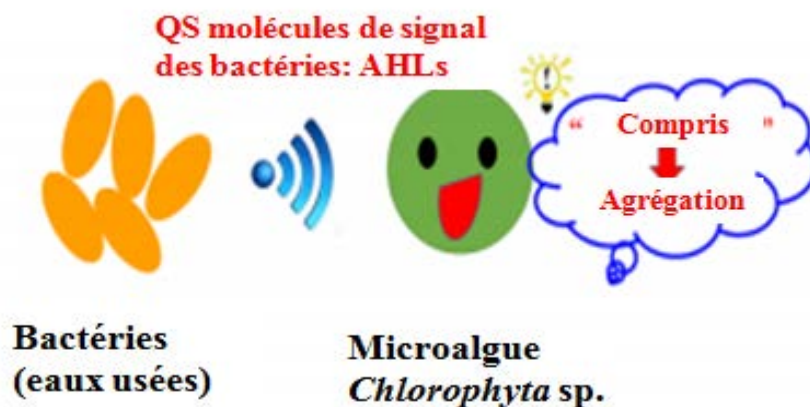


**Figure I.9.** Interactions coopératives ( ✓ ) et compétitives ( X ) établies entre les micro-algues et les bactéries (adaptées par Munoz et Guieysse, (2006))

Les bactéries *Roseobacters* produisent des facteurs de croissance pour améliorer la 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 synthétisent des 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 produit entre 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 bactéries et 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 amélioré l'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))

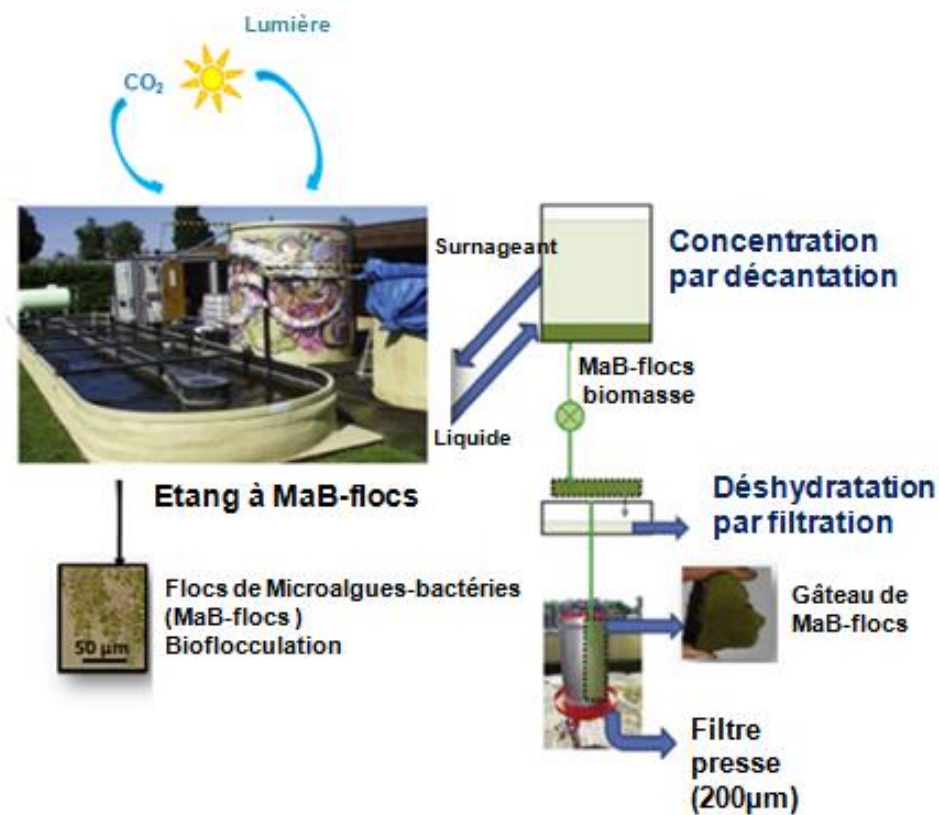
En revanche, les macroalgues marines sont également capables de perturber le QS (Natrah *et al.*, 2011). Ainsi, la macroalgue marine *Delisea pulchra* a été largement étudiée pour sa

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 floccs-MaB mettra l'accent sur les échanges moléculaires de QS entre les micro-organismes.

#### **I.4. Récupération de la biomasse des floccs-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 floccs de microalgues-bactéries (floccs-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 des floccs-MaB dans les effluents de l'aquaculture et de l'industrie alimentaire est respectivement de 5,29 et 8,07 € kg<sup>-1</sup> MES (Vulsteke *et al.*, 2017). Cette étude montre que l'optimisation des étangs des floccs-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 floccs de microalgues-bactériens dans des réacteurs semi-continus (SBR) (floccs-MaB SBR) (Van Den Hende *et al.*, 2014b). Ainsi, l'avantage majeur des floccs-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 floccs-MaB par sédimentation dans un décanteur sans addition de flocculant et (2) une déshydratation par un filtre-pressé avec une taille de pores variant de 150-250 µm, formant ainsi un gâteau de floccs-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  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$  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 présentait des diamètres d'environ 100  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$  (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).



**Figure I.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  $\text{CO}_2$ . 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 floccs de microalgues-bactéries (floccs-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<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, et d'ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (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-floccs présentent une performance économique de 0,25 à 0,50 €. m<sup>-3</sup> 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<sub>4</sub>-N et de PO<sub>4</sub>-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 floccs-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 floccs de microalgues-bactériens (floccs-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 floccs-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,  $77 \pm 5\%$  d'azote,  $73 \pm 2\%$  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<sub>1</sub>) contenant des consortiums de floccs-MaB et un réacteur à panneau plat à microalgues seulement (FPR<sub>2</sub>) pour l'élimination de l'ammonium des eaux usées artificielles. Les floccs-MaB ont éliminé l'ammonium à des taux plus élevés ( $100 \pm 18 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{NL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) que les microalgues ( $44 \pm 16 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{NL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

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<sub>2</sub> 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 floccs-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<sub>2</sub> sur 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 <sub>i</sub> (mg/L)	%R	C <sub>i</sub> (mg/L)	%R	C <sub>i</sub> (mg/L)	%R	
<i>Chlorella vulgaris</i> + bactéries issues des eaux usées primaires	Eaux usées municipales	PBR fermé tubulaire Suspendu Batch	8-20	17-207 NH <sub>4</sub> -N	30.9 100	1.4-19.6 TP	65-98	n.a	n.a	He <i>et al.</i> , 2013
Consortium de microalgues isolé d'un HRAP et de boues activées	Eaux usées synthétiques	PBR fermé Suspendu Continu	2-20	120 NH <sub>4</sub> -N	75-96	n.a	n.a	200 TOC	86-90	Alcántara <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella vulgaris</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>	Eaux usées synthétiques	PBRs fermé Suspendus Batch	6	20 NH <sub>4</sub> -N	78	4 TP	92	n.a	n.a	Liang <i>et al.</i> , 2013
Consortium de microalgues-bactéries isolé des eaux usées centrales	Eaux usées centrales	PBR tubulaires à biofilm "ouverts"	10	91 TN	70	7 PO <sub>4</sub> -P	85	181 TOC	90	Posadas <i>et al.</i> , 2013

C<sub>i</sub> - concentration initiale (in mg L<sup>-1</sup>); %R -Taux d'élimination; NH<sub>4</sub>-N - ammonium; TN - Azote Total (mg N L<sup>-1</sup>); PO<sub>4</sub>-P - Phosphorus (mg P L<sup>-1</sup>); TP - phosphores Total (mg PL<sup>-1</sup>); TOC - carbone organique Total (mg C L<sup>-1</sup>); COD (mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>); 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 floccs 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	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grandes quantités d'eaux usées à traiter.</li> <li>- Opération à grande échelle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Récolte des microalgues après traitement.</li> </ul>
Système de culture immobilisée	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Récolte des microalgues plus simples.</li> <li>- La matrice d'immobilisation plus haute résistanceaux environnements difficiles(salinité, la toxicité des métaux, pH)</li> <li>- Surface élevée requise (meilleure adhésion de microalgues + formation de biofilm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coûts élevés associés aux matrices d'encapsulation.</li> <li>- La limitation de la lumière.</li> <li>- Applicable uniquement dans les petites opérations à l'échelle pilote</li> </ul>

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 système, 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

	<b>Polymères naturels</b>	<b>Polymères synthétiques</b>
Polymères <i>(Takei et al., 2011)</i>	Agar, Agarose, Alginate, Chitosane, Kappacarréténane	Polyacrylamide, Polyuréthane et Poly (éthylène glycol) prépolymère, PVA
Inconvénients <i>(Van Pham et al., 2014)</i>	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'empêcher 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.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Billes d'alginate carraghénine	eaux usées domestiques primaires (3 jours)	95% ammonium 99% phosphates	Lau <i>et al.</i> , 1997
co-culture d' <i>Azospirillum brasilense</i> <i>C. vulgaris</i> et <i>C. sorokiniana</i>	Billes d'alginate	eaux usées municipale (6 jours)	100% d'ammonium, 15% de nitrate 36% phosphore	De-Bashan <i>et al.</i> , 2004

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

Les systèmes de croissance immobilisés pour 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 systèmes et 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 des réacteurs 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 des biofilms symbiotiques dans des contacteurs biologiques à disques rotatifs (RBC) comme une application, peu coûteuse 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<sub>2</sub> 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 floes-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.

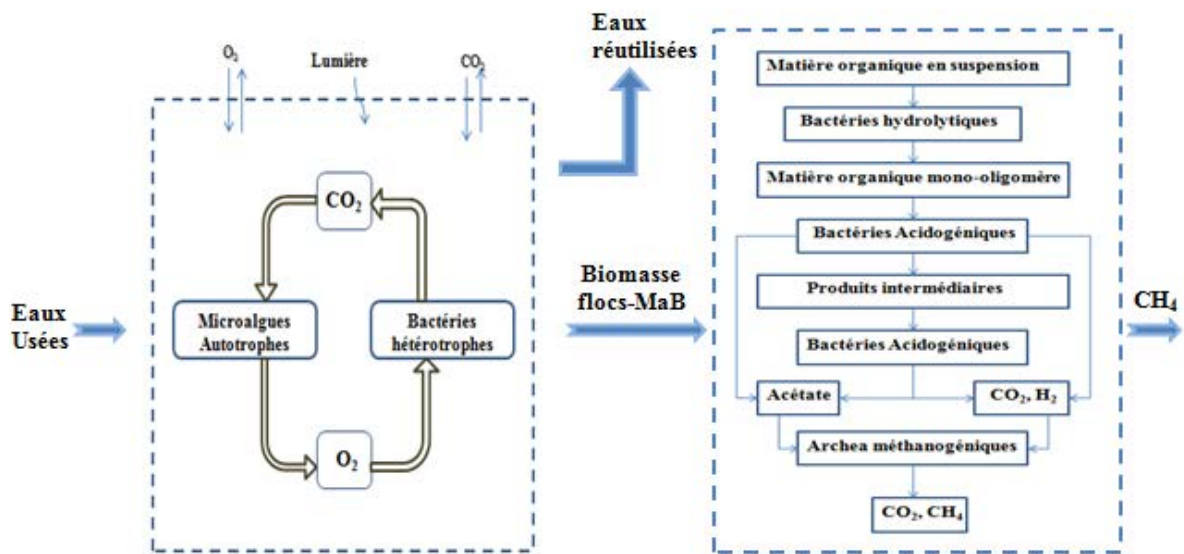
## **I.6. Valorisation des floccs-MaB par une co-digestion anaérobie et bioremédiation des digestats**

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 (Wagner *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 représente une 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 floccs-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<sub>2</sub> 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 organiques issus de la digestion anaérobie tels que les acides gras volatils (acétate) et les composés phosphorés et azotés (phosphate et ammoniac) 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 eaux par la symbiose microalgues-bactéries et la digestion anaérobie des boues générées avec une production du méthane  $\text{CH}_4$  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  $\text{CH}_4$   $\text{kg}^{-1}$  VS, sachant que les RBM des boues activées non traitées vont de 129 à 380 NL  $\text{CH}_4$   $\text{kg}^{-1}$  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.

#### *1.6.1.1. 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:  $VS_{\text{substrat}} \text{ (g)} / VS_{\text{inoculum}} \text{ (g)}$  (Wieczorek *et al.*, 2015). Les rendements maximaux en biogaz et en méthane ont été de  $271,34 \pm 6,65 \text{ mL CH}_4 \text{ g. VS}^{-1}$  pour un rapport S / L de 0,2 de  $VS_{\text{substrat}} \text{ (g)} / VS_{\text{inoculum}} \text{ (g)}$  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<sub>4</sub>. Le prétraitement enzymatique, comme la méthode la plus efficace, soutenait la productivité maximale du biogaz de  $369,44 \pm 6,36 \text{ mL de g. VS}^{-1}$  des flocs-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 une génération efficace de la bioénergie.

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

La digestion anaérobie (DA) de la biomasse crée un flux de déchets riche en nutriments (N et P), appelé Digestate Liquide (DL). 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 (DL) 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 DL a montré l'efficacité élevée d'élimination de NH<sub>4</sub>-N d'environ 99% pour les espèces cyanobactérie (*Arthrospira maxima*) et microalgue (*Tetradismus 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 floccs microalgues-bactéries (floccs-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.



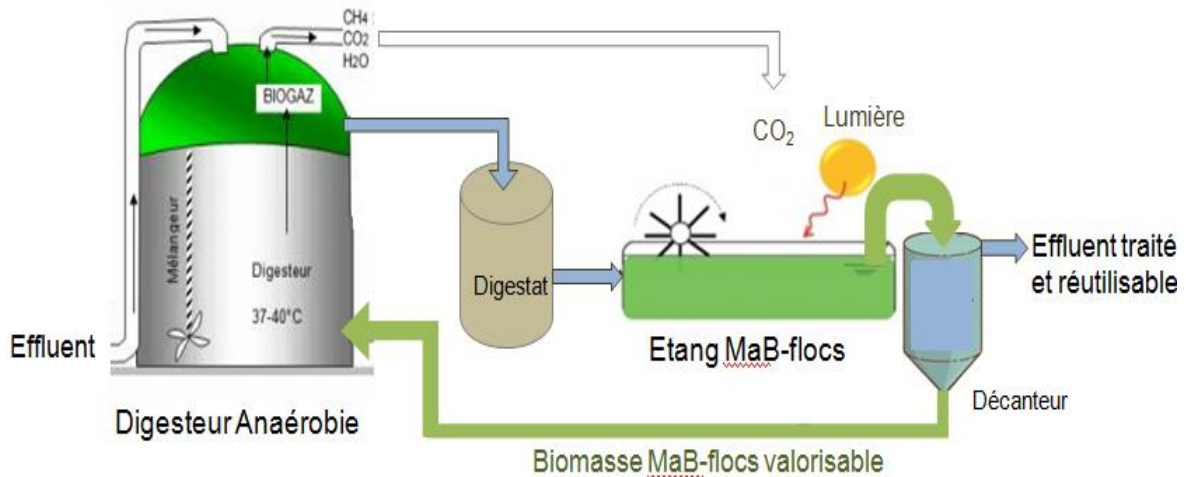


Figure I.13. Diagramme récapitulatif du processus en boucle fermée avec zéro déchet rejeté

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

Bien que plusieurs études aient été appliquées avec les consortiums 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 différentes 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 utiles 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 produits à 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 photobioréacteurs.



## **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 systèmes 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 amélioreraient 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 flocons de microalgues-bactéries (flocs-MaB) sans aucun apport d'oxygène et dégagement de CO<sub>2</sub>. Cette technologie multitrophique présente de nombreuses avantages : elle permet de préserver l'environnement, ne consomme pas d'énergie, ne produit pas des boues, ne génère pas des nuisances olfactives et contribue à 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 flocons 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 flocons-MaB a été obtenue après 26 jours de culture en batch et en présence d'une lumière 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 constituant les flocons-MaB. Avant chaque procédé de traitement des eaux usées, une pré-culture des flocons-MaB pendant 7 jours a été lancée afin d'enrichir les flocons et de fixer les propriétés de biomasse souhaitées en termes de TSS, VSS et concentration en Chl(a).

Une première application de ces flocons-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-bioremediation des polluants organiques et minéraux a été lancée sans apport d'oxygène et sans dégagement de CO<sub>2</sub>, d'où l'originalité de cette approche. La performance des floccs-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 floccs-MaB, concentration de DCO, temps d'incubation) sur l'évolution morphologique des floccs et sur le traitement des nutriments pourrait jouer un rôle 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-bioremediation.

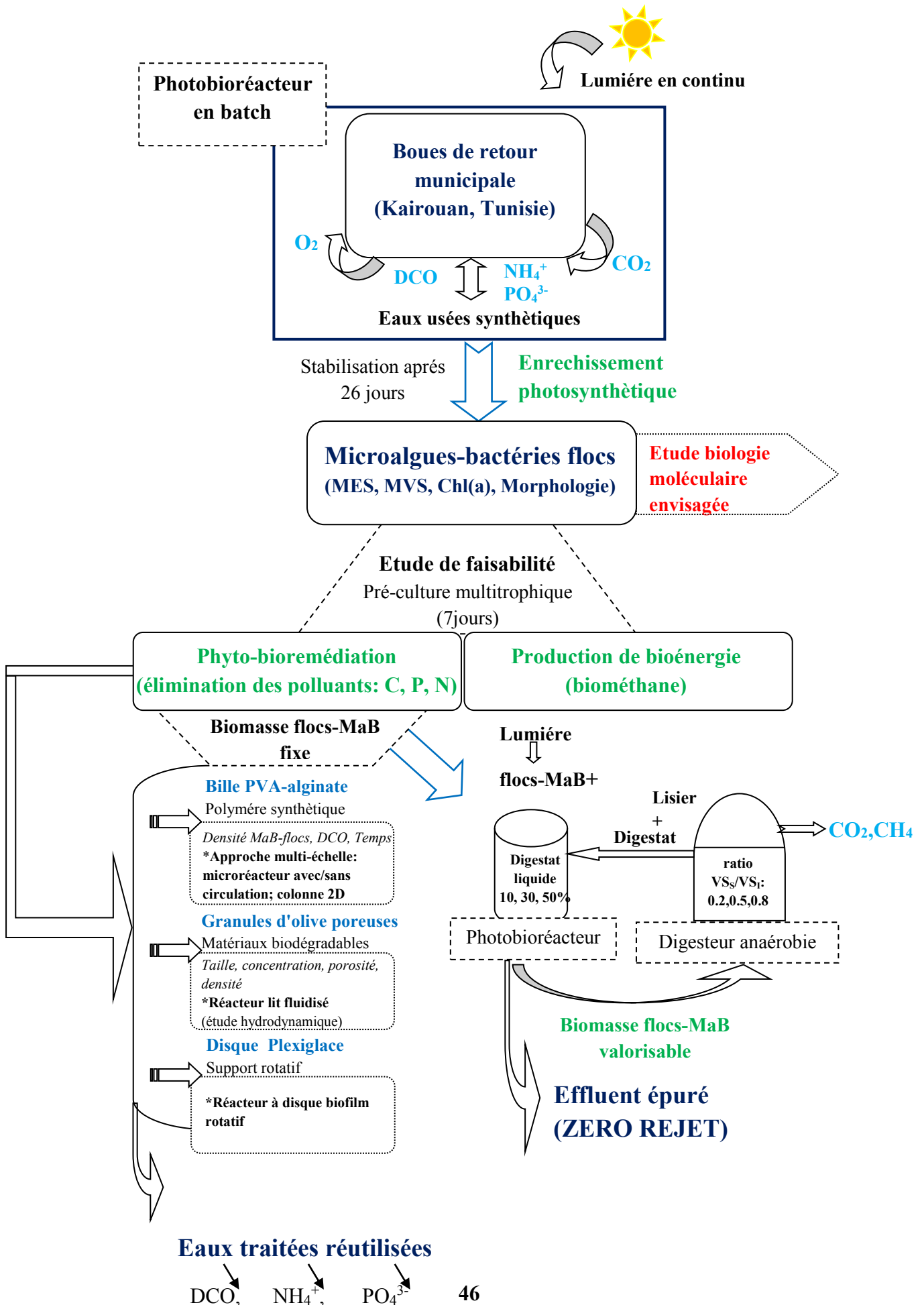
-Dans le but de mettre en place un processus de photobioremediation durable sous l'angle de la protection et de la réutilisation de la biomasse piégée pour la production de bioénergie, une autre méthode d'immobilisation des floccs-MaB a été proposée en utilisant des poudres d'olives poreuses (OPP) comme 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 floccs-MaB pour le traitement des eaux usées. Le comportement hydrodynamique du système gaz-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 floccs-MaB appliqués dans la bioremediation 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 floccs-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 floccs-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  $VS_S/VS_L$ . 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 floccs-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:



## **CHAPITRE II.**

**Approche à multi-échelle d'élimination des polluants en utilisant  
des floccs de microalgues-bactéries (floccs-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<sub>2</sub>) et en régénérant la biomasse et l'oxygène (O<sub>2</sub>). 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 floccs-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 adopté 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 floccs de bactéries-microalgues immobilisées**

Dans ce contexte, une étude à multi-échelle a été lancée pour le traitement des eaux usées en utilisant une technique d'immobilisation des floccs-MaB dans des polymères de polyvinyl alcool (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 floccs 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<sub>1</sub>(2%, v/v), C<sub>2</sub>(5%, v/v) et C<sub>3</sub>(10%, v/v) de floccs-MaB encapsulées dans des billes de PVA-alginate.

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

---

Dans le but d'étudier la performance de la culture multitrophique des floccs-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 floccs-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 floccs-MaB.

Les résultats présentés dans l'article soumis et accepté au journal " *Environmental Technology* " montre que le microréacteur est conçu afin de mieux contrôler l'évolution des floccs-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.



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

3

4 **Olfa Beji<sup>a,b</sup>, Nouceiba Adouani<sup>a</sup>, Souhila Poncin<sup>a</sup>, Moktar Hamdi<sup>b</sup>, Huai Z. Li<sup>a,\*</sup>**

5

6

7

8 <sup>a</sup>Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue  
9 Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

10 <sup>b</sup>Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute  
11 of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22 \*Corresponding author:

23 Pr. Huai Zhi LI

24 [huai-zhi.li@univ-lorraine.fr](mailto:huai-zhi.li@univ-lorraine.fr)

25 **Abstract**

26 Microalgae-bacterial floes (MaB-floes) immobilization technique using polyvinyl alcohol  
27 (PVA) crosslinked with sodium alginate represents a novel approach for sustainable  
28 pollutants removal. The present work was made in order to enhance the performance of a  
29 microscale multitrophic batch reactor (MMBR) for treating two synthetic wastewater  
30 solutions prepared with two different initial Chemical Oxygen Demand (COD): 200 mg.L<sup>-1</sup>  
31 and 450 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. Three MaB-floes concentrations were entrapped into PVA-  
32 alginate beads: C<sub>1</sub> (2%, v/v), C<sub>2</sub> (5%, v/v) and C<sub>3</sub> (10%, v/v), without O<sub>2</sub> supply, during three  
33 periods 2, 4 and 6 days of batch incubation. PVA-alginate beads containing the highest  
34 concentration C<sub>3</sub> of MaB-floes improved the performance of batch reactor at microscale to  
35 remove significantly (p<0.05) COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> of about 63%, 61% and 82%,  
36 respectively, from wastewater more than the two other concentrations used. This result  
37 confirms that C<sub>3</sub> of MaB-floes hasn't only a good potential for nutrients and organic  
38 compounds removals but also the highest MaB-floes morphological progression after 6 days  
39 of wastewater treatment with the highest COD of 450 mg.L<sup>-1</sup>. The feasibility of the PVA-  
40 alginate for cells immobilization, investigated through microscopy analysis, has shown, for all  
41 experiments, the evolution of multicellularity in MaB-floes.

42

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

45

46

47

48

49

50

51

## 52 1. Introduction

53 The wastewater treatment processes are not always efficient in reducing carbon emission  
54 because of their high energy consumption and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) release (Pacheco et al.,  
55 2015). The biosequestration of CO<sub>2</sub> has been proposed by using the photosynthetic  
56 microalgae cultivation as a sustainable technology of Carbon Capture and Storage (CCS)  
57 (Lam et al., 2012). In this phycoremediation approach (Bawiec et al., 2018), the biomass of  
58 microalgae-bacterial floes (MaB-flocs) helps in restoring the ecosystem and promoting green  
59 technology for the biological wastewater treatment in the term of the circular economy (zero  
60 discharge) (Chisti et al., 2007; Rawat et al., 2011). The use of MaB-flocs technology allows to  
61 replace a classical aeration by a photosynthetic aeration (Jia et al., 2016 ; Bawiec et al., 2018;  
62 Abinandan et al., 2018). Therefore, this phycoremediation system was applied firstly within a  
63 wastewater ponds process by Oswald since 1950s (Abinandan et al., 2018), by incorporating  
64 the entire algal biomass and simultaneously removing of organic carbon and nutrients from  
65 wastewater (Gutzeit et al., 2005). The synergies between photo-autotrophic algae and  
66 heterotrophic bacteria are determined by the exchange of oxygen (O<sub>2</sub>) and carbon dioxide  
67 (CO<sub>2</sub>) (Gutzeit et al., 2005). The consumption of CO<sub>2</sub> and nutrients (ammonium and  
68 phosphorus) by microalgae can enhance bacterial growth rate during photosynthetic  
69 phenomena and in return CO<sub>2</sub> release and some substances production by bacteria improves  
70 consequently microalgal growth (Jia et al., 2016). Hence, photosynthetic aeration by  
71 microalgae could be used for the degradation of organic contaminants, nitrogen and  
72 phosphorus based on algae–bacteria wastewater treatment (Jia et al., 2016; Pahazri et al.,  
73 2016). The phycoremediation process is adopted to recycle the wastewater for algae growth,  
74 with zero discharge, which is part of the circular economy and sustainable development (Efaq  
75 et al., 2015). In this context, immobilization of MaB-flocs for wastewater treatment was  
76 proposed to solve the problem of the biomass harvesting and to enhance the nutrients removal  
77 efficiencies from wastewater. The most widely used technique for microorganism  
78 immobilization is the entrapment method, based on the confinement of the living cells within  
79 a three-dimensional gel (Mallick, 2002). The porous matrix allows the sufficient retaining of  
80 cell abundance and tends to resolve the inherent biomass losses in outflows (Xiao et al.,  
81 2011). Recently, polyvinyl alcohol (PVA), a cheap and non-toxic synthetic polymer, was  
82 successfully applied for wastewater treatment using entrapped microorganisms (Zain et al.,  
83 2010 ; Van Pham et al., 2014). The agglomeration and swelling problems encountered in the  
84 PVA-boric matrix are eliminated by the addition of calcium alginate and sodium sulfate.

85 Simultaneously, this avoids the drastic decrease in microorganism viability, caused by the  
86 saturated boric acid solution (Zain et al., 2010 ; Van Pham et al., 2014). The present study  
87 focuses on the efficiency of multitrophic batch microreactor for the mineral pollutant removal  
88 without O<sub>2</sub> supply. This will provide a sustainable treatment process based on  
89 phycoremediation. A photosynthetic method was carried out to improve the natural bio-  
90 flocculation of algae-bacterial biomass. The obtained floccs were immobilized and  
91 incorporated into a batch photobioreactor. The design of the reactor was established at  
92 microscale and helped to solve the problem of biomass harvesting. The feasibility of the  
93 immobilization process was studied with three concentrations C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> of MaB-floccs in  
94 PVA-alginate matrix. To assess the potential of multitrophic MaB-floccs culture in wastewater  
95 treatment, simultaneous removal of nutrients (ammonium and phosphorus) and COD was  
96 evaluated. Moreover, morphological evolution of MaB-floccs during different periods (2, 4 and  
97 6 days) of wastewater treatment was examined. Hence, the effect of the microscale  
98 operational conditions on the removal efficiency of pollutants was investigated by controlling  
99 both physicochemical wastewater qualities (COD) and MaB-floccs densities. The advantage of  
100 the immobilization process is related to the possibility of the scale-up wastewater treatment  
101 with an importance harvesting of biomass (Christenson et al., 2011). The present work can  
102 provide new insights into the multiscale applications of multitrophic interactions of  
103 microalgae-bacterial floccs (MaB-floccs) for the sustainable phycoremediation. The MaB-floccs  
104 could be reused in further treatment processes which will avoid any biomass discharge.  
105 Hence, the integration of this system in wastewater treatment process represents an economic  
106 and ecologic approach.

107

## 108 **2. Materials and methods**

### 109 ***2.1. Microalgae-bacterial floccs (MaB-floccs) preparation***

110 MaB-floccs were pre-cultured in a batch reactor (Figure 1.a) without O<sub>2</sub> supply and CO<sub>2</sub>  
111 release. The reactor was filled with 1.5L of activated sludge collected from a settling tank of a  
112 municipal sewage treatment plant in Kairouan city, Tunisia. The synthetic wastewater was  
113 added to obtain a working volume of 4.5 L, which composition was described by Huang et al.  
114 (2015) (Table 1). The homogenization of the culture was achieved by an external re-  
115 circulation rate of 0.855 cm<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> of the headspace gas distributed at the reactor bottom without  
116 adding oxygen. Light was kept on continuously using two fluorescent lamps with a light

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

## 119 ***2.2. Preparation of chemical solutions***

120 The matrices were prepared to encapsulate free cells using a 5%, (w/v) sodium alginate  
121 solution (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na)<sub>n</sub> (Fisher Scientific, UK) in distilled water and then agitated (Heat-Stir,  
122 Stuart) overnight. Polyvinyl alcohol solution was prepared by adding 10 g of PVA (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>  
123 to 70 mL of distilled water heated to around 80°C to dissolve PVA polymer, according to [Van  
124 Pham et al. \(2014\)](#). Samples were prepared by adding 20 mL of sodium alginate solution (5%,  
125 w/v) to the PVA solution. The PVA- alginate solution cooled at room temperature was used to  
126 entrap 10 mL of the MaB-flocs. In fact, this solution has PVA (10%, w/v), sodium alginate  
127 (1%, w/v), MaB-flocs (10%, v/v). The effect of MaB-flocs concentrations on wastewater  
128 treatment was studied by using a highest concentration C<sub>3</sub> (10%, v/v), as a reference of other  
129 study [Van Pham et al. \(2014\)](#) compared with two others concentrations of MaB-flocs C<sub>1</sub> (2%,  
130 v/v) and C<sub>2</sub> (5%, v/v). Thus, the concentration of microorganisms (10%, v/v) was fixed  
131 according to the formulation of the matrix adopted by the previous researchers ([Zain et al.,  
132 2010](#) ; [Van Pham et al., 2014](#)). Moreover, a reference sample was prepared without MaB-  
133 floes for comparison.

## 134 ***2.3. MaB-flocs matrix entrapped***

135 The MaB-flocs PVA-alginate matrix was gelled in order to form beads of 3 mm of the  
136 diameter through a syringe needle (21G, Sterican, France). The PVA-boric beads were formed  
137 by immersing the matrix droplets into sterile solutions of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (5%, w/v) and CaCl<sub>2</sub> (2%,  
138 w/v) under continuous stirring for 1 hour (Figure 2). After washing beads in pure water, PVA-  
139 sulfate beads were prepared by transferring the PVA-boric beads to a 0.5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution  
140 and immersing them for 1 hour ([Van Pham et al., 2014](#)). All beads were finally washed and  
141 stored in the pure water at 4°C until experiments. For the wastewater treatment with  
142 entrapped cells, several dilutions were performed from initial MaB-flocs suspension in Bold's  
143 Basal Medium (BBM) as described by [Bohutskyi et al. \(2015\)](#) in order to obtain  
144 different concentrations of MaB-flocs C<sub>1</sub> (2%, v/v), C<sub>2</sub> (5%, v/v), and C<sub>3</sub> (10%, v/v). The  
145 components of BBM media were as follows (per liter): 176 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 75 mg  
146 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 mg tetrasodium EDTA, 31 mg KOH, 25 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25 mg NaCl,  
147 11.4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8.83 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.84 mg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.57 mg  
148 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.44 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.71 mg MoO<sub>3</sub>, and 0.49 mg Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

149 **2.4. Microscale wastewater treatment with MaB-flocs into PVA beads**

150 A multitrophic wastewater treatment in the micro-batch- reactor by using entrapped samples  
151 was performed in parallel in three microreactors of 5 mL working volume each (Figure 3).  
152 The microreactor was designed in order to better control the evolution of the floccs inside the  
153 beads and to investigate the suitable operating conditions for a further multiscale approach. In  
154 each micro-reactor, one PVA-alginate bead with one of three MaB-flocs concentrations  $C_1$   
155 (2%, v/v),  $C_2$  (5%, v/v), and  $C_3$  (10%, v/v) was filled in the center of the microreactor without  
156 the recirculation of the synthetic wastewater under a batch regime. PVA-alginate beads were  
157 incubated for three different periods: 2, 4 and 6 days of batch experiment and exposed under a  
158 fluorescent lamp with a light power of 1050 lm (18W, Philips, France), during a single light  
159 phase of 24 hours. Hence, the use of these periods of treatment was justified by the results  
160 obtained and discussed below (section 3.2). Synthetic wastewater used in this study was  
161 prepared with two initial COD concentrations of 200 and 450 mg.L<sup>-1</sup>, respectively (Table 1).  
162 The pH value of the wastewater was adjusted between 7.0 and 8.3 by means of sodium  
163 bicarbonate. According to the previous studies [Gutzeit et al.\(2005\)](#), initial COD of 420 mg.L<sup>-1</sup>  
164 was suitable for the bioflocculation of MaB-flocs biomass into a lab-scale reactor. As used by  
165 [Boelee et al. \(2014\)](#), within symbiotic microalgae–bacterial biofilm reactors, the municipal  
166 wastewater contains 350 mg.L<sup>-1</sup> COD, 50 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and 10 mg.L<sup>-1</sup> PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P. Thus,  
167 microalgae are ubiquitous and able to grow under several conditions of ecosystems ([Diniz et](#)  
168 [al., 2017](#)).

169 **2.5. Analytical techniques**

170 Every two days, effluent samples were filtered and analyzed for COD using HACH (51996-  
171 2000) method. The concentrations of phosphorus (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) were  
172 measured using Nessler method and phosphate reagent for a 10 mL sample (HACH-LANGE  
173 GmbH, Germany), respectively, on a HACH DR2000 spectrophotometer. Total concentration  
174 of Chlorophyll(a) was extracted (Eq. 1) through a 1M methanol solution and measured using  
175 spectrophotometer (UV–Vis 2550, Shimadzu, Japan) at 652 nm and 665 nm ([Porra et al.,](#)  
176 [1989](#)):

$$177 \text{Chlorophyll(a)} = 16,29 A_{665} - 8,54 A_{652} \quad (1)$$

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

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

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

$$185 \quad V = - \frac{ds}{dt} = \frac{V_m S_f}{K_m + S_f} \quad (2)$$

186 where V is the biodegradation rate (mg.L<sup>-1</sup>.H<sup>-1</sup>), S<sub>f</sub> is the substrate concentration (mg.L<sup>-1</sup>) in  
187 the effluent, V<sub>m</sub> is the maximum biodegradation rate (mg.L<sup>-1</sup>.H<sup>-1</sup>), and K<sub>m</sub> is the Michaelis  
188 constant (mg.L<sup>-1</sup>).

## 189 **2.6. Statistical analyses**

190 The data were analyzed using an independent sample t-test with the statistical software SPSS  
191 13.0 (SPSS Inc., USA). A standard deviation (p-value < 0.05) at the 95% confidence level  
192 was chosen to compare all the parameters analyzed (ammonium, phosphorus and MaB-floes'  
193 size). Each analysis was repeated four times.

194

## 195 **3. Results and discussions**

196

### 197 **3.1. Bio-flocculation of MaB-floes in a batch reactor**

198 The main objective of this study is to enhance the photosynthetic microorganism's  
199 development from return sludge without CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> supply and microalgae consortium addition.

200 The activated sludge inoculated into the batch reactor settled initially after 30min giving 14.4

201 ± 0.01 g TSS.L<sup>-1</sup> and 10.2 ± 0.3 g VSS.L<sup>-1</sup> in order to give Sludge Volume Index 30 (SVI<sub>30</sub>) of

202 91.5ml g<sup>-1</sup> under permanent illumination (Table 2). After 26 days of enrichment under a

203 continuous light exposing, a green layer was observed on the walls of the reactor which

204 indicates the development of algae in the sludge (Figure 1.b, 1.c). Thus, MaB-floes settled

205 faster with SVI<sub>30</sub> of 80 ml.g<sup>-1</sup> reaching up to a density of 3.2 ± 0.05 g VSS.L<sup>-1</sup> (Table 2). The

206 decrease of the MaB-floes settleability during synthetic wastewater feeding, could be

207 explained through microscopic analysis as in other studies Van Den Hende et al. (2011b) by

208 the abundance of filamentous species *Phormidium* sp. Furthermore, the Chl(a) concentration

209 increased from 0.12 ± 0.15 mg Chl(a).g<sup>-1</sup>VSS to 3.8 ± 0.24 mg Chl(a).g<sup>-1</sup>VSS at day 26

210 (Table 2). This is of the same order of magnitude that the Chl(a) concentration obtained by

211 Van Den Hende et al.(2014): 4.9 mg Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS after 7 days in a batch reactor treating



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

### 225 **3.2. Morphological evolution of microalgae-bacterial floes**

226

227 Observations by the microscopy of the entire shape of the bead shown in Figure 5 reveal that  
228 the immobilization process has only a few effects on the MaB-floes morphology.  
229 Nevertheless, it maintains the density of MaB-floes between the crosslinks of the PVA-  
230 alginate polymers. Then, the morphology of immobilized MaB-floes was evolved temporarily  
231 during the wastewater treatment, in the same manner as activated sludge floes (Gutzeit et al.,  
232 2005). Similarly, De-Bashan et al. (2008) mentioned that the immobilization of *C. vulgaris*  
233 and *C. sorokiniana* with Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), *Azospirillum brasilense*,  
234 within small alginate beads significantly enhances the growth kinetics of the microalgae, in  
235 terms of colony and cell sizes. Table 3 resumes the evolution of MaB-floes' diameter, for all  
236 densities, after 2 and 6 days of wastewater treatment containing initial COD of 450 mg.L<sup>-1</sup>  
237 and 200 mg.L<sup>-1</sup> concentrations. After 2 days of batch incubation with initial COD of 450  
238 mg.L<sup>-1</sup>, PVA beads contained small colonies with diameters of  $4.01 \pm 0.21 \mu\text{m}$ ,  $8.5 \pm 0.09$   
239  $\mu\text{m}$ , and  $12.09 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , respectively, for the three concentrations of MaB-floes C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, and  
240 C<sub>3</sub>. Such cells differ significantly in their sizes and can produce different numbers of daughter  
241 cells with two-times increased in size. In addition, with the highest concentration C<sub>3</sub>, the floes'  
242 diameter increases significantly to achieve a maximum of  $220.7 \pm 0.67 \mu\text{m}$  after 6 days of  
243 wastewater treatment with initial COD of 450 mg.L<sup>-1</sup>. This indicates the multicellularity  
244 evolution of algae cells. Whereas using the lowest concentration C<sub>1</sub>, a slight evolution of



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

278 75.5 ± 0.26 µm after 6 days of wastewater treatment (Table 3). The dynamics of algae-  
279 bacteria communities within the immobilization materials were affected by the flexibility, the  
280 permeability of the matrix and the diffusivity of substrates and by-products to and from the  
281 cells (Pahazri et al., 2016 ; Wang et al., 2018). The biodegradation rate of the substrate was  
282 affected by three steps: the transfer of the substrate and products from the liquid medium to  
283 the floes (external mass transfer), the diffusion of substrates within the matrix (internal mass  
284 transfer) and the microbial reactions (Hamdi, 1995 ; Pilkington et al., 1998). In  
285 photobioreactors containing immobilized cells, the biodegradation is limited by liquid and  
286 solid-phase substrate diffusion kinetics (Hamdi, 1995). Through the small crosslinks of PVA-  
287 alginate bead, nutrients diffuse to the entrapped cells in order to enhance its growth (Whitton  
288 et al., 2015). Thus, the diffusion of carbon could be explained by the concentration gradient  
289 between the external medium and the matrix (Jodra et al., 2003). Previous works were carried  
290 out concerning the transfer of external mass of substrate in the immobilized floes per unit area  
291 and per unit time which corresponds to the flux ( $J_0$ ) in the bulk liquid. The phenomenon was  
292 characterized by the mass transfer coefficient ( $k_L$ ) (Hamdi, 1995 ; Pilkington et al., 1998). The  
293 transferred nutrients and organic compounds through the solid phase will affect the growth  
294 evolution of immobilized MaB-floes. However, algae and bacteria formed aggregates from  
295 the surface area to the inside of beads in the bioreactor related to the competition for substrate  
296 (Li et al., 2009). Heterotrophic aerobic bacteria assimilated organic carbon and oxygen  
297 supplied by microalgae, and in return, released inorganic carbon ( $CO_2$ ) essential for algal  
298 growth during photosynthetic metabolism (Chinnasamy et al., 2014 ; Nguyen et al., 2014 ; Jia  
299 et al., 2016). In the presence of high organic matter ( $COD\ 450\ mg.L^{-1}$ ), heterotrophic bacteria  
300 play a ubiquitous role in increasing the unicellular microalgae floes when they are farmed  
301 massively as like  $C_3$  of MaB-floes by establishing mutualistic interactions (Ramanan et al.,  
302 2016). For instance, the importance of mutual mechanism was demonstrated by the beneficial  
303 exchange of carbon within co-immobilizing *Azospirillum brasilense* and *C. vulgaris* (Jia et  
304 al., 2016). In these cooperative interactions, QS mechanism is generally considered to  
305 facilitate carbon biodegradation only when the bacterial population reaches a sufficient cell  
306 density in the presence of high COD ( $450\ mg.L^{-1}$ ), via increasing QS signal molecules (Yabur  
307 et al., 2007). The removal efficiencies of carbon compounds, as a substrate, were calculated  
308 by the difference between the substrate concentrations before and after the wastewater  
309 treatment (results not shown in the paper).

310

311 **3.3. Nutrients (ammonium and phosphorus) removal rates**

312 Figure 8 displays the performance of the microreactor through the evolution of ammonium  
313 and phosphorus removal rates under three MaB-flocs concentrations  $C_1$ ,  $C_2$ , and  $C_3$ . During  
314 the treatment, no nutrients removal rates were observed using the reference sample (PVA-  
315 beads without cells). The highest removal rates of ammonium and phosphorus were obtained  
316 after 6 days of wastewater treatment containing initial COD of  $450 \text{ mg.L}^{-1}$  for all densities.  
317 Although the highest concentration of  $C_3$  decreased more significantly ( $p < 0.05$ ) the total N-  
318  $\text{NH}_4^+$  and P- $\text{PO}_4^{3-}$  contents than the other concentrations  $C_1$  and  $C_2$ . Hence, the density of  
319 MaB-flocs affects strongly the remove of ammonium and phosphorus. The ammonium  
320 removal efficiency increased from  $27.86 \pm 0.4 \%$  for the day 2 to achieve  $60.92 \pm 0.7 \%$  after  
321 6 days for  $C_3$ , which is higher than  $57.9 \pm 0.7 \%$  obtained for  $C_2$  for the same period in the  
322 batch treatment. Unlike  $C_3$ , beads containing low density of  $C_1$  increased slightly the  
323 ammonium removal rate to reach  $52.2 \pm 0.4 \%$  at the end of the experiment (Figure 8.a). The  
324 high assimilation of ammonium by entrapped cells could be caused by the ionic interactions  
325 which concentrate the ammonium (cation) onto the alginate gel (anion). This finding  
326 highlights the important role of the immobilized matrix for the biodegradation of inorganic  
327 nutrients (Swe et al., 2017). In this multitrophic system, the relationship between bacteria and  
328 microalgae could be competitive for nutrients (ammonium, nitrite, and nitrate) removal  
329 (Wang et al., 2018 ; Gonzalez-Camejo et al., 2018). The nitrification-denitrification processes  
330 adopted by bacteria could inhibit the microalgae growth owing to the reduction of ammonium  
331 concentration by nitrifying bacteria (Gonzalez-Camejo et al., 2018). Optimal algae growth  
332 conditions may have an inhibitory effect on nitrification-denitrification reactions. In the  
333 presence of a continuous light supply, microalgae dominate the competition for ammonium  
334 assimilation. Thus, for inorganic nitrogen, ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) represents the preferred form  
335 assimilated by microalgae with less energy requirement than nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )  
336 (Whitton et al., 2015 ; Jia et al., 2016; Abinandan et al., 2018). However, the reduction of  
337 nitrate and nitrite into ammonium was carried out in two successive steps, during the  
338 assimilation of nitrogen, by using catalyzed enzymes nitrate reductase and nitrite reductase,  
339 respectively (Jia et al., 2016). Similar to the ammonium remove, for the highest density of  $C_3$ ,  
340 the phosphorus removal efficiency raised up to  $81.95 \pm 0.5 \%$  after 6 days in the microreactor.  
341 Whereas, the total P- $\text{PO}_4^{3-}$  concentration weakly decreases with the lowest  $C_1$  to achieve  $52.3$   
342  $\pm 0.2\%$  of removal rate for the day 6 (Figure 8.a). Previously, Su et al. (2011) obtained the  
343 removal efficiency of phosphate about of  $64.8 \pm 1.0 \%$  after 8 days of municipal wastewater

344 with a suspension culture of wastewater-born and settleable algae-bacterial. By comparing to  
345 suspended systems, the immobilized biomass is able to remove high concentrations of  
346 nutrients during a treatment with low HRT of 1 day (Whitton et al., 2015). Hence, the present  
347 result confirms the feasibility of the immobilized process for MaB-flocs as compared to a free  
348 system. 450 mg.L<sup>-1</sup> of initial COD in the wastewater significantly enhances the ammonium  
349 and phosphorus removal as the density of MaB-flocs increases. On the other hand, by using  
350 wastewater with COD of 200 mg.L<sup>-1</sup>, the highest nutrients' removal rates of ammonium and  
351 phosphorus reached 36.06 ± 0.4 % and 69.67 ± 0.5 %, respectively, after 6 days of batch  
352 incubation with C<sub>3</sub>. For low density C<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> removal rates increased less than with  
353 C<sub>3</sub> in order to obtain 27.8 ± 0.4 % and 47.6 ± 0.2 %, respectively, for the day 6 (Figure 8.b).  
354 These results confirm that despite the lowest COD 200 mg.L<sup>-1</sup>, bacteria improve the growth of  
355 microalgae floes and enhance its capacity for nutrients removal, especially phosphorus.  
356 Recently, the co-immobilization of cyanobacteria (*Synechococcus elongatus*) with PGPB (*A.*  
357 *brasilense*), in alginate beads, increased efficiency the phosphorus removal (44. 8%) more  
358 than immobilized cyanobacteria cells alone (32 %) from an initial concentration of PO<sub>4</sub> (8.35  
359 mg.L<sup>-1</sup>) after 7 days (Ruiz-Güereca et al., 2016). In the present study, the ammonium removal  
360 was a much slower process than that observed for phosphate as the latter showed an increase  
361 of about 50 % of the removal rate between 2 and 6 days of batch treatment. During this  
362 experiment, the pH values didn't exceed 7.3 and no significant effect on nutrients removals  
363 was observed. According to Huang and Wang, 2003, the highest phosphate removal  
364 efficiency of 73.97 % was obtained at a pH value around 7 by using a co-immobilized  
365 *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge into polyvinyl alcohol (PVA) gel. The  
366 mechanisms for phosphate removal through co-immobilized systems, such as precipitation,  
367 algae uptake, and absorption, were affected by the pH values (Huang and Wang, 2003;  
368 Larsson et al., 2007). In our case with pH = 7.3, the phosphate removal is probably due to  
369 the absorption phenomena across the porous of the carrier as reported by Huang and Wang,  
370 2003. Otherwise, the role of nutrients could determine the mutual relationship between algae  
371 and bacteria by forming a stable ecosystem, as explained by Abinandan et al. (2018) and  
372 Ramanan et al. (2016). This interaction mechanism was also proposed to highlight the role of  
373 PGPB, *Rhizobium* sp. in enhancing *Chlorella vulgaris* biomass (Kim et al., 2014). It appears  
374 that the combination of MaB-flocs at C<sub>3</sub> density, encapsulated within one PVA-bead, was  
375 significantly successful (p<0.05) in reducing nutrients (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) of about 61 % and 82  
376 %, respectively, from synthetic wastewater with initial COD 450 mg.L<sup>-1</sup>. Therefore,

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

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

397

### 398 **3.4. COD removal rate**

399 The variation of COD removal rates reveals a best treatment of wastewater containing initial  
400 COD (450 mg.L<sup>-1</sup>) after 6 days for all MaB-flocs densities (Figure 9.a). The best COD  
401 removal rate was obtained using  $C_3$  increasing from 49.38 ± 1.1 % after 2 days to 62.81 ± 1.4  
402 % after 6 days of wastewater treatment. Furthermore, with low density  $C_1$  of MaB-flocs,  
403 organic matters decreased from 450 mg.L<sup>-1</sup> to of about 242 mg.L<sup>-1</sup> in order to achieve 46.11 ±  
404 1.1 % of COD removal efficiency for 6 days of batch experiment (Figure 9.a). As MaB-flocs  
405 concentration significant increases ( $C_3$ ), as symbiosis communities consume more rapidly the  
406 organic compound present in the wastewater. Hence, the evolution of COD removal depends  
407 significantly ( $p < 0.05$ ) on the population density of the MaB-flocs affected by cultivation  
408 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  $22.78 \pm$   
411  $1.2 \%$  for the day 2 until  $47.51 \pm 1.2 \%$  for the day 6 using the highest density  $C_3$ , with initial  
412 COD ( $200 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As obtained by  $C_3$ , the COD removal rate achieved after 6 days a  
413 maximum of  $43.82 \pm 1.8 \%$  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 ( $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) and organic carbon of about  $61 \%$ ,  $82 \%$  and  $63 \%$ , respectively,  
416 from synthetic wastewater with  $450 \text{ mg COD.L}^{-1}$ . 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 ( $\text{COD } 450 \text{ mg.L}^{-1}$ )  
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 floes 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

441 **4. Conclusion**

442 The use of high MaB-floccs concentration C<sub>3</sub> demonstrated significant (p<0.05) higher  
443 nutrients removal rates about of 61 % (ammonium), 82 % (phosphorus) and 63 % (organic  
444 matter) after 6 days of microscale treatment without O<sub>2</sub> supply. For the same case, the size of  
445 algae floccs was evolved from small colonies to obtain a higher diameter (220.4µm) after a  
446 wastewater treatment with initial COD of 450 mg.L<sup>-1</sup>. This study reveals the possibility to  
447 optimize the operating parameters such as MaB-floccs density, COD concentration and  
448 incubation period for further multiscale applications. Thus, PVA-sulfate beads containing of  
449 MaB-floccs density C<sub>3</sub> was chosen to study the treatment of wastewater (450 mgCOD.L<sup>-1</sup>)  
450 during 6 days within the reactors at different scales with stable shapes and activities. Finally,  
451 we are currently exploring the way to extend the combination of the entrapment method with  
452 the symbiotic algae-bacteria interactions as an alternative to bioremediation techniques by  
453 recirculating the effluent in a 2D column at mesoscale approach.

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467 **Référence**

- 468 Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K & Megharaj, M. (2018). Nutrient  
469 removal and biomass production: advances in microalgal biotechnology for wastewater  
470 treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-17.
- 471 APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edn.  
472 Washington, DC: *American Public Health Association*, p:1268.
- 473 Bawiec A. (2018). Efficiency of nitrogen and phosphorus compounds removal in hydroponic  
474 wastewater treatment plant. *Environmental Technology*, 1-11.
- 475 Bišová, K., Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple  
476 fission. *Journal of Experimental Botany*, 65, 2585-2602.
- 477
- 478 Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C. J. N., Wijffels, R. H. (2014).  
479 Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors  
480 treating synthetic municipal wastewater. *Ecology Engineering*, 64, 213-221.
- 481 Bohutskyi, P., Liu, K., Nasr, L. K., Byers, N., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Bower, E. J.  
482 (2015). Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and  
483 phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate. *Applied*  
484 *Microbiology and Biotechnology*, 99, 6139-6154.
- 485 Chinnasamy S, Sood A, Renuka N, Prasanna R, Ratha S. K, Bhaskar S, Lewis D. M. (2014).  
486 Ecobiological aspects of algae cultivation in wastewaters for recycling of nutrients and  
487 biofuel applications. *Biofuels*, 5, 141-158.
- 488 Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*, 25:249–306.
- 489 Cho, D. H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B. H., Oh, H. M., Kim, H.  
490 S. (2015). Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial  
491 community. *Bioresource Technology*, 175, 578-585.
- 492
- 493 Christenson L, Sims R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater  
494 treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advance*, 29, 686–702.



- 495 De-Bashan, L. E., Antoun, H., Bashan, Y. (2008). Involvement of indole-3-acetic acid  
496 produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of  
497 *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, 44, 938-947.
- 498 De-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants:  
499 review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101, 1611-1627.
- 500 Diniz, G. S., Silva, A. F., Araújo, O. Q., & Chaloub, R. M. (2017). The potential of  
501 microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater  
502 resources. *Journal of Applied Phycology*, 29, 821-832.
- 503 Efaq, A. N., Rahman, N. N. N. A., Nagao, H., Al-Gheethi, A. A., Shahadat, M., & Kadir, M.  
504 A. (2015). Supercritical carbon dioxide as non-thermal alternative technology for safe  
505 handling of clinical wastes. *Environmental Processes*, 2, 797-822.
- 506 Gonzalez-Camejo J, Barat R, Pachés M, Murgui M, Seco A, Ferrer J. (2018). Wastewater  
507 nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on  
508 the microalgae–bacteria competition. *Environmental Technology*, 39, 503-515.
- 509 Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Biofloculent algal–bacterial  
510 biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science of Technology*, 52, 9-18.
- 511 Hallmann, A. (2006). Morphogenesis in the family Volvocaceae: different tactics for turning  
512 an embryo right-side out. *Protist*, 157, 445-461.
- 513
- 514 Hamdi M. (1995). Biofilm thickness effect on the diffusion limitation in the bioprocess  
515 reaction: Biofloc critical diameter significance. *Bioprocess engineering*, 12, 193-197.
- 516 Huang, G., Wang, Y.(2003). Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella*  
517 *pyrenoidosa* and activated sludge at different pH values. *Water Quality Research Journal of*  
518 *Canada*, 38, 541-551.
- 519
- 520 Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015). Effect of algae  
521 growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using  
522 sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.

- 523 Jia H, Yuan Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and  
524 microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2, 1275089.
- 525 Jodra Y, Mijangos F. (2003). Phenol adsorption in immobilized activated carbon with  
526 alginate gels. *Separation Science and Technology*, 38, 1851-1867.
- 527 Kim, B. H., Ramanan, R., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. (2014). Role of Rhizobium, a  
528 plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic  
529 interaction. *Biomass and Bioenergy*, 69, 95-105.
- 530
- 531 Lam MK, Lee KT, Mohamed AR. (2012). Current status and challenges on microalgae-based  
532 carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 10, 456–469
- 533 Larsdotter K, Jansen JLC, Dalhammar G. (2007). Biologically mediated phosphorus  
534 precipitation in wastewater treatment with microalgae. *Environmental Technology*, 28, 953-  
535 960
- 536
- 537 Li W. Y, Xu Y, Feng J. (2009). Treatment of coking wastewater by using an immobilized-  
538 microbial-cell anaerobic-aerobic system. *Energy Sources, Part A*, 31, 1397-1405.
- 539 Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and  
540 metal removal: a review. *Biometals*, 15, 377-390.
- 541 Mannina, G., Ekama, G. A., Capodici, M., Cosenza, A., Di Trapani, D., & Ødegaard, H.  
542 (2017). Moving bed membrane bioreactors for carbon and nutrient removal: The effect of C/N  
543 variation. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 31-40.
- 544 Mennaa F. Z, Arbib Z, Perales J. A. (2017). Urban wastewater photobiotreatment with  
545 microalgae in a continuously operated photobioreactor: growth, nutrient removal kinetics and  
546 biomass coagulation–flocculation. *Environmental Technology*, 1-14.
- 547
- 548 Moreno-Garrido I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and  
549 uses. *Bioresource Technology*, 99, 3949-3964.
- 550 Nguyen T. D. P., Frappart, M., Jaouen, P., Pruvost, J., Bourseau, P. (2014). Harvesting  
551 *Chlorella vulgaris* by natural increase in pH: effect of medium composition. *Environmental*  
552 *Technology*, 35, 1378-1388.

- 553 Oswald, W.J., Gotaas, H.B., Ludwig, H.F. Lynch, V. (1953). Algae symbiosis in oxidation  
554 ponds, III. Photosynthetic Oxygenation. *Sewage and Industrial Wastes*, 25, 692-705.
- 555 Pacheco, M.M., Hoeltz, M., Moraes, M.S., Schneider, R. C. (2015). Microalgae: cultivation  
556 techniques and wastewater phycoremediation. *Journal of Environmental Science and Health,*  
557 *Part A*, 50, 585-601.
- 558 Pahazri, N. F., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A. A., & Kassim, A. H. M. (2016).  
559 Production and harvesting of microalgae biomass from wastewater: a critical  
560 review. *Environmental Technology Reviews*, 5, 39-56.
- 561 Pilkington, P. H., Margaritis, A., & Mensour, N. A. (1998). Mass transfer characteristics of  
562 immobilized cells used in fermentation processes. *Critical reviews in biotechnology*, 18, 237-  
563 255.
- 564 Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate  
565 extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted  
566 with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by  
567 atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 975,  
568 384-394.
- 569
- 570 Praveen, P., Loh, K. C. (2015). Photosynthetic aeration in biological wastewater treatment  
571 using immobilized microalgae-bacteria symbiosis. *Applied of Microbiology and*  
572 *Biotechnology*, 99, 10345-10354.
- 573
- 574 Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria  
575 interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advance*, 34, 14-  
576 29.
- 577
- 578 Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae:  
579 phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels  
580 production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424.
- 581 Rivas, M.O., Vargas, P., Riquelme, C.E. (2010). Interaction of *Botryococcus braunii* cultures  
582 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 floes 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.

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

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

616

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

620

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

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

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637 **Figure captions**

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

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

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

642

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

646 **Figure 5.** Morphology of MaB-flocs(TIFF format) C<sub>1</sub>(2%, v/v)(A), C<sub>2</sub>(5%, v/v)(B) and  
647 C<sub>3</sub>(10%, v/v)(C) entrapped into PVA-sulfate beads before wastewater treatment (T= 0 day)  
648 (objective X2.5).

649 **Figure 6.** Morphologic evolution of entrapped MaB-flocs (TIFF format) C<sub>1</sub>(2%, v/v) (a), C<sub>2</sub>  
650 (5%, v/v) (b) and C<sub>3</sub>(10%, v/v) (c) in PVA-sulfate beads after a wastewater treatment  
651 containing initial COD 450mg.L<sup>-1</sup> (objective X10).

652 **Figure 7.** Morphologic evolution of entrapped MaB-flocs (TIFF format) C<sub>2</sub>(5%, v/v) (a) and  
653 C<sub>3</sub>(10%, v/v) (b) in PVA-sulfate beads after a wastewater treatment containing initial COD  
654 200 mg.L<sup>-1</sup> (objective x10).

655 **Figure 8.** Variation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> removal rates during the treatment of wastewater  
656 containing initial COD 450 mg.L<sup>-1</sup>(a) and 200 mg.L<sup>-1</sup> (b), with different MaB-flocs  
657 concentrations C<sub>1</sub>(2%, v/v); C<sub>2</sub>(5%, v/v); C<sub>3</sub>(10%, v/v) entrapped into PVA-sulfate beads.

658 **Figure 9.** Variation of organic compounds (COD) removal rates during the treatment of  
659 wastewater containing initial COD 450 mg.L<sup>-1</sup> (a) and 200 mg.L<sup>-1</sup> (b), with different MaB-  
660 flocs concentrations C<sub>1</sub>(2%, v/v); C<sub>2</sub>(5%, v/v); C<sub>3</sub>(10%, v/v) entrapped into PVA-sulfate  
661 beads.

662

663

664

665 **Tables**

666 **Table 1.** Synthetic wastewater composition.

667 **Table 2.** Biomass characteristics and settling of MaB-floes from batch reactor

668 **Table 3.** Variation of diameter means of MaB-floes after 2 and 6 days of wastewater  
669 treatment with initial COD 450 mg.L<sup>-1</sup> (a) and 200 mg.L<sup>-1</sup> (b), for three MaB-floes  
670 concentrations C<sub>1</sub>(2%, v/v); C<sub>2</sub>(5%, v/v); C<sub>3</sub>(10%, v/v) entrapped into PVA-sulfate beads.

671 **Table 4.** Michaelis-Menten kinetic parameter values (V<sub>m</sub> and K<sub>m</sub>) for three MaB-floes  
672 concentrations C<sub>1</sub>(2%, v/v); C<sub>2</sub>(5%, v/v); C<sub>3</sub>(10%, v/v) after wastewater treatment with initial  
673 COD 450 mg.L<sup>-1</sup> and 200 mg.L<sup>-1</sup>.

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687 **Figure 1.**

688



689

690

691

692

693

694

695

696

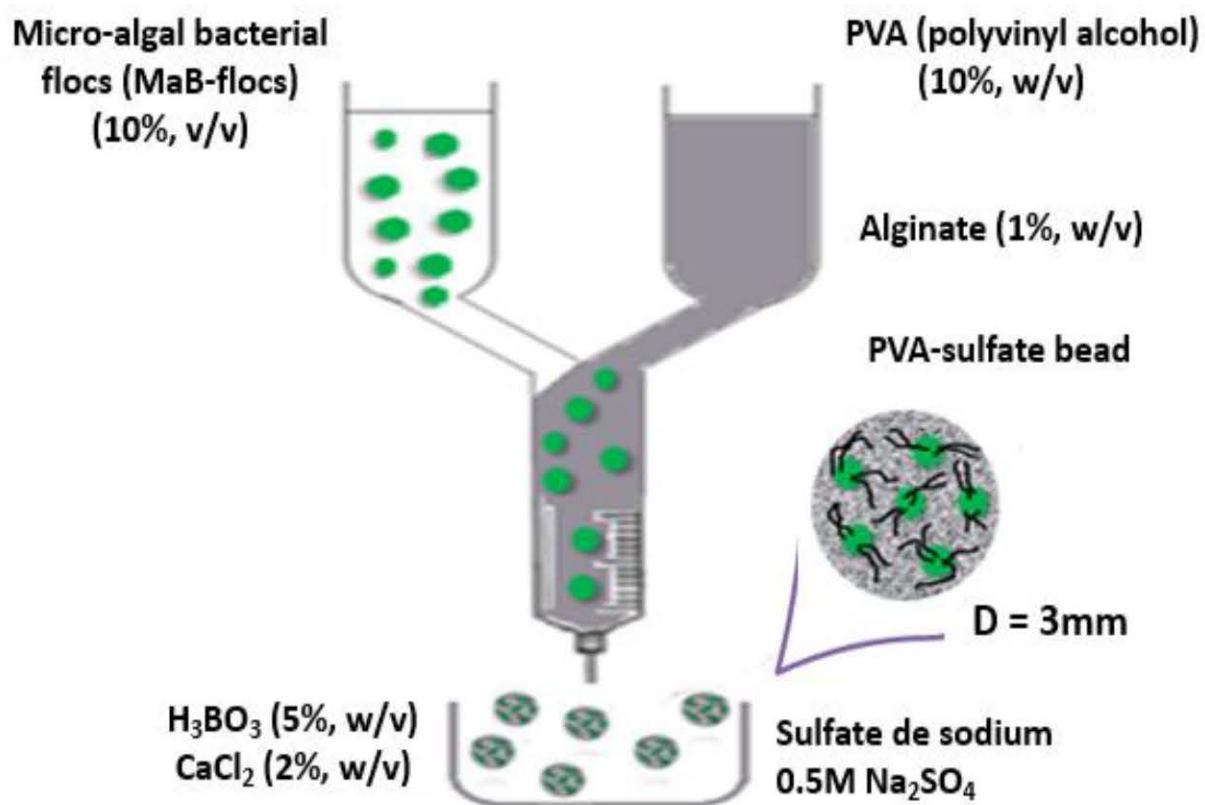
697

698



699 Figure 2.

700



701

702

703

704

705

706

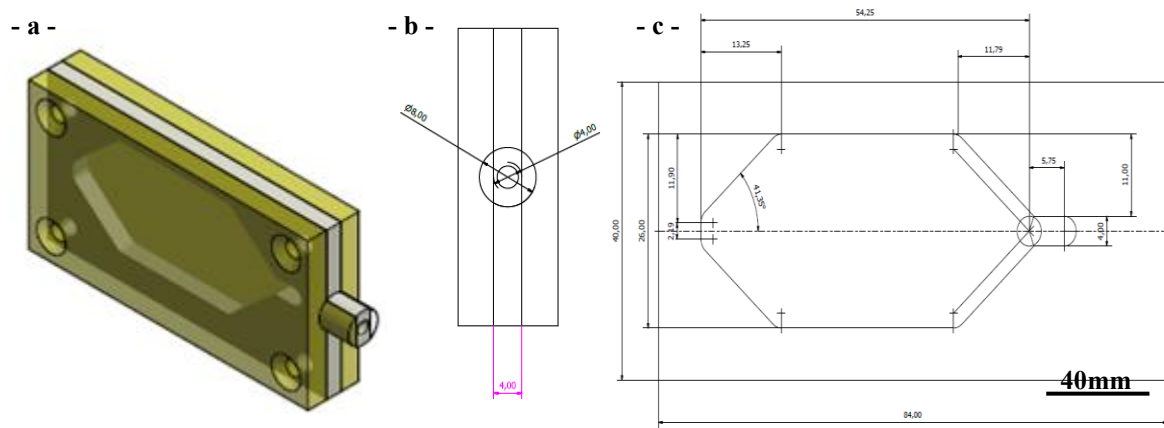
707

708

709

710 **Figure 3.**

711



712

713

714

715

716

717

718

719

720

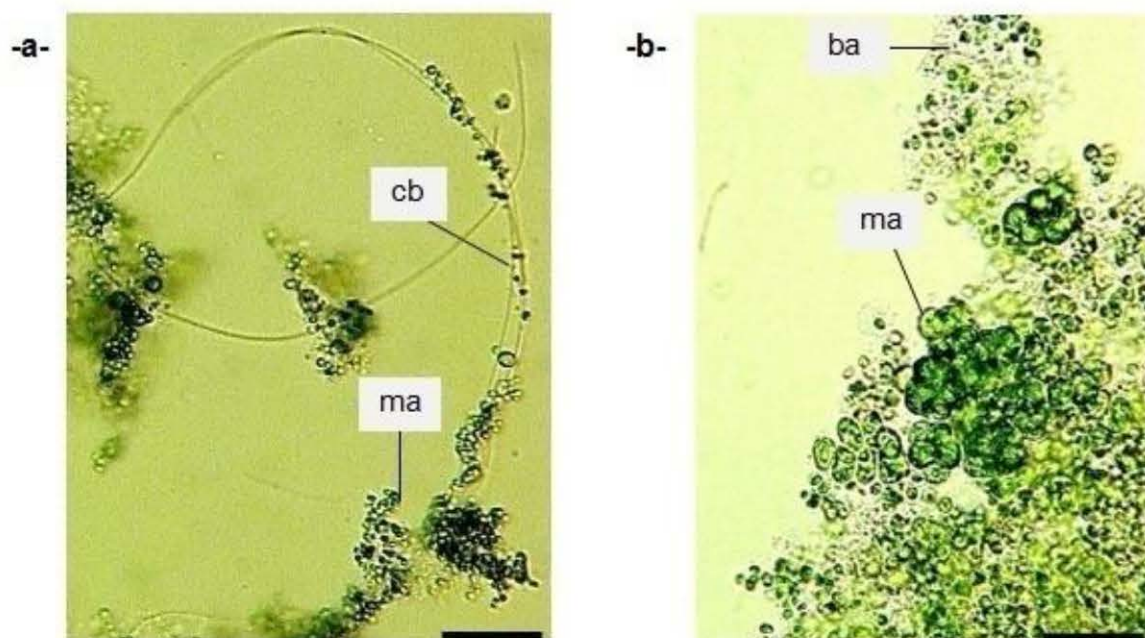
721

722

723

724 **Figure 4.**

725



726

727

728

729

730

731

732

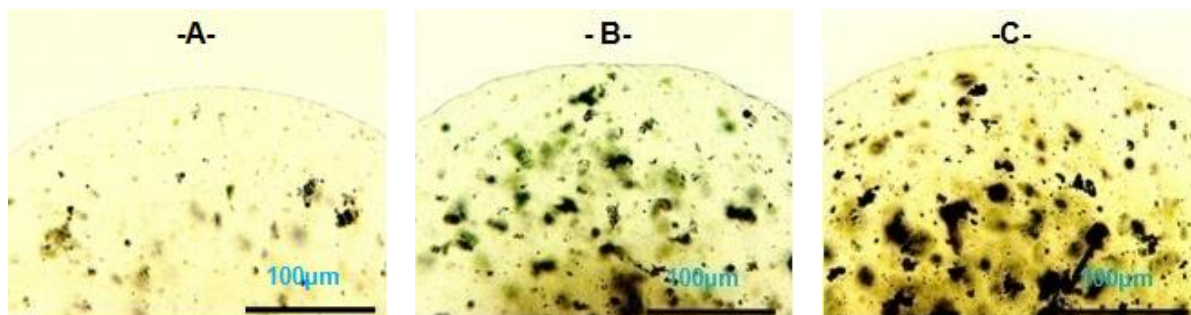
733

734

735

736 **Figure 5.**

737



738

50µm

739

50µm

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

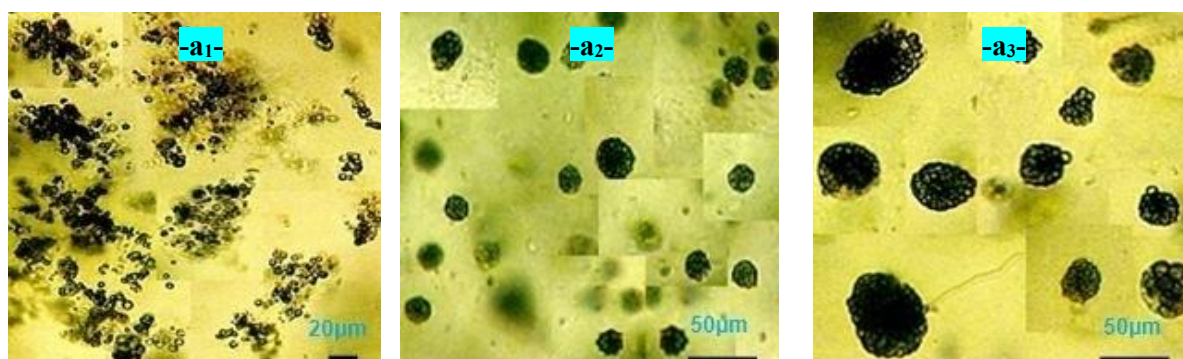
752

753

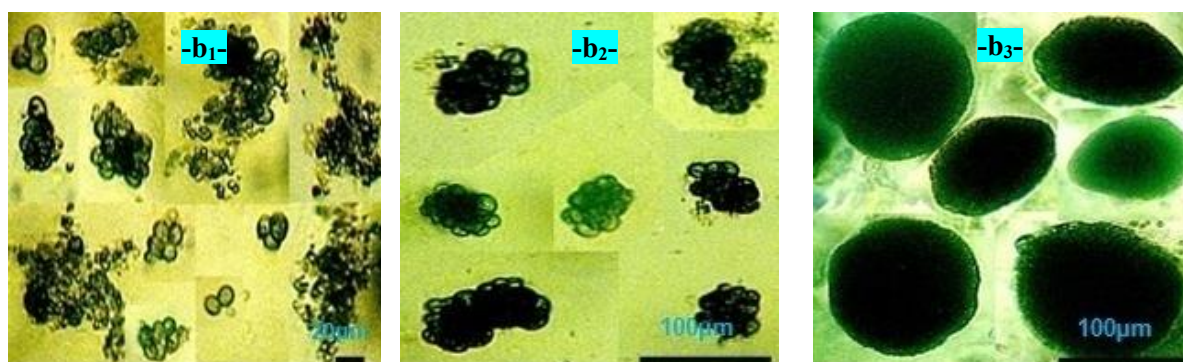
754

755 **Figure 6.**

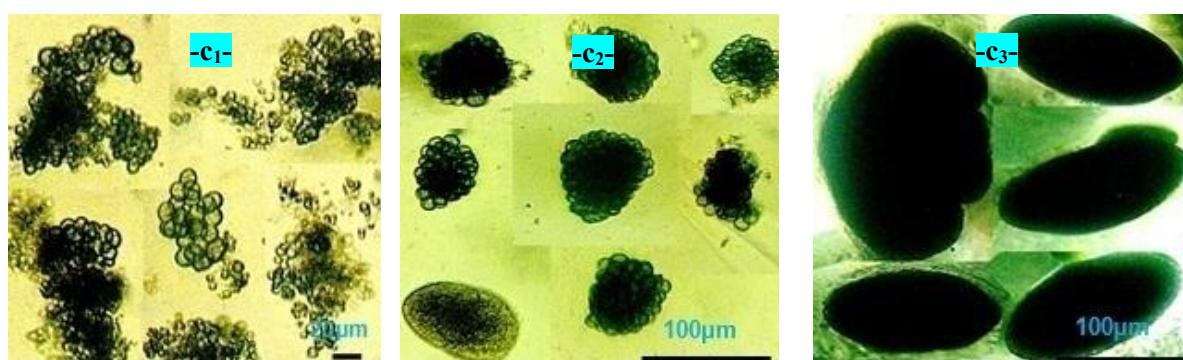
756



**Fig. 6.a. C<sub>1</sub> MaB-flocs bead: a<sub>1</sub> after 2 days, a<sub>2</sub> after 4 days and a<sub>3</sub> after 6 days**



**Fig.6.b. C<sub>2</sub> MaB-flocs bead: b<sub>1</sub> after 2 days, b<sub>2</sub> after 4 days and b<sub>3</sub> after 6 days**



757 **Fig. 6.c. C<sub>3</sub> MaB-flocs bead: c<sub>1</sub> after 2 days, c<sub>2</sub> after 4 days and c<sub>3</sub> after 6 days**

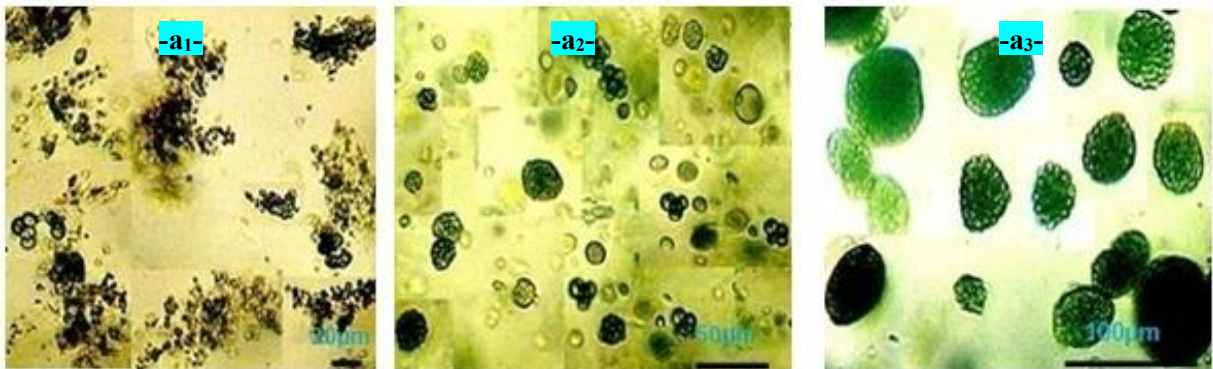
758

759



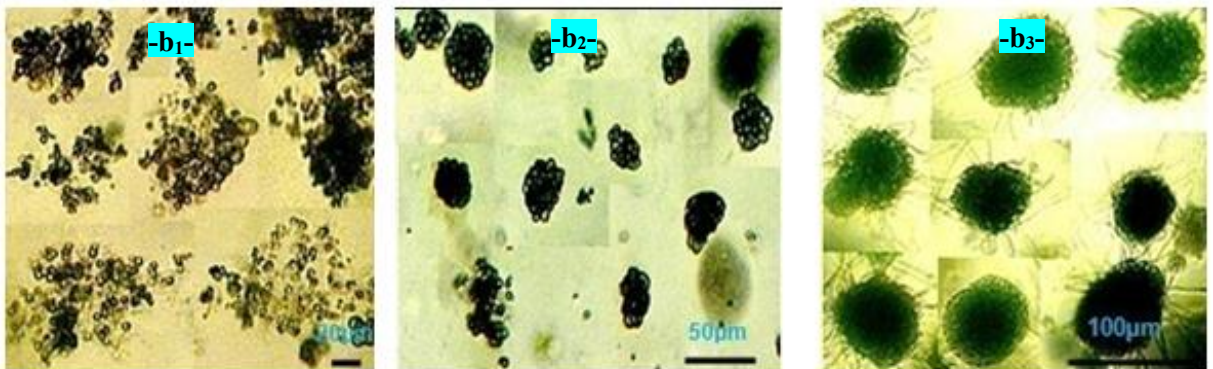
760 **Figure 7.**

761



762

763 **Fig.7.a. C<sub>2</sub> MaB-flocs bead: a<sub>1</sub> after 2 days, a<sub>2</sub> after 4 days and a<sub>3</sub> after 6 days**



764

765 **Fig.7.b. C<sub>3</sub> MaB-flocs bead: b<sub>1</sub> after 2 days, b<sub>2</sub> after 4 days and b<sub>3</sub> after 6 days**

766

767

768

769

770

771

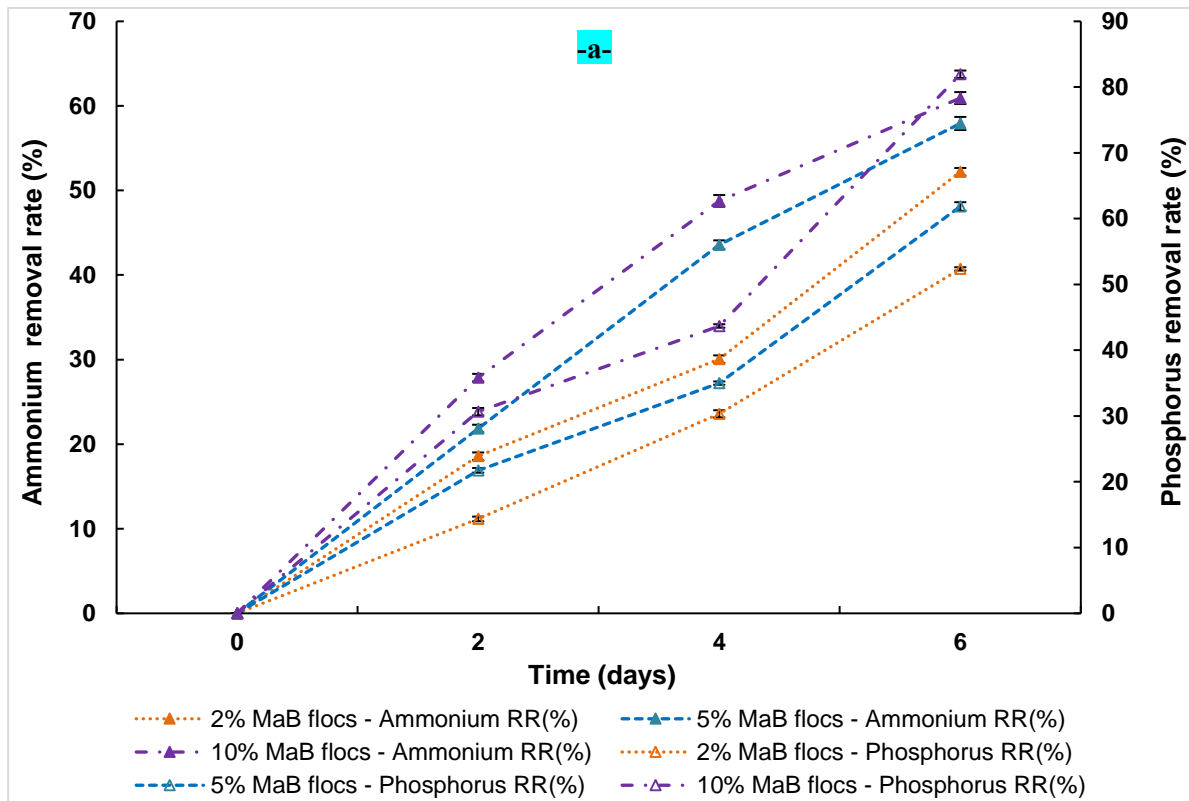
772

773

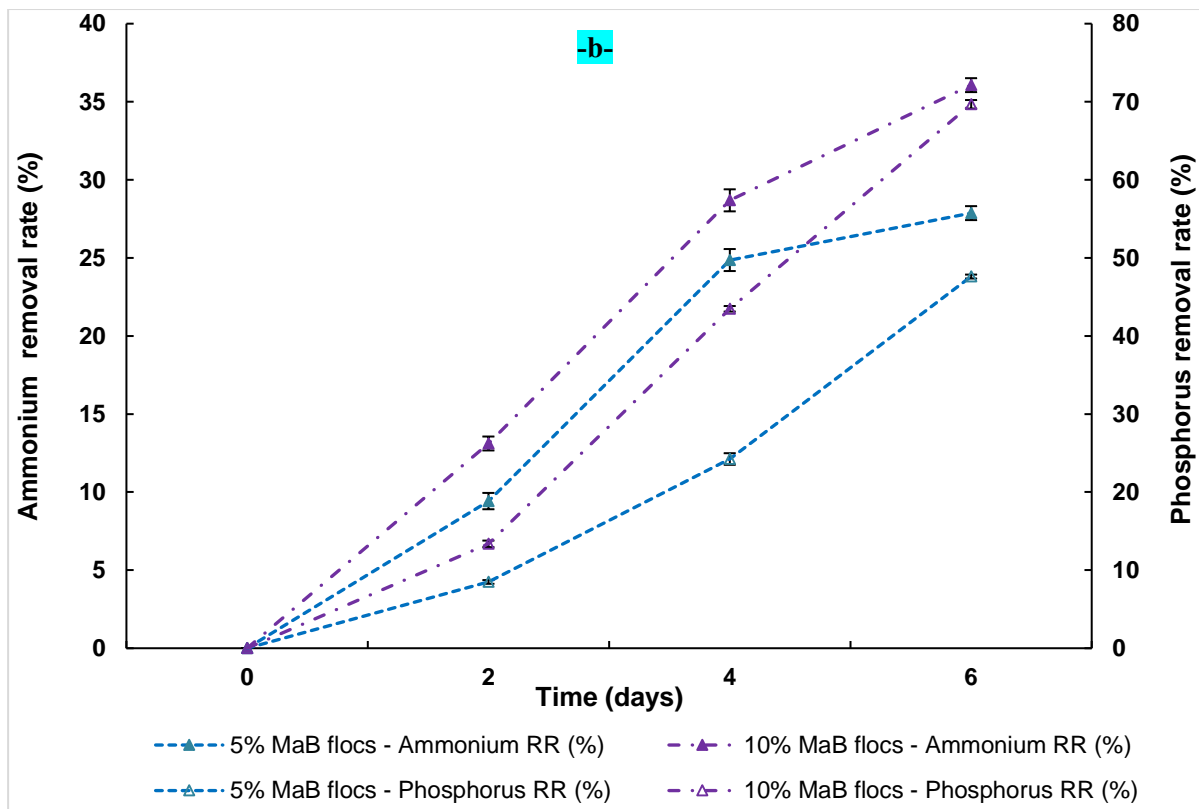
774

775 **Figure 8.**

776



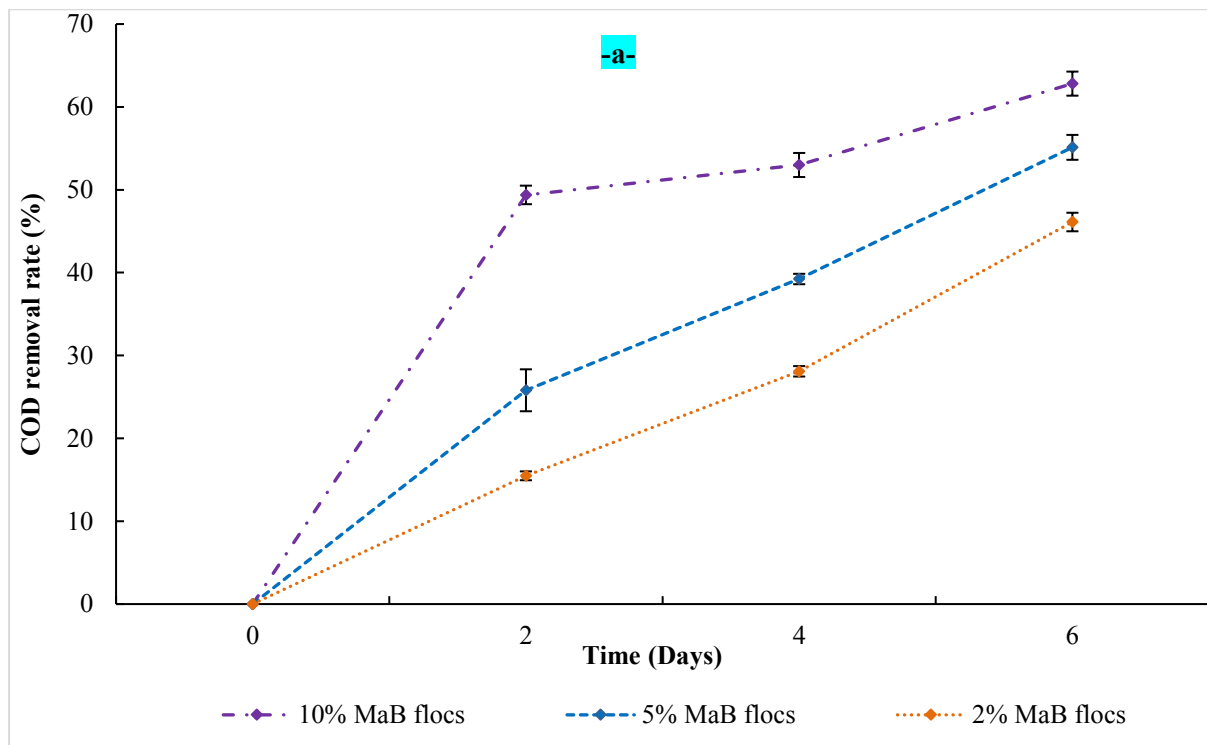
777



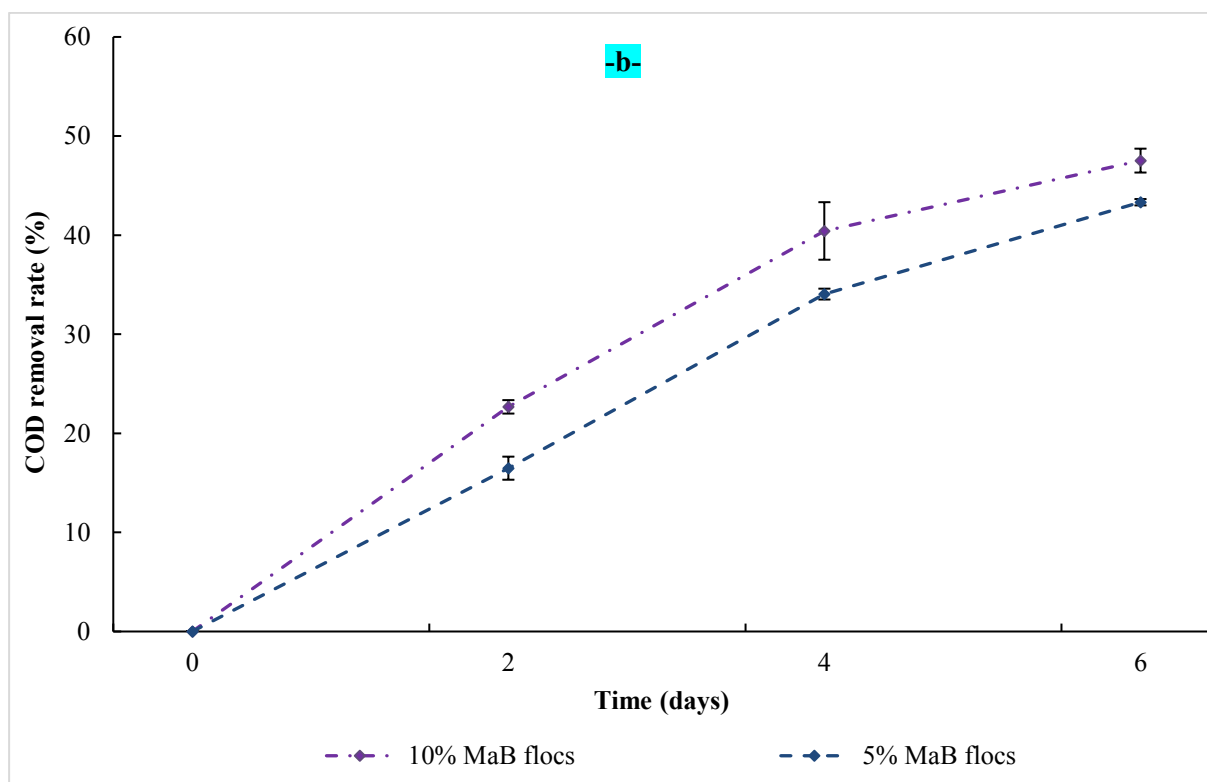
778

779 **Figure 9.**

780



781



782

783



784 **Tables**

785 **Table 1.**

786

Components		Concentrations (mg.L <sup>-1</sup> )	
Medium organic (O)(1L)	Glucose	450 mg	50%=223.8
	Acetate	COD L <sup>-1</sup>	50%=452.44
Medium nutrient (N)(1L)	NH <sub>4</sub> Cl	100	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5	
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5	
Trace elements (1mL.L <sup>-1</sup> )	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50	
	ZnCl <sub>2</sub>	50	
	CuCl <sub>2</sub>	30	
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	50	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	50	
	AlCl <sub>3</sub>	50	
	CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	50	
	NiCl <sub>2</sub>	50	

787

788

789

790

791 **Table 2.**

792

Parameters	Unit	Initial preparation of sludge	26 days of MaB-flocs cultivation
<i>Biomass</i>			
TSS	g TSS.L <sup>-1</sup>	14.4 ± 0.01	5.6± 0.2
VSS	g VSS.L <sup>-1</sup>	10.2 ± 0.3	3.2 ± 0.05
Chl (a)	mgChl (a) g <sup>-1</sup> VSS	0.12 ± 0.15	3.8± 0.24
AI*	mg VSS mg <sup>-1</sup> Chl (a)	8325.2 ± 0.15	260.7 ± 0.16
<i>Floc settling</i>			
I <sub>M</sub>	ML.L <sup>-1</sup>	970	450
SVI <sub>30</sub>	ML.g <sup>-1</sup>	91.5	80

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

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804 **Table 3.**

805

Wastewater treatment conditions		MaB-flocs densities		
		C <sub>1</sub> (2%, v/v)	C <sub>2</sub> (5%, v/v)	C <sub>3</sub> (10%, v/v)
		d(MaB-flocs) ± SD	d(MaB-flocs) ± SD	d(MaB-flocs) ± SD
Initial COD	After 2 days	4 ± 0.2 μm <sup>a,α</sup>	8.5 ± 0.16 μm <sup>b,α</sup>	12 ± 0.3 μm <sup>c,α</sup>
450 mg.L <sup>-1</sup>	After 6 days	87.8 ± 0.18 μm <sup>a,β</sup>	126.8 ± 0.3 μm <sup>b,β</sup>	220.4 ± 0.24 μm <sup>c,β</sup>
Initial COD	After 2 days	1.6 ± 0.03 μm <sup>a,α</sup>	3.8 ± 0.1 μm <sup>b,α</sup>	6.2 ± 0.06 μm <sup>c,α</sup>
200 mg.L <sup>-1</sup>	After 6 days	42 ± 0.2 μm <sup>a,β</sup>	65.3 ± 0.2 μm <sup>b,β</sup>	75.5 ± 0.05 μm <sup>c,β</sup>

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

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818 **Table 4.**

819

		$V_m$ (mg.L <sup>-1</sup> .H <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$R^2$
<b><u>Substrate(1): Ammonium</u></b>				
<b>Initial COD</b> <b>450 mg.L<sup>-1</sup></b>	MaB-floes C <sub>1</sub> (2%, v/v)	0.987	2.295	0.824
	MaB-floes C <sub>2</sub> (5%, v/v)	1.033	3.192	0.759
	MaB-floes C <sub>3</sub> (10%, v/v)	2.178	5.156	0.956
<b>Initial COD</b> <b>200 mg.L<sup>-1</sup></b>	MaB-floes C <sub>2</sub> (5%, v/v)	0.482	2.562	0.791
	MaB-floes C <sub>3</sub> (10%, v/v)	0.975	3.802	0.734
<b><u>Substrate(2): Phosphorus</u></b>				
<b>Initial COD</b> <b>450 mg.L<sup>-1</sup></b>	MaB-floes C <sub>1</sub> (2%, v/v)	0.364	2.147	0.836
	MaB-floes C <sub>2</sub> (5%, v/v)	0.430	3.122	0.762
	MaB-floes C <sub>3</sub> (10%, v/v)	0.385	3.502	0.745
<b>Initial COD</b> <b>200 mg.L<sup>-1</sup></b>	MaB-floes C <sub>2</sub> (5%, v/v)	0.150	1.432	0.905
	MaB-floes C <sub>3</sub> (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 choisies afin d'être 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 floccs-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 floccs 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 floccs-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'identifier l'influence des différentes conditions hydrodynamiques telles que le débit, la recirculation des liquides et la conception du réacteur sur l'évolution morphologique des floccs-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 floccs de bactéries-microalgues immobilisés dans des réacteurs multitrophiques à multi-échelles**

1 **Short Communication (I): Impacts of hydrodynamic conditions on**  
2 **pollutants removal using immobilized microalgae-bacteria floes in**  
3 **multiscale multitrophic reactors**

4  
5

6 **Olfa Beji<sup>a,b</sup>, Nouceiba Adouani<sup>a</sup>, Souhila Poncin<sup>a</sup>, Marie-Noëlle Pons<sup>a</sup>,**  
7 **Moktar Hamdi<sup>b</sup>, Huai Z. Li<sup>a\*</sup>**

8  
9

10  
11 <sup>a</sup>Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue  
12 Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

13 <sup>b</sup>Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute  
14 of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

15  
16

17  
18

19  
20

21  
22

23  
24

25  
26

27  
28

\*Corresponding author:

29 Pr. Huai Zhi LI

30 [huai-zhi.li@univ-lorraine.fr](mailto:huai-zhi.li@univ-lorraine.fr)

## 31 **1. Introduction**

32 Microalgae-bacterial floes (MaB-floes) are now receiving extensive global attention as an  
33 integrating ecology and economy approach for the bioremediation of wastewater sufficient  
34 solar radiation (Van Den Hende et al., 2016). Multitrophic (algae-bacteria) technology as a  
35 sustainable wastewater treatment process, incorporates the entire algal biomass and  
36 simultaneously accomplishes the removal of pollutants. In this context, immobilization of  
37 MaB-floes into PVA-alginate matrix have been applied as a promising wastewater treatment  
38 (Van Pham et al., 2014). Under immobilized system, the sun-powered process is based on the  
39 multitrophic interactions between autotrophic microalgae and heterotrophic bacteria which are  
40 the subject of several applications by reducing organic and mineral compounds. The  
41 multitrophic interactions between algae and bacteria was supported by gas and nutrients  
42 exchange, while algae facilitate bacterial growth through direct nutrient exchange by  
43 providing organic compounds released during photosynthesis or by providing nutrients from  
44 decomposing algal cells (Gutzeit et al., 2005). The present work aims at developing an  
45 original approach to investigate various phenomena at different scales within a multitrophic  
46 bioreactor in order to intensify its performance for sustainable bioremediation. The role of  
47 hydrodynamic conditions on MaB-floes morphological evolution and nutrients removal  
48 efficiency at both micro- and mesoscale are discussed from these results. From previous  
49 studies on micro-batch-reactor (without liquide recirculation) best conditions were selected in  
50 order to obtain a high wastewater treatment (section II.2). Hence, the use of PVA-alginate  
51 beads containing C<sub>3</sub> (10%, v/v) of MaB-floes density for wastewater treatment with initial  
52 COD 450 mg.L<sup>-1</sup> during 6 days was applied into microscale and mesoscale reactors. During  
53 the process of cell immobilization, a high biomass density entrapped within the matrix allows  
54 the stability of the cells in a small size of the photobioreactor (Sagir et al., 2017).

55

## 56 **2. Materials and methods**

57 Microalgae bacterial-floes (MaB-floes) culture, prepared during previous study, had 5.62 g  
58 TSS.L<sup>-1</sup>, 3.24 g VSS.L<sup>-1</sup> and 3.83 mg Chlorophyll (a).g<sup>-1</sup> (VSS) was encapsulated by the  
59 addition of alginate crosslinked with boric acid solution, as described in section II.2. PVA-  
60 sulfate beads were prepared by transferring the PVA-boric beads to 0.5M sulfate sodium  
61 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution to avoid the drastic decrease in microorganism viability caused by saturated  
62 boric (Van Pham et al., 2014). After the immobilization process, a multi-scale wastewater

63 treatment was undergone into a microreactor and column 2D during a single light phase of  
64 24 h by using two fluorescent lamps with a light power of 1050 lm each (18W, Philips,  
65 France). During the microscale wastewater treatment, three PVA-sulfate beads containing C<sub>3</sub>  
66 (10%, v/v) of MaB-flocs were stacked between three grids in the microreactor, as shown in  
67 Figure 1. The micro-reactor was operated in batch mode by varying different internal liquid  
68 recirculation rates Q<sub>1</sub> (0.5 mL.min<sup>-1</sup>), Q<sub>2</sub> (0.6 mL.min<sup>-1</sup>) and Q<sub>3</sub> (0.7 mL.min<sup>-1</sup>) of the  
69 wastewater containing 450 mg COD.L<sup>-1</sup>, described by Huang et al. (2015). To circulate the  
70 liquid into the microreactor hermetically closed, nitrogen gas was injected at the bottom of the  
71 influent bottle. Otherwise, a mesoscale treatment was performed in a 2D column (Figure 2) by  
72 varying the volume of beads N<sub>1</sub>:5 mL, N<sub>2</sub>:2.5 mL, and N<sub>3</sub>:1 mL for 50 mL of the wastewater  
73 that suspended at 28.23 mL.min<sup>-1</sup> flow rate. The main objective of this study was to  
74 investigate the effect of beads' volume on the bioremediation and the morphological  
75 evolution of flocs. In each case, same as the experiment in the microreactor, beads were  
76 incubated for three different periods of wastewater treatment: 2, 4 and 6 days under a  
77 continuous light phase. Both reactors were inoculated with synthetic wastewater containing  
78 initial NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P and COD concentrations of 30 mg.L<sup>-1</sup>, 15 mg.L<sup>-1</sup> and 450 mg.L<sup>-1</sup>  
79 respectively (Huang et al., 2015). The feasibility of this PVA-alginate immobilization  
80 technology was investigated by checking the growth of the MaB-flocs on a bead by  
81 microscopy observation. Every two days, organic and mineral nutrients (COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and  
82 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) concentration were analyzed to prove the performance of anaerobic reactors efficiency  
83 for multiscale bioremediation.

84

### 85 **3. Results and discussions**

#### 86 **3.1. Microreactor performance**

##### 87 *3.1.1. Nutrients (COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) removal rates analysis*

88 The performance of multitrophic wastewater treatment in the microreactor containing three  
89 grids has shown in Figure 3 the evolution of COD and nutrients (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) at different  
90 flow rates Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub> and Q<sub>3</sub> of influent recirculation using C<sub>3</sub> (10%, v/v) of MaB-flocs. The  
91 compartment of algae in terms of nutrients removal was strictly affected by the  
92 hydrodynamic features (Huang et al., 2016). The best bioremediation was obtained after 6  
93 days using a flow rate of Q<sub>3</sub> with significant ammonium, phosphorous and COD removal  
94 efficiencies of 61.87 ± 0.2 %, 92.45 ± 0.4 % and 82.37 ± 0.7 %, respectively. The lowest  
95 internal recirculation of effluent promotes bacteria-microalgae interactions in order to



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

### 100 *3.1.2. Morphological evolution of MaB-floccs*

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

## 111 **3.2. Column 2 D performance**

### 112 *3.2.1. Nutrients (COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) removal rates analysis*

113 During mesoscale multitrophic wastewater treatment in the 2D column, the two highest  
114 volumes of PVA-beads (N<sub>1</sub> and N<sub>2</sub>) showed the increase of the carbon compound released  
115 from the hydrogel to the external medium due to the high collision frequency between beads.  
116 The lowest volume of beads (N<sub>3</sub>:1 ml) characterized by a low collision frequency, has  
117 demonstrated a best COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> removal rates of 72.07 ± 0.2 %, 78,26 ± 0.3 % and  
118 90,56 ± 0.4 %, respectively after 6 days of wastewater treatment (Figure 4).For all analysis in  
119 both reactors, the faster removal process was observed for phosphate.This result confirms that  
120 PVA-sulfate beads are relatively easy to handle on a large scale in the 2D column and the  
121 collision frequency between beads affects the organic and mineral pollutants removal.

### 122 *3.2.2. Morphological evolution of MaB-floccs*

123 The main purpose of this work is to investigate the feasibility of the immobilization process  
124 into PVA-sulfate matrix on MaB-floccs growth under column 2D process. The colonial  
125 forming algae favorites the immobilization system in order to enhance the light absorption of  
126 light, compared to suspended cells (Calderon et al., 2018). Shear rates exerted on PVA-sulfate  
127 beads have shown the effect of the liquid flow fields and the relative motion of bubbles on the  
128 morphological evolution of algae. The use of the lowest volume of beads (N<sub>3</sub>:1 mL) seems to

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

#### 135 **4. Conclusion**

136 This study confirms that PVA-sulfate matrix seems to be a suitable immobilized system  
137 which maintains the morphological progression of microalgae-bacteria floes during 6 days of  
138 experiences. For all experiments, high density of MaB-floes C<sub>3</sub> (10%, v/v) has demonstrated  
139 the highest pollutants (C, N, and P) removals and the best multicellularity evolution of  
140 algae. PVA-sulfate beads are relatively easy to handle on a large scale in the 2D column and  
141 the collision frequency between beads affect the organic and mineral pollutants removal and  
142 the morphological evolution of algae. Mesoscale reactor (column 2D) shows a high COD and  
143 nutrients (N, P) removal rates of about 72 %, 78 %, and 90 % respectively, using a low beads'  
144 volume (1mL). Thus, the use of a low beads' volume causes low frequency of collision and  
145 affects less the morphological evolution of algae floes. Then, the interaction particles-particles  
146 affects the nutrients diffusion to the matrix and the biological metabolisms within the  
147 crosslink of the bead.

148 For microreactor with 3 grids, the low recirculation of effluent with a flow rate Q<sub>3</sub>: 0.7 mL.  
149 min<sup>-1</sup> shows the highest removal rates in termes of COD (82 %) , NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (62 %) PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (92 %)  
150 than the others flow rates. By compared with the microreactor without a flow, the  
151 morphological evolution of the floes shows a less cell transition.

152

153

154

155

156

157

158 **References**

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

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

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

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

170 Sagir, E., Alipour, S., Elkahout, K., Koku, H., Gunduz, U., Eroglu, I., & Yucel, M. (2017).  
171 Scale-up studies for stable, long-term indoor and outdoor production of hydrogen by  
172 immobilized *Rhodobacter capsulatus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 22743-  
173 22755.

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

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

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

183

184

185

186 **Figure captions**

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

189 **Figure 2.** Column 2D design

190 **Figure 3.** Variation of COD,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  removal rates after 6 days of wastewater  
191 treatment by PVA-beads containing  $\text{C}_3$ (10%, v/v) at different flow rates  $Q_1$ ,  $Q_2$  and  $Q_3$

192 **Figure 4.** Variation of COD,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  removal rates during wastewater treatment by  
193 using PVA-alginate (10% MaB-flocs) under Column 2D containing  $\text{N}_3$ :1mL

194

195 **Tables.**

196

197 **Table 1.** Morphologic evolution of  $\text{C}_3$ (10%, v/v) of MaB-flocs entrapped in PVA-beads after  
198 6 days of treatment into micro-reactor with different flow rates  $Q_1$ ,  $Q_2$  and  $Q_3$  (objective  
199 X10).

200

201 **Table 2.** Morphologic evolution of  $\text{C}_3$ (10%, v/v) MaB-flocs entrapped in PVA- beads during  
202 wastewater treatment into column 2D containing volume of beads ( $\text{N}_3$ :1 ml) (objective X10).

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

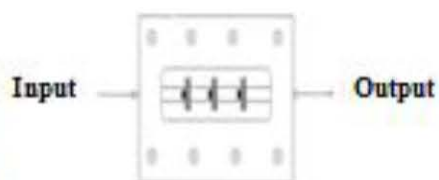
214

215

216

217 **Figure 1.**

218



219

220

221

222

223

224

225

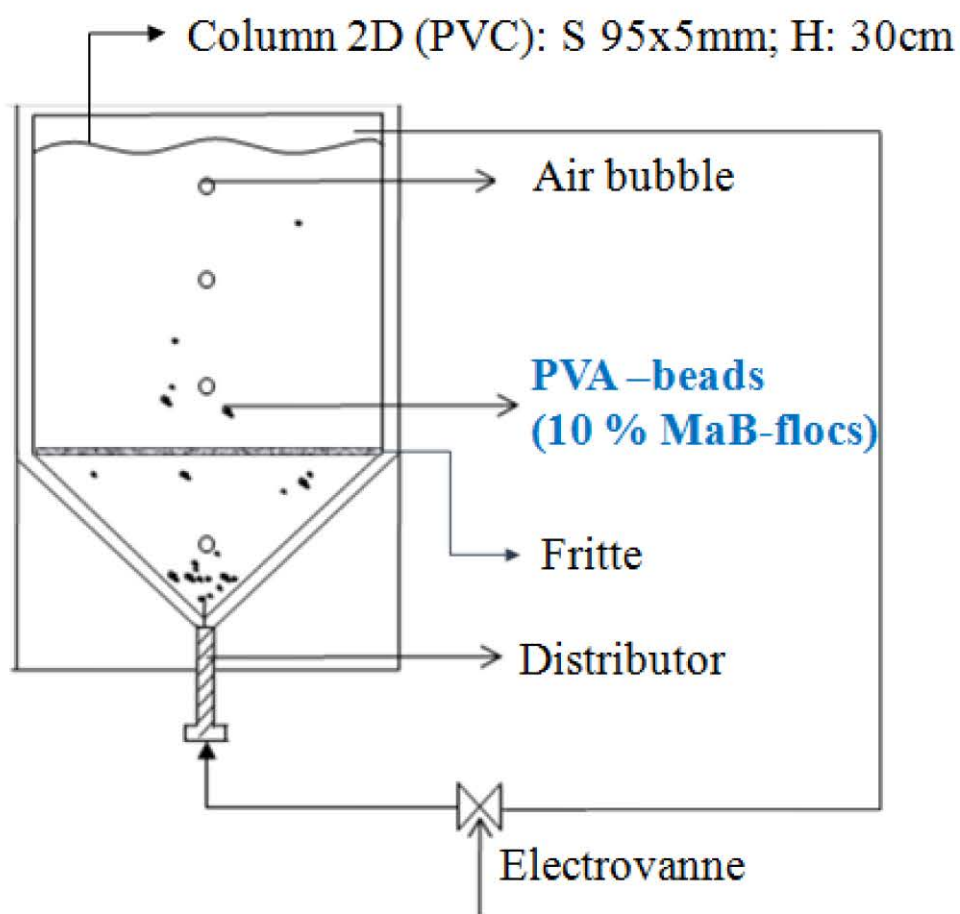
226

227

228

229

230 **Figure 2.**



231

232

233

234

235

236

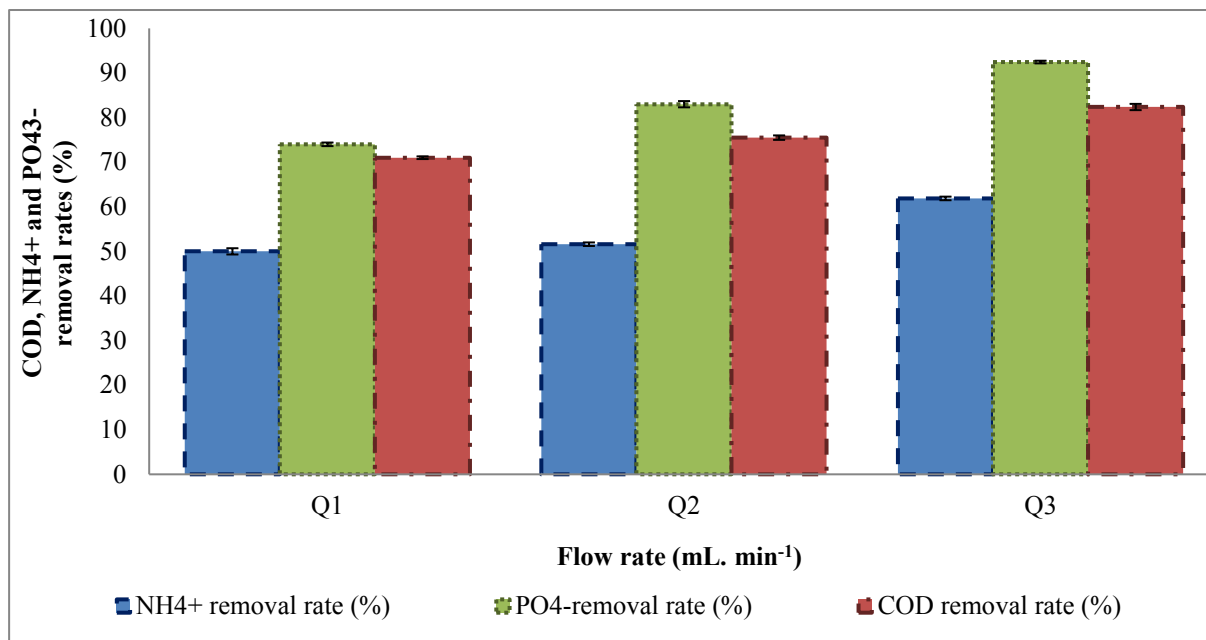
237

238

239

240 Figure 3.

241



242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

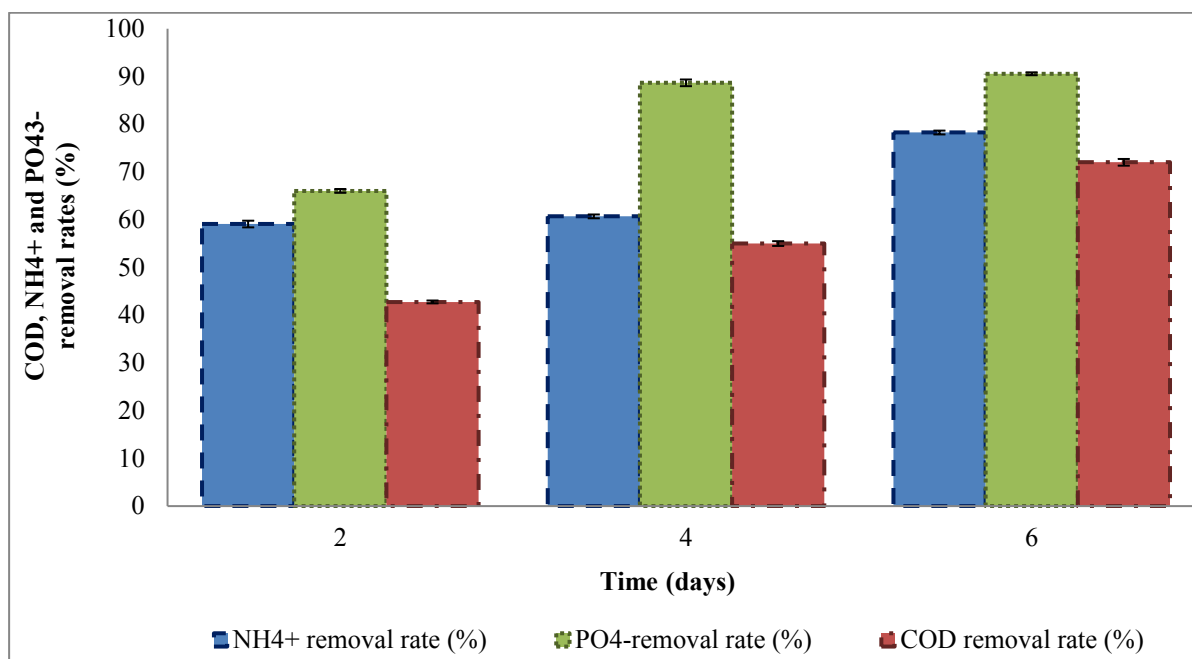
259

260

261 **Figure 4.**

262

263



264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

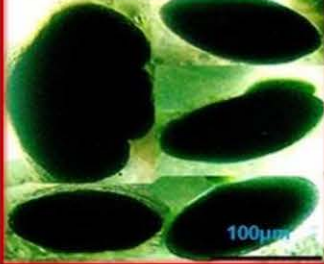
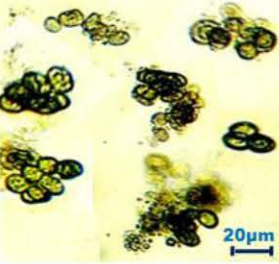
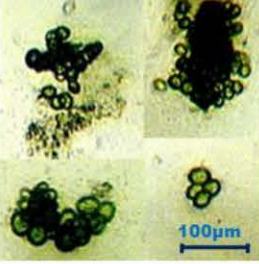
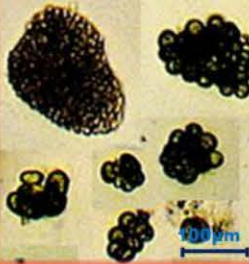
274

275



276 Table 1.

277

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

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

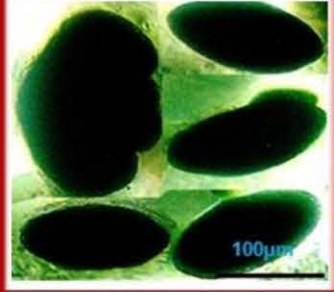
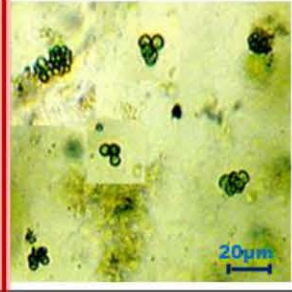
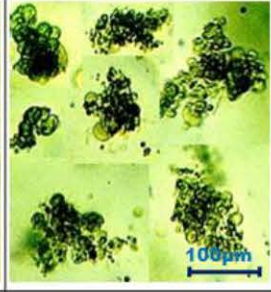
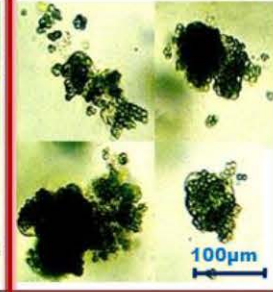
290

291

292

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<sub>3</sub> (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 floes-MaB a été observée afin d'obtenir un diamètre élevé de 220,4 µm après un traitement des eaux usées (DCO 450 mg.L<sup>-1</sup>). 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<sub>3</sub> (10%, v/v) ont été choisies pour étudier le traitement des eaux usées (450 mgCOD.L<sup>-1</sup>) pendant 6 jours au sein des réacteurs à multi-échelles avec des formes et des activités stables.

Cette étude de faisabilité des floes-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 floes-MaB. Plus la vitesse d'écoulement est lente à l'intérieur du réacteur plus la transition multicellulaire des floes 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 floes d'algues. Ainsi, l'utilisation d'un faible volume de billes entraîne une faible fréquence de collision et affecte moins l'évolution morphologique des floes-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 floccs 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 photobiorémédiation 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 biorémédiation des polluants (DCO, ammonium et phosphore) sans apport d'oxygène et les interactions multitrophiques établies dans les floes-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 floes de bactéries-microalgues (floes-MaB). La présente étude visait donc à déterminer un support approprié pour la fixation des floes-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):  $d = 1 \text{ mm}$  et OPP (B):  $d = 1,5 \text{ mm}$  à trois concentrations  $\alpha$  (1, 2 et 4 vol.%) ont été testées pour souligner leur effet sur le comportement hydrodynamique à différents débits de gaz ( $U_g$ ) 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 le 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 floes de bactéries-microalgues sur l'élimination des polluants dans un réacteur lit fluidisé-SBR à biofilm**

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

4

5 **Olfa Beji<sup>a,b</sup>, Nouceiba Adouani<sup>a</sup>, Souhila Poncin<sup>a</sup>, Huai Z. Li<sup>a\*</sup>, Moktar Hamdi<sup>b</sup>**

6

7

8

9 <sup>a</sup>Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue  
10 Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

11 <sup>b</sup>Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute  
12 of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23 \*Corresponding author:

24 Pr. Huai Zhi LI

25 [huai-zhi.li@univ-lorraine.fr](mailto:huai-zhi.li@univ-lorraine.fr)

26 **Abstract**

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

41

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

44

45

46

47

48

49

50

51

52

## 53 **1. Introduction**

54 Renewable energy in term of the circular economy is of major importance to maintain a large  
55 development of the society. The algae biomass production is considered as an economical and  
56 sustainable strategy for generating renewable energy. This energy-efficient covers about 33–  
57 50 % of the world energy needs by 2050 (Vassilev et al., 2013). A current problem of global  
58 warming via greenhouse gasses (GHG) emissions has triggered the combustion of green  
59 biomass for remediation through photosynthetic oxygenation (Maza-Márquez et al., 2014;  
60 Dahalan et al., 2015). The green technology of wastewater treatment has been applied for the  
61 first time into high rate algal ponds (HRAPs) (Oswald, 1988). Microalgae-bacteria flocs  
62 (MaB-flocs) ponds have received considerable interest as a potential feedstock for sustainable  
63 wastewater treatment through photosynthetic O<sub>2</sub> supply (Quijano et al., 2017). Most studies  
64 focus on the coupling between microalgae and activated sludge bacteria for the efficiency  
65 remove of carbon (C) through aerobic carbon oxidation and nutrients (N and P) via  
66 assimilation into biomass (Kang et al., 2018). A novel cultivation strategy of microalgae  
67 bacterial-flocs (MaB-flocs) was elucidate into sequencing batch reactors (SBR) system (MaB-  
68 flocs SBRs) to enhance the pollutants removal during wastewater treatment without O<sub>2</sub>  
69 supply. Recently, Van Den Hende et al. (2017) have evaluated the performance of MaB-flocs  
70 SBRs as an innovative technology for the treatment of paper mill UASB effluent via only  
71 photosynthetic aeration. This SBR system leads to significant organic carbon (58-21 %),  
72 inorganic carbon (27-8 %), nitrogen (77-5 %) and phosphorus (73-2 %) removal rates from  
73 the paper mill effluent (Van Den Hende et al., 2017). Although SBR operation can be  
74 permanently set for the separation of MaB-flocs biomass from treated wastewater during the  
75 settling phase (Van Den Hende et al., 2016), this operation mode may also be used during  
76 fluidized bed process. Therefore, the potential of the MaB-flocs SBR process for the  
77 treatment of synthetic wastewater was investigated by using multitrophic fluidized bed  
78 biofilm reactor (MFBBR) in the absence of additional O<sub>2</sub>. Several investigations have shown  
79 the application of attached-growth system using bioparticles, such as the Circulating Fluidized  
80 Bed Biofilm Reactor (CFBBR) in order to reduce the sludge production and to enhance  
81 biological nutrient removal (Li et al., 2012). This strategy of immobilization of consortium  
82 could be a simple harvesting concept with low cost and a feasible application for wastewater  
83 treatment without energy supply (Cheirsilp et al., 2017 ; Bello et al., 2017). The carrier  
84 particles are among the key features of the fluidized bed reactor and widely involved in  
85 wastewater treatment process because of its large contact area between microorganisms and



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

## 101 **2. Materials and methods**

### 102 *2.1. Preparation and characterization of Olive Pit Powder (OPP) as a biocarriers*

#### 103 *2.1.1. Olive Pit Powder (OPP) properties*

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

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

$$122 \quad \rho = \frac{M_p}{V_p}, \text{ (g.cm}^{-3}\text{)} \quad (1)$$

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

$$125 \quad \epsilon = \frac{V_L}{V_S}, \text{ (\%)} \quad (2)$$

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

### 136 *2.1.2. Chemical activation with phosphoric acid*

137 The step of chemical activation was realized using phosphoric acid solution  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (100 mL,  
138 80 %, w/w) in order to create a porous biodegradable support. This technique of chemical  
139 activation increases the surface areas and enhances the adsorption property of composites  
140 (Velo-Gala et al., 2014). The acid solution was mixed with the pre-dried OPP samples for 24  
141 h, then the solid part was separated from the acid residue, washed with distilled water to  
142 maintain a pH of 7-7.3 and dried during 24 h at  $110^\circ\text{C}$  into an oven.

143

144

145 **2.2. Inoculation and reactor startup MaB-flocs culture in batch mode**

146 Microalgae-bacterial floes (MaB-flocs) culture has been prepared in a batch reactor with  
147 double envelope (Figure 1.a), using the previous pre-culture of MaB-flocs obtained from  
148 sludge (municipal sewage treatment plant in Tunisia, Kairouan city). Within the batch reactor,  
149 350 mL of MaB-flocs with 4.48 g.L<sup>-1</sup> of total suspended solids (TSS), 2.75 g.L<sup>-1</sup> of volatile  
150 suspended solids (VSS) and 3.46 mg Chlorophyll (a).g<sup>-1</sup> (VSS) were mixed with synthetic  
151 municipal wastewater (SMW) prepared as used by [Dahalan et al. \(2015\)](#) (Table 2) in order to  
152 obtain a working volume of 900 mL. The multitrophic culture was homogenized using a  
153 stirring speed of 100 rpm and exposed under a cycle of light/dark (16h/8h) using fluorescent  
154 lamps with a light power of 1050 lm (18W, Philips, France). The temperature inside the  
155 reactor was maintained at 27°C and water circulated through a thermostatic bath during 7  
156 days of all operation.

157 **2.3. Multitrophic Fluidization Biofilm Bed Reactor (MFBBR) configuration and process**  
158 **description**

159 **2.3.1. MFBBR description**

160 Experiments were performed within a square bubble column (MFFBR) with a length of 6 cm  
161 and a height of 50 cm, corresponding to a total volume of 1.8 L, as shown in Figure 1.b. The  
162 MFBBR was designed in transparent Plexiglass material and allowed to visual observations of  
163 the behaviors of bubbles and particles, via the wall of the column. Nitrogen (N<sub>2</sub>) gas was  
164 introduced at the bottom of the column. A stainless steel porous sparger plate (Sintertech,  
165 Poral) of 50 mm length (thickness of 3 mm and uniform perforations of 0.5 mm mean holes  
166 diameter) was used to sparge the nitrogen for the experiments. The air upflow rate was  
167 monitored by a mass flow controller (Smart Mass Flow, Serv Instruments, ZI Broteau-Nord)  
168 operated into the range air 4 N.min<sup>-1</sup>. Thus, during the aeration phase, the air velocity was  
169 controlled via the connexion between an air-flow-meter (Brooks Instrument 0254, USA) and  
170 a timer (Evology, China).

171 **2.3.2. SBR operation set-up**

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

175 14 days for each type of media. The effluent was pumped at a flow rate of 25 mL.min<sup>-1</sup> via a  
176 submerged tube, containing several holes of 0.5 mm of diameter in order to ensure a uniform  
177 feeding of the liquid inside the column. Each SBR cycle of six hours for a continuous  
178 operation of 24 h comprises five phases: aeration, settling, feeding, discharge and idle, as  
179 given in Table 3. After the filling-up of the column, the aeration phase was provided through  
180 the gas sparger at a gas upflow velocity of 2.1 cm.s<sup>-1</sup> in order to obtain a uniform distribution  
181 of bubbles and a well mixing of the medium. The cycle of feeding/discharge with fresh  
182 synthetic wastewater of thirty minutes was controlled in order to ensure a ratio of 50%  
183 volume exchange (Table 3). At the end of the operation, the reactor was kept for an idle  
184 period of forty-five minutes. Illumination around the MFBBR was accomplished using 18W  
185 Phillips white tubes with a light power of 1050 lm under the continuous supply of light/dark  
186 cycles of 16h/8h. For each experiment, the MFBBR was charged with three volume fractions  
187  $\alpha_s$  (1, 2 and 4 vol. %) for both sizes (A and B) of OPP particles.

#### 188 **2.4. Experimental procedure and analytical Methods**

189 Fluidization tests were carried out into the MFBBR for both cases before adding the particles  
190 and after charging the column with different sizes and volume fractions of OPP. The  
191 superficial gas velocity ranges from 0.5 to 2.5 cm.s<sup>-1</sup>. The volume average gas holdup ( $\epsilon$ )  
192 values were obtained by measuring the bed height before and after the shutting of the gas  
193 phase entrance in all cases (Eq. 3). The gas holdup is defined as follows (Temesgen et al.,  
194 2017). It is an important hydrodynamic parameter as it affects the mass transfer and gives  
195 useful information about the flow regime which prevails in the bed. Moreover, its knowledge  
196 is essential for design and scale-up purpose in bubble columns with and without suspended  
197 particles (Thobie et al., 2017).

$$198 \quad \epsilon = \frac{V_g}{V_s} = \frac{V_f - V_i}{V_f} = \frac{H_d - H_i}{H_d} \quad (3)$$

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

204

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-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 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 Chlorophyll(a) = 16,29 A<sub>665</sub> - 8,54 A<sub>652</sub> (4)

215 The autotrophic index (mg VSS mg<sup>-1</sup> 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-floes 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<sub>4</sub><sup>+</sup>, and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). 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 (U<sub>g</sub>), 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  $U_{g1}$  of about  $0.6 \text{ cm.s}^{-1}$ , 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  $\epsilon_G$  versus  $U_g$  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  $\text{cm.s}^{-1}$  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  $\epsilon_G$  with the superficial gas velocity and the solid concentration (Figure 3).  
255 The gas holdup increases in all cases with  $U_g$ . The decrease of this hydrodynamic parameter  
256 with the solid loading is negligible at low solid concentrations ( $\alpha_s$ , 1 vol. %) but becomes  
257 more important at the highest solid loading ( $\alpha_s$ , 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  $\epsilon_G$  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.



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

### 278 **3.3. Generation of MaB-flocs biomass during batch culture**

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

### 290 **3.4. Performance of multitrophic fluidized bed biofilm reactor (MFBBR) for wastewater 291 treatment and biofilm attachment**

292 In the present work, the dynamics gas–MaB-flocs–OPP flow in MFBBR was investigated for  
293 the removal of organic pollutants (COD) at the highest nitrogen gas upflow  $U_{g3}$ , which leads  
294 to the highest gas holdup (section 3.1.2). Moreover, the aeration into the circulating fluidized  
295 bed biofilm reactor at a flow rate of  $50 \text{ NL.min}^{-1}$  maintains similar turbulence of the flow and

326 generates narrow bubbles size (Li et al., 2013). According to several studies, the type of the  
327 distributed gas (CO<sub>2</sub>, air, He, and N<sub>2</sub>) used into the fluidized bed affects the bubbles behavior  
328 because of the variation of its molecular weight (Temesgen et al., 2017). Thus, it was  
329 demonstrated that micro-bubbles were better generated by N<sub>2</sub>, better than by air and He  
330 (Temesgen et al., 2017). However, the use of air and nitrogen for bubbles generation play a  
331 major role for the increase of bacteria activities in both anaerobic and aerobic operations  
332 (Ghadimkhani et al., 2016).

333 *3.4.1. Effect of bioparticles (OPP) properties on organic compounds (COD) removal during*  
334 *SBR experiment*

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

327



328 3.4.2. *Effect of bioparticles (OPP) properties on nutrients (Ammonium and Phosphorus)*  
329 *removal during SBR experiment*

330 The influence of OPP properties on bio-nutrient bioremediation was assessed based on the  
331 removal of ammonium and phosphorus during the SBR-MFBBR process. For both size of  
332 OPP particles, as shown in Figure 4, the remove of the total N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> depend  
333 significantly on the concentration of biocarriers. When the volume fraction of OPP increased  
334 from A''' ( $\alpha_s$ , 1 vol. %) to A' ( $\alpha_s$ , 4 vol. %), the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> removal efficiencies reached  
335 52.94 ± 0.5% and 68.4 ± 0.2%, respectively, after 14 days of SBR operation. Thus, the  
336 effective removal of nitrogen (N) could be contributed via ammonium assimilation and also  
337 phosphorus (P) through adsorption and precipitation (Boelee et al., 2014a). The highest  
338 removal efficiencies of nutrients (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) were significantly (p<0.05) attributed to  
339 the largest size of OPP (B) in comparison with the lowest size (A). At high size and  
340 concentration of OPP (B'), the ammonium and phosphorus removal performances are  
341 illustrated in Table 5. The total N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations in the effluent varied from 69.91 mg  
342 L<sup>-1</sup> until 30.1 ± 0.8 mg.L<sup>-1</sup> at day 14 with an ammonium removal efficiency of 56.94 ± 0.9%  
343 (Figure 4). Similar to ammonium remove, for the OPP(B'), the total P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> concentration  
344 continued to decrease from 33.62 mg.L<sup>-1</sup> to 9.3 ± 0.47 mg.L<sup>-1</sup> (Table 5) and reached a highest  
345 phosphorus removal rate at the end of the experience of about 72.33 ± 1.42 % (Figure 4).  
346 Hence, by comparing the effectiveness of pollutants removals, this study has demonstrated a  
347 significant difference (p<0.05) between a small and a large size of OPP into symbiotic biofilm  
348 reactor MFBBR. During this experiment, the pH values stayed stable at 7.5. Thus, according  
349 to the pH evolution, the remove of phosphorus could be explained by the biotic assimilation  
350 mechanism which is contributed by algae growth (Tang et al., 2018). Otherwise, the neutral  
351 pH could be obtained by the process of carbon dioxide consumption (González-Fernández et  
352 al., 2016). A similar study into flow cells of microalgae–bacterial biofilms has improved the  
353 removing of ammonium, phosphate, and an organic compound (acetate) from municipal  
354 wastewater, without oxygen requirement (Boelee et al., 2014a). As reported by Posadas et al.  
355 (2013), the efficiency of carbon, nitrogen and phosphorus removals achieved about of 91 ± 3  
356 %, 70 ± 8 % and 85 ± 9 %, respectively, from domestic wastewater, using algal–bacterial  
357 biofilm bioreactors. The main conclusion of this study was the significant robustness of  
358 MFBBR using high size and concentration of OPP (B') at a ratio COD/N of 8.7 in terms of  
359 COD (85 %) ammonium (57 %) and phosphorus (72 %) removal efficiencies. Thus, as the  
360 ratio COD/N increases the nitrification phenomena was mostly affected by the heterotrophic

361 microorganisms than by the nitrifying organisms. Although, a low COD/N ratio leads to limit  
362 the processes of denitrification (Islam et al., 2009; Vergara et al., 2016). Consequently, the  
363 application of the symbiotic microalgae–bacterial relationship into fluidized biofilm bed  
364 reactors has a potential engineering aspect for wastewater treatment to uptake organic and  
365 mineral pollutants without an external O<sub>2</sub> supply.

#### 366 3.4.3. Biofilm morphology and physical characteristics of OPP

367 The performance of MFBFR for biofilm attachment by using different sizes and  
368 concentrations of OPP was significantly ( $p < 0.05$ ) affected by the physical features of  
369 biocarriers. The bulk density ranged between 1014 kg.m<sup>-3</sup> and 1056 kg.m<sup>-3</sup> for OPP (A) and  
370 OPP (B), respectively. This result confirmed the influence of carriers' size on bulk density,  
371 when finer olive pit powders of 60 µm of diameter achieved about of 393 kg.m<sup>-3</sup> of bulk  
372 density (Koutsomitopoulou et al., 2014). Whereas, other natural supports such as lava rock  
373 have shown the higher bulk density of 1142 kg.m<sup>-3</sup>. Therefore, it was demonstrated that due to  
374 its lowest physical parameters, compared to the other carriers adopted into fluidized bed, the  
375 husk olive granules are quickly fluidized via only aeration (Hamdi and Ellouz, 1993). In  
376 addition, the variation of porosity, yields a value of 38 % for OPP (A) which is significantly  
377 lower than that for OPP (B) with a value of 57 %. Through the scanning electron micrographs  
378 (SEM), olive pit powders at both sizes A and B shown a distribution with an almost irregular  
379 shape of granules (Figure 5.a). By analyzing the surface area of OPP biocarriers with SEM  
380 procedure, several porous were formed due to chemical activation which confirmed the  
381 porosity property of the material (Figures 5.b and 5.c). Various irregularly shapes of pores  
382 have been located over all OPP surface and elucidated the rough structure of particles.  
383 According to Bello et al. (2017), the surface roughness of materials is suitable for biofilm  
384 adhesion. This study demonstrates the feasibility of introducing porous OPP biocarriers  
385 within the MFBFR column for the formation of multitrophic biofilm and the MaB-flocs  
386 enrichment as well as successful bioremediation. However, inoculation of MaB-flocs into the  
387 OPP showed a greater attachment of biofilm-related to the decrease of COD and nutrients (N-  
388 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) concentrations in the effluent (section 3.4.1 and 3.4.2). MaB-flocs culture  
389 was quickly adapted to the micropores particles of OPP and its rough surface. The particles  
390 with high porosity are considered as a protective niche for microorganisms to survive and  
391 growth (Liang et al., 2009). Consequently, the pollutants removal would be important. The  
392 SEM analysis showed that the OPP (B) particles with large porosity (57 %) maintained a

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

415

416

417

418

419

420

421

422 **4. Conclusion**

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

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448 **References**

- 449 Alcántara, C., Domínguez, J. M., García, D., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P. A.,  
450 Muñoz, R. (2015) . Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic–aerobic algal–  
451 bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass  
452 balances. *Bioresource Technology*, 191, 173-186.
- 453 APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edn.  
454 Washington, DC: *American Public Health Association*, p. 1268.
- 455 Bello, M. M., Raman, A. A. A., Purushothaman, M. (2017). Applications of fluidized bed  
456 reactors in wastewater treatment–A review of the major design and operational  
457 parameters. *Journal of Clean Production*, 41, 1492-1514.
- 458 Boelee, N. C., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C.J. N., Wijffels, R. H. (2014).  
459 Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors  
460 treating synthetic municipal wastewater. *Ecology Engineering*, 64, 213-221.
- 461 Camarasa, E., Vial, C., Poncin, S., Wild, G., Midoux, N., Bouillard, J. (1999). Influence of  
462 coalescence behaviour of the liquid and of gas sparging on hydrodynamics and bubble  
463 characteristics in a bubble column. *Chemical Engineering and Process: Process*  
464 *Intensification*, 38, 329-344.
- 465 Cheirsilp, B., Thawechai, T., Prasertsan, P. (2017). Immobilized oleaginous microalgae for  
466 production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized  
467 bed photobioreactor. *Bioresource Technology*, 241, 787-794.
- 468 Dahalan, F. A., Najib, M. Z. M., Salim, M. R., Ujang, Z. (2015). Characteristics of developed  
469 granules containing phototrophic aerobic bacteria for minimizing carbon dioxide  
470 emission. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 102, 15-23.
- 471 Deckwer, W.D., Louisi, Y., Zaidi, A., Ralek, M. (1980). Hydrodynamic properties of the  
472 Fisher-Tropsch slurry process. *Industrial & Engineering Chemical Process Design and*  
473 *Development*, 19, 699-708
- 474 Eldyasti, A., Nakhla, G., Zhu, J. (2012). Influence of particles properties on biofilm structure  
475 and energy consumption in denitrifying fluidized bed bioreactors (DFBBRs). *Bioresource*  
476 *Technology*, 126, 162-171.

- 477 Fernandez, N., Montalvo, S., Borja, R., Guerrero, L., Sánchez, E., Cortés, I., Colmenarejo,  
478 M.F., Travieso, L., Raposo, F. (2008). Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed  
479 reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery  
480 wastewater. *Renewable Energy* 33, 2458e2466.  
481 <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2008.02.002>.
- 482 Ghadimkhani, A., Zhang, W., Marhaba, T. (2016). Ceramic membrane defouling (cleaning)  
483 by air nano bubbles. *Chemosphere*. 146, 379-384.
- 484 Gianico, A., Braguglia, C.M., Mescia, D., Mininni, G. (2013). Ultrasonic and thermal  
485 pretreatments to enhance the anaerobic bioconversion of olive husks. *Bioresource*  
486 *Technology*, 147:623e6.
- 487
- 488 González-Fernández, C., Mahdy, A., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2016). Impact of  
489 temperature and photoperiod on anaerobic biodegradability of microalgae grown in urban  
490 wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 106, 16-23.
- 491 Hamdi, M., Ellouz, R. (1993). Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic  
492 filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*, 14, 183-188.
- 493 Hyndman, C. L., Larachi, F., Guy, C. (1997). Understanding gas-phase hydrodynamics in  
494 bubble columns: a convective model based on kinetic theory. *Chemical Engineering*  
495 *Science*, 52, 63-77.
- 496 Islam, M., George, N., Zhu, J., Chowdhury, N. (2009). Impact of carbon to nitrogen ratio on  
497 nutrient removal in a liquid–solid circulating fluidized bed bioreactor (LSCFB). *Process*  
498 *Biochemical*, 44, 578-583.
- 499 Kang, D., Kim, K., Jang, Y., Moon, H., Ju, D., Jahng, D. (2018). Nutrient removal and  
500 community structure of wastewater-borne algal-bacterial consortia grown in raw wastewater  
501 with various wavelengths of light. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 10-  
502 20.
- 503 Kara, S., Kelkar, B.G., Shah, Y.T., Carr, N. L. (1982). Hydrodynamics and axial mixing in a  
504 three-phase bubble column. *Industrial & Engineering Chemical Process Design and*  
505 *Development*, 21, 584-594

- 506 Karantonis, H.C., Tsantila, N., Stamatakis, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Antonopoulou,  
507 S., Demopoulos, C.A. (2008). Bioactive polar lipids in olive oil, pomace and waste by-  
508 products. *Journal of Food Biochemical*, 32, 443–459.
- 509
- 510 Katsoni, A., Mantzavinos, D., Diamadopoulos, E. (2014). Sequential treatment of diluted olive  
511 pomace leachate by digestion in a pilot scale UASB reactor and BDD electrochemical  
512 oxidation. *Water Research*, 57, 76–86.
- 513 Koutsomitopoulou, A. F., Bénézet, J. C., Bergeret, A., Papanicolaou, G. C. (2014).  
514 Preparation and characterization of olive pit powder as a filler to PLA-matrix bio-  
515 composites. *Powder Technology*, 255, 10-16.
- 516 Li, H., Prakash, A. (1999). Analysis of bubble dynamics and local hydrodynamics based on  
517 instantaneous heat transfer measurements in a slurry bubble column. *Chemical Engineering  
518 Science*, 54, 5265-5271
- 519 Li, M., Nakhla, G., Zhu, J. (2012). Simultaneous carbon and nitrogen removal with enhanced  
520 bioparticle circulation in a circulating fluidized bed biofilm reactor. *Chemical Engineering  
521 Journal*, 181, 35-44.
- 522 Li, M., Nakhla, G., Zhu, J. (2013). Impact of worm predation on pseudo-steady-state of the  
523 circulating fluidized bed biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 8, 281-289.
- 524 Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., Li, G. (2009). Porous biocarrier-enhanced biodegradation of  
525 crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 80-87.
- 526 Maza-Márquez, P., Martínez-Toledo, M. V., Fenice, M., Andrade, L., Lasserrot, A.,  
527 Gonzalez-Lopez, J. (2014). Biotreatment of olive washing wastewater by a selected  
528 microalgal-bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 69-76.
- 529 Nelson, M. J., Nakhla, G., Zhu, J. (2017). Fluidized-Bed Bioreactor Applications for  
530 Biological Wastewater Treatment: *A Review of Research and Development Engineering*, 3,  
531 330-342.
- 532 Oswald, W.J. (1988). Micro-algae and waste-water treatment. In: Borowitzka, M.A.,  
533 Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press,  
534 Cambridge, pp. 305–328.



- 535 Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E.(1989). Determination of accurate  
536 extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted  
537 with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by  
538 atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et BiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics*. 975,  
539 384-394.
- 540
- 541 Posadas, E., García-Encina, P. A., Soltau, A., Domínguez, A., Díaz, I., Muñoz, R. (2013).  
542 Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal–bacterial  
543 biofilm bioreactors. *Bioresource Technology*, 139, 50-58.
- 544 Quijano, G., Arcila, J. S., Buitrón, G. (2017). Microalgal-bacterial aggregates: Applications  
545 and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 35, 772-781
- 546 Saxena, SC, Rao, NS, Saxena, AC. (1990). Heat transfer and gas holdup studies in a bubble  
547 column: air-water-glass bead system. *Chemical Engineering Commun*, 96, 31-55
- 548 Sur, D. H., Mukhopadhyay, M. (2017). Process aspects of three-phase inverse fluidized bed  
549 bioreactor: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 3518-3528.
- 550 Tang, C. C., Tian, Y., Liang, H., Zuo, W., Wang, Z. W., Zhang, J., He, Z. W. (2018).  
551 Enhanced nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater via algae-assisted  
552 sequencing batch biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 250, 185-190.
- 553 Temesgen, T., Bui, T. T., Han, M., Kim, T. I., Park, H.(2017). Micro and nanobubble  
554 technologies as a new horizon for water-treatment techniques: *A Review Advance in Colloid  
555 and interface Science*, 246, 40-51.
- 556 Thobie, C., Gadoin, E., Blel, W., Pruvost, J., Gentric, C. (2017). Global characterization of  
557 hydrodynamics and gas-liquid mass transfer in a thin-gap bubble column intended for  
558 microalgae cultivation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 122,  
559 76-89.
- 560 Van Den Hende, S., Beelen, V., Julien, L., Lefoulon, A., Vanhoucke, T., Coolsaet, C.,  
561 Rousseau, D. P. (2016). Technical potential of microalgal bacterial floc raceway ponds  
562 treating food-industry effluents while producing microalgal bacterial biomass: An outdoor  
563 pilot-scale study. *Bioresource Technology*, 218, 969-979.



- 564 Van Den Hende, S., Rodrigues, A., Hamaekers, H., Sonnenholzner, S., Vervaeren, H., Boon,  
565 N. (2017). Microalgal bacterial floes treating paper mill effluent: A sunlight-based approach  
566 for removing carbon, nitrogen, phosphorus, and calcium. *New Biotechnology*.
- 567 Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K., Vassileva, C. G. (2013). An overview of the  
568 composition and application of biomass ash. Part 1. Phase–mineral and chemical composition  
569 and classification. *Fuel*, 105, 40-76.
- 570 Velo-Gala, I., Lopez-Penalver, J.J., Sanchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J. (2014). Surface  
571 modifications of activated carbon by gamma irradiation. *Carbon*, 67, 236e249
- 572 Vergara, C., Muñoz, R., Campos, J. L., Seeger, M., Jeison, D. (2016). Influence of light  
573 intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications  
574 for microalgae-based wastewater treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*,  
575 114, 116-121.
- 576 Zyoud, A., Nassar, H. N., El-Hamouz, A., Hilal, H. S. (2015). Solid olive waste in  
577 environmental cleanup: enhanced nitrite ion removal by ZnCl<sub>2</sub>-activated carbon. *Journal of*  
578 *Environmental Management*, 152, 27-35.

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590 **Figure captions**

591 **Figure 1.** Culture of microalgae-bacterial floes (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

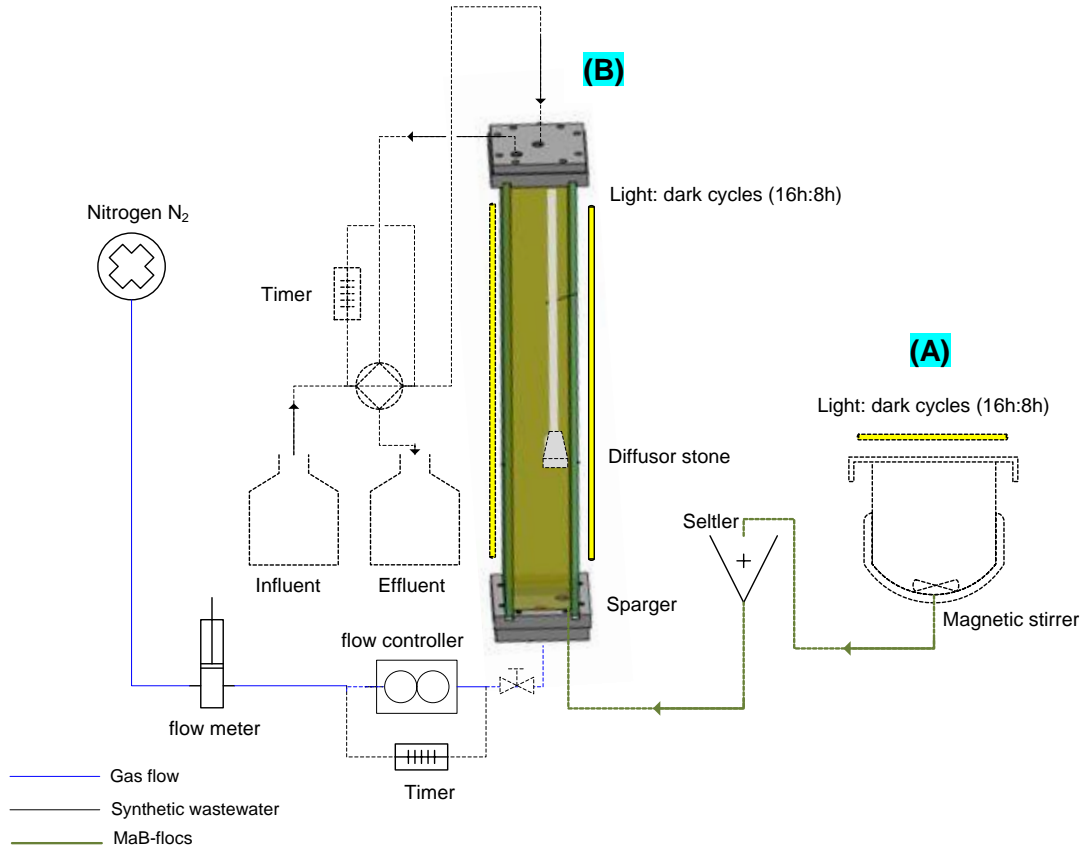
613

614

615

616 **Figure 1.**

617



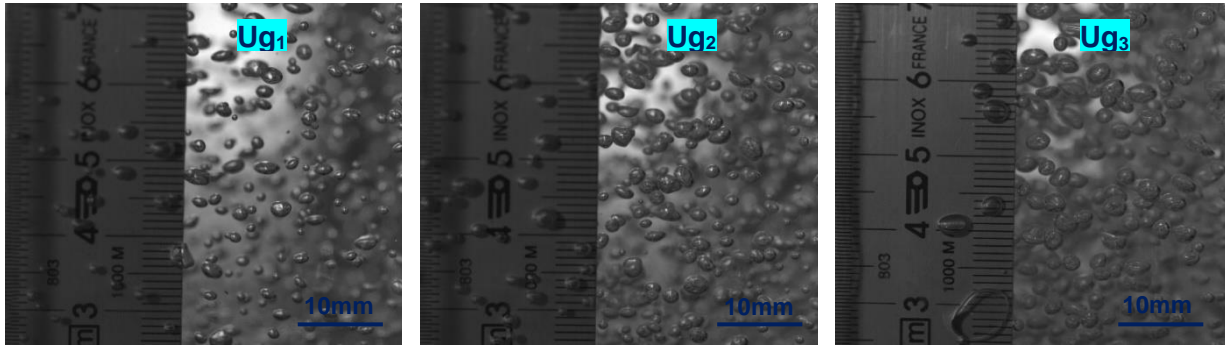
630 **Figure 2.**

631

632 (A)

(B)

(C)



633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

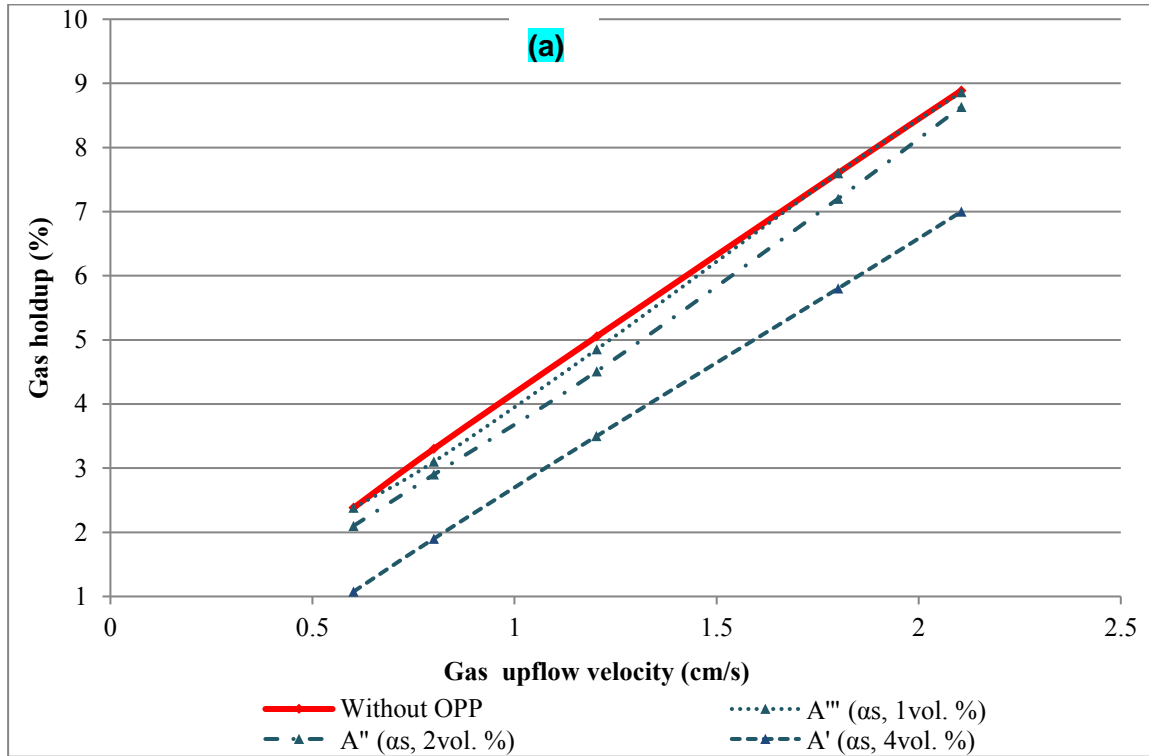
646

647

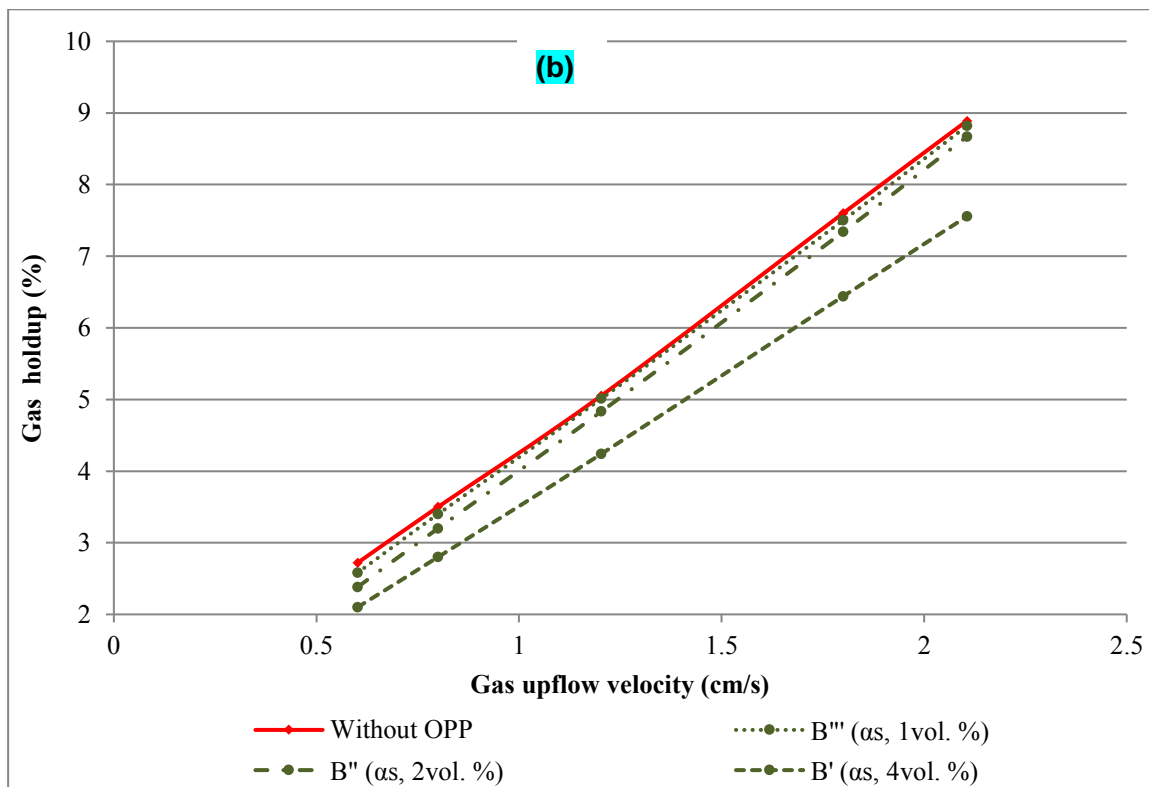
648

649 Figure 3.

650



651

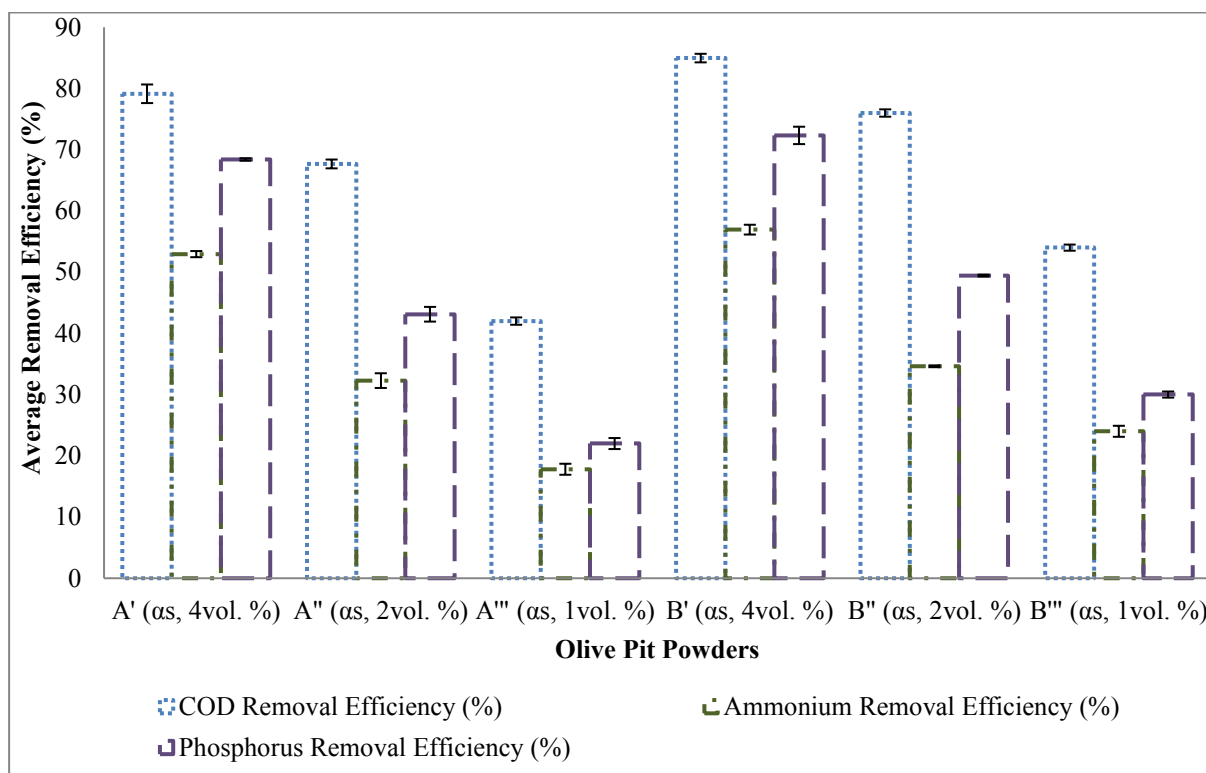


652

653

654 **Figure 4.**

655



656

657

658

659

660

661

662

663

664

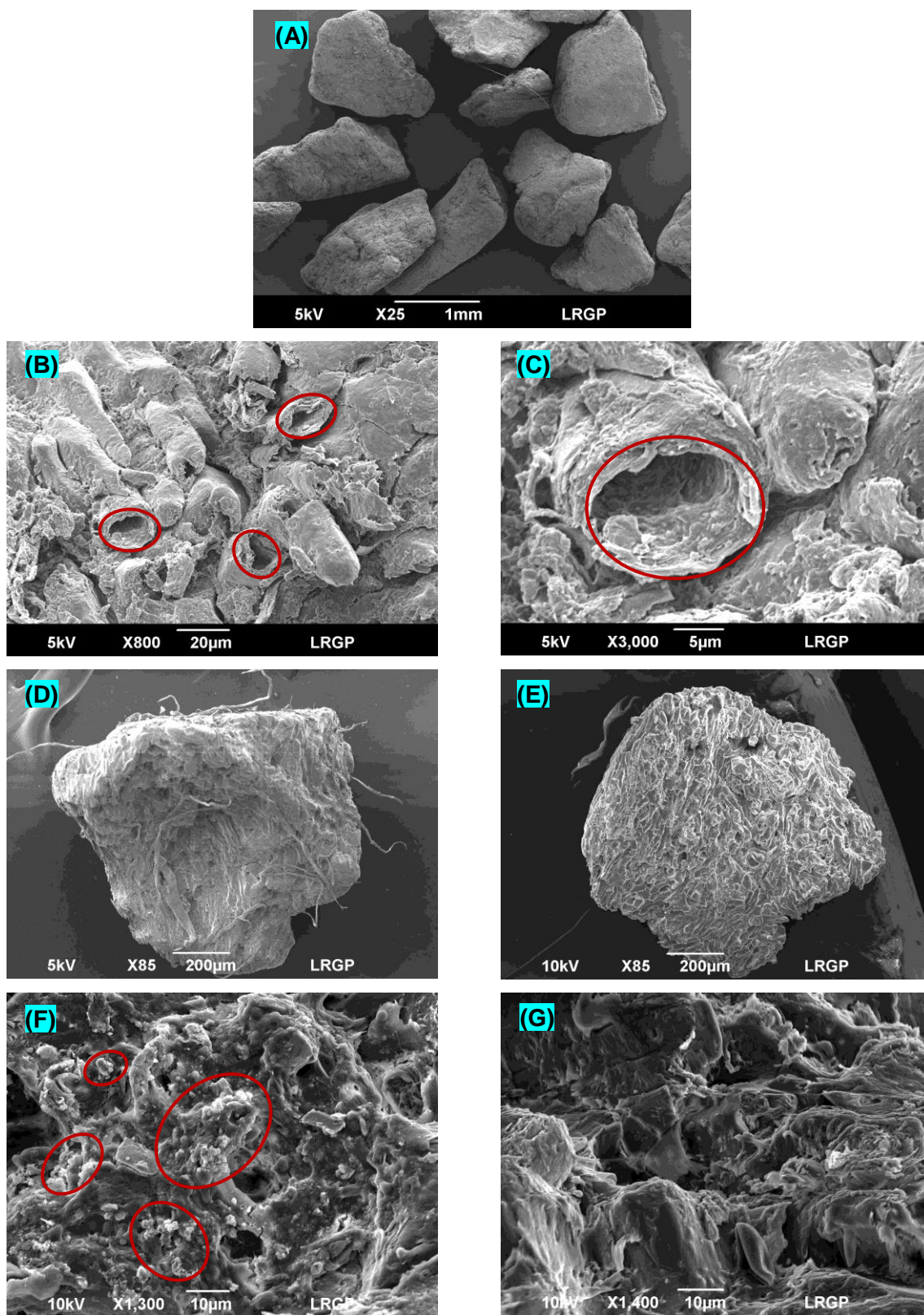
665

666

667

668 Figure 5.

669



670

671 **Tables**

672 **Table 1.**

673

<b>Olive pit powders properties</b>	<b>Mean diameter (mm)</b>	<b>Bulk density (g cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Porosity (%)</b>
<b>Olive pit powder (A)</b>	1,075 ± 0,019	1.014	38
<b>Olive pit powder (B)</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 <sup>-1</sup> )	
Medium organic (O) (1 L)	Glucose	600mg COD.L	50%=298.4
	Acetate		50%=603.26
Medium nutrient (N) (1 L)	NH <sub>4</sub> Cl	239	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	45.9	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	46.2	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	26.5	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70.3	
Trace elements (10 mL L)	EDTA.2H <sub>2</sub> O	4.78	
	FeCl <sub>3</sub>	2.38	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.25 10 <sup>-2</sup>	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.75 10 <sup>-2</sup>	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	12.5 10 <sup>-3</sup>	
	MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.184	
	H <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	1.25	

689

690

691

692

693

694

695

696 **Table 3.**

697

<b>MFBBR (operation phase)</b>	<b>Time (min)</b>
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

<b>MaB-flocs biomass Characteristics Unit</b>		<b>TSS</b> g TSS.L <sup>-1</sup>	<b>VSS</b> g VSS.L <sup>-1</sup>	<b>AI*</b> mg VSS mg <sup>-1</sup> Chl (a)	<b>Chl (a)</b> mgChl (a) g <sup>-1</sup> VSS
<b>Batch culture</b>	T <sub>0</sub>	4.48	2.75	288.86 ± 0.5	3.46 ± 0.5
	T <sub>7days</sub>	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 <sup>-1</sup> )	-	25
mgCOD.L <sup>-1</sup>	612	92 ± 6.08
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg.L <sup>-1</sup> )	69.91	30.1 ± 0.8
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P (mg.L <sup>-1</sup> )	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 ( $\alpha$ s, 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 floccs-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 observation a montré la capacité des floccs-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 floccs-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 floccs-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 floes 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 floccs-MaB à produire un biofilm multitrophique, où la minéralisation et la photosynthèse sont couplées sans aucun l'apport d'O<sub>2</sub>, a été étudiée dans un réacteur à disques rotatifs (RDR) à l'échelle du laboratoire. Ainsi, des disques rotatifs en Plexiglas ont 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 de cette 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 et présentés 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 de biofilm.

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 floccs**

1 **Short Communication (II): Multitrophic rotating biofilm contactor with**  
2 **microalgae bacterial-flocs for pollution removal without O<sub>2</sub> supply (and/or)**  
3 **CO<sub>2</sub> release**

4

5 **Olfa Beji<sup>a,b</sup>, Nouceiba Adouani<sup>a</sup>, Souhila Poncin<sup>a</sup>, Marie-Noëlle Pons<sup>a</sup>,**  
6 **Moktar Hamdi<sup>b</sup>, Huai Z. Li<sup>a\*</sup>**

7

8

9

10 <sup>a</sup>Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue  
11 Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

12 <sup>b</sup>Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute  
13 of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 \*Corresponding author:

30 Pr. Huai Zhi LI

31 [huai-zhi.li@univ-lorraine.fr](mailto:huai-zhi.li@univ-lorraine.fr)



32 **Abstract**

33 Multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC) technology represents a way of sustainable  
34 wastewater treatment using microalgae-bacterial floes that can contribute to limiting the  
35 climate change by the biosequestration of CO<sub>2</sub>. MRBC was designed to study the attachment-  
36 detachment phenomena of biofilms after batch and continuous wastewater treatment at 1 day  
37 of HRT. During continuous mode, the opacity evolution indicated a stationary phase from day  
38 36 corresponding to stable and mature biofilm, before a slight biofilm detachment at day 57.  
39 In the same period, ammonium, phosphorous and COD removal rates of 82 %, 76 % and 83  
40 %, respectively have confirmed the best biofilm accumulation and justified the autotrophic  
41 dominance within MRBC, compared to batch test. Thus, in accordance to literature, the  
42 algae-bacterial biofilm is less sensitive to rotating velocity and supports nutrient removals  
43 from wastewater. Future research should investigate the dimensioning of an up-scaled MRBC  
44 for a post-treatment of a real wastewater.

45

46

47 **Keywords:** Multitrophic rotating biofilm contactor, opacity evolution, microalgae bacterial-  
48 floes, sustainable wastewater treatment, climate change.

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

## 60 1. Introduction

61 It is currently admitted that classical wastewater treatment processes release CO<sub>2</sub> as a  
62 greenhouse gas (GHG) and then contribute to climate change (Dahalan et al., 2015). In this  
63 regard, various biological strategies using photosynthetic biomass have been applied as a  
64 sustainable way to reduce CO<sub>2</sub> emissions (Yadav et al., 2017) from wastewater treatment. The  
65 earliest algal–bacterial system was operated into high rate algal ponds (HRAPs) since 1950s  
66 (Ramanan et al., 2016) for nutrients treatment with the exchange of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Thus this  
67 symbiosis technology provides a solution to GHG mitigation technologies, through the CO<sub>2</sub>  
68 biosequestration (Yadav et al., 2017). The multitrophic interaction between microalgae and  
69 heterotrophic bacteria is sustained by the production of O<sub>2</sub> by microalgae in the presence of  
70 light and CO<sub>2</sub> (Muñoz and Guieysse, 2006). This symbiosis connection is often required by  
71 heterotrophic bacteria to oxidize the organic pollutants present in the wastewater and to  
72 produce in return CO<sub>2</sub> essential for microalgae photosynthesis (Unnithan et al., 2014). Hence,  
73 algae-associated bacterial populations may play critical roles in algal adaption and survival by  
74 using trophic connections. Moreover, bacteria grow well in algal floccs and may be beneficial  
75 by either decomposing organic material or producing secondary metabolites which will  
76 become nutrients for the algal organisms during respiration (Grotkjær et al., 2016). In return,  
77 algae facilitate bacterial growth through direct nutrients exchange by providing organic  
78 compounds released during photosynthesis (Unnithan et al., 2014). One of the limitations in  
79 the application of multitrophic microalgae–bacterial systems is a cost-effective separation of  
80 the biomass from the treated wastewater (Posadas et al., 2014). In this context, it has been  
81 suggested by Babu et al. (2010) that phototrophic biofilms systems based on the symbiosis  
82 growth of microalgae-bacteria attached on surfaces, could be a solution for wastewater  
83 treatment. The use of multitrophic biofilms in wastewater treatment processes and their  
84 potential for algal biomass retention can play a significant role to reduce the harvesting costs  
85 and to improve the nutrient removal efficiency (Posadas et al., 2013). The present  
86 investigation deals with the incorporation of microalgae-bacterial floccs (MaB-floccs) culture  
87 into multitrophic rotating biofilm contactor (MRBC), consisting of a series of Plexiglas  
88 (methyl methacrylate) discs covered with an active symbiotic film and partially submerged in  
89 a synthetic wastewater medium. A similar process using an open algal–bacterial  
90 photobioreactor has demonstrated high nitrogen NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (75 %) and phosphorus PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (80 %)   
91 removal capacities at 10 days of HRT, unlike bacterial biofilms (Posadas et al., 2013). Thus, it

92 was confirmed that a microalgal–bacterial biofilm can develop on wastewater and remove  
93 organic compounds without any external O<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub> supply (Boelee et al., 2014b). The aim of  
94 this study is to compare the batch and the continuous-flow modes at a short hydraulic  
95 retention time (HRT) of 1 day without O<sub>2</sub> supply and CO<sub>2</sub> release. Hence, the main objectives  
96 are to assess the organic compounds and nutrients (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) removal capacities and  
97 the simultaneous production of the microalgae-bacterial biofilms. The functionality associated  
98 with this complex ecosystem will be critically derived from the synergistic activities of its  
99 microbial communities, which in return will be affected by the induced trophic status of the  
100 same system (Umnithan et al., 2014).

101 The MaB-flocs abundance, as well as the photosynthetic efficiency of the multitrophic  
102 biofilm process as a post-treatment system, were studied in order to reduce the emission of  
103 CO<sub>2</sub> to the environment. The aim of the present work is to study the behavior of multitrophic  
104 biofilm and its feasibility for wastewater treatment during 57 days without O<sub>2</sub> supply and CO<sub>2</sub>  
105 release.

## 106 **2. Materials and Methods**

### 107 *2.1. Experimental setup and operation*

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

122

123 After 7 days of batch pre-culture of MaB-flocs, the re-circulation of the liquid at the bottom  
124 of the reactor was stopped and the MRBC was fed with synthetic wastewater. The feeding  
125 flow rate was maintained at 2.5 L.day<sup>-1</sup> during the experiment with a concentration of 500  
126 mgCOD.d<sup>-1</sup> and a COD/N ratio of 8.3. The MRBC was illuminated using two fluorescent  
127 lamps with a light power of 1050 lm each (18W, Philips, France) under light: dark cycles of  
128 16/8 hours. The temperature of the system was maintained between 21°C and 22°C during the  
129 treatment. Every two days, maintenance consisting of cleaning the reactor walls and bottom  
130 was performed to avoid biofilm accumulation.

### 131 **2.2. Nutrient removal analysis**

132 Samples were taken from the effluent tank every 24 hours during the experimentation and  
133 filtered through a 0.45 µm filter (Millex-LCR, Merck Millipore, USA). Chemical Oxygen  
134 Demand (COD), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>were analyzed using HACH (51996-2000) method,  
135 Nessler method and phosphate reagent for 10mL sample (Hach-Lange GmbH, Germany),  
136 respectively, on a HACH DR 2000 spectrophotometer, USA. pH was measured using a pH  
137 meter (Mettler Toledo M300a, USA).

### 138 **2.3. Biomass growth analysis**

139 MaB-flocs biomass was collected from the medium of the MRBC and was analyzed for TSS  
140 (g.L<sup>-1</sup>), VSS (g.L<sup>-1</sup>) and Chlorophyll (a) concentration (mg Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS). Chlorophyll(a)  
141 was extracted (Eq 1.) using a solution of methanol (2 M) and its total concentration was  
142 determined using UV-Vis spectrophotometer (UV-Vis 2550, Shimadzu, Japan) at 652nm and  
143 665nm (Porra et al., 1989):

$$144 \text{ Chlorophyll(a) (mg.L}^{-1}\text{)} = 16.29 A_{665} - 8.54 A_{652} \quad (1)$$

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

151

152 **2.4. Image acquisition and analysis: Opacity measurement**

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

161

162 **3. Results and Discussions**

163 **3.1. Performance of rotating biological contactor (RBC) for wastewater treatment**

164 **3.1.1. MaB-flocs characterization into the MRBC medium**

165 MaB-flocs biomass within the MRBC tank was analyzed in order to understand the effect of  
166 the inoculums on the biofilm development. Batch pre-culture revealed the increase of TSS  
167 and VSS values up to 13.44 g.L<sup>-1</sup> and 9.02g.L<sup>-1</sup>, respectively, after 7 days under light/dark  
168 (16/8h) cycles. The mean Chl(a) was reduced from 4.58 ± 0.1 mg Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS to reach  
169 0.65 ± 0.2 mg Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS at day 7 (Table 2). This decrease could be explained by the  
170 intolerance of photosynthetic micro-organisms to the moderate toxicity of the chemical  
171 substrates release from wastewater and the lack of nutrients (Van Den Hende et al., 2014),  
172 which affect the biofilm growth (see section 3.1.4).

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

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

181

182 *3.1.2. Removal of organic carbon COD in batch and continuous operation*

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

196 *3.1.3. Removal of ammonium and phosphorus in batch and continuous operation*

197 During the seven days of batch operation without O<sub>2</sub> supply, the total N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>  
198 concentrations were gradually decreased down to 34.8 ± 0.25 mg.L<sup>-1</sup> and 7.5 ± 0.7 mg.L<sup>-1</sup>,  
199 respectively corresponding to ammonium and phosphorus removal rates of 47.2 ± 0.4% and  
200 77.2 ± 2.1 %, respectively (Figure 4). No significant variation of pH values was detected  
201 during the batch pre-culture in the MRBC. Su et al. (2016) have shown high nitrogen (N-  
202 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and phosphorus (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) removal efficiencies of 42.95 ± 5.11 % and 97.97 ± 1.12 %,  
203 respectively, into a reactor wall attached biofilm. While low removal efficiencies of nitrogen  
204 and phosphorus of 38.06 ± 5.80 % and 83.14 ± 8.16 %, respectively, have been observed in  
205 the reactor without biofilm (Su et al., 2016). This result confirmed the performance of  
206 attached and multitrophic system for ammonium and phosphorus removals. As reported by  
207 Liang et al. (2013), a co-culture of *C. vulgaris* and *B. licheniformis* has shown a higher  
208 ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and TP removal of 78 % and 92 %, respectively, after six days of  
209 treatment, which were 2.7 and 1.6 times higher than the algae system alone. During the  
210 continuous wastewater treatment a slight reduction of ammonium removal rate was observed  
211 until obtaining a stabilization after 26 days at about 28.5 ± 0.4 % (Figure 4). Afterwards, a  
212 significant decrease of total N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration was obtained from 29 days. At the end of  
213 the continuous operation, the MRBC at a flow rate of 2500 mL.day<sup>-1</sup> has shown an

214 ammonium removal rate of  $82 \pm 0.5$  % after 50 days (Figure 4). This ammonium efficiency is  
215 higher than the 57 % of  $\text{N-NH}_4^+$  removal rate which is obtained through the algal rotating  
216 disks working at a flow rate of  $2400 \text{ mL}\cdot\text{day}^{-1}$  (Przytocka-Jusiak et al., 1984). In this work a  
217 spontaneous inoculum of MaB-flocs cultivated naturally from sludge, without algae supply,  
218 registered a high  $\text{NH}_4^+$  removal rate of 82%. Although, a symbiosis interaction between  
219 filamentous blue-green algae and activated sludge with a ratio of 5:1 reaches about 99 % of  
220  $\text{NH}_4^+$  removal efficiency with an initial concentration of  $\text{N-NH}_4^+$  ( $39.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Su et al.,  
221 2012). The symbiotic development of a microalgae–bacterial biofilm reactor suggested that  
222 about 70 % of nitrogen removal could be obtained via heterotrophic bacteria capacities of  
223 nitrification and denitrification with light supply (Boelee et al., 2014a) while 30 % of  $\text{NH}_4^+$   
224 could be mainly assimilated by microalgae with light supply (Boelee et al., 2012). The total  
225  $\text{N-NH}_4^+$  concentration was completely depleted throughout the continuous operation  
226 compared to the batch experiment, under 16/8h light cycle, by algae assimilation. During this  
227 experiment, a slight increase of pH value up to 7.5 occurred after 26 days owing to  
228 microalgae growth and  $\text{CO}_2$  sequestration. According to Gutzeit et al. (2005), the pH value  
229 did not exceed 7.6 within the algae-bacteria aggregates according to the symbiotic interactions  
230 between *Chlorella vulgaris* (Strain Hamburg) and activated sludge. On the other hand, during  
231 the first eight days of continuous treatment, the total  $\text{P-PO}_4^{3-}$  concentration decreased slightly  
232 from  $32.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $29.1 \pm 0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  to obtain a low phosphorus removal rate of  $11.4 \pm 1.4$   
233 %. Hereafter, the phosphorus concentration considerably decreased for 19 days to attain  
234 maximum phosphorus removal rate of  $76.04 \pm 2.6$  % at day 47 of wastewater treatment  
235 (Figure 4). Hence, a better phosphorus removal was recorded by assimilation into algae-  
236 bacterial biofilm than in bacterial biofilm (Boelee et al., 2014b). The above results indicated  
237 that the highest phosphorus removal performance at day 47 of continuous treatment was  
238 similar to that obtained after seven days of batch experiment. In this context, the phosphorus  
239 removal could be maintained by both adsorption and photosynthesis mechanisms of algae.  
240 Unlike algae, bacteria removed phosphorus essentially by over-intake (Shi et al., 2004). At  
241 the end of the experiment, phosphorus and ammonium removal rates were suddenly reduced  
242 to  $18.63 \pm 0.7$  % and  $38.03 \pm 0.7$  %, respectively after 57 days of rotating disk operation. This  
243 result was explained by the opacity evolution discussed in section 3.1.4. The main conclusion  
244 of this study was the highest performance of MRBC in terms of nutrients and organic  
245 compounds removal during continuous wastewater treatment at a HRT of one day unlike the  
246 batch operation. In addition, a similar study into Rotating Algal Biofilm Reactor (RABR) has



247 demonstrated the influence of different HRTs on nutrients removals with a higher nitrogen  
248 removal in 2 days HRT and a best phosphorus removal in 6 days HRT (Shayan et al., 2016).  
249 Moreover, continuous treatment at a short HRT of 1 day reports a significant ammonium,  
250 phosphorous and COD removal rates of about 82 %, 76 % and 83 %, respectively, whereas  
251 other researches obtained better organic carbon ( $89 \pm 2$  %), nitrogen  $\text{NH}_4^+$  ( $92 \pm 5$  %) and  
252 phosphorus  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $96 \pm 2$  %) removal rates, in the open biofilm photobioreactor at a HRT of  
253 10 days (Posadas et al., 2014). Furthermore, the performance of MRBC process was obtained  
254 at the C/N ratio of 8.3 with a high COD removal rate of 83 %. In another study Mannina et al.  
255 (2017) argued the effect of higher C/N ratio of 10 in sludge-MBR performance with an  
256 excellent total  $\text{COD}_T$  removal (98 %). Therefore, these results confirmed the influence of the  
257 wastewater C/N ratio on the MRBC performance in terms of organic carbon, ammonium and  
258 phosphorus removals.

259

#### 260 3.1.4. Opacity and biofilm thickness growth

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



280 cyanobacteria (*Pseudanabaena*), diatom (*Nitzschia*), and green microalgae (*Scenedesmus*)  
281 (Boellee et al., 2014b). Otherwise, at day 57, a slight biofilm detachment (Figure 5.d) was  
282 observed on disc 1. This occurred due to several factors such as environmental change,  
283 oxygen availability and the most common depletion in nutrients (Cohn, 2010). In this case,  
284 the biofilm detachment leads to the loss of biomass and thus to a fall of the yields of  
285 elimination of  $\text{N-NH}_4^+$  and  $\text{P-PO}_4^{3-}$  (section 3.1.3). As has been shown by Alnnasouri et al.  
286 (2011a), the loss of large portions of biofilm via detachment and sloughing at day 57 induced  
287 the increase of  $\text{NH}_4^+$  concentration in the reactor. Hence, the detachment of biofilm from the  
288 discs increases at high disc rotation speed because of the increase of the shear force and  
289 with disc speed (Griffin et al., 2000). The opacity evolution (Figure 6) shows that the first step  
290 of the MRBC treatment was characterized by a rapid increase of the biofilm opacity from day  
291 0 to day 7 for all discs. During this initial growth phase (seven days), the opacity increased  
292 more on disc 1, due to its position on the rotatif axle, to achieve the highest value of  $59.76 \pm$   
293  $23.27$ , than on disc 3 which shows a low opacity value of  $24.6 \pm 25.73$  (Figure 6). After this  
294 period, the opacity evolved on disks 2, 3 and 4 in a similar manner during a continuous  
295 treatment, except for disc 1 where the development was higher. All discs opacities continued  
296 to increase from day 11 but at a slightly slower rate than for disc 1. Besides, the opacity  
297 stabilized from day 36 until day 57 corresponding to a stationary phase (Figure 6). Thus, disc  
298 1 resumed its accumulation of biofilm for reaching a best increase in opacity of 135.8 which  
299 was observed on day 57 with a standard deviation equal to 22.58 (Figure 6). According to the  
300 studies (Alnnasouri et al., 2011a) using the same biofilm reactor (RBC), the increase of the  
301 biofilm opacity on rough discs was continued until day 60, followed by a biofilm detachment  
302 only at the end of the experiment.

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

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

315

#### 316 **4. Conclusion**

317 This study focuses on the valorization of natural MaB-flocs obtained from a wastewater  
318 sludge within MRBC without O<sub>2</sub> supply and CO<sub>2</sub> release. The obtained data emphasize the  
319 influence of the highest COD (83 %), ammonium (82 %) and phosphorus (76 %) removal  
320 rates and microalgae communities'abundance (diatoms and cyanobacteria) on the biofilm  
321 development, during continuous treatment compared to the batch operation. Thus, the opacity  
322 evolution of the biofilm confirms a continuous increase until 57 days, corresponding to a  
323 stable biofilm attachment as reported in previous studies. This work allows to prepare  
324 multitrophic biomass of MaB-flocs, in more efficient conditions, as a feedstock for anaerobic  
325 digestion.

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

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., Sigeo, 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.

- 381 Cohn, S., Hayes, A., Renault, K. (2010). The Effect of Substrate Variation on Biofilm Growth  
382 for Use in Wastewater Treatment. *Degree of Bachelor of Science*.
- 383 Dahalan, F. A., Najib, M. Z. M., Salim, M. R., Ujang, Z. (2015). Characteristics of developed  
384 granules containing phototrophic aerobic bacteria for minimizing carbon dioxide  
385 emission. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 102, 15-23.
- 386 Donian, R.M.(2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Disea.* 8, 881.
- 387 Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial  
388 biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 52, 9-18.
- 389 Griffin, P., Findlay, G. E. (2000). Process and engineering improvements to rotating  
390 biological contactor design. *Water Science and Technology*, 41, 137-144.
- 391
- 392 Gross, M., Jarboe, D., Wen, Z.Y. (2015). Biofilm-based algal cultivation systems. *Applied*  
393 *Microbiology Biotechnology*, 99, 5781–5789
- 394 Grotkjær, T., Bentzon-Tilia, M., D'Alvise, P., Dierckens, K., Bossier, P., Gram, L.  
395 (2016). *Phaeobacterinhibens* as probiotic bacteria in non-axenic *Artemia* and algae  
396 cultures. *Aquaculture*, 462, 64-69.
- 397
- 398 Hamdi, M. (1995). Biofilm thickness effect on the diffusion limitation in the bioprocess  
399 reaction. biofloc critical diameter significance. *Bioprocess Engineering*, 12, 173 –179.
- 400
- 401 Hamdi, M. (2016). Lessons from rhizosphere and gastrointestinal ecosystems for inventive  
402 design of sustainable wastes recycling bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 62-  
403 70.
- 404
- 405 Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015). Effect of algae  
406 growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using  
407 sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.
- 408
- 409 Kesaano, M., Sims, R. C. (2014). Algal biofilm based technology for wastewater  
410 treatment. *Algal Research*, 5, 231-240.
- 411

- 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 Engineering Journal*, 125, 31-40.
- 419 Muñoz, R., Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous  
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., Muñoz,  
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 concentrates 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. *Biotechnology advance*, 34, 14-29.

- 444 Sekar, R., Nair, K. V. K., Rao, V. N. R., Venugopalan, V. P. (2002). Nutrient dynamics and  
445 successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology*, 47, 1893-1907.  
446
- 447 Shayan, S. I., Agblevor, F. A., Bertin, L., Sims, R. C. (2016). Hydraulic retention time effects  
448 on wastewater nutrient removal and bioproduct production via rotating algal biofilm  
449 reactor. *Bioresource Technology*, 211, 527-5330.  
450
- 451 Shi, X.L., Yang, L.Y., Wang, F.P., Xiao, L., Jiang, L.J., Kong, Z.M., Gao, G., Qin, B.Q.  
452 (2004). Growth and phosphate uptake kinetics of *Microcystis aeruginosa* under various  
453 environmental conditions. *Journal of Environmental Science*, 16, 288–292.  
454
- 455 Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass  
456 accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water*  
457 *Research*. 45, 3351-3358.
- 458 Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born  
459 algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation  
460 ratios. *Bioresource Technology*, 105, 67–73.  
461
- 462 Su, Y., Mennerich, A., Urban, B. (2016). The long-term effects of wall attached microalgal  
463 biofilm on algae-based wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 218, 1249-1252.  
464
- 465 Takemura A.F., Chien D.M., Polz M.F. (2014). Associations and dynamics of Vibrionaceae  
466 in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiology*, 5, 38.
- 467 Unnithan, V., Unc, A., Smith, G. B. (2014). Mini-review: a priori considerations for bacteria–  
468 algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. *Algal Research*,  
469 4, 35-40.
- 470 Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Desmet, S., Boon, N., 2011a. Bioflocculation of  
471 microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New*  
472 *Biotechnology*, 29, 23-31.

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

476 Van Den Hende, S., Carré, E., Cocaud, E., Beelen, V., Boon, N., Vervaeren, H.  
477 (2014).Treatment of industrial wastewaters by microalgal bacterial floccs in sequencing batch  
478 reactors. *Bioresource Technology*, 161, 245-254.

479 Yadav, G., Sen, R. (2017). Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-  
480 dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological  
481 advances in climate research. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*,17, 188-206.

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497 **Figure captions:**

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

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

503 **Figure 3.** Variation of COD concentration (mg.L<sup>-1</sup>) and removal rate (%) during batch and  
504 continuous wastewater treatment into MRBC.

505 **Figure 4.** Variation of ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and phosphorus (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) removal rates (%)  
506 during batch and continuous wastewater treatment into MRBC.

507 **Figure 5.** Scanned images (TIFF format) from biofilm of disc 1 on day 7(a), day 26(b), day  
508 40 (c), and day 57(d), respectively during the batch and continuous wastewater treatment.

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

511

512 **Tables**

513 **Table 1.** Composition of the urban synthetic wastewater

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

515

516

517

518

519

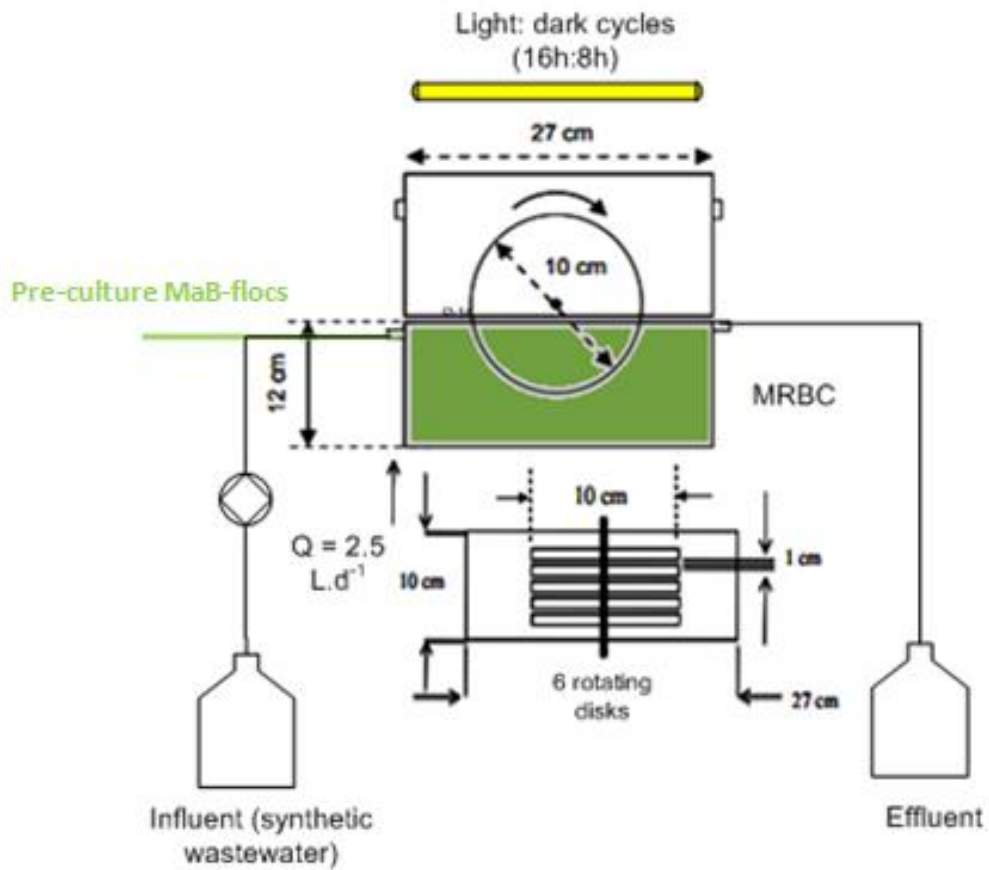
520

521



522 Figure 1.

523



524

525

526

527

528

529

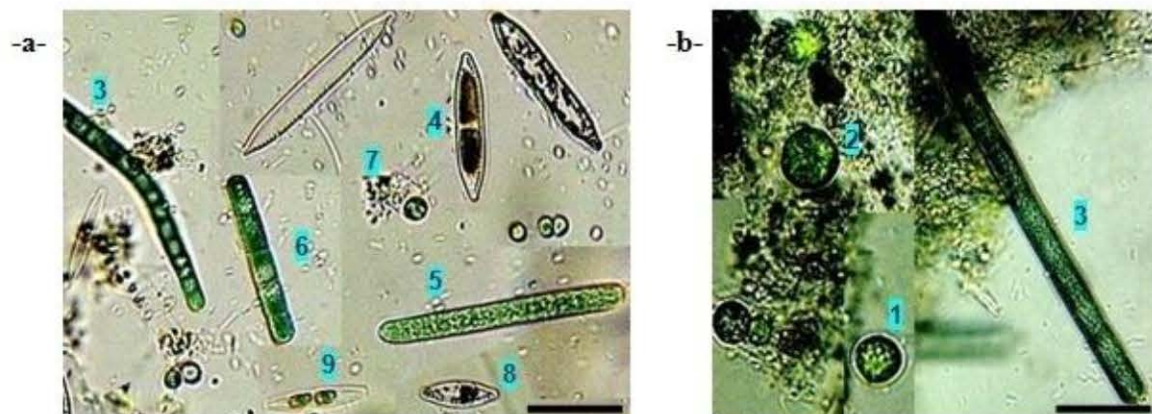
530

531

532

533 **Figure 2.**

534



535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

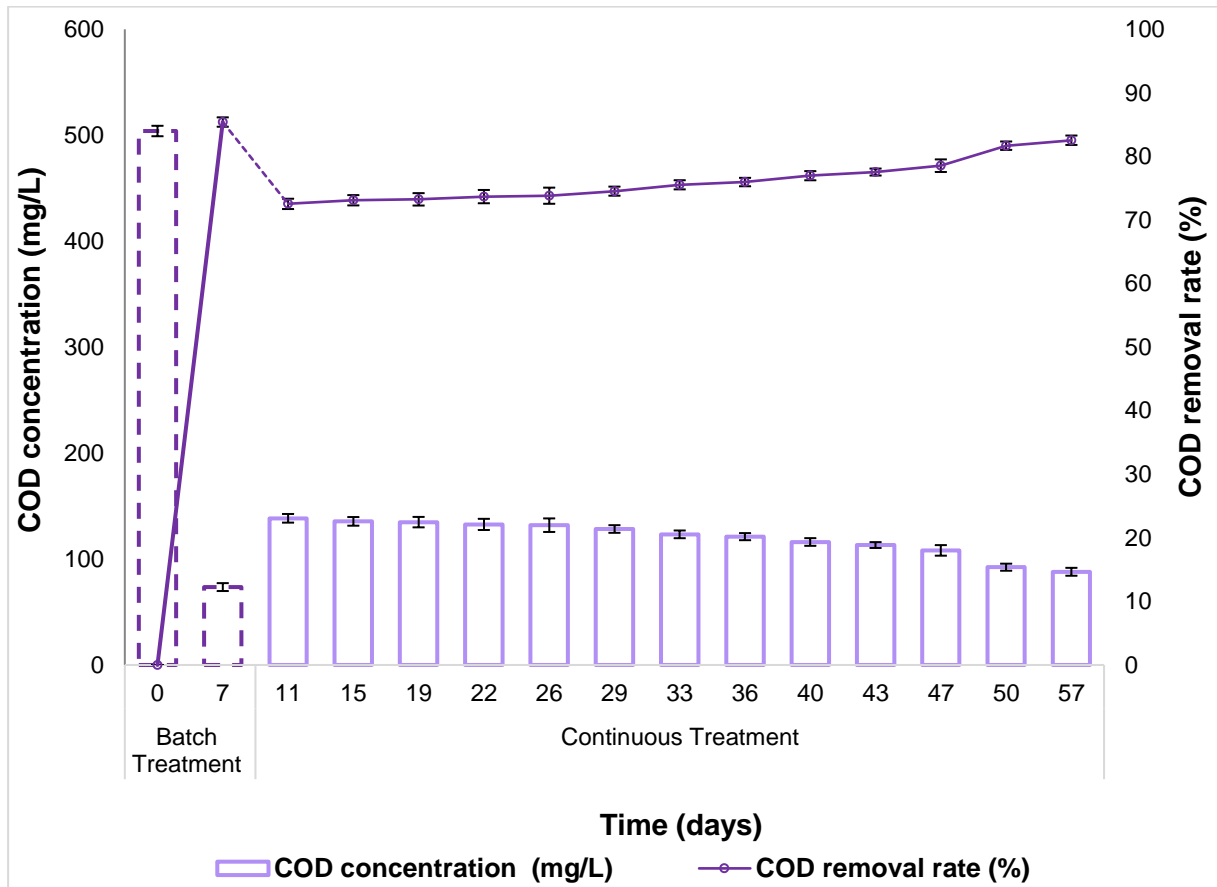
546

547

548

549

550 Figure 3.



551  
552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

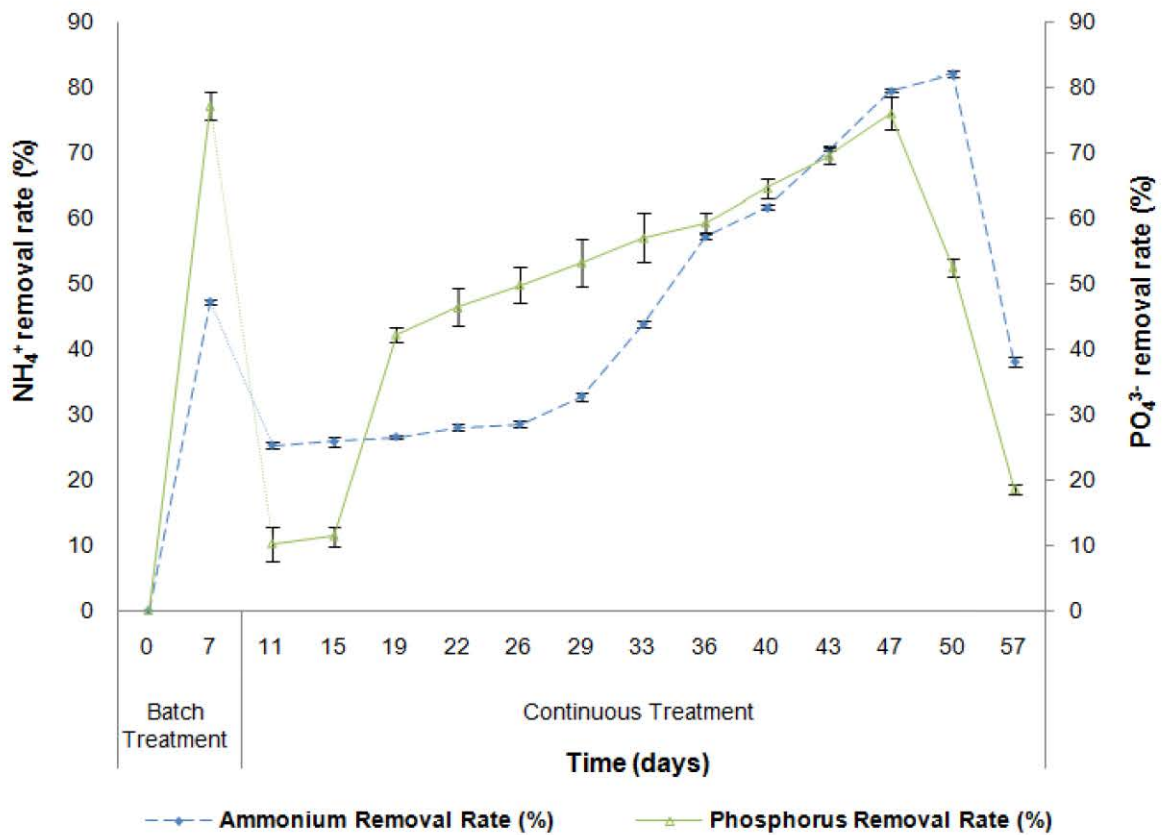
565

566

567

568 Figure 4.

569



570

571

572

573

574

575

576

577

578

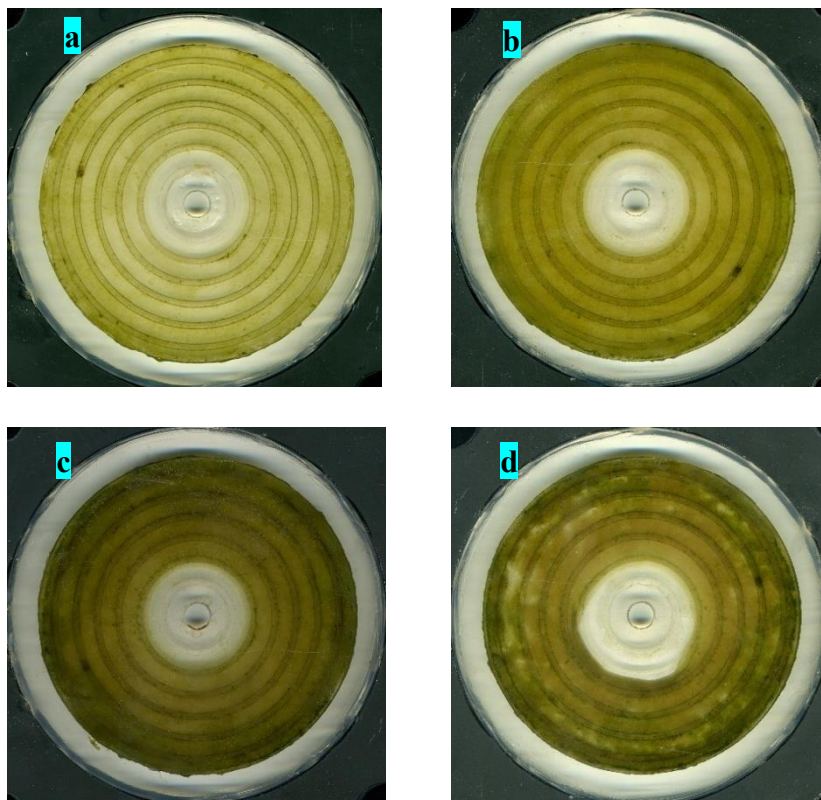
579

580

581

582 **Figure 5.**

583



584

585

586

587

588

589

590

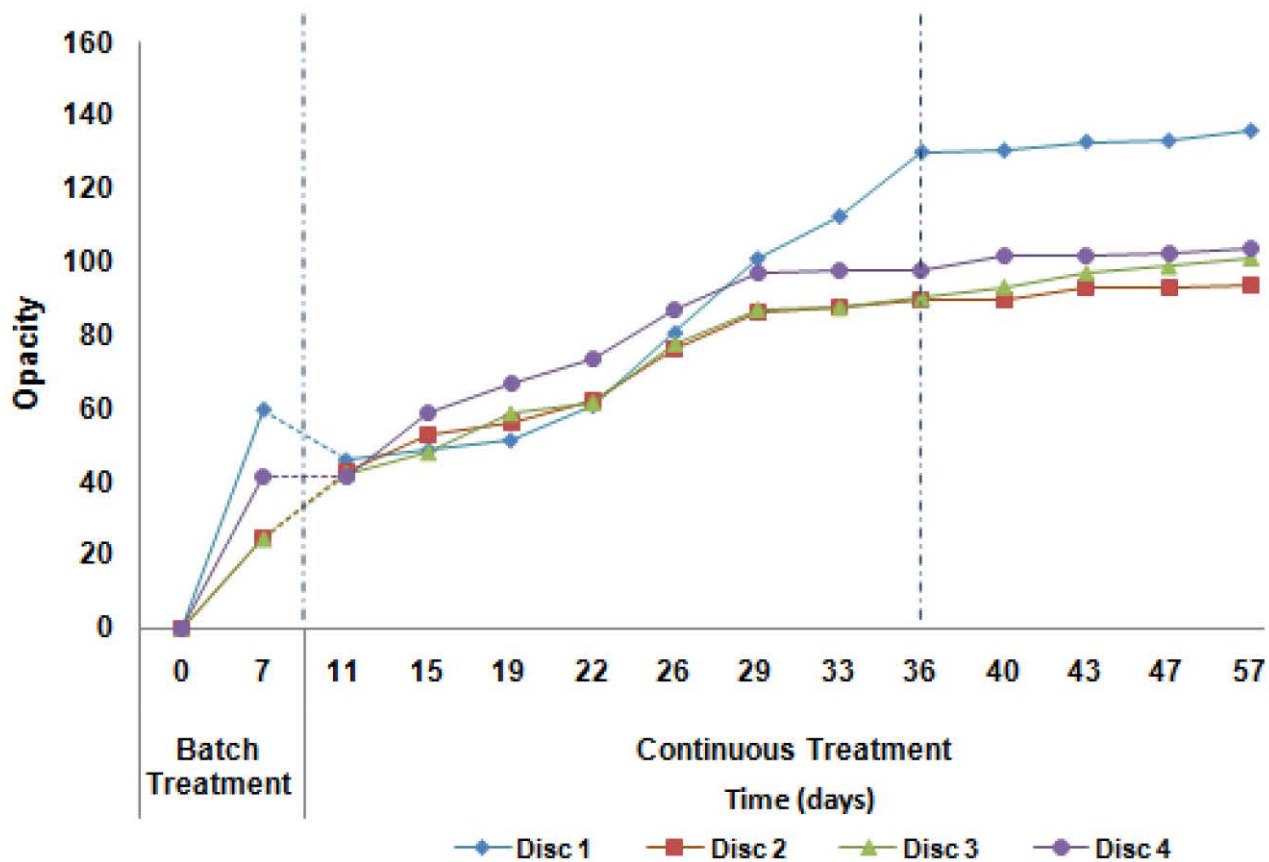
591

592

593

594 Figure 6.

595



596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606 **Tables:**

607 **Table 1.**

608

Composant		Concentration	
Medium organic (O)(1L)	Glucose	600mg COD.L <sup>-1</sup>	50%=298.4 mg.L <sup>-1</sup>
	Acetate		50%=603.26 mg.L <sup>-1</sup>
Medium nutrient (N)(1L)	NH <sub>4</sub> Cl	239 mg.L <sup>-1</sup>	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	45.9 mg.L <sup>-1</sup>	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	46.2 mg.L <sup>-1</sup>	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	26.5 mg.L <sup>-1</sup>	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70.3 mg.L <sup>-1</sup>	
Trace elements (10 mL.L <sup>-1</sup> )	EDTA.2H <sub>2</sub> O	4.78 mg.L <sup>-1</sup>	
	FeCl <sub>3</sub>	2.38 mg.L <sup>-1</sup>	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.25 10 <sup>-2</sup> mg.L <sup>-1</sup>	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.75 10 <sup>-2</sup> mg.L <sup>-1</sup>	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	12.5 10 <sup>-3</sup> mg.L <sup>-1</sup>	
	MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.184 mg.L <sup>-1</sup>	
	H <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	1.25 mg.L <sup>-1</sup>	

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619 **Table 2.**

620

<b>Biomass</b>		<b>TSS</b>	<b>VSS</b>	<b>VSS/TSS</b>	<b>Chl (a)</b>
<b>Characteristics</b>					
<b>Unit</b>		g TSS.L <sup>-1</sup>	g VSS.L <sup>-1</sup>	%	mgChl (a).g <sup>-1</sup> VSS
<b>Batch pre-culture</b>	T <sub>0</sub>	3.76	2.35	62.5	4.58 ± 0.1
	T <sub>7days</sub>	13.44	9.02	67.08	0.65 ± 0.2



### **IV.3. Conclusion générale**

Cette étude consiste à valoriser les floccs microalgues-bactéries (floccs-MaB) sous forme de biofilms comme une approche innovante du traitement des eaux usées dans un réacteur MRBC sans rejet de CO<sub>2</sub>. 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 être 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 floes-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<sub>2</sub> et sans libération de CO<sub>2</sub>, un procédé innovant de valorisation de cette biomasse multitrophique sera suggéré pour 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 inoculum (digestat et lisier) a été testée avec la biomasse algale, comme matière première, en variant le ratio VS<sub>S</sub>/VS<sub>I</sub> (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 a 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<sub>2</sub> 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**

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

4

5

6 **Olfa Beji<sup>a,b</sup>, Nouceiba Adouani<sup>a</sup>, Souhila Poncin<sup>a</sup>, Moktar Hamdi<sup>b</sup>, Huai Z. Li<sup>a,\*</sup>**

7

8 <sup>a</sup>Laboratory of Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, 1, rue  
9 Grandville, BP 20451, 54001 Nancy cedex, France.

10 <sup>b</sup>Laboratory of Microbial Ecology and Technology, University of Carthage, National Institute  
11 of Applied Sciences and Technology, BP: 676, 1080 Tunis, Tunisia.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21 \*Corresponding author:

22 Pr. Huai Zhi LI

23 [huai-zhi.li@univ-lorraine.fr](mailto:huai-zhi.li@univ-lorraine.fr)

24 **Abstract**

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

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

41

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

43

44

45

46

47

48

49

50

## 51 **1. Introduction**

52 The climate change is a worldwide issue demanding constant novel alternatives for renewable  
53 energy production. In this context, the biogas production via anaerobic digestion represents  
54 the major beneficial process for energy generation (Ajeej et al., 2015). Thus, biogas is  
55 considered as a promising source of bioenergy, which can replace the fossil fuels and gaseous  
56 vehicle fuel (Ajeej et al., 2015). Several researchers have adopted the algal biomass as a  
57 sustainable feedstock for the production of renewable energy (Wieczorek et al., 2015), with  
58 regard to the high efficiency of their photosynthetic mechanism in CO<sub>2</sub> mitigation and  
59 biomass growth (Franchino et al., 2016). The cultivation of microalgae is a potentially green  
60 concept that enhances the biodegradation of organic matter for biogas production (Ajeej et al.,  
61 2015). The production of biomethane by using anaerobic digestion from microalgae, as a  
62 substrate, was adopted firstly in the 1950s by Golueke et al. (1957). As highlighted by  
63 Wieczorek et al. (2015), microalgae play a major role in the bioremediation of wastewater to  
64 reduce high amounts of essential nutrients (ammonia and phosphate). Thus, the potential of  
65 the cultivation system of microalgae for anaerobic digestion should be integrated with  
66 wastewater treatment regarding nutrients recovery (Debowski et al., 2013 ; Mahdy et al.,  
67 2015), to overtake the high cost of biomass production (Franchino et al., 2016). Microalgae-  
68 bacterial process applied for industrial wastewater treatment has been currently submitted to a  
69 special attention (Hernandez et al., 2013). Under these systems, symbiotic connections  
70 between photo-autotrophic algae and heterotrophic bacteria were maintained through the  
71 exchange of simultaneous gas (oxygen and carbon dioxide) and nutrients (Gutzeit et al.,  
72 2005). Thus, during wastewater treatment, the use of coupled microalgae with aerobic bacteria  
73 allows to avoid the external O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and tends to remove nutrients as well as to reduce  
74 CO<sub>2</sub> sequestration from the atmosphere (Hernandez et al., 2013). With this regard,  
75 microalgae-bacteria flocs have been considered as an alternative for simultaneous removal of  
76 pollutants from wastewater and methane production (Wieczorek et al., 2015 ; Van Den Hende  
77 et al., 2015). The aim of the following work is to evaluate the coupled system of the symbiotic  
78 MaB-flocs process for Liquid Digestate treatment with anaerobic digestion. The study starts  
79 for the first time the potential of MaB-flocs biomass to improve methane yields. Various  
80 investigations have been conducted for biogas production from MaB-flocs in order to enhance  
81 a maximum biomethane production with efficiency-cost of this operation (Wieczorek et al.,  
82 2015). The present work is focused on the determination of the optimum inoculum source and  
83 of the effect of the substrate/inoculum ratio, for improving biogas yields from MaB-flocs.

84 However, the anaerobic batch experiments were carried out by testing two inoculums:  
85 Digestate and Slurry. Actually, the biomethane production is strongly influenced by the  
86 choice of the inoculum such as municipal sludge, soil extracts (sediment), industrial treatment  
87 plants, rumen and animal manures, which contains various bacterial populations (Elbeshbishy  
88 et al., 2012). Various studies have demonstrated the efficiency of methane production through  
89 the co-digestion of algae with different substrates. Recently, according to Prajapati et al.  
90 (2014), several species of algae such as *Chlorella* spp., and *Chroococcus* spp., have been  
91 adopted for methane bioconversion. As the result of the anaerobic co-digestion from algae,  
92 the "Liquid Digestate", containing nutrients (N and P), is essential for the cultivation of  
93 microalgae (Prajapati et al., 2014). As reported by previous researchers, the "Liquid  
94 Digestate" collected from the anaerobic digestion of paper industry bio-sludge and of cow  
95 dung have been examined for the growth of *Scenedesmus acuminatus* (Hidaka et al., 2017)  
96 and *Chroococcus* sp. (Prajapati et al., 2014), respectively. Furthermore, according to Massa et  
97 al. (2017), the vegetable Liquid Digestate, used as a nutrient media, leads to a high potential  
98 for the growth of various photosynthetic microorganisms such cyanobacterium (*Arthrospira*  
99 *maxima*), the freshwater microalgae (*Tetradesmus obliquus* ; *Botryococcus braunii*) and the  
100 marine diatom (*Phaeodactylum tricorutum*). The purpose of the second part of this study  
101 aims to compare two Liquid substrates (Digestate and Slurry) for the MaB-flocs growth. The  
102 performance of the photobioreactors was evaluated in terms of organic matter and ammonium  
103 removal efficiencies coupled with phototrophic biomass production. Hence, in the context of  
104 "closed-loop process", researches were made to produce biomethane through the co-digestion  
105 of MaB-flocs previously cultivated on the Liquid Digestate as a growth media.

## 106 **2. Materials and Methods**

### 107 **2.1. Inoculation and reactor startup MaB-flocs culture in batch mode**

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

115 using fluorescent lamps with a light power of 1050 lm (18W, Philips, France), without  
116 O<sub>2</sub> supply. The temperature inside the reactor was maintained at 27°C and circulated through a  
117 thermostatic bath during 7 days of all operation. As shown in the previous study, these  
118 conditions of culture maintain a stable algae growth. Synthetic wastewater employed for the  
119 MaB-flocs growth was prepared as used by Dahalan et al. (2015) with initial COD 600 mg.L<sup>-1</sup>,  
120 as described in the previous studies (Sections III and IV).

## 121 **2.2. Liquid Digestate and Slurry characterizations**

122 Digestate and Slurry were collected from a farm near Nancy, France, where cows and sheep  
123 were raised for the production of milk and their derivatives. The Digestate withdrawn from  
124 farm anaerobic digester, as well as the Slurry samples were stocked at 4°C. Supernatant  
125 samples called “Liquid Digestate (D<sub>L</sub>)” and “Liquid Slurry (S<sub>L</sub>)”, were obtained by filtration  
126 with coffee filters of 100 g of Digestate and Slurry in 1 L of distilled water, in order to  
127 remove suspended particules that risk blocking the microorganism’s activities and their  
128 growth (dark). It was considered that the initial (D<sub>L</sub>)<sub>0</sub> and (S<sub>L</sub>)<sub>0</sub> solutions were very rich in  
129 ammonium more than synthetic wastewater, used as reference. Thus, the need for diluted  
130 samples is related to a suitable algae growth. For both substrates D<sub>L</sub> and S<sub>L</sub>, the determination  
131 of Chemical Oxygen Demand (COD) was realized using HACH (51996-2000) method. The  
132 total ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) was measured using Nessler method and phosphate reagent for  
133 10mL sample (HACH-LANGE GmbH, Germany), respectively, on a HACH DR2000  
134 spectrophotometer, USA. The pH was measured using a pH meter (METTLER Toledo  
135 M300a, USA).

## 136 **2.3. Algal growth and nutrient recycling from Liquid Digestate and Liquid Slurry**

137 The first set of experiments was elaborated into batch conditions in order to monitor algal  
138 performance to remove nutrients from diluted samples of Slurry and Digestate without  
139 oxygen supply. Starting from the samples of initial Liquid Slurry and Liquid Digestate, other  
140 dilutions were prepared: 10 %, 30 %, and 50 %. During this experiment, Erlenmeyers flasks  
141 of 200 mL working volume and containing liquid substrate, were inoculated with 10 % (v/v)  
142 of MaB-flocs content as inoculum. The Erlenmeyers were incubated thermostatically at 25°C,  
143 under 16/8 hours of light/dark cycles, and mixed by an orbital shaker at 250 rpm (Figure 2),  
144 during 14 days. All the experiments were carried out in duplicate. The liquid effluents were  
145 daily analyzed for COD and N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations. The algae growth was estimated in



146 terms of chlorophyll (a) concentration ( $\text{mg Chl(a).g}^{-1}$  VSS). Total concentration of  
147 Chlorophyll(a) was extracted (Eq. 1) through methanol solution (1M) and measured using  
148 spectrophotometer (UV-Vis 2550, Shimadzu, Japan) at 652 nm and 665 nm (Porra et al.,  
149 1989):

$$150 \text{ Chlorophyll(a)} = 16,29 A_{665} - 8,54 A_{652} \quad (1)$$

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

$$154 \mu = \frac{\ln\left(\frac{X_t}{X_0}\right)}{t-t_0}, \text{ d}^{-1} \quad (2)$$

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

## 161 **2.4. Co-digestion of MaB-flocs for biogas production**

### 162 *2.4.1. Sample preparation and working conditions*

163 For the biomethane production step, batch anaerobic co-digestion of MaB-flocs was carried  
164 out into 1 L glass bottles. This step of the experiments was conducted by varying 3 different  
165 Volatile Solids ratios (VS) between substrate (Microalgal-bacterial flocs) and inoculum  
166 (Slurry or Digestate):  $0.2 \text{ VS}_{\text{substrate}}/\text{VS}_{\text{inoculum}}$ ,  $0.5 \text{ VS}_{\text{substrate}}/\text{VS}_{\text{inoculum}}$ ,  $0.8 \text{ VS}_{\text{substrate}}/\text{VS}_{\text{inoculum}}$ ,  
167 as reported by Wieczorek et al. (2015). The substrate concentration (MaB-flocs) was fixed at  
168  $12.21 \text{ g VS.g}^{-1}$  with substrate to inoculum ratio (S/I ratio) of 0.2 on VS basis. Both inoculums  
169 ( $D_g$ ) and ( $S_L$ ) were first aseptically introduced into the glass bottle, then MaB-flocs substrate  
170 was added and the bottle was finally filled up to 800 mL with distilled water. The control  
171 associated was composed only by inoculum, without the addition of flocs. The glass bottles,  
172 tightly closed, are kept in the thermostated cabin at  $40^\circ\text{C}$ , for 30 days of experiment period.

173

174

175 *2.4.2. Measurement of biomethane production*

176 The biogas volume and composition measurements were conducted every day to monitor the  
177 evolution of the biogas production. Biogas volume production was measured using acidic  
178 water (pH  $\approx$ 4.0) with a displacement method each 24 hours. The acidic water is used to avoid  
179 the loss of CO<sub>2</sub> due to its high solubility in water, which means that some amount of CO<sub>2</sub>  
180 could however be lost in the water itself. Biogas composition was analysed using a gas  
181 chromatograph (chromatograph Varian 430-GC) with a Thermal Conductivity Detector  
182 (TCD), provided by air injector, capillary column and a column oven of 23 cm (w) x 11 cm  
183 (d) x 28 cm (h). Gas phase samples of 100  $\mu$ L of synthetic biogas were extracted from the  
184 bottles by a syringe and injected in the gas chromatograph. The biomethane production was  
185 measured in terms of cumulative and daily biomethane production, given by the quotient  
186 between gas volume in milliliters and grams of VS of fed, for all the incubation period.

187 **2.5. Statistical analysis**

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

190 **3. Results and Discussions**

191 **3.1. Generation of MaB-flocs biomass during batch culture**

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

202

203 **3.2. Liquid Digestate and Slurry characteristics and utilization for MaB-flocs growth**

204 *3.2.1. Nutrients and pollutants level of Liquid Digestate and Slurry*

205 Before phytoremediation experiments, Liquid Digestate ( $D_L$ ) and Slurry ( $S_L$ ) were analyzed  
206 for its nutrients ( $NH_4-N$ ) and organic compounds (COD) values (Table 2). The total  $NH_4-N$   
207 and  $COD_S$  concentrations were evaluated depending of the dilution ratios (10 %, 30 %, and 50  
208 %) as shown in Table 2. After dilution, the highest ( $NH_4-N$ )<sub>T</sub> concentration of about 86.2  
209  $mg.L^{-1}$  was obtained at  $D_L$  concentration of 50 % (Table 2). Thus, the initial characteristics of  
210  $D_L$  of 50 % are similar to those of the synthetic wastewater. As well as nutrients availability,  
211  $COD_S$  level of the Liquid Slurry was also highest of about 1337  $mg.L^{-1}$ , without dilution.  
212 Therefore, MaB-flocs biomass is successfully used for nutrient recycling and treating the  
213 Liquid Digestate and Slurry.

214 *3.2.2. Phytoremediation of Liquid Digestate and Slurry: COD and ammonium removals*

215 The ammonium removal efficiency was evaluated for each substrate between the day 2 and  
216 day 14, as shown in Figures 4.a and 4.b. After fourteenth days of MaB-flocs growth, for all  
217 cases, the level of total  $NH_4-N$  in the effluent decreased quickly to obtain the highest  
218 ammonium removal rate. Furthermore, in comparison to the synthetic wastewater, for both  
219 initial substrates without dilution ( $D_L$ )<sub>0</sub> and ( $S_L$ )<sub>0</sub>, low ammonium removal efficiencies of  
220 about  $50.25 \pm 1$  % and  $62.38 \pm 0.5$  %, respectively, were observed at the end of the culture.  
221 These significant decreases are due to the high level of total  $NH_4-N$  concentrations which  
222 varied between 192.6 and 129.1  $mg.L^{-1}$  (Table 2) for Liquid Digestate and Slurry,  
223 respectively, which induce a toxic effect for MaB-flocs growth. As demonstrated by [Massa et](#)  
224 [al. \(2017\)](#), microalgae suffers in the presence of high abundance of ammonium, despite its  
225 high tolerance to  $NH_4-N$ . The use of the optimal nitrogen concentration essentially depends  
226 on algae species. According to [Collos and Harrison \(2014\)](#), different communities of  
227 microalgae have been adapted to various optimal ammonium concentrations such  
228 as *Chlorophyceae* (140  $mg.L^{-1}$ ), *Cyanophyceae* (45  $mg.L^{-1}$ ) and *Diatomophyceae* (6  $mg.L^{-1}$ ).  
229 The removal of ammonium occurs by several mechanisms (nitrification, denitrification and  
230 ammonia volatilization) through the microalgae-bacterial populations. The pH values strongly  
231 affect the process of ammonium removal. In this case, the pH value was around 7–8 during 14  
232 days of batch culture which caused the ammonia volatilization. The results achieved  
233 demonstrated the high ability of MaB-flocs to remove ammonium from diluted  $D_L$  at 30 %,

234 especially with initial  $\text{NH}_4\text{-N}$  concentration of  $51.1 \text{ mg.L}^{-1}$ , while the removal rate reached up  
235  $93 \pm 1.1 \%$ , after 14 days (Figure 4.a). It is interesting to notice that the highest removal rate  
236 corresponding to the day 14 is reached by the 30 % Digestate, confirming the results obtained  
237 by [Prajapati et al. \(2014\)](#). These researchers have found an optimal growth of *Chroococcus*  
238 sp. cultivated on diluted Liquid Digestate at 30 % concentration and a high removal rate of  
239 total ammoniacal nitrogen (TAN) obtained after 12 days ([Prajapati et al., 2014](#)). Thus 30 %  
240 Liquid Digestate is used as an efficiency growth media for algae which enhances its ability to  
241 reduce nutrients. Recent investigations made by [Massa et al. \(2017\)](#), show the high  
242 performance of a freshwater microalgae (*Botryococcus braunii*) and a marine diatom  
243 (*Phaeodactylum tricornutum*) cultivation on Liquid Digestate to remove respectively, 88.5 %  
244 and 79 % of  $\text{NH}_4\text{-N}$ . However, MaB-flocs have shown the best  $\text{NH}_4\text{-N}$  removal efficiency  
245 with a value up to  $84 \pm 2.9 \%$  for  $\text{S}_\text{L}$  diluted at 10% concentration, after 14 days (Figure 4).  
246 Hence, the data confirmed that a lowest concentration of substrates is consumed faster by  
247 microalgae, with the higher values of ammonia removal rate. The composition of substrate  
248 sources ( $\text{D}_\text{L}$  and  $\text{S}_\text{L}$ ) strongly affected nitrogen transformation taking place into batch reactor  
249 inoculated with microalgae–bacteria flocs (MaB-flocs). It was suggested by [González-](#)  
250 [Fernández et al. \(2011\)](#), that various mechanisms for ammonium removal from the Slurry  
251 substrate such as algal uptake, ammonia evaporation, bacterial growth, and nitrification could  
252 be applied in microalgae-bacteria process. As the ammonium removal rate, the COD removal  
253 efficiencies were higher for all cases after 14 days of batch incubation, compared to 2 days.  
254 Figure 5, illustrated the lowest organic compounds removal performances present on initial  
255  $(\text{D}_\text{L})_0$  ( $14.76 \pm 2.9 \%$ ) and  $(\text{S}_\text{L})_0$  ( $20 \pm 1.3 \%$ ), which is due to its high COD content of  $1184$   
256  $\text{mg.L}^{-1}$  and  $1337 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectively (Table 2). Contrary to diluted Digestate and Slurry, the  
257 initial solutions  $(\text{D}_\text{L})_0$  and  $(\text{S}_\text{L})_0$  could be toxic to the MaB-flocs owing to the municipal  
258 organic waste discharged into the anaerobic digester which contains several impurities ([Massa](#)  
259 [et al., 2017](#)). In this case, MaB-flocs suffer from organic compounds inhibition. After 14 days,  
260 a high reduction in COD removal efficiencies were observed for diluted Slurry at 10 % and 30  
261 % concentrations of about 83.1-82.3 %, respectively, while only a decrease of COD removal  
262 of about 37.7 % for 30 %  $\text{D}_\text{L}$  was noticed. As previously mentioned, the removal of the  
263 soluble COD depended also on the dilution ratio of the substrate. For MaB-flocs, highly  
264 diluted Liquid Slurry represents a suitable growth medium, despite the COD concentrations  
265 were lower than the respective synthetic wastewater (WWS). The best results achieved by  
266 Slurry samples could be attributed to a simple visual consideration. The Slurry taken from the

267 farm had a liquid consistency against the viscosity and less dense composition than the  
268 Digestate. This aspect could affect the performances because the nutrients are easier to  
269 assimilate by MaB-flocs. Therefore, the biodegradation of the organic compounds by  
270 heterotrophic bacteria enhance CO<sub>2</sub> release which is essential for microalgae growth and  
271 phytoremediation through nutrients removal (González-Fernández, 2011 ; Bohutskiy et al.,  
272 2015). In this case, the nutrients and gas exchange between bacteria and algae could be  
273 explained by mutualistic relationships. Otherwise, microalgae can consume organic carbon  
274 matters via mixotrophic and heterotrophic metabolisms to improve their growth (Bohutskiy et  
275 al., 2015). Hence, according to Marazzi et al. (2017), organic matter can play a double role on  
276 mixotrophic growth of algae (*Chlorella* sp.) as carbon source and growth factors.

### 277 3.2.3. *MaB-flocs growth and biomass productivity on Liquid Digestate and Slurry*

278 Microalgae-bacteria flocs (MaB-flocs) culture were tested via the evolution of growth rate  
279 (d<sup>-1</sup>), for Liquid Digestate and Slurry solutions, considered as a growth media (see Table 3).  
280 The comparison of MaB-flocs productivity values, based on the variation of g VSS.L<sup>-1</sup>, was  
281 realized at different D<sub>L</sub> and S<sub>L</sub> dilutions (10 %, 30 % and 50 %) for 14 days of batch culture.  
282 The lowest productivities were observed for initial solutions of Liquid Digestate and Slurry,  
283 without dilution, with values of 0.011 ± 0.03 d<sup>-1</sup> and 0.017 ± 0.01 d<sup>-1</sup> (Table 3), respectively.  
284 Thus, the high ammonium and organic compounds concentrations (Table 2) seem to represent  
285 the majority cause of the productivity reduction owing to their toxic effect. The current data,  
286 reported on the MaB-flocs growth in Liquid Digestate, have shown at 30 % dilution a growth  
287 rate of 0.024 ± 0.02 d<sup>-1</sup> corresponding to a higher value than in the initial (D<sub>L</sub>)<sub>0</sub> used without  
288 dilution. Indeed, the Liquid Digestate collected from anaerobic digestion of zootechnical  
289 wastes, enhanced the photosynthetic algae (*Tetradesmus obliquus*) and cyanobacterium  
290 (*Arthrospira maxima*) cultivation on account of the N availability (Massa et al., 2017).  
291 Another study has shown that by using Liquid Digestate at 30 % dilution, the biomass  
292 concentration of microalgae *Chroococcus* sp. reaches its optimal value of 0.79 ± 0.064 g.L<sup>-1</sup>  
293 (Prajapati et al., 2014). For the batch reactor fed with Liquid Slurry, the biomass productivity  
294 attained 0.028 ± 0.02 d<sup>-1</sup> for S<sub>L</sub> at 10 % dilution, which is higher than the ones fed with D<sub>L</sub>  
295 and with others dilutions. Hence, increasing dilution resulted in higher productivities. Of  
296 greater interest, the two dilutions are 10 % and 30 %, because the 50 % behavior is closer to  
297 the WWS trend. The comparison between microalgal biomass productivity as indicated by the  
298 variation of mg Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS in 30 %D<sub>L</sub>, 10 % S<sub>L</sub>, initial (D<sub>L</sub>)<sub>0</sub> and (S<sub>L</sub>)<sub>0</sub> and the synthetic

299 wastewater was shown in Figures 6.a and 6.b. When the algae grows up at 30 % D<sub>L</sub>,  
300 containing 51.1 mg NH<sub>4</sub>-N.L<sup>-1</sup>, the total Chl(a) content increased from 1.4 ± 0.01 mg  
301 Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS to reach 2.67 ± 0.01 mg Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS (Figure 5) after 14 days of batch  
302 culture. However, doubling the ammonium concentration in (D<sub>L</sub>)<sub>0</sub>, without dilution, resulted  
303 in a decrease in biomass productivity (Table 3) and less mg Chlorophyll (a).g<sup>-1</sup> VSS value of  
304 1.87 ± 0.02, which is lower than synthetic wastewater. According to [Ayre et al. \(2017\)](#),  
305 increasing ammonium concentration in the digestate of piggery effluent had an inhibiting  
306 effect on chlorophyll (a) production by algae. This observation could be the same as that  
307 obtained for the slurry of cattle used in this study. Thus, as the total NH<sub>4</sub>-N concentration  
308 decreased (14.4 mg.L<sup>-1</sup>), the algae biomass achieved its optimal with 2.98 ± 0.04 mg  
309 Chl(a).g<sup>-1</sup> VSS at day 14, in Liquid Slurry at 10 % dilution. Hence, the maximal growth rate  
310 (0.028 days<sup>-1</sup>) and the maximal Chl (a) abundance (2.98 mgChl(a).g<sup>-1</sup>VSS) were observed  
311 with high diluted substrate (10 %S<sub>L</sub>). Currently, the potential of algae in phytoremediation,  
312 including a sufficient decrease of nitrogen and phosphorus concentrations, improved algal  
313 growth performance ([Bohutskyi et al., 2015](#)). Further, the trophic state of microalgae-bacteria  
314 community depends on the Autotrophic Index (AI). Thus, AI identifies the community  
315 abundance: autotrophic or heterotrophic domination. The predominance of autotrophic  
316 organisms is given by the lower values of AI while heterotrophic dominance is related to  
317 higher values of AI ([APHA, 1985](#)). In batch conditions, the lower value was obtained after 14  
318 days for almost all the samples (S<sub>L0</sub>, D<sub>L0</sub>, 30 %D<sub>L</sub>, and 10 %S<sub>L</sub>) as with synthetic wastewater.  
319 The AI decreased from a high value of about 711.8 related to heterotrophic colonization into  
320 the MaB-flocs suspension to reach lower AI of 374.2 after 14 days of culture into 30 %D<sub>L</sub>,  
321 than the obtained value with (D<sub>L</sub>)<sub>0</sub> (AI: 532.6) (Figure 6). Thus, the lowest AI confirmed the  
322 autotrophic abundance of microalgae into the MaB-flocs inoculum. Similar to D<sub>L</sub>, the Liquid  
323 Slurry diluted at 10 % achieved the lowest AI of 335.3, corresponding to the high autotrophic  
324 dominance. In this case, the media S<sub>L</sub> enhanced more the algae growth in MaB-flocs, which  
325 improved the ammonium and organic compounds removal efficiencies. therefore, the lower  
326 content of ammonium and COD on Liquid Digestate and Slurry resulted in higher algal  
327 biomass productivity and Autotrophic Index. As reported by [Hernández et al. \(2013\)](#), the  
328 availability of carbon and nutrients in wastewater was contributed by algal biomass  
329 assimilation and organic macromolecules conversion.

330



331 **3.3. Biomethane production from the microalgae-bacteria flocs**

332 The variation of daily and cumulative biomethane production under batch experience,  
333 displayed in Figures 7 and 8, was conducted for two inoculums Digestate and Slurry, in terms  
334 of mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed. The cumulated methane production profiles have been reported at  
335 substrate/inoculum ratio of 0.2, 0.5, and 0.8 g VS<sub>substrate</sub>/g VS<sub>inoculum</sub> during anaerobic digestion  
336 carried out at 38°C (Figures 7.a and 8.a). For all cases, the methane production was followed  
337 for 30 days from the beginning of the anaerobic digestion. The cumulative methane yield for  
338 initial biomass (Digestate) achieved the highest value of 245.66 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed, after 30  
339 days of operation. However, under mesophilic co-digestion with MaB-flocs as a substrate, the  
340 CH<sub>4</sub> production achieved 165.73, 30.99 and 14.3 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed for the S/I ratio of 0.2,  
341 0.5, and 0.8, respectively, at the end of the treatment. According to these data, the highest  
342 methane yields were observed at 0.2 g VS<sub>substrate</sub>/g VS<sub>inoculum</sub>. This result shows that the CH<sub>4</sub>  
343 production evolved differently and decreased with increasing ratios. Similar to that, [Passos et](#)  
344 [al. \(2013\)](#) reported that as the S/I ratio increased from 0.2 to 0.8 gVS<sub>substrate</sub>/g VS<sub>inoculum</sub>, the  
345 cumulative methane production with MaB-Flocs biomass decreased from 206.92 ± 7.81 to  
346 171.54 ± 6.67 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS, respectively. Hence, several studies tested the biodegradability  
347 of MaB-flocs and its performance for biogas production. Recently, [Van Den Hende et al.](#)  
348 [\(2015\)](#) supported biochemical methane yield of 226 NL CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> VS from MaB-flocs  
349 biomass harvested and adopted for batch anaerobic digestion. However, as seen in Figure 7.b,  
350 the daily biomethane production started from day 0 and increased up to 32.25 and 21.96 mL  
351 CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed, respectively, for classic digestion (D<sub>g0</sub>) and co-digestion of MaB-flocs using  
352 the ratio of 0.2 g VS<sub>substrate</sub>/g VS<sub>inoculum</sub>, after 4 days. Batch reactors via slurry as inoculum  
353 were adopted to emphasize the impact on anaerobic co-digestion of different ratio of VS<sub>MaB-</sub>  
354 <sub>flocs</sub>:VS<sub>Inoculum</sub>. In the case of the Slurry alone (S<sub>L0</sub>), the methane production increased from  
355 35.17 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed to reach 726.72 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed, after 30 days, which is  
356 significantly higher than the values reported for biomass (Digestate) (Figure 8.a). Hence, this  
357 inoculum (Slurry) constitutes a suitable biomass as a nutritive source for anaerobic bacteria  
358 which enhance its biodegradability ability. Under co-digestion of MaB-flocs, the highest  
359 cumulative biochemical methane yield of 317.18 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> VS fed was given by Slurry  
360 biomass according to a VS<sub>substrate</sub> (g):VS<sub>inoculum</sub> (g) ratio of 0.2. Otherwise, due to the higher  
361 addition ratio of MaB to Slurry and Digestate (0.8 g VS<sub>substrate</sub>/g VS<sub>inoculum</sub>), lower yields of  
362 cumulative methane were observed (Figures 7.a and 8.a). Therefore, as confirmed by  
363 [Hernández et al. \(2013\)](#), the variation of the substrate/inoculum ratio affected the methane

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

#### 379 **4. Conclusion**

380 For the first part of the study, the best performances are achieved by Diluted Digestate at 30  
381 % concentration, and Diluted Slurry at 10 % concentration. A greater dilution seems to give  
382 the advantageously effect for future applications, probably due to an easier achievement of  
383 MaB-flocs to nutrients, as previously discussed. Regarding the co-digestion part, for both  
384 Slurry and Digestate, the best conditions are reached by the ratio 0.2 VS<sub>S</sub>/VS<sub>I</sub>, where the  
385 results for Slurry are considerably higher than the values reported for Digestate. Compared to  
386 the simple digestion, however, the co-digestion with MaB-flocs doesn't reach high values in  
387 terms of cumulative biomethane production (mL/ g VS). Future studies would evaluate this  
388 phenomenon in greater deep, to understand if digestion is a better choice than the co-digestion  
389 or if the conditions of this experiment weren not favorable to the MaB-flocs action.

390

391

392

393



394 **References**

- 395 APHA. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th edn.  
396 Washington, DC: *American Public Health Association*, p. 1268.
- 397 Ajeej, A., Thanikal, J. V., Narayanan, C. M., Kumar, R. S. (2015). An overview of bio  
398 augmentation of methane by anaerobic co-digestion of municipal sludge along with  
399 microalgae and waste paper. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 270-276.
- 400 Ayre, J. M., Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A. (2017). Growth of microalgae on  
401 undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal*  
402 *Research*, 24, 218-226.
- 403 Bohutskyi, P., Liu, K., Nasr, L. K., Byers, N., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Bouwer, E. J.  
404 (2015). Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and  
405 phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate. *Applied*  
406 *Microbiology and Biotechnology*, 99, 6139-6154.
- 407 Collos Y, Harrison PJ .(2014). Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to  
408 unicellular algae. *Marine Pollution Bulletin*, 80, 8–23.
- 409 Debowski, M., Zielin' ski, M., Grala, A., Dudek, M. (2013). Algae biomass as an alternative  
410 substrate in biogas production technologies – review. *Renewable Sustainable Energy*  
411 *Reviews*. 27, 596–604.
- 412 Elbeshbishy, E., Nakhla, G., Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential (BMP) of food  
413 waste and primary sludge: influence of inoculum pre-incubation and inoculum source.  
414 *Bioresource Technology*, 110, 18–25
- 415 Franchino, M., Tigini, V., Varese, G. C., Sartor, R. M., Bona, F. (2016). Microalgae treatment  
416 removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggery digestate. *Science of the Total*  
417 *Environment*, 569, 40-45.
- 418 Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotass, H.B. (1957). Anarobic digestion of algae. *Applied*  
419 *Microbiology*, 5, 47–55.
- 420 Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., Neis, U. (2005). Bioflocculent algal–bacterial  
421 biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science Technology*, 52, 9-18.

- 422 González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., García-González, M. C. (2011). Nitrogen  
423 transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae–bacteria  
424 consortium treating pig slurry. *Bioresource Technology*, 102, 960-966.
- 425 Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., Zhou, B. (2015). Effect of algae  
426 growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using  
427 sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187-192.
- 428 Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M. C. (2013). Treatment of agro-  
429 industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic  
430 digestion of the produced biomass. *Bioresource Technology*, 135, 598-603.
- 431 Hidaka, T., Takabe, Y., Tsumori, J., Minamiyama, M. (2017). Characterization of microalgae  
432 cultivated in continuous operation combined with anaerobic co-digestion of sewage sludge  
433 and microalgae. *Biomass and Bioenergy*, 99, 139-146.
- 434 Koblenz Barbara, Sabine, Rücknagel Jan, Christen Olaf. (2015). Influence of biogas digestate  
435 on density, biomass and community composition of earthworms, *Industrial Crops and*  
436 *Products*, Volume 66, Pages 206-209
- 437 Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C. (2015). Algaculture  
438 integration in conventional wastewater treatment plants: anaerobic digestion comparison of  
439 primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresource Technology*, 184, 236-  
440 244.
- 441 Marazzi, F., Sambusiti, C., Monlau, F., Cecere, S. E., Scaglione, D., Barakat, A. Ficara, E.  
442 (2017). A novel option for reducing the optical density of liquid digestate to achieve a more  
443 productive microalgal culturing. *Algal Research*, 24, 19-28.
- 444 Massa, M., Buono, S., Langellotti, A. L., Castaldo, L., Martello, A., Paduano, A., Fogliano, V.  
445 (2017). Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for  
446 *Tetrademus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricorutum* and *Arthrospira*  
447 *maxima*. *New Biotechnology*, 36, 8-16.
- 448 Passos, F., Solé, F., García, J., Ferrer, I. (2013). Biogas production from microalgae grown in  
449 wastewater: effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, 168–175.

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

453 Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate  
454 extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted  
455 with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by  
456 atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 975,  
457 384-394.

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

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

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

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475 **Figure captions**

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

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

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

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

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

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

491 **Figure 7.** (a) Cumulative biomethane production from Digestate used as an inoculum for  
492 testing different substrate ratio of MaB-flocs (b) Variation of daily and cumulative  
493 biomethane production for classic digestion and co-digestion of 0.2g VS<sub>MaB-flocs</sub>:VS<sub>Inoculum</sub>

494 **Figure 8.** (a) Cumulative biomethane production from Slurry used as an inoculum for testing  
495 different substrate ratio of MaB-flocs (b) Variation of daily and cumulative biomethane  
496 production for classic digestion and co-digestion of 0.2g VS<sub>MaB-flocs</sub>:VS<sub>Inoculum</sub>

497

498

499

500

501

502

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 ( $\text{day}^{-1}$ ) (mean value  $\pm$  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

529 **Figure 1.**

530



531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546 **Figure 2.**

547



548

549

550

551

552

553

554

555

556

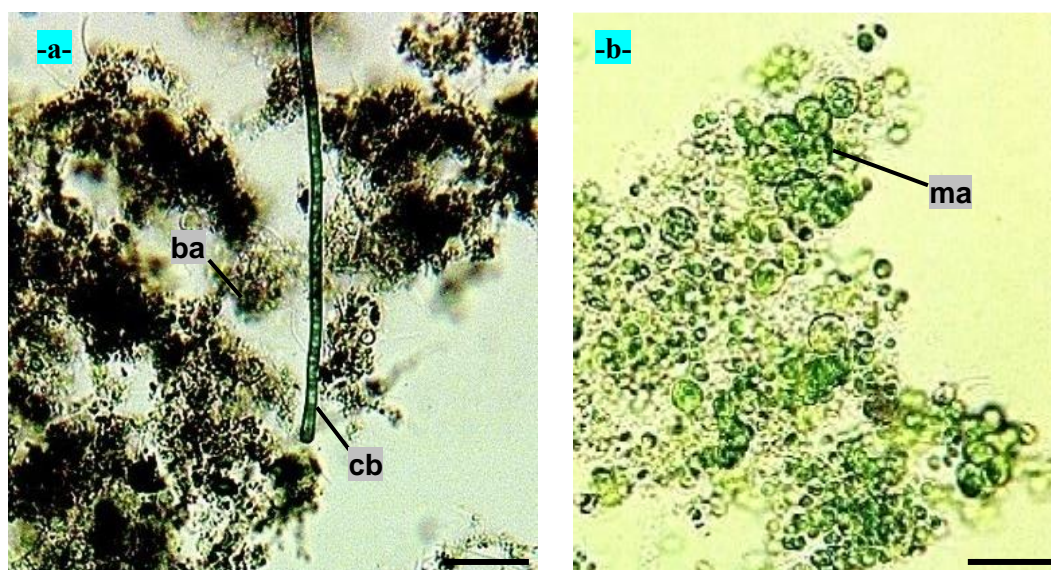
557

558



559 **Figure 3.**

560



561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

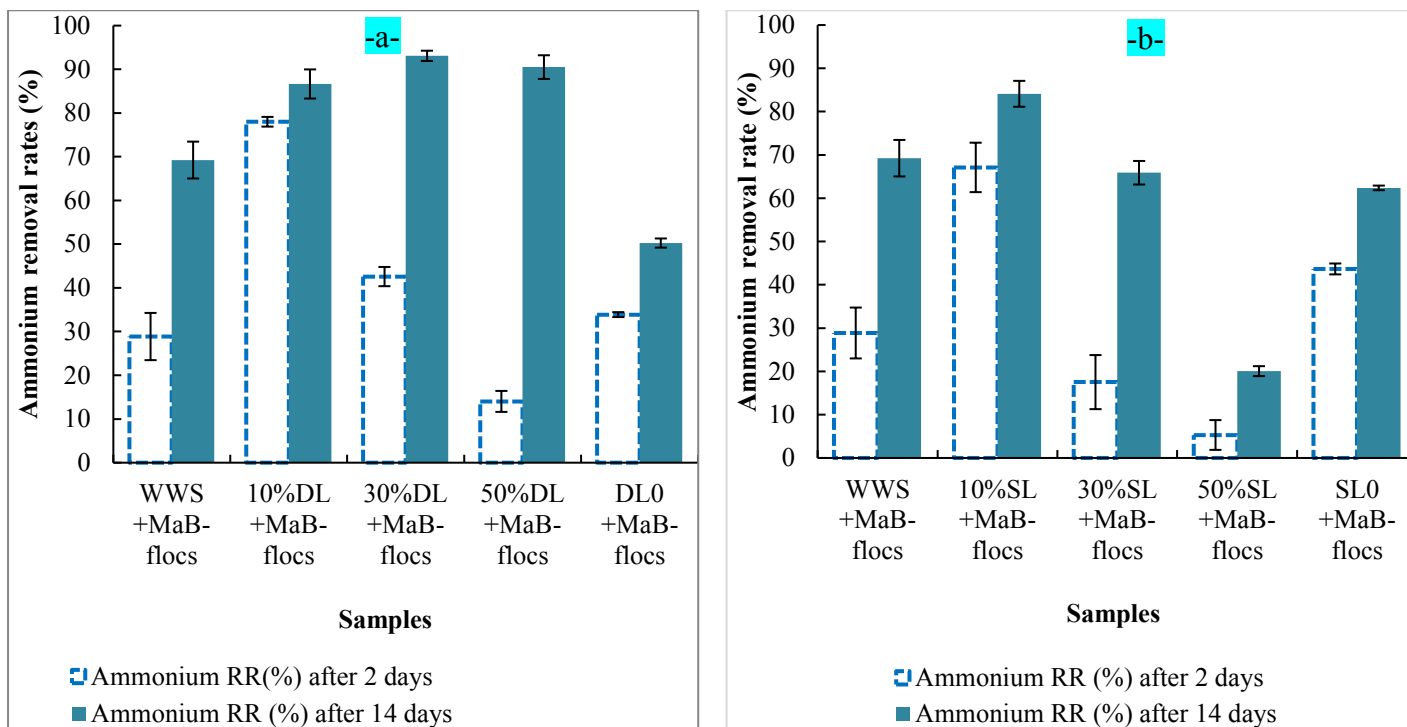
571

572



573 **Figure 4.**

574



575

576

577

578

579

580

581

582

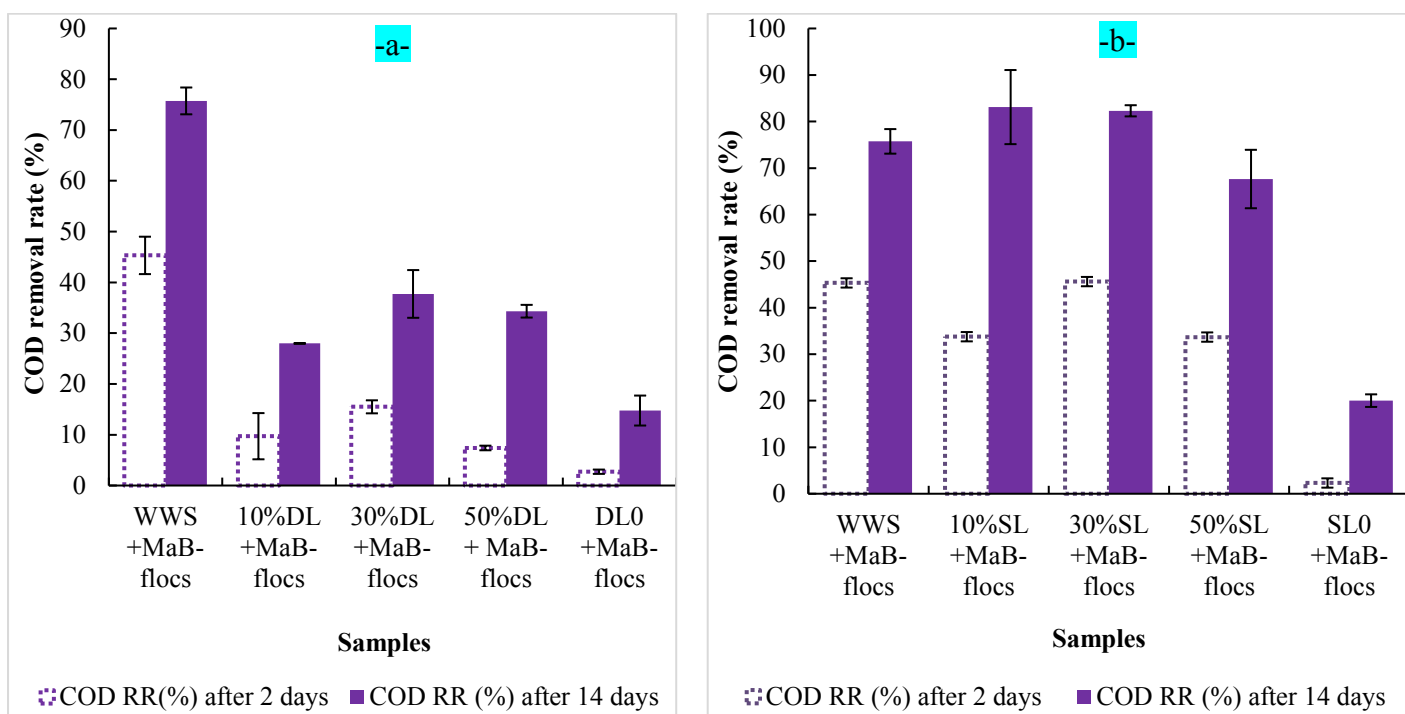
583

584

585

586 **Figure 5.**

587



588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

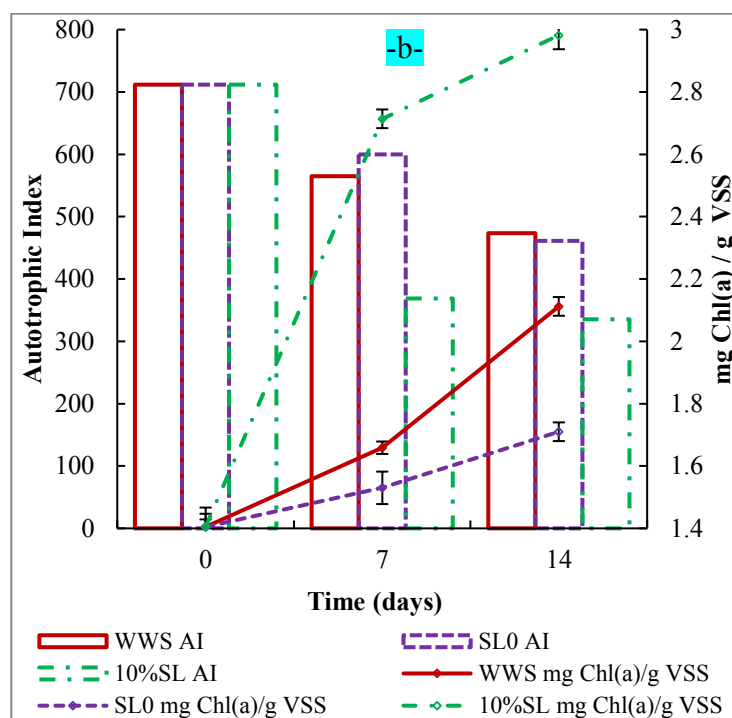
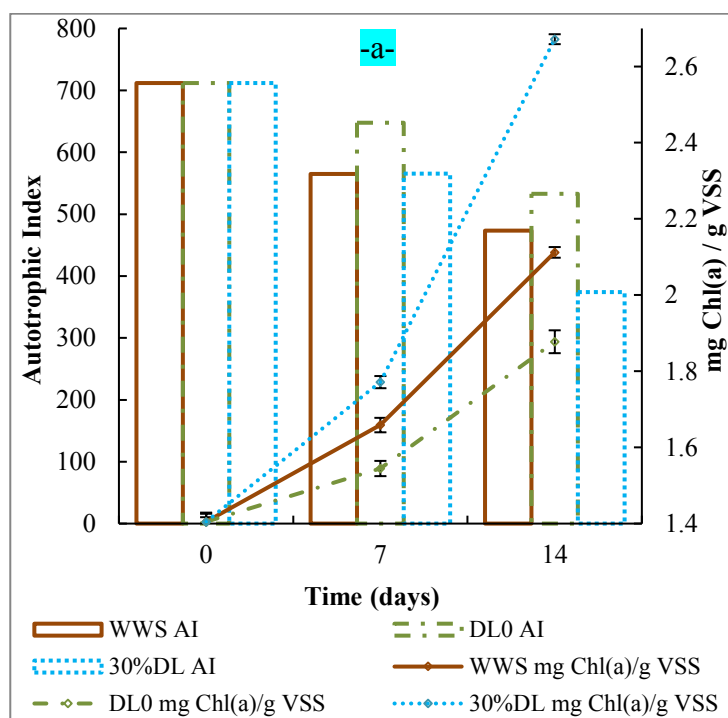
598

599

600

601 Figure 6.

602



603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

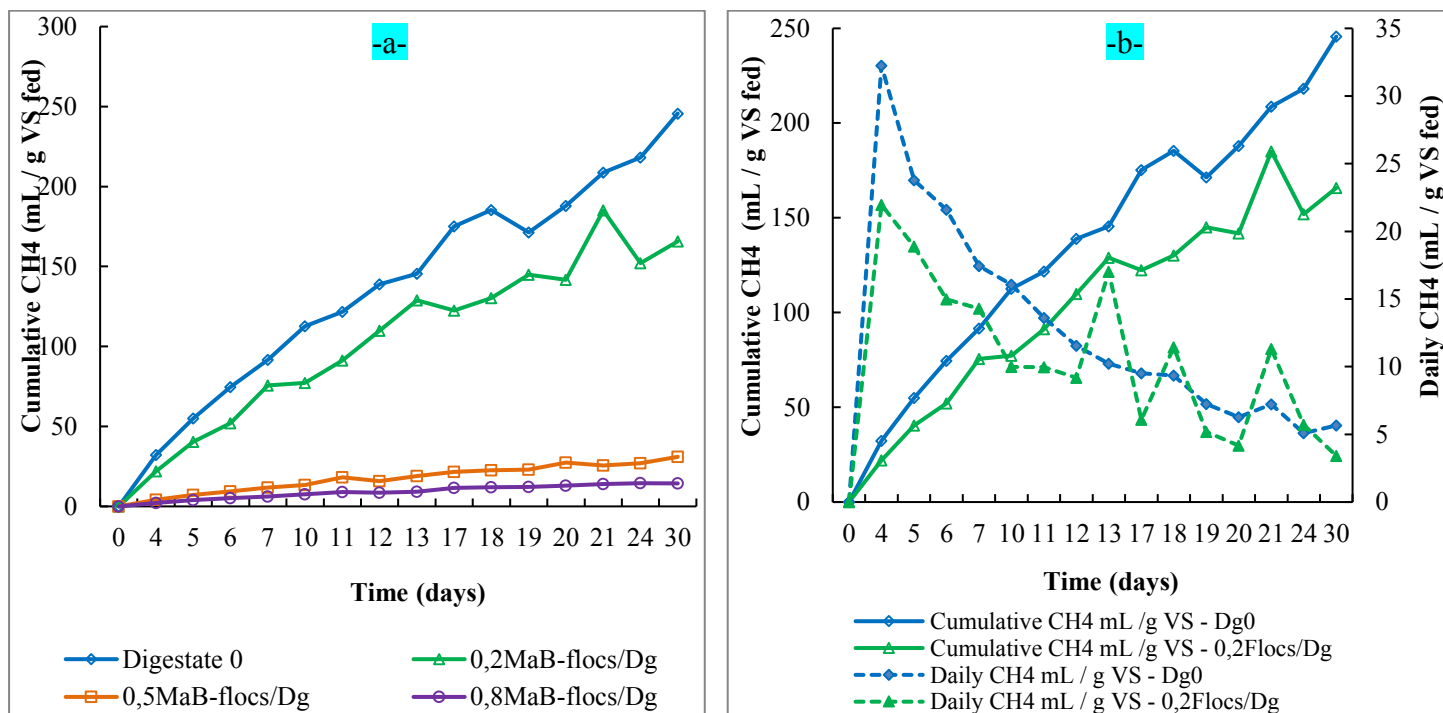
613

614

615

616 **Figure 7.**

617



618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

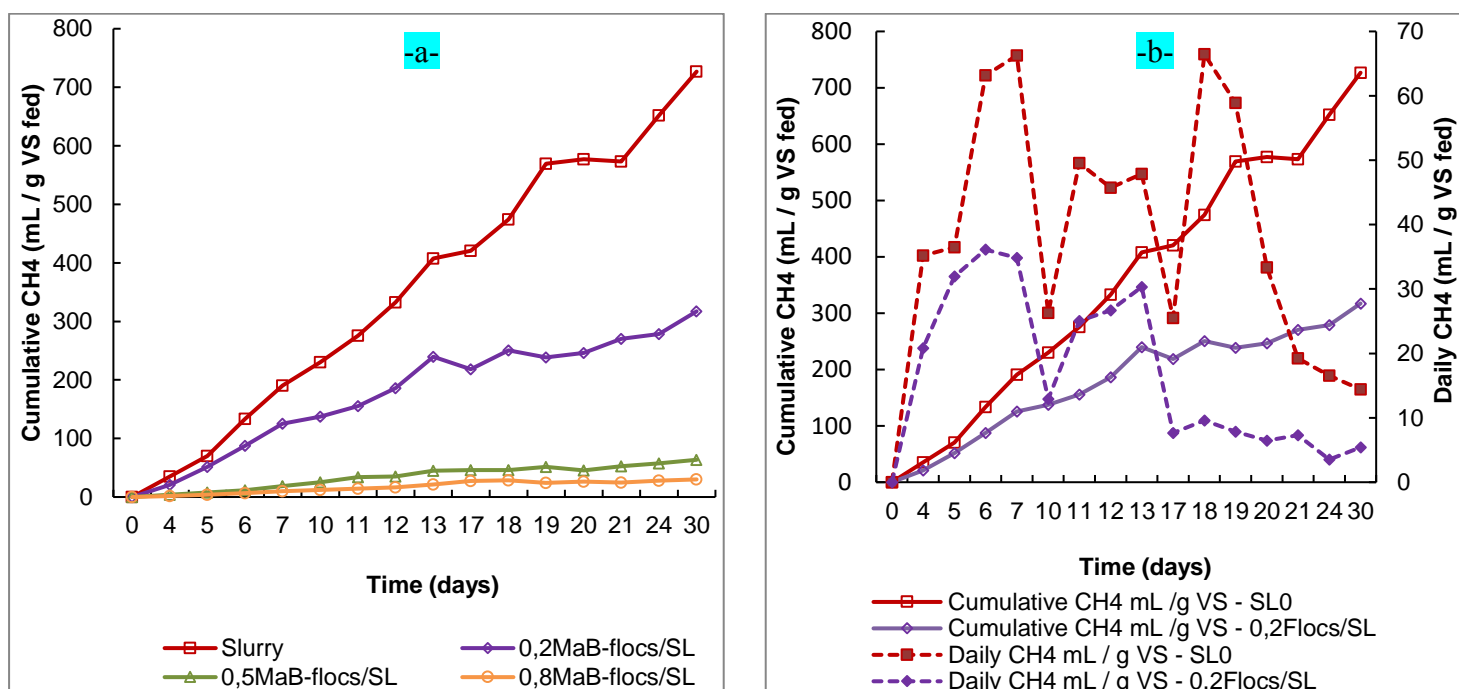
629

630

631

632 **Figure 8.**

633



634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648 **Tables**

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

650

<b>MaB-flocs biomass</b>		<b>TSS</b>	<b>VSS</b>	<b>AI*</b>	<b>Chl (a)</b>
<b>Characteristics</b>					
<b>Unit</b>		g TSS.L <sup>-1</sup>	g VSS.L <sup>-1</sup>	mg VSS .mg <sup>-1</sup> Chl (a)	mg Chl (a) .g <sup>-1</sup> VSS
<b>Batch culture</b>	T <sub>0</sub>	4.48	2.75	288.86 ± 0.1	3.46 ± 0.1
	T <sub>7days</sub>	3.76	2.35	218 ± 0.2	4.58 ± 0.2

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

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665 **Table 2.**

666

Parameter	Liquid Digestate (DL)				Liquid Slurry (SL)				Synthetic wastewater
	(DL) <sub>0</sub>	10% (DL)	30% (DL)	50% (DL)	(SL) <sub>0</sub>	10% (SL)	30% (SL)	50% (SL)	
<b>COD<sub>s</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	1184	137	383.6	550	1337	195	562	1034	601
<b>NH<sub>4</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	192.	19.5	51.1	86.2	129.1	14.4	37	58.4	86.75
<b>pH</b>		7.46				8.3			7.01

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680 **Table 3.**

681

<b>Medias</b>		<b>MaB-flocs Growth rate (d<sup>-1</sup>)(mean value ± SD)</b>
<b>Synthetic wastewater</b>		0.032 ± 0.02
<b>Liquid</b>	<b>(DL)<sub>0</sub></b>	0.011 ± 0.03
<b>Digestate</b>	<b>10%DL</b>	0.015 ± 0.04
	<b>30%DL</b>	0.024 ± 0.02
	<b>50%DL</b>	0.018 ± 0.01
<b>Liquid Slurry</b>	<b>(SL)<sub>0</sub></b>	0.017 ± 0.01
	<b>10%SL</b>	0.028 ± 0.02
	<b>30%SL</b>	0.021± 0.03
	<b>50%SL</b>	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 mises en jeu entre ces micro-organismes. Il s'agit d'un processus de phytobiorémédiation 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<sub>2</sub>. 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 fermée 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 biorémédiation 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 phytobiorémédiation 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<sub>2</sub> dans l'atmosphère.

Dans un premier temps, un système simple d'encapsulation des floccs-MaB sous forme de billes a été lancé afin d'optimiser certains paramètres opératoires (DCO, densité des floccs et temps) pour une application à multi-échelle de traitement des eaux usées. Cette approche a montré la faisabilité des floccs-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 floccs 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 floccs même à faible volume de particules, ce qui est à la faible fréquence de collision. La démarche adoptée dans ce travail se base sur l'étude de l'influence des différentes conditions hydrodynamiques comme le volume des particules, fréquence de collision et vitesse de cisaillement entre les particules.

L'étude de faisabilité des floccs-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 floccs-MaB. Il a été montré que les taux d'élimination des polluants (DCO,  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) 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 ( $\alpha$ s, 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 floccs-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  $\text{CO}_2$ .

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 floccs-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 dépend 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 phytobiorémédiation 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 meilleurs taux de production cumulée de méthane (mL / g de VS) sont atteints par le ratio 0,2 VS<sub>s</sub> / VS<sub>I</sub>. 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 consortiums, 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 pourraient 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<sub>2</sub> et sans libération de CO<sub>2</sub>. 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<sub>s</sub>) 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<sub>2</sub>.
- 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 intégrant 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 CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>12</sub> 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<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*, 100, 833-8.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., & Neis, U. (2005). Biofloculent 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 Microbiology and 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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](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 *Tetrademus 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> Utilization*, 17, 188-206.

Yadav, G., Karemore, A., Dash, S. K., & Sen, R. (2015). Performance evaluation of a green process for microalgal CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub> et sans dégagement du CO<sub>2</sub>. Il s'agit d'une étude de faisabilité de ces flocs-MaB pour la photobiorémediation 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-organismes 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 bioremediation 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'issue 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, bioremediation 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<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub> supply and CO<sub>2</sub> 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.

