

République Algérienne Démocratique et Populaire

العلمي والبحث العالي التعليم وزارة

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

الساحل وتهيئة البحر لعلوم العليا الوطنية المدرسة

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention d'un diplôme d'Ingénieur en
Sciences de la Mer**

Option : Aquaculture

Thème :

**Étude l'efficacité épuratoire de consortia microalgues-
bactéries dans le traitement des eaux usées aquacoles**

Présenté par :

MOUHEB Kahina

Soutenu le 15/07/2024, devant le jury composé de :

ZENATI Billal	Promoteur	MRA	CNRDPA
AIT SAIDI Adel	Co-promoteur	MCB	ENSSMAL
LOURGUIOUI Hichem	Président		ENSSMAL
AMROUCHE Lynda	Examinatrice		ENSSMAL

Année universitaire : 2023 - 2024

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, de m'avoir accordé la santé, la volonté et la patience pour mener à bien ma formation.

Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans l'assistance, les conseils et les orientations, que m'a prodigué mon promoteur M. ZENATI B. Je remercie également mon Co-promoteur M. AIT SAAIDI A, qui trouvera ici, le témoignage de ma profonde gratitude et reconnaissance.

Mes sincères remerciements vont aux membres du jury, M. LOURGUIOUI H. et Mme AMROUCHE L, pour avoir accepté de présider et d'examiner mon travail. Leurs conseils et remarques contribueront certainement à améliorer la qualité de ce travail.

Je remercie vivement le Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) qui m'a accueilli chaleureusement et m'a offert tous les moyens nécessaires pour réaliser ce projet. Merci à tout le personnel auprès duquel j'ai trouvé l'aide et l'assistance nécessaires. Mes remerciements s'adressent particulièrement à M. AYAD M., ainsi qu'à toute l'équipe qualité qui ont partagé généreusement leur expérience avec moi et qui m'ont transmis la passion de leur métier et la cruciale de travail d'équipe.

Mes profonds remerciements vont à Mme CHEGRANI A., Mme REBHI A., et HADIMI A., responsable et ingénieurs de l'atelier de microbiologie, Mme BENCHAMA Y., M. HAZEM S., et Mme DAOUDI L. responsable et ingénieurs de l'atelier physico-chimique pour leur disponibilité, leur aide technique et leur patience.

Je suis profondément reconnaissante à M. DILMI A. pour avoir facilité notre accès au microscope optique, ainsi qu'à toute l'équipe de la ferme marine du CNRDPA pour leur soutien.

Mes sincères remerciements vont à M. GHERIBI F., chercheur au CRAPC, pour nous avoir effectué l'analyse de la DCO.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme FERHANI K, et à M. BOUDJENAH M., Ex-directeur du centre conchylicole du CNRDPA pour m'avoir accordé l'accès au microscope optique.

Je remercie chaleureusement M. GENACHI B. pour avoir nous assuré la conservation des solutions stock du milieu BG11.

Je suis reconnaissante à toute l'équipe de la STEP de Koléa pour avoir facilité l'accès à la station pour le prélèvement de la boue activée en deux reprises.

Mes remerciements les plus chaleureux vont au responsable de la ferme GARDEN AQUA pour nous avoir fourni l'échantillon d'effluent aquacole.

Je tiens à exprimer ma gratitude à M. MEKNACHI A., M. ETSOURI M., et M. KOURDALI S. pour leurs précieux conseils et informations.

Je suis profondément reconnaissante à Mme KHERARBA Maha pour son soutien inestimable dans l'identification de certaines souches.

Je tiens par la présente occasion pour exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble des enseignants de l'ENSSMAL. À tous ceux qui m'ont aidé à accomplir ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance sincère.

Dédicaces

À mes chers parents, mon très cher papa Mouloud et ma très chère maman Nadia.

À tous mes frères Amar, Izem, Mouhammed, mes sœurs Noura et Thanina

Pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour leur patience, leur amour et leurs encouragements pour que je puisse atteindre mes Objectifs.

À Mes copines Sarah et Aïcha, je leur souhaite une vie pleine de réussite. Que dieu, le tout puissant, les préserve et les accorde l'amour, le bonheur, la santé et une longue vie. Que ce travail leur apporte la joie et la fierté.

À tout échec dans ma vie, merci.

À toute la famille.

À tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction.....1

CHAPITRE I. GÉNÉRALITES

I.1. Composition des effluents aquacoles.....4

I.2. Impact Environnemental des effluents aquacoles.....4

I.3. Remédiation des effluents d'aquaculture en utilisant des microbes.....6

I.3.1. Bactéries6

I.3.2. Microalgues6

I.3.3. D'autres microbes7

I.4. Les bénéfices de consortia de microalgues-bactéries dans la réduction de la charge polluante des eaux usées de l'aquaculture.....8

I.5. Défis liés à la récolte des microalgues.....9

I.6. Les techniques d'immobilisation des microalgues.....11

I.6.1. Immobilisation passive12

I.6.2. Immobilisation active12

I.6.2.1. Le piégeage12

I.6.2.2. Agents flocculants13

I.6.2.3. La fixation chimique13

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Conservation et repiquage routinier des souches de microalgues.....15

II.2. Croissance des souches de microalgues sur milieu de référence.....16

II.3. Criblage des souches de microalgues sur un effluent d'aquaculture réel.....19

II.4. Effet du consortium microalgues-bactéries sur l'efficacité de traitement de l'effluent d'aquaculture	21
II.4.1. Mode de culture en suspension.....	22
II.4.2. Mode de culture immobilisé.....	23
II.4.3. Paramètres de suivi des traitements de l'effluent d'aquaculture.....	25

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Visualisation microscopique des souches de microalgues sélectionnées.....	29
III.2. Croissances des souches de microalgues sur milieu BG11.....	30
III.2.1. Cinétique et paramètres de croissance des souches par méthode spectrophotométrie.....	30
III.2.1.1. Détermination de la longueur d'onde maximale.	30
III.2.1.2. Cinétique de croissance des souches de microalgues par mesure de la DO à 680 nm.....	32
III.2.2. Cinétique et paramètres de croissance souches de microalgues par dénombrement cellulaire.....	34
III.2.2.1. Cinétique de croissance des souches par détermination du nombre de cellules.....	34
III.2.2.2. Paramètres de croissance des souches par détermination du nombre de cellules.....	35
III.3. Criblage des souches de microalgues pour le traitement des effluents aquacoles.....	36
III.3.1. Caractérisation de l'effluent.....	36
III.3.2. Croissance des souches sur l'effluent du Tilapia.....	37
III.3.2.1. Cinétique de croissance.....	37
III.3.2.2. Paramètres de croissance.....	39
III.3.3. Elimination des nutriments par les souches de microalgues.....	40
III.4. Etude de la symbiose entre microalgues et bactéries dans le traitement des effluents aquacoles.....	42
III.4.1. Caractérisation de l'effluent synthétique.....	42
III.4.2. Traitement de l'effluent synthétique avec le consortium Microalgue-Boue en mode de culture suspendu.....	43
III.4.2.1. Croissance des microalgues en culture suspendue.....	43
III.4.2.2. Croissance des bactéries en culture suspendue.....	44

III.4.2.3. Elimination de la DCO et des nutriments en culture suspendue.....	45
III.4.3. Traitement de l'effluent synthétique avec le consortium Microalgue-Boue en mode de culture immobilisé.....	50
III.4.3.1. Croissance des microalgues en mode de culture immobilisé.....	50
III.4.3.2. Croissance des bactéries en mode de culture immobilisé.....	51
III.4.3.3. Elimination de la DCO et des nutriments en mode de culture immobilisé.....	52
Conclusion.....	58
Références bibliographiques.....	61
Annexes	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma explicatif de la réaction de nitrification et dénitrification.....	5
Figure 2 : Incubation de la préculture des cinq souches étudiées à une température de 27 °C, une luminosité continue et un flux d'air stérile.....	17
Figure 3 : Un cadrant des cellules de microalgues de la souche 2 ST à un grossissement de 400×.....	18
Figure 4 : Prélèvement de l'effluent de Tilapia rouge à la Pépinière Garden (Cheraga, Alger)	19
Figure 5 : Autoanalyseur d'analyse des sels nutritifs.	20
Figure 6 : Prélèvement de la boue de l'aérateur biologique à la station d'épuration de Koléa.....	22
Figure 7 : Culture en suspension de la souche de microalgue 5 CNR.	23
Figure 8 : Les différentes étapes d'immobilisation de la souche de microalgue 5 CNR. A <i>Préculture</i> B . <i>Centrifugation de la culture</i> C . <i>Mélange de la suspension des microalgues avec de l'alginate de sodium</i> D . <i>Plongée des billes d'alginate dans le bain de CaCl₂</i> E . <i>Conservation des billes d'alginate</i>	24
Figure 9 : Culture immobilisée de la souche 5 CNR.....	25
Figure 10 : Etapes d'analyse de la DCO par la méthode des kits. A <i>Préparation de l'échantillon</i> , B . <i>Digestion</i> , C . <i>Lecture de la DCO</i>	27
Figure 11 : Visualisation par microscope optique des cinq souches de microalgues étudiées. A) 2 ST. B) 4 CNR. C) 5 CNR. D) D ST. E) 10 ST. Grossissement 1000 ×.....	29
Figure 12 : Longueurs d'ondes maximales (λ_{max}) des souches de microalgues étudiées, déterminées au spectrophotomètre. A) 4 CNR (689 nm), B) D ST (687nm), C) 5 CNR (684nm), D) 10 ST (684 nm), E) 2 ST (683 nm).	31
Figure 13 : Cinétiques de croissance des souches de microalgues étudiées (4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST) dans le milieu BG11.	34
Figure 14 : Cinétiques de croissance des souches de microalgues déterminées par dénombrement cellulaire dans l'effluent de Tilapia rouge.	37

Figure 15 : Cinétiques de croissance des souches de microalgues déterminées par mesure de la DO à 680 nm dans l'effluent de Tilapia rouge.	39
Figure 16 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire des microalgues seules en suspension et microalgues en suspension co-cultivée avec boue de l'effluent synthétique.	44
Figure 17 : Evolution temporelle de la flore bactérienne totale dans la co-culture des microalgues en suspension avec boue et boue seule de l'effluent synthétique.....	45
Figure 18 : Evolution temporelle de la DCO de l'effluent Synthétique traité par microalgues seules en suspension, microalgues en suspension avec boues en suspension et boues seule. ...	46
Figure 19 : Evolution temporelle des nutriments dans l'effluent synthétique suite aux traitements par microalgue seule en suspension, en co-culture avec boue et par boue A. Nitrite B. Orthophosphate, C. Nitrate, D. Ammonium	47
Figure 20 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire des microalgues seules immobilisée et microalgues immobilisée co-cultivée avec boue.	50
Figure 21 : Evolution temporelle de la flore bactérienne totale dans la co-culture des microalgues immobilisée avec boue et boue seule de l'effluent synthétique.	51
Figure 22 : Evolution temporelle de la DCO de l'effluent Synthétique traité par microalgues seules immobilisées, microalgues immobilisées avec boues en suspension et boues seule.....	52
Figure 23 : Evolution temporelle des nutriments dans l'effluent synthétique suite aux traitements par microalgue seule immobilisée, en co-culture avec boue et par boue. A. Nitrites, B. Nitrates, C. Ammonium, D. Orthophosphates	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractérisation des effluents de l'aquaculture de Tilapia de Nil (Ansari <i>et al.</i> , 2017).	4
Tableau 2 : Coûts de récoltes des microalgues (de Morais <i>et al.</i> , 2023).	11
Tableau 3 : Ecart de valeurs entre la longueur d'onde $\lambda_{680 \text{ nm}}$ et λ_{max} des cinq souches de microalgues étudiées.	31
Tableau 4 : Cinétique de croissance des cinq souches de microalgues (4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST et 2 ST) par mesure de la DO à 680 nm.	32
Tableau 5 : Performances de croissance des cinq souches de microalgues développés sur le milieu BG11.....	34
Tableau 6 : Caractérisation physico-chimique de l'effluent du Tilapia rouge.	36
Tableau 7 : Détermination des paramètres de croissance des souches de microalgues développées dans l'effluent de Tilapia par DO à 680 nm.	39
Tableau 8 : Détermination des paramètres de croissance des souches de microalgues développées dans l'effluent de Tilapia par dénombrement cellulaire.....	39
Tableau 9 : Les rendements d'élimination des élément nutritifs par les souches de microalgues étudiées.....	41
Tableau 10 : Caractérisation physico-chimique de l'effluent synthétique.....	42
Tableau 11 : Récapitulatif des rendements d'élimination des nutriments suite aux différents traitements de l'effluent synthétique en mode de culture suspendu.	49
Tableau 12 : Récapitulatif des rendements d'élimination des nutriments de l'effluent synthétique en mode de culture immobilisé.	56

Résumé :

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'efficacité épuratoire des microalgues locales vis-à-vis un effluent aquacole et voir leur symbiose avec les bactéries. Tout d'abord, nous avons cultivé cinq souches de microalgues sur un milieu BG11 toute en fournissant les conditions optimales pour la croissance des microalgues (température, lumière et aération). En parallèle, ces souches ont été identifiées sommairement par microscopie. Les souches ont été criblées par la suite, dans le traitement d'une eau usée issue de l'élevage du Tilapia pour sélectionner la meilleure. Après cette étape, des consortia de la souche performante, en suspension ou immobilisée, ont été mis avec la flore totale d'une boue activée provient d'une station d'épuration. Les résultats obtenus, ont montré que la souche 5 CNR a une croissance relativement rapide dans le milieu BG11 ainsi que dans l'effluent de Tilapia rouge. La culture suspendue de la 5 CNR avec la flore totale de la boue activée a montré un effet positif tant sur la croissance des microalgues que les bactéries, avec un bon rendements d'élimination de l'ammonium et les phosphates (99%), mais une faible diminution de la DCO, des nitrates et des nitrites par rapport au traitement avec la boue seule. En mode de culture immobilisé, l'ajout des bactéries au milieu n'a pas d'effet positif remarquable sur la croissance de la microalgue, mais une nette amélioration de l'élimination de la DCO (un rendement de 88,17% et de 84% respectivement pour la microalgue seule et le consortium) et de tous les éléments nutritifs (un rendement de 99 à 100 %) a été enregistrée, ce qui met en évidence l'importance de l'immobilisation pour atténuer la pollution des rejets aquacoles.

Mots clés : Microalgues, Boue activée, Co-culture symbiotique, Immobilisation, Traitement des eaux usées aquacoles.

Abstract :

The main objective of this work is to study the purification efficiency of local microalgae for aquaculture effluent and their symbiosis with bacteria. Firstly, we cultivated five strains of microalgae on a BG11 medium while providing optimal conditions for microalgal growth (temperature, light and aeration). These strains were also briefly identified by microscopy. The strains were then screened using wastewater from Tilapia farms to select the best one. Consortia of the best-performing strain, in either suspension or immobilised, were then mixed with the total flora of activated sludge from a wastewater treatment plant. The results showed that strain 5 CNR grew relatively fast in the BG11 medium and in the red Tilapia effluent. Suspended culture of 5 CNR with the total flora of the activated sludge showed a positive effect on the growth of both microalgae and bacteria, with a good ammonium and phosphate removal efficiency (99%), but a slight reduction in COD, nitrates and nitrites compared to treatment with sludge alone. In immobilised culture mode, the addition of bacteria to the medium had no remarkable positive effect on the growth of the microalgae. However, a considerable improvement in the elimination of COD (a yield of 88.17% and 84% respectively for the microalgae alone and the consortium) and all the nutrients (a yield of 99 to 100%) was recorded, which highlights the importance of immobilisation in mitigating the pollution of aquaculture discharges.

Key words: Microalgae, Activated sludge, Symbiotic co-culture, Immobilisation, Aquaculture wastewater treatment.

المخلص :

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو دراسة كفاءة تنقية الطحالب المجهرية المحلية فيما يتعلق بالنفايات السائلة لتربية الأحياء المائية وتكافلها مع البكتيريا. أولاً، قمنا بزراعة خمس سلالات من الطحالب الدقيقة على وسط BG11 مع توفير الظروف المثلى لنمو الطحالب الدقيقة (درجة الحرارة والضوء والتهوية). في الوقت نفسه، تم تحديد هذه السلالات بإيجاز عن طريق الفحص المجهرى. بعد ذلك تم فحص هذه السلالات الخمس في معالجة مياه الصرف من مزارع البلطي لاختيار الأفضل. بعد هذه المرحلة، تم إجراء خلط أفضل السلالات أداءً، في حالة تعليق أو تثبيت مع النباتات الكلية للحماة المنشطة من محطة معالجة مياه الصرف الصحي. أظهرت النتائج أن سلالة CNR 5 نمت بسرعة نسبياً في وسط BG11 وفي نفايات البلطي الأحمر السائلة. أظهرت الاستزراع المعلق للسلالة CNR 5 مع النباتات الكلية للحماة المنشطة تأثيراً إيجابياً على نمو كل من الطحالب الدقيقة والبكتيريا، مع كفاءة جيدة في إزالة الأمونيوم والفسفات (99%)، ولكن مع انخفاض طفيف في COD والنترات والنترتت مقارنةً بالمعالجة بالحماة وحدها. في وضع الاستزراع المثبت، لم يكن لإضافة البكتيريا إلى الوسط أي تأثير إيجابي ملحوظ على نمو الطحالب الدقيقة، ولكن تم تسجيل تحسن واضح في التخلص من COD (مردود 88.17% و84% على التوالي للطحالب الدقيقة وحدها والاتحاد) وجميع العناصر الغذائية (محصول يتراوح بين 99 إلى 100%)، مما يسلط الضوء على أهمية التثبيت في التخفيف من تلوث مياه الصرف الصحي لتربية المائيات.

كلمات مفتاحية: الطحالب الدقيقة، الحماة المنشطة، الاستزراع التكافلي المشترك، التثبيت، معالجة مياه الصرف الصحي لتربية المائيات.

INTRODUCTION

Introduction

L'aquaculture est une industrie qui revêt une importance économique et sociale, qui génère environ 47 % de la consommation humaine de poisson (Mishra et al., 2022), également des emplois et des revenus. Cependant, comme d'autres activités anthropiques, elle a un impact négatif sur l'environnement, principalement en raison de la génération d'effluents riches en matières solides sédimentables, en matières organiques, en phosphore et en azote (de Vasconcelos et al., 2021). L'intensification de la production aquacole nécessitera l'utilisation d'un plus grand nombre d'intrants, ce qui entraînera une augmentation de la production de déchets dans les systèmes de production (John et al., 2020).

D'autre part, la présence de concentrations élevées d'ammoniac, de nitrites et de nitrates constitue un défi majeur pour l'industrie de l'aquaculture afin de maintenir la production halieutique, d'où la nécessité d'un traitement économiquement réalisable et respectueux de l'environnement (John et al., 2020). Face à ces défis cruciaux, de nouvelles technologies et stratégies sont étudiées dans le but d'éliminer les contaminants et les composés chimiques des eaux usées de l'aquaculture. À cette fin, on observe une tendance croissante à utiliser les microalgues avec un double avantage, d'une part pour la remédiation des nutriments et d'autre part pour la production de biomasse. Dans ce contexte, les microalgues représentent une opportunité de produire d'importants sous-produits, ainsi que de l'énergie ou des aliments pour animaux (Andreotti, 2019). Le développement des technologies microbiennes est une approche prometteuse pour la conversion de la biomasse en énergie propre et renouvelable, dans une perspective de développement durable, de sécurité énergétique et d'environnement (Das et al., 2022). En outre, une approche alternative et renouvelable, est l'élimination des nutriments des eaux usées par la coculture de bactéries et de microalgues (Mujtaba et al., 2017).

Le rôle clé de la bioremédiation est d'identifier et d'extraire les microalgues après le traitement des eaux usées. L'immobilisation est l'une des méthodes permettant de résoudre les problèmes de récolte. Les microalgues immobilisées avec des billes d'alginate sont le plus souvent utilisées pour résoudre ce problème. De plus, cette méthode présente des avantages tels que l'élimination rapide des nutriments et l'absence de cellules dans l'effluent (Meril et al., 2022).

Dans ce contexte, notre projet de fin d'étude se positionne comme une réponse aux défis environnementaux et économique liées au développement de l'aquaculture en Algérie, notamment l'aquaculture d'eau douce, fonctionnant en circuit fermé et ouvert. L'objectif spécifique de ce mémoire réside dans la recherche de l'effet de la symbiose entre les

microalgues et les bactéries sur les performances de croissance des deux microorganismes et d'élimination des nutriments des rejets aquacoles. Notre première étape consiste, à évaluer la performance de traitement d'un milieu BG11 et un effluent aquacole d'eau douce (issu d'un bassin d'élevage de tilapia) par cinq souches de microalgues sélectionnées 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST.

Notre étude inclura également une évaluation de l'efficacité d'une souche de microalgue sélectionnée à partir des cinq souches mentionnées, dans le traitement d'un effluent aquacole synthétique en deux modes de culture séparées : mode de culture en suspension et mode de culture immobilisé. Cette évaluation nous permettra de mesurer leur contribution à la réduction des niveaux de demande chimique en oxygène (DCO), d'azote (N), et de phosphore (P) dans cet environnement spécifique. En comprenant les mécanismes d'adaptation de cette souche de microalgue aux environnements pollués et en évaluant son efficacité dans le traitement des effluents aquacoles, notre recherche contribuera de manière significative à la réponse de la requête de solutions durables pour la préservation des ressources aquatiques et la gestion efficaces des eaux usées.

CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉ

CHAPITRE I. GÉNÉRALITES

I.1. Composition des effluents aquacoles :

Les eaux usées typiques de l'aquaculture (AW) comprennent des matières fécales et des nutriments provenant de l'excrétion des animaux aquatiques, ainsi que des aliments non consommés, des substances chimiques et des antibiotiques (Andreotti, 2019).

La qualité de l'eau est un facteur essentiel dans les systèmes d'aquaculture. La qualité optimale de l'eau varie selon les espèces et doit être surveillée pour garantir la croissance et la survie (Andreotti, 2019).

Dans l'aquaculture, les paramètres de qualité de l'eau régulièrement contrôlés sont : la température, l'oxygène dissous, le pH, l'alcalinité, la dureté, l'ammoniaque et les nitrites (Andreotti, 2019).

Dans les eaux usées, il existe deux formes de composés : des substances dissoutes ou et des solides en suspension (Andreotti, 2019).

La fraction inorganique comprend les nitrites, les nitrates et l'ammoniac, tandis que la fraction organique reste sous forme de protéines attachées aux solides organiques en suspension (aliments non consommés, fèces, floes) ou comprenant la biomasse du phytoplancton et/ou du zooplancton (Martinez-Porchas et al., 2014).

Il a été calculé que 10 kg de Phosphore et 60 kg de l'azote sont rejetés dans l'environnement par tonne de poisson produite. Tandis que 21 kg de phosphore et 56 kg de l'azote sont rejetés par tonne de crevettes produite (Martinez-Porchas et al., 2014).

Le tableau 1 donne un exemple sur la composition des eaux usées issues de l'élevage du Tilapia.

Tableau 1 : Caractérisation des effluents de l'aquaculture de Tilapia de Nil (Ansari *et al.*, 2017).

Paramètre	Unité	Valeur
pH	–	7,28 ± 0,32
Température	°C	27,3 ± 1,5
Solide Total	mg/l	0,42 ± 0,02
Solide Dissous Total	mg/l	0,352 ± 0,04
Salinité	mg/l	0,26 ± 0,02
Oxygène dissous	mg/l	4,17 ± 0,31
DCO	mg/l	96 ± 0,00 (80–150*)
N-NH ₄ ⁺	mg/l	5,32 ± 0,45 (4–8*)
N-NO ₂ ⁻	mg/l	5,52 ± 0,18
N-NO ₃ ⁻	mg/l	40,67 ± 0,84 (25–100*)

P –PO₄³⁻	mg/l	8,82 ± 0,02 (4–25*)
Fe	mg/l	4,05 ± 0,01
Mo	mg/l	3 ± 0,08
Zn	mg/l	0,85 ± 0,01
Na	mg/l	66,25 ± 1,49
Ni	mg/l	0,3 ± 0,00
Mg	mg/l	8,45 ± 0,04
K	mg/l	5,9 ± 0,02
Concentration bactérienne	UFC/ml	1,795 × 10 ³ ± 0,049 × 10 ³

*Moyenne annuelle.

I.2. Impact environnemental des effluents aquacoles

L'augmentation de la production aquacole s'accompagne d'une augmentation des impacts environnementaux négatifs causés par le rejet d'effluents (de Vasconcelos et al., 2021). L'eutrophisation, l'hypernutrification et les altérations de la nitrification sont les majeures conséquences causées par les effluents de l'aquaculture dans le monde entier (Martinez-Porchas et al., 2014). Par conséquence, un déversement important de ces eaux usées dans les lacs, les rivières, les estuaires ou les mers peut avoir des effets néfastes sur l'environnement (Andreotti, 2019). Il est donc impératif que les eaux usées contenant de l'azote et du phosphore ne soient pas rejetées directement dans la masse d'eau avant d'avoir subi un traitement adéquat (Mujtaba et al., 2017).

Une fois que les nutriments azotés sont libérés dans l'environnement, le processus de nitrification se met en place (Martinez-Porchas et al., 2014). Voir le schéma ci-dessous (figure 01)

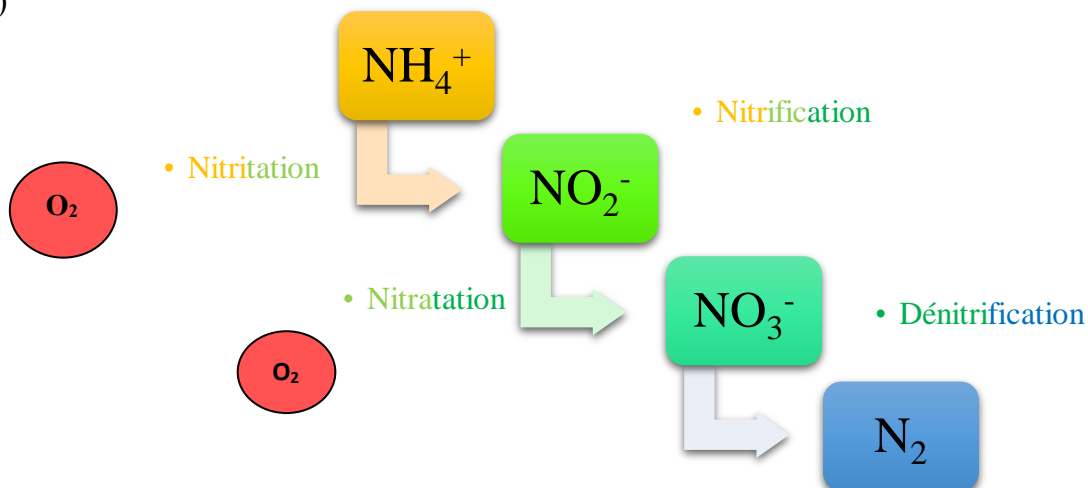


Figure 1 : Schéma explicatif de la réaction de nitrification et dénitrification

Ce processus est réalisé par les bactéries *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*; cependant, les environnements recevant des effluents d'aquaculture ont une capacité limitée à traiter et à incorporer ces nutriments dans les chaînes alimentaires et dans les cycles biogéochimiques, ce qui résultent d'une accumulation de ces nutriments, provoquant ainsi des déséquilibres écologiques ou bien hypernutrification (Martinez-Porchas *et al.*, 2014).

I.3. Remédiation des effluents d'aquaculture en utilisant des microbes

Les communautés microbiennes sont responsables du traitement biologique des eaux usées, mais notre compréhension de leur diversité, de leurs modèles d'assemblage et de leurs fonctions reste limitée (Niu *et al.*, 2024). On cite ici quelques microorganismes épurateurs d'eaux usées :

I.3.1. Bactéries

Les bactéries possèdent divers potentiels de bioremédiation qui sont bénéfiques d'un point de vue environnemental et économique. Les méthodes de bioremédiation et de biotransformation ont été utilisées pour exploiter la capacité métabolique naturelle des micro-organismes à dégrader, transformer ou accumuler des composés toxiques, notamment des hydrocarbures, des composés hétérocycliques, des substances pharmaceutiques, des radionucléides et des métaux toxiques (Das and Dash, 2014). Le principe de la bioremédiation est de stimuler les micro-organismes avec des nutriments et d'autres produits chimiques qui leur permettent de détruire les contaminants. Les systèmes de bioremédiation utilisés aujourd'hui s'appuient sur des micro-organismes natifs des sites contaminés, qu'ils encouragent à travailler en leur fournissant des niveaux optimaux de nutriments et d'autres produits chimiques essentiels à leur métabolisme (Das and Dash, 2014). En outre, les bactéries peuvent éliminer les polluants des masses d'eau par l'adsorption et la décomposition des matières organiques et des substances toxiques présentes dans les effluents (Yu *et al.*, 2023).

Le cycle biogéochimique de l'azote est principalement influencé par deux processus naturels : la nitrification et la dénitrification. La nitrification est un processus microbien qui implique la transformation de l'ammoniac en nitrate par des bactéries nitrifiantes telles que *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus*, *Nitrolobus* et *Nitrospira* (John *et al.*, 2020).

La dénitrification se produit lorsque les bactéries utilisent le nitrate comme accepteur terminal d'électrons dans leur processus respiratoire, et est réalisée par des bactéries appartenant aux genres *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* (John *et al.*, 2020).

I.3.2. Microalgues

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques unicellulaires qui utilisent l'énergie solaire, les nutriments inorganiques et le CO₂ (dioxyde de carbone) de l'environnement pour générer de la biomasse qui peut être valorisée comme matière première pour les biocarburants, les aliments pour animaux ou l'aquaculture (Ansari *et al.*, 2017).

Les microalgues ont un grand potentiel pour la production de lipides, de protéines, d'hydrates de carbone, de pigments, etc. Elles sont aussi des aliments naturels de l'écosystème aquacole et sont largement utilisées pour les larves, les crustacés et les mollusques (Ansari *et al.*, 2017). D'autre part, plusieurs auteurs ont évalué la possibilité d'utiliser les microalgues pour traiter les eaux usées des usines de production de poissons ou de crevettes, en raison de leur capacité à absorber rapidement les nutriments (Andreotti, 2019).

L'intégration de l'épuration des eaux usées et de la production de microalgues dans les systèmes d'aquaculture est une méthode alternative pour optimiser l'utilisation des ressources (Andreotti, 2019). De plus, la culture des microalgues dans les effluents aquacoles empêche la dépendance en eau douce pour la culture (Ansari *et al.*, 2017). Ainsi, de nombreuses études ont démontré la capacité des microalgues à éliminer l'azote et le phosphore des eaux usées (Andreotti, 2019).

Les microalgues ont attiré l'attention des chercheurs, des organismes gouvernementaux et de l'industrie en raison de leur capacité à éliminer les nutriments des effluents, tout en produisant une biomasse précieuse (Ansari *et al.*, 2017).

La co-culture de microalgues est pratiquée depuis longtemps à plusieurs fins. L'un des objectifs importants de la co-culture est la biorestauration et le traitement des rejets municipaux, agricoles, animaux, et laitiers. En outre, des études récentes ont démontré un potentiel considérable pour la récolte facile de la biomasse et la réduction du coût global de la consommation d'énergie et de la réduction du coût global de la consommation d'énergie (Das *et al.*, 2022).

Les microalgues peuvent agir comme agents de bioremédiation de l'eau (Gonzalez et Bashan, 2000) et en tant qu'une source de biocarburant de troisième génération, ont une biomasse et une productivité en huile beaucoup plus élevées (Das *et al.*, 2022).

I.3.3. D'autres microbes

Parmi les divers micro-organismes utilisés en co-culture avec les algues, les champignons filamenteux sont avantageux pour le traitement des eaux usées car ils peuvent réduire le coût

de production du biodiesel grâce à leur méthode de récolte facile, faisable et efficace (Das *et al.*, 2022).

Pour minimiser le coût de production des biocarburants, en particulier pour réduire les coûts d'investissement pour la récolte, la co-culture d'algues et de champignons est introduite car les champignons filamenteux agissent comme un biofloculant attrayant en raison de leur nature d'auto-pelletisation par laquelle ils emprisonnent les cellules microalgales (Das *et al.*, 2022).

Les champignons absorbent efficacement le phosphore et présentent de nombreuses similitudes avec d'autres organismes accumulant le polyphosphate (Barnharst *et al.*, 2023).

En permettant à *Chlorella vulgaris* et à *Mucor indicus* de se développer dans des eaux usées d'aquaculture simulées, on obtiendra des eaux usées contenant moins de composés azotés et de phosphore, tout en produisant une biomasse de mycoalgues facilement récoltable (Barnharst *et al.*, 2023).

I.4. Les bénéfices de consortia de microalgues-bactéries dans la réduction de la charge polluante des eaux usées de l'aquaculture

Le développement des technologies microbiennes est une approche prometteuse pour la conversion de la biomasse en énergie propre et renouvelable, la production de lipides, ainsi que l'élimination des déchets (Das *et al.*, 2022). Par ailleurs, si la croissance et la maintenance de deux micro-organismes différents sont compatibles dans un système de co-culture, le métabolisme hétérotrophe des bactéries aérobies et les capacités d'absorption des nutriments et d'oxygénation photosynthétique des algues peuvent être mutuellement symbiotiques (Mujtaba *et al.*, 2017).

L'un des moyens d'accroître les populations de microalgues consiste à les inoculer avec d'autres micro-organismes, une stratégie qui est actuellement testée pour son potentiel d'augmentation des rendements des plantes agricoles importantes (Gonzalez and Bashan, 2000).

Parfois, les bactéries peuvent stimuler la croissance des algues en libérant des vitamines et des hormones végétales, tandis que les microalgues peuvent également libérer des composés organiques qui peuvent être utilisés par les bactéries comme source d'énergie. Ainsi, l'élimination simultanée de l'azote, du phosphore et des matières organiques dans leur biomasse en tant que constituants cellulaires et la libération de l'oxygène exogène, pour répondre à la plupart des besoins des bactéries aérobies, peut être réalisée dans un seul réacteur en

sélectionnant des souches appropriées de bactéries et de microalgues dans un système de co-culture (Mujtaba *et al.*, 2017).

Le profil de rétention des nutriments ainsi que le rendement en biomasse et en lipides des deux espèces de microalgues ont été analysés et ont permis de conclure que *Scenedesmus dimorphus* a un plus grand potentiel de dégradation des déchets que *Chlorella vulgaris*, ce qui entraîne des différences dans l'utilisation des nutriments et le rendement de la biomasse (Das *et al.*, 2022).

Certaines microalgues marines et bactéries hétérotrophes, lorsqu'elles sont cultivées ensemble, sécrètent des enzymes extracellulaires et des facteurs de croissance qui favorisent la croissance de chaque souche (Das *et al.*, 2022).

I.5. Défis liés à la récolte des microalgues

Actuellement, l'industrie des biocarburants à base de microalgues est confrontée aux défis majeurs parmi lesquels les coûts économiques élevés pour la récolte et/ou la déshydratation des cellules de microalgues à partir de grands volumes de culture (Das *et al.*, 2022).

Le coût de la récolte des microalgues, qui représente jusqu'à 20-30% du coût de production final, constitue un défi important pour l'industrialisation des biocarburants à base de microalgues. Dans le contexte du traitement des eaux usées, la récolte est extrêmement importante car elle affecte le rejet final et la réutilisation potentielle de l'eau traitée (de Morais *et al.*, 2023)

Plusieurs études dans la littérature ont s'intéressé sur la récolte des microalgues, car il s'agit d'une étape cruciale dans la chaîne de production de la biomasse. Cependant, les spécificités des consortia de traitement des eaux usées, et en particulier l'importance de la récupération de la biomasse pour garantir la qualité de l'eau traitée et le traitement en aval de la biomasse, n'ont pas été étudiées de manière approfondie (de Morais *et al.*, 2023). En outre, l'impact de la technique de récolte sur la qualité de l'eau traitée et sa réutilisation éventuelle doit également être pris en compte.

Les dimensions des cellules, l'activité métabolique et la concentration cellulaire sont d'autres facteurs cruciaux qui influencent l'efficacité de la récolte (de Morais *et al.*, 2023).

La récolte de la biomasse microalgale est difficile et coûteuse, ce qui constitue l'un des principaux obstacles à une mise en œuvre à grande échelle (de Morais *et al.*, 2023). Pour cela, la recherche d'une approche intégrée couvrant les concepts de l'ingénierie, de la chimie verte et de l'application de l'anabolisme microbien aux processus de récolte est obligatoire pour la mise

en place à grande échelle d'usines de traitement des eaux usées à base de microalgues (de Morais *et al.*, 2023)

Les techniques existantes sont basées sur des principes chimiques, mécaniques, électriques et biologiques. L'étape de récupération initiale peut varier de manière significative par décantation gravitaire, épaissement, déshydratation et séchage. Les étapes de déshydratation et de séchage sont énergivores et coûteuses, et représentent les plus grands défis technologiques dans la production de biomasse des microalgues pour la récupération de bioproduits (de Morais *et al.*, 2023).

La centrifugation est une autre méthode rapide et efficace de récolte des microalgues, mais son utilisation est limitée en raison des coûts élevés d'investissement et de fonctionnement en termes d'équipement et de consommation d'énergie. De plus, il faut veiller à ne pas endommager mécaniquement les cellules de microalgues au cours du processus. Pour ces raisons, la sédimentation et la flottation sont considérées comme des alternatives plus économiques et plus appropriées pour récolter les microalgues dans les eaux usées, en particulier lorsque le produit final n'a pas une grande valeur marchande (de Morais *et al.*, 2023).

La sédimentation se produit naturellement, mais c'est un processus lent. Pour réduire le volume du décanteur et le temps de rétention hydraulique, elle est généralement précédée d'une coagulation/floculation, ou simplement d'une coagulation. Cependant, l'utilisation de produits chimiques pour la coagulation-floculation peut limiter la réutilisation des eaux usées et de la biomasse récoltée. Si les sels à base de métaux sont rentables, ils peuvent également contaminer les effluents en raison de leur non-biodégradabilité. Les clarificateurs ou les décanteurs sont couramment utilisés pour séparer la biomasse microalgale par sédimentation. La récupération des cellules de microalgues par floculation en augmentant le pH peut réduire les nutriments résiduels, mais elle augmente la salinité et la matière organique résiduelle dans la biomasse (de Morais *et al.*, 2023).

La principale limite de la filtration est l'encrassement et le colmatage, qui augmentent les coûts d'exploitation, d'énergie et de maintenance (de Morais *et al.*, 2023).

L'utilisation de micro ou nanoparticules magnétiques (NMP), telles que celles produites avec de la magnétite (Fe_3O_4), est apparue comme une nouvelle approche dans la récolte des microalgues. Ces particules peuvent adhérer aux cellules, ce qui permet de récupérer les agrégats par l'application d'un champ magnétique externe, comme les aimants. Cela permet une séparation rapide, automatisée, évolutive et efficace. Des efforts sont en cours pour améliorer

la durabilité et la capacité de récolte de ces particules magnétiques en les fonctionnalisant avec des tanins, des quaternaires d'ammonium et d'autres composés hydrophobes (de Morais *et al.*, 2023).

Le coût de la récolte des microalgues peut être influencé par différents facteurs, tels que la technique utilisée, la dilution de la biomasse, le taux d'humidité et la phase de croissance des cellules. Le tableau 2 donne un aperçu sur le coût de quelques méthodes de la récolte des microalgues.

Tableau 2 : Coûts de récoltes des microalgues (de Morais *et al.*, 2023).

Méthode	Coût estimé
Centrifugation	480 €/Ton
Chitosane	7280 \$/Ton
Fe₃O₄ Nanoparticules magnétiques d'arginine	347 \$/Ton
Coagulation-floculation	40 \$/Ton
Floculation-centrifugation	4,52 \$/m ³
Filtration	206 \$/Ton

I.6. Les techniques d'immobilisation des microalgues

Les processus d'immobilisation consistent en l'interaction de molécules avec une matrice polymère ou un support, qui peut se présenter sous différentes formes et matériaux, tels que des billes, des pastilles, des capsules et des granulés (de Souza *et al.*, 2022). Il convient de noter que la comparaison directe des efficacités d'élimination des nutriments de diverses expériences est particulièrement difficile, en raison des variations de la concentration initiale en nutriments, de la durée de l'expérience, du pH de la solution de travail, des espèces d'algues sélectionnées et du type de matrice d'immobilisation (Eroglu *et al.*, 2015).

Les cellules immobilisées emprisonnées dans une matrice polymère ou fixées à la surface d'un support solide présentent des avantages par rapport à leurs homologues à cellules libres : la récolte de la biomasse est plus facile, le traitement des eaux usées est amélioré et la production de bioproduits est enrichie (Eroglu *et al.*, 2015). Les microalgues immobilisées ont été utilisées pour un grand nombre de bioprocédés, notamment pour accéder à des produits de grande valeur (biohydrogène, biodiesel et photopigments), pour éliminer les nutriments (nitrate, phosphate et

ions ammonium), pour éliminer les ions de métaux lourds, et bien d'autres applications (Eroglu *et al.*, 2015).

La plupart des techniques d'immobilisation conçues pour les micro-organismes en général peuvent être appliquées aux microalgues, à l'exception de la transmission de la lumière si l'on souhaite immobiliser des cellules vivantes. D'après Moreno-Garrido (2008), les techniques d'immobilisation peuvent être divisées en deux groupes : l'immobilisation "passive" et l'immobilisation "active" :

I.6.1. Immobilisation passive

Elle consiste à utiliser des matériaux naturels ou synthétiques pour fixer des cellules de microorganismes sur des surfaces. Les matériaux naturels utilisés incluent des éponges en luffa, des fruits secs de la plante Luffa, qui sont non toxiques et stables dans les cultures à long terme. Les cellules de microalgues, de champignons et de bactéries peuvent être immobilisées sur ces éponges pour des applications telles que le traitement des eaux usées, la production de biocarburants et la dégradation de polluants (Moreno-Garrido, 2008).

Les avantages de l'immobilisation passive sont : un faible coût, une facilité d'utilisation et une grande stabilité dans les cultures à long terme. En revanche, cette méthode a des inconvénients, tels que la contamination des effluents par des cellules non collées (Moreno-Garrido, 2008).

I.6.2. Immobilisation active

Il convient de distinguer l'utilisation de piégeage du gel (agars, carraghénane et résine...), d'agents flocculants (le chitosane) de la fixation chimique (Moreno-Garrido, 2008).

I.6.2.1. Le piégeage : est l'une des méthodes d'immobilisation les plus courantes qui consiste à capturer les cellules dans un réseau de gel tridimensionnel, composé de polymères naturels (agar, cellulose, alginate, carraghénane) ou synthétiques (polyacrylamide, polyuréthane, polyvinyle, polypropylène). Les polymères synthétiques seraient plus stables dans les échantillons d'eaux usées que les polymères naturels, tandis que les polymères naturels ont des taux de diffusion des nutriments/produits plus élevés et sont plus respectueux de l'environnement (Eroglu *et al.*, 2015). Le piégeage en gel d'alginate présente un avantage majeur du fait que les cellules immobilisées ne subissent pas de changements extrêmes de conditions physico-chimiques pendant le processus d'immobilisation (Moreno-Garrido, 2008). Selon Eroglu *et al.*, (2015) les billes d'alginate sont l'une des matrices d'encapsulation les plus courantes.

Le piégeage cellulaire présente certains inconvénients dus aux limitations du transfert d'oxygène et/ou de dioxyde de carbone du milieu liquide à travers la matrice d'immobilisation, ce qui poserait des difficultés, en particulier, pour les micro-organismes aérobies. La co-immobilisation du micro-organisme cible avec des cellules de microalgues a été proposée comme une alternative intéressante pour surmonter les limitations du transfert d'oxygène (Eroglu *et al.*, 2015).

I.6.2.2. Agents floculants : les agents floculants ont été principalement utilisés pour éviter une centrifugation fastidieuse et coûteuse lorsqu'il s'agit d'éliminer les algues d'un milieu liquide. Parmi les floculants couramment utilisés, le chitosane : un polysaccharide présente des groupements aminés chargés positivement, ce qui lui confère des propriétés très intéressantes pour l'adsorption de particules chargées négativement. Le chitosane est avéré utile pour le piégeage d'un grand nombre d'espèces de microalgues (Moreno-Garrido, 2008). L'inconvénient du chitosane dans les techniques d'immobilisation est sa faible stabilité. Contrairement, les gels de chitosane à haute viscosité (2% p/v) ont montré une plus grande stabilité chimique dans les expériences précédentes (Moreno-Garrido, 2008).

I.6.2.3. La fixation chimique : elle présente des inconvénients majeurs lorsqu'il s'agit d'immobiliser des cellules vivantes, car l'interaction chimique (principalement due à la liaison covalente, à la réticulation - impliquant le glutaraldéhyde, par exemple - ou aux résines photoréticulables) cause des dommages à la surface cellulaire et réduit considérablement la viabilité des cellules. Bien que, l'attraction ionique n'est pas aussi dangereuse pour les organismes vivants, mais l'efficacité de cette technique dépend du pH et de la force ionique du milieu environnant (Moreno-Garrido, 2008).

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Le travail qui sera présenté ici constitue une continuation des travaux lancés par Meberbeche et Hamadouche (2023) qui ont isolés une vingtaine de souches de microalgues à partir des échantillons d'eaux usées. Certaines souches de la collection ont fait l'objet d'un criblage préliminaire afin de sélectionner les meilleures qui éliminent les nutriments (et éventuellement la pollution carbonée) d'une eau usée d'élevage du Tilapia. Cette année nous allons essayer de confirmer le pouvoir remédiant des souches de microalgues sélectionnées, en étudiant plus en détail la croissance des souches et nous continuons dans la démarche d'amélioration de la capacité épuratoire des souches en explorant la symbiose entre bactéries et microalgues.

II.1. Conservation et repiquage routinier des souches de microalgues

Une sélection de microalgues de cinq souches a été choisie pour le lancement de la suite des expériences de laboratoire. Les souches ont d'abord été repiquées à nouveau dans un milieu solide BG11 selon les étapes décrites par Meberbeche et Hamadouche (2023). Brièvement, un milieu solide BG11 stérile est collé dans les boîtes de Pétri. Les boîtes sont inoculées avec un fragment de colonies des souches anciennes (conservées dans des boîtes de Pétri à 4 °C) qui sont ensuite incubées dans une étuve réfrigérée, à une température de 27 ± 2 °C avec une luminosité continue de 2000 Lux pendant 15 jours (Figure 2). Après développement des cellules, les souches de microalgues sont conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans les différentes expériences. Un control routinier de la pureté des souches est fait par observation microscopique d'un fragment de colonies de chaque souche de microalgue (mise en suspension dans une goutte d'eau physiologique à 0,85% NaCl entre lame et lamelle) à un grossissement de 400× et 1000×.

Le repiquage des souches en boîtes se fait chaque mois pendant la période du stage. Les souches bien purifiées ont été conservées à long terme, en faisant un repiquage en tubes inclinés. La méthode consiste à préparer un milieu BG11 gélosé dans des tubes à essai (un volume d'environ 7 à 10 ml est versé dans chaque tube), les tubes sont stérilisés à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min puis inclinés légèrement sur un support (une baguette, burette ou autre) avec un angle d'inclinaison qui ne dépasse pas 30° afin d'obtenir une surface solide, la plus large que possible à l'intérieur des tubes. Après solidification (de l'agar), chaque souche estensemencée par stries dans la surface inclinée à l'intérieur des tubes. Les tubes sont incubés dans les mêmes conditions que les boîtes.

II.2. Croissance des souches de microalgues sur milieu de référence

En premier temps, nous avons suivi la cinétique de croissance des souches de microalgues sélection, à savoir la souche 2 ST, 4 CNR, 5 CNR, 10 ST et D ST sur milieu de culture favorable à la culture des microalgues qui est le milieu BG11 (sa composition est en annexe n°1). Les étapes de suivi consistent en :

- Préculture des souches : la préculture est une étape importante qui permet de fournir un inoculum en pleine croissance (à partir de la phase exponentielle). Pour cela, 100 ml de milieu BG11 stérile est préparé dans des erlenmeyers de 250 ml de capacité que l'on ajout un fragment de colonies de la microalgue dans les conditions d'asepsie (devant un bec bunsen). Les erlenmeyers contenant les microalgues sont par la suite incubées à une température de 27 °C, une luminosité continue et un flux d'air stérile (fourni à l'aide des aérateurs et passe sur des filtres seringues de porosité de 0,45 µm) pendant d'environ une semaine (Figure 2).
- Inoculation du milieu BG11 par les suspensions des microalgues : un inoculum de chaque suspension des microalgues en phase exponentielle de croissance est ajouté à 300 ml de BG11 stérile (préparé dans des erlenmeyers de 500 ml) de telle sorte à obtenir une densité microalgale des milieux BG11 neufs, exprimée en densité optique à 680 nm (DO à 680 nm), entre 0,15 à 0,35. Les cultures des microalgues sont incubées dans les même conditions précédente pendant 14 jours.

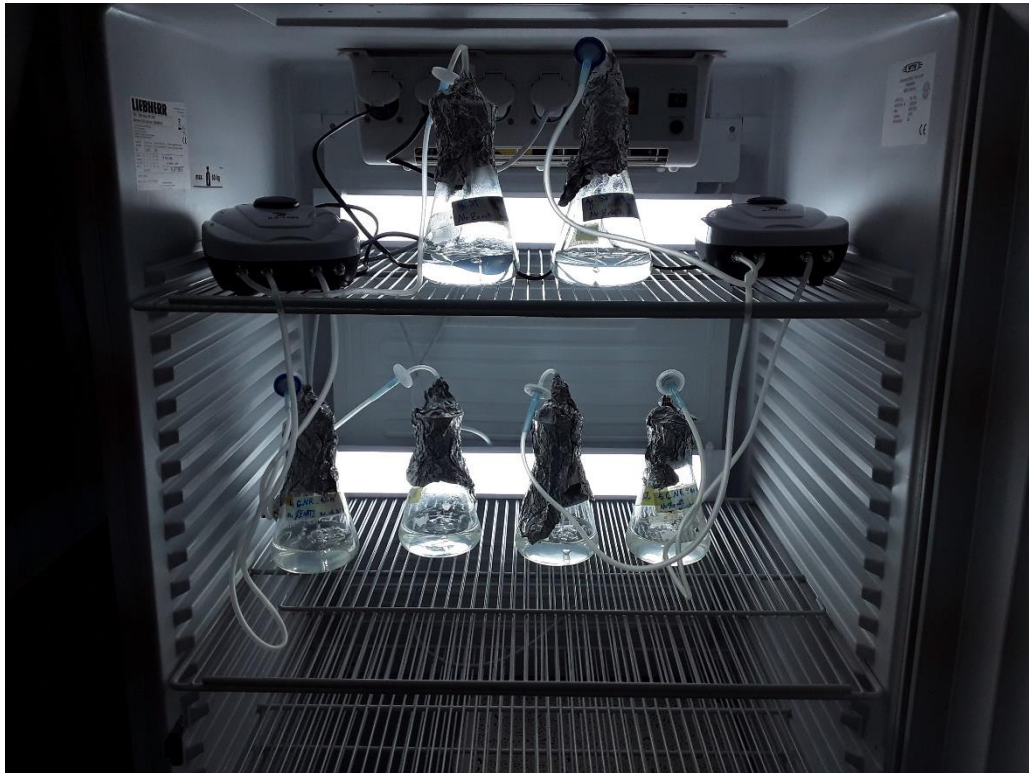


Figure 2 : Incubation de la préculture des cinq souches étudiées à une température de 27 °C, une luminosité continue et un flux d'air stérile.

- Paramètres de suivi : un prélèvement quotidien (y compris au jour 0) de 2 ml de chaque suspension (en conditions d'asepsie) est effectué pour la détermination de la croissance des microalgues, en utilisant deux méthodes d'évaluation. La première méthode consiste à mesurer la densité optique (à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible) à la longueur d'onde maximale de la souche, déterminée après balayage dans le domaine spectral du visible (entre 500 et 800 nm). Les valeurs mesurées à la longueur d'onde maximale sont comparées par rapport à celles mesurées à une longueur d'onde de 680 nm largement reportée dans la littérature (Mahmoud *et al.*, 2024 ; Abou-Shanab *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2022 ; Izadpanah *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Dans la deuxième méthode, nous faisons le comptage des cellules de microalgues sous microscope optique à un grossissement de 400× à l'aide d'un hémacytomètre (lame Malassez) (Gonzalez and Bashan, 2000). Le détail de la technique est porté en annexe n°1 et la figure 3 montre un exemple d'un cadran des cellules de microalgues à un grossissement de 400×.

- Grandeurs de la croissance : le suivi des cinétiques de croissance des souches de microalgues permet de déterminer les grandeurs suivantes :
 - Nombre de cellules (N_{max}) et densité optique maximums (DO_{max}) : déduits à partir des courbes de croissance des microalgues.
 - Taux de croissance spécifique (μ_{max}) : calculé à partir de la courbe de croissance $N_{max} = f(\text{temps})$ selon la formule suivante (Reda et al. 2014 ; Huang et al. 2024)

$$\mu_{max}(j^{-1}) = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

N_2 et N_1 sont respectivement le nombre de cellules/ml aux temps t_2 et t_1

- Le temps de dédoublement des cellules ou temps de génération : calculé selon l'équation suivante (Huang *et al.* 2024)

$$dt(j) = \ln 2 / \mu_{max}$$

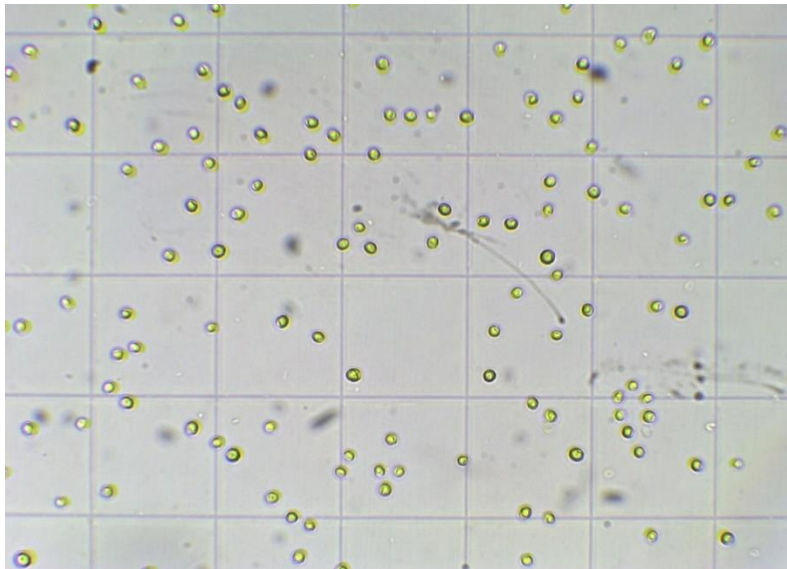


Figure 3 : Un cadrant des cellules de microalgues de la souche 2 ST à un grossissement de 400×.

II.3. Criblage des souches de microalgues sur un effluent d'aquaculture réel

Afin de sélectionner la meilleure souche de microalgue qui peut croître et assimiler les effluents d'aquaculture, nous avons cultivé les cinq souches sur un effluent réel issu de l'élevage du Tilapia. L'effluent a été fourni par la Pépinière Garden (Cheraga) comme le montre la figure 4.

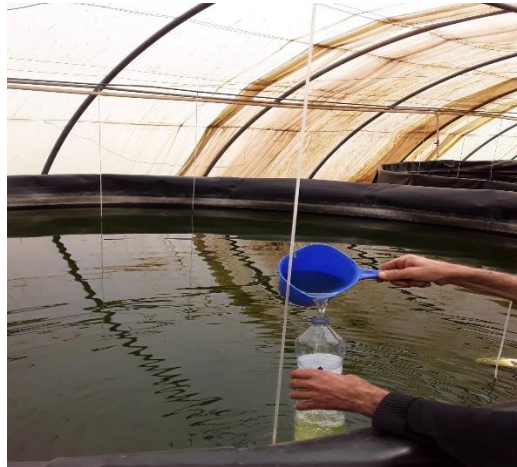


Figure 4 : Prélèvement de l'effluent de Tilapia rouge à la Pépinière Garden (Cheraga, Alger)

A l'arrivée au laboratoire, l'effluent a été décanté puis filtré sur un papier filtre de fibres en verre GF/F d'une porosité de $0,7 \mu\text{m}$ afin d'éliminer les matières particulaires. L'effluent est ensuite stérilisé à l'autoclave et caractérisé (pH, salinité, oxygène dissous et nutriments). Les paramètres pH, salinité et oxygène dissous ont été mesurés à l'aide d'un multiparamètre de terrain Hanna.

Les sels nutritifs (nitrites, nitrates, ammonium et phosphates) sont analysés à l'aide d'un autoanalyseur de marque QuAatro. QuAatro utilise le principe de l'analyse en flux continu par segmentation d'air (SFA) où les échantillons sont mélangés aux réactifs dans un flux continu. Les segments d'échantillons individuels sont séparés par des bulles d'air.

Les principaux composants du système sont l'échantillonneur (module séparé), la pompe, le collecteur et le module de détection. Le contrôle du système est assuré par le logiciel AACE (figure 5).



Figure 5 : Autoanalyseur d'analyse des sels nutritifs.

Une préculture de chaque souche de microalgue est préparée dans le milieu BG11 de la même manière que celle décrite dans la section II.2. Après cinq à sept jours de croissance dans ce milieu, un inoculum des souches de microalgues est ajouté à 300 ml de l'effluent de Tilapia stérile (dans les conditions d'asepsie) pour obtenir une densité optique initiale à 680 nm d'environ 0,2. Les erlenmeyers contenant les cultures de microalgues ont été incubé à une température de 27 °C sous une luminosité et aération continue pendant 13 jours.

Un prélèvement journalier de 2 ml est effectué pour la détermination de la densité optique et le nombre de cellules. A la fin de l'expérience, un volume de 15 ml de culture des microalgues est filtré sur un filtre GF/F et congelé jusqu'à analyse des sels nutritifs.

Les résultats générés par le suivi de la croissance des microalgues permettent de déterminer et comparer les grandeurs de croissance des souches les unes aux autres (section II.2), tandis que

l'analyse des sels nutritifs permet de calculer et comparer les rendements d'élimination de chaque élément nutritif. Le calcul du rendement d'élimination des sels nutritifs est donné selon la formule suivante :

$$R_{SN}(\%) = \frac{SN_0 - SN_f}{SN_0}$$

Où : SN_0 et SN_f sont respectivement la concentration de l'élément nutritif (NO_2 , NO_3 , NH_4 et PO_4) de l'effluent du Tilapia avant et après traitement.

II.4. Effet du consortium microalgues-bactéries sur l'efficacité de traitement de l'effluent d'aquaculture

Deux modes de cultures ont été testés pour étudier l'efficacité des consortia de microalgues – bactéries : le mode de culture en suspension et le mode de culture immobilisé.

Dans les deux méthodes nous avons choisi d'utiliser un effluent d'aquaculture synthétique (SAWW) avec la souche de microalgue sélectionnée. Plusieurs effluents synthétiques sont proposés dans la littérature ; celui proposé par Zhang *et al.*, (2023), qui est basé sur un échantillon d'eau usée concentré prélevé au fond d'un bassin d'élevage commercial de Tilapia, convient mieux pour le suivi de la pollution organique (exprimée par la demande chimique d'oxygène DCO), les nitrites, les nitrates, l'ammonium et les phosphates. Sa composition et préparation (légèrement modifiée) est donnée comme suite :

Dans 1 l d'eau distillée, on fait dissoudre 540 mg de CH_3COONa (compté pour 1/3) et $C_6H_{12}O_6$ (compté pour 2/3), 25 mg NH_4Cl , 10 mg KH_2PO_4 , 20 mg $NaNO_3$, 10 mg $NaNO_2$, 20 mg $CaCl_2$, 10 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 1 ml de solution trace métallique (la même que celle de la composition du BG11). Le pH du milieu est ajusté à l'aide d'une solution concentrée de $NaHCO_3$ de 2 g/l. Le milieu étant stérilisé à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 15 min.

Le consortium de microalgues-bactéries employé dans nos expériences est représenté par la souche performante 5 CNR pour les microalgues et les boues activées pour les bactéries. Les boues activées (B) ont été fournies gracieusement par la station d'épuration de Koléa. Cette boue est provenue de l'aérateur biologique (Figure 6), elle est transportée dans une enceinte thermostatée à 4 °C jusqu'au laboratoire.



Figure 6 : Prélèvement de la boue de l'aérateur biologique à la station d'épuration de Koléa.

L'étude de la symbiose entre les deux microorganismes est réalisée selon les recommandations de Mujtaba et Lee, (2017). Les auteurs ont trouvé une concentration optimale de boues de 0,4 g/l (exprimée en matière sèche) pour le traitement d'une eau usée. Nous avons pris cette concentration de boue comme la concentration optimale à opérer dans les deux expériences (cultures en suspension et immobilisée). Afin de se rapprocher de cette concentration (0,4 g/l matière sèche), nous avons séché six répliquas de masses différentes afin d'en déduire leur humidité moyenne. Le détail de cette expérience est donné en annexe n°1.

II.4.1. Mode de culture en suspension

Les traitements appliqués pour étudier la symbiose microalgues-bactéries en suspension sont les suivantes :

- Traitement N°1 : Microalgues seules en suspension
- Traitement N°2 : Microalgues en suspension + boues en suspension
- Traitement N°3 : Boues seules en suspension
- Témoin abiotique : SAWW stérile seul.

Chaque traitement est effectué en duplicatas (02). Les systèmes de traitement consistent à inoculer 200 ml de SAWW stérile (contenu dans des erlenmeyers de 500 ml) avec les microorganismes. En ce qui concerne les microalgues, une préculture de la souche 5 CNR en phase exponentielle a été ajoutée aux traitements 1 et 2 de telle sorte d'avoir une concentration cellulaire initiale d'environ 6×10^6 cellules/ml. Pour la boue, une concentration 0,83 g/l (exprimée en biomasse fraîche) a été inoculée dans les traitements 2 et 3. Les erlenmeyers sont

incubés à 27 °C dans l'étuve réfrigérée sous une luminosité continue et une agitation de 150 tr/min (Figure 7) pendant six jours.



Figure 7 : Culture en suspension de la souche de microalgue 5 CNR.

II.4.2. Mode de culture immobilisé

Dans cette expérience nous avons respecté les mêmes traitements, à l'exception que les microalgues sont immobilisés dans un support (l'alginate) au lieu d'être mises en suspensions. Nous avons donc appliqué trois traitements en duplicatas à savoir :

- Traitement N°1 : Microalgues seules immobilisées
- Traitement N°2 : Microalgues immobilisées + Boues en suspension
- Traitement N°3 : Boue en suspension

Les étapes d'immobilisation des microalgues ont été réalisées selon le protocole décrit par de-Bashan *et al.*, (2004) avec une légère modification :

- 1- 100 ml de BG11 inoculé par la souche 5 CNR est cultivé à 27 °C sous une lumière et aération continue pendant 5 à 6 jours jusqu'à arriver à une concentration cellulaire d'environ 6×10^6 /ml.
- 2- La culture est centrifugée à une vitesse de 3500 tr/min pendant 10 min (Hu *et al.*, 2021). On récupère le culot algal et on le rince deux fois avec une solution saline stérile (8,5 g/l de NaCl). Le culot est ensuite remis en suspension dans 20 ml dans la même solution saline stérile.
- 3- 20 ml de cette solution est mélangé avec 80 ml d'alginate de sodium stérile (stérilisée à l'autoclave 121 °C pendant 20 min) à une concentration de 50 g/l (Javed *et al.*, 2024). Les deux solutions sont bien mélangées à l'agitateur magnétique pendant 15 min à une

vitesse lente (en conditions d'asepsie). Le gel des microalgues est versé goutte à goutte à l'aide d'une seringue (stérile) dans une solution de CaCl_2 stérile à 20 g/l avec une agitation périodique. Les billes d'alginate formées sont laissées 1 h à température ambiante dans la solution de chlorure de calcium pour puisse permettre le durcissement des billes, puis rincés par la solution saline.

- 4- On peut conserver les billes d'alginate jusqu'à une semaine dans la solution saline à 4 °C. l'inoculum est ajouté à raison de 40 g/l d'eau usée.
- 5- Pour le comptage des cellules des microalgues, 05 billes sont solubilisées dans 5 ml de NaHCO_3 de 40 g/l pendant une période minimum de 45 min.

Les différentes étapes d'immobilisation sont présentées dans la figure 8 :

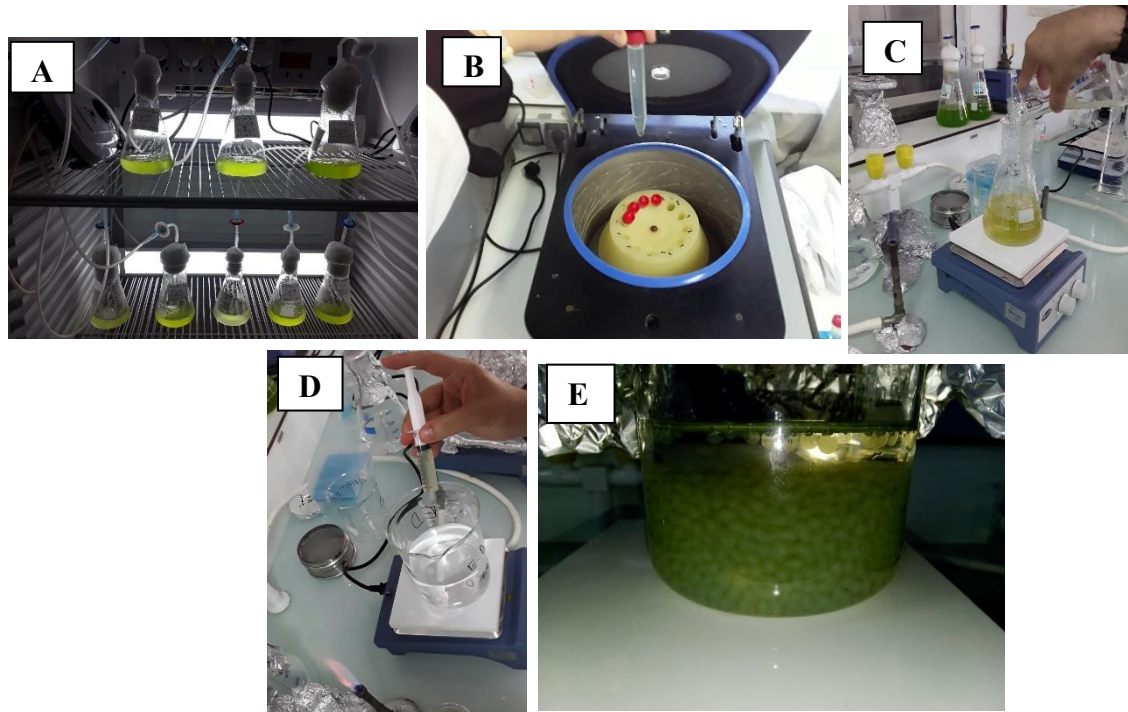


Figure 8 : Les différentes étapes d'immobilisation de la souche de microalgue 5 CNR. **A** Préculture **B**. Centrifugation de la culture **C**. Mélange de la suspension des microalgues avec de l'alginate de sodium **D**. Plongée des billes d'alginate dans le bain de CaCl_2 **E**. Conservation des billes d'alginate.

Dans chaque traitement, on met 200 ml de SAWW stérile (inoculé par la boue à 0,83 g/l ou par les billes d'alginate). Les erlenmeyers sont incubés dans les mêmes conditions que celles décrites dans la section II.4.1 (Figure 9)

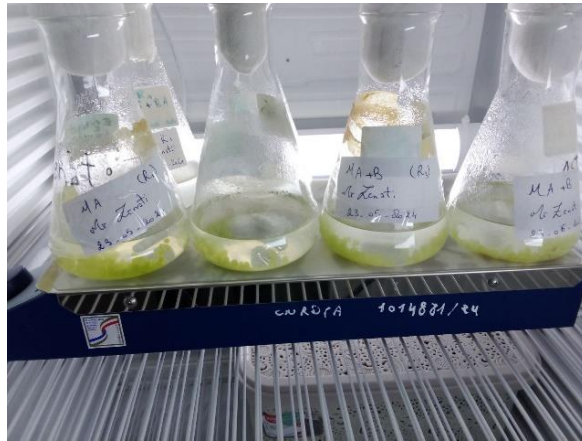


Figure 9 : Culture immobilisée de la souche 5 CNR.

II.4.3. Paramètres de suivi dans les traitements de l'effluent d'aquaculture

Pour les deux modes de traitement, un prélèvement chaque deux jours est effectué pour les paramètres suivants :

- Le dénombrement des cellules de microalgues à l'aide d'un hémacytomètre,
- Le dénombrement de la flore totale de la boue,
- L'évolution de diamètre des billes à l'aide d'un pied à coulisse,
- La détermination de la concentration des nutriments
- L'analyse de la DCO.

Le dénombrement de la flore totale consiste à préparer une série de dilution avec la solution saline stérile dans des tubes à essais contenant 9 ml. La première dilution 10^{-1} est obtenue par inoculation de 1 ml de la solution mère (traitement 2 et 3) dans 9 ml de la solution saline, la deuxième dilution 10^{-2} consiste à inoculer 1 ml de la dilution 10^{-1} dans 9 ml d'eau physiologique. Les dilutions se succèdent de la même façon jusqu'à 10^{-10} . Ensuite, un ensemencement en profondeur (par incorporation) de 1 ml de chaque dilution et de la solution mère est réalisé dans les boîtes de Pétri (deux boîtes par dilution) et on fait couler le gélose PCA (après qu'il soit fondu et refroidi à une température de 45 ± 1 °C) en deux couches (on verse la première couche et on attend qu'il se solidifie bien puis on verse la deuxième couche). Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 3 jours.

Le résultat de dénombrement est exprimé en nombre d'unités formant colonies (UFC/ml), calculé selon la formule suivante (ISO 8199 :2005):

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}}$$

C_s est l'estimation du nombre d'ufc/ml.

Z est la somme de toutes les colonies dénombrées dans les boites (entre 10 et 300 colonies) des dilutions d_1, d_2, \dots, d_i .

V_{tot} est le volume total calculé d'échantillon d'origine inoculé dans les boites dénombrées.

$$V_{tot} = (n_1V_1d_1) + (n_2V_2d_2) + \dots + (n_iV_id_i)$$

n_1, n_2, \dots, n_i est le nombre de boites dénombrées des dilutions d_1, d_2, \dots, d_i

V_1, V_2, \dots, V_i est le volume de la prise d'essai pour les dilutions d_1, d_2, \dots, d_i .

Analyse de la DCO

La DCO est analysée selon la méthode 1.14541 « Chemical Oxygen Demand (COD) by Dichromate Oxidation and Photometry »

- Une aliquote d'échantillons conservés à l'acide sulfurique d'échantillons conservés à l'acide sulfurique (jusqu'à un pH <2), filtré sur un filtre seringue de 0,45 μm , est mesurée dans les tests en cellule DCO Spectroquant® et bien mélangés. Les réactifs prémesurés dans les tests en cellule DCO Spectroquant contiennent un excès connu de bichromate de potassium et d'acide sulfurique. Le sulfate d'argent et le sulfate mercurique sont inclus en tant que catalyseur et agent complexant du chlorure, respectivement.
- Les tests en cellule DCO Spectroquant® sont scellés et chauffés à 148 - 150 °C pendant deux heures. L'oxydation des matières inorganiques et organiques entraîne la production de l'ion chrome trivalent vert (Cr^{3+}) et du chromate restant.
- La détermination de la DCO se fait par lecture directe dans le Spectroquant® Prove 300 en choisissant la gamme de mesure 25 – 1500 mg/l DCO (Figure 10).

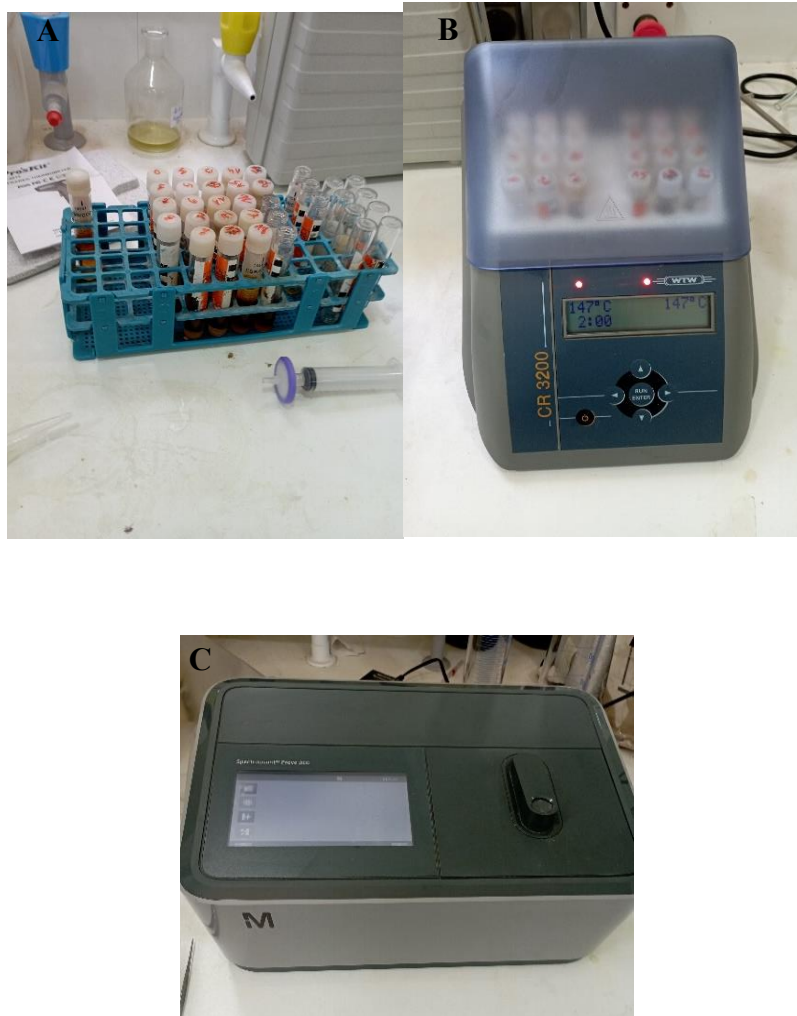


Figure 10 : Etapes d'analyse de la DCO par la méthode des kits. **A** Préparation de l'échantillon, **B.** Digestion, **C.** Lecture de la DCO

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Visualisation microscopique des souches de microalgues sélectionnées

L'examen microscopique des souches de microalgues et l'aide des clés d'identification présentées dans Bourrely (1990) ainsi que dans Hindák et Hindáková (2008) et Ferro *et al.*, (2018) a permis une identification préliminaire probablement appartenant au genre *Scenedesmus* sp. pour la souche 10 ST et *Chlorella* sp. pour les autres souches D ST, 4 CNR, 5 CNR et 2 ST (Figure 12).

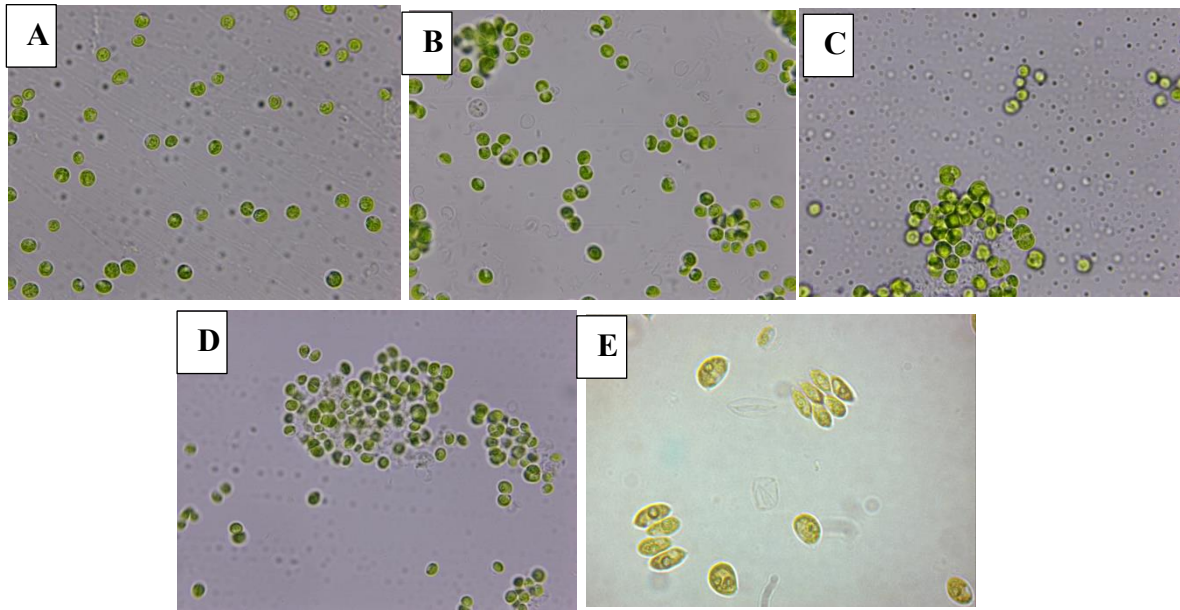


Figure 11 : Visualisation par microscope optique des cinq souches de microalgues étudiées.

A) 2 ST. B) 4 CNR. C) 5 CNR. D) D ST. E) 10 ST. Grossissement 1000 ×.

Dans la phycoremédiation, les souches de microalgues les plus utilisées appartiennent au phylum Chlorophyta, plus particulièrement aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus* (Sarma *et al.*, 2024).

Dans l'étude qui a été faite par Minhas *et al.* (2023), trente espèces différentes d'algues vertes appartenant à 4 ordres, 11 familles et 14 genres ont été identifiées dans différents habitats des du Tehsil Gujar Khan, district de Rawalpindi (Pakistan). En outre, les échantillons ont été prélevés à partir des sites pollués (fossés, eaux stagnantes et barrages) et non pollués (ruisseaux, eaux courantes, étangs et puits tubulaires). Les genres les plus courants étaient *Scenedesmus* (26,6 %), *Cosmarium* (20 %), *Chlorococcum*, *Ankistrodesmus*, *Coelastrum* et *Closterium* (6,6 %). Les autres genres qui ne représentaient qu'une seule espèce (3,3 %) étaient *Chlamydomonas*, *Eudorina*, *Tetraspora*, *Chlorella*, *Westella*, *Pediastrum*, *Acutodesmus* et *Stigeoclonium* (Minhas *et al.*, 2023).

Parmi les différentes espèces de microalgues, les espèces de *Chlorella* sont largement explorées pour l'élimination des contaminants émergents de diverses eaux usées. *Chlorella* est une microalgue verte avec de nombreuses sous-espèces unicellulaires qui sont observées dans les eaux douces et marines (Mehariya *et al.*, 2024).

L'identification moléculaire par séquençage du gène complet de l'ARNr 18S et de la région ITS (Internal Transcript Spaces) a confirmé l'identification morphologique des nouveaux isolats d'eaux usées provient des stations de traitement des eaux usées, ce qui a permis de confirmer l'isolement de deux espèces de genre *Chlorella* : *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris* (Izadpanah *et al.*, 2018).

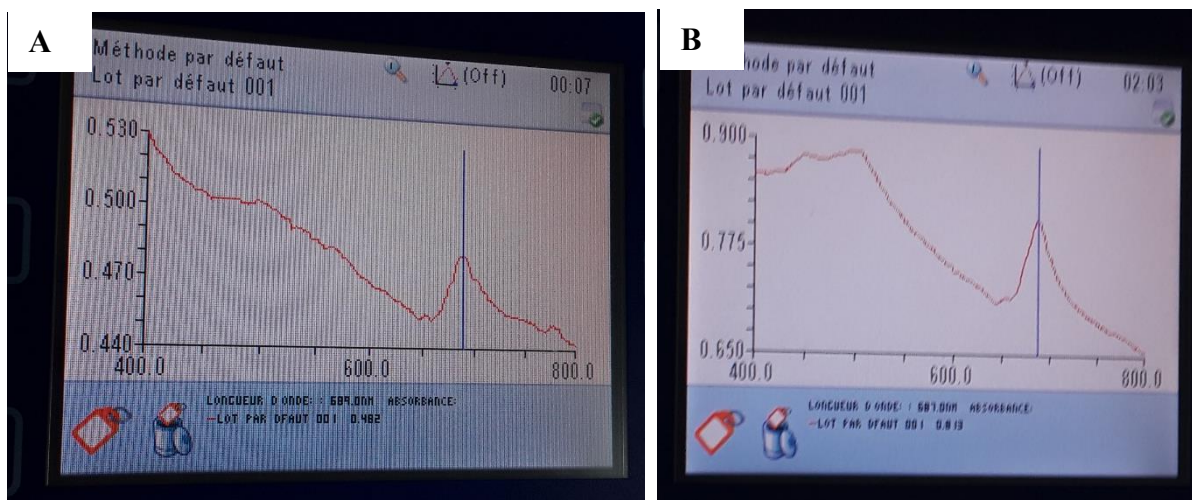
III.2. Croissances des souches de microalgues sur milieu BG11

III.2.1. Cinétique et paramètres de croissance des souches par méthode spectrophotométrie

III.2.1.1. Détermination de la longueur d'onde maximale.

Afin de poursuivre la cinétique de la croissance des cultures, la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) a été déterminée par balayage dans le domaine du visible (550 – 800 nm) (Santos-Ballardo *et al.*, 2015) pour chaque souche 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST (Figure 13).

La figure 12 présente les longueurs d'ondes maximales (λ_{\max}) de chaque souche de microalgues 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST.



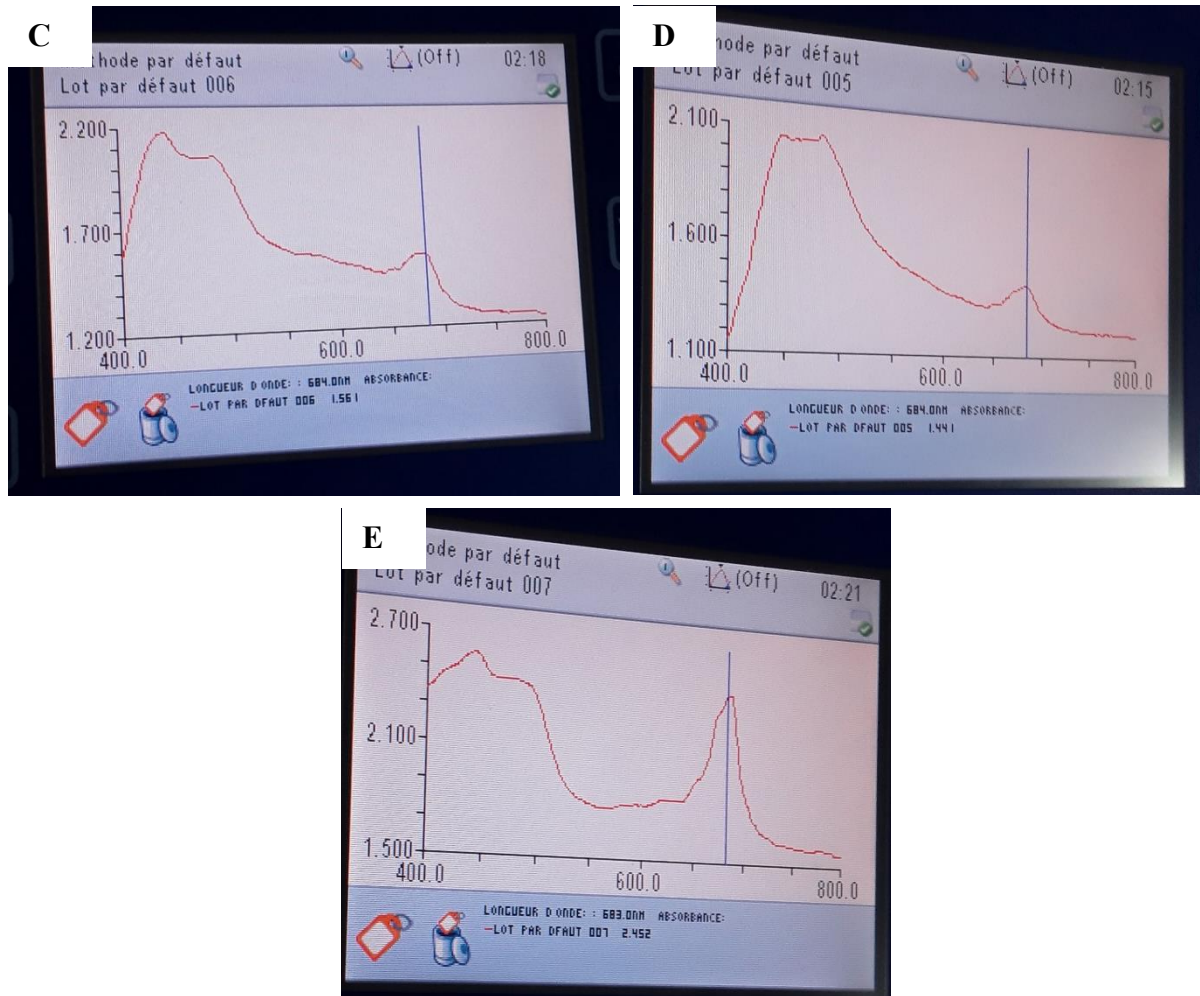


Figure 12 : Longueurs d’ondes maximales (λ_{\max}) des souches de microalgues étudiées, déterminées au spectrophotomètre. **A)** 4 CNR (689 nm), **B)** D ST (687nm), **C)** 5 CNR (684nm), **D)** 10 ST (684 nm), **E)** 2 ST (683 nm).

Les résultats des absorbances que nous avons noté à la longueur d’onde 680 nm et à λ_{\max} de chaque souche pour les jours (J0, J3, J6, J9), ont montré une différence non significative entre $\lambda = 680$ nm et λ_{\max} avec un coefficient de variation très faible, inférieur à 5 % (Tableau 3). Pour cela, nous avons choisi la $DO_{680\text{ nm}}$ pour suivre la croissance de la biomasse des toutes les souches.

Cette valeur de densité optique (680 nm) a été recommandé par plusieurs auteurs pour suivre la croissance de différentes espèces de microalgues (Mahmoud *et al.*, 2024 ; Abou-Shanab *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2019 ; Izadpanah *et al.*, 2018).

Tableau 3 : Ecart de valeurs entre la longueur d’onde $\lambda_{680\text{ nm}}$ et λ_{\max} des cinq souches de microalgues étudiées.

Souche	Temps (jours)	DO _{680 nm}	DO _{max}	Moyenne	Ecartype	Coefficient de variation (%)
4 CNR	0	0,575	0,534	0,555	0,029	5,23
	3	1,553	1,571	1,562	0,013	0,81
	6	2,01	2,046	2,028	0,025	1,25
	9	2,251	2,31	2,281	0,042	1,83
D ST	0	0,275	0,284	0,2795	0,00636396	2,28
	3	0,951	0,967	0,959	0,01131371	1,18
	6	1,125	1,143	1,134	0,01272792	1,12
	9	1,518	1,541	1,5295	0,01626346	1,06
5 CNR	0	0,414	0,427	0,4205	0,00919239	2,18
	3	1,319	1,335	1,327	0,01131371	0,85
	6	1,047	1,059	1,053	0,00848528	0,80
	9	1,421	1,441	1,431	0,01414214	0,98
10 ST	0	0,384	0,393	0,3885	0,00636396	1,64
	3	2,165	2,165	2,165	0	0
	6	2,443	2,451	2,447	0,00565685	0,23
	9	2,151	2,17	2,1605	0,01343503	0,62
2 ST	0	0,375	0,384	0,3795	0,00636396	1,67
	3	2,366	2,399	2,3825	0,02333452	0,98
	6	2,038	2,066	2,052	0,01979899	0,96
	9	2,356	2,386	2,371	0,0212132	0,89

III.2.1.2. Cinétique de croissance des souches de microalgues par mesure de la DO à 680 nm

Une évaluation de la cinétique de croissance des souches de microalgues 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST a été faite à la longueur d'onde 680 nm, cela a permis d'obtenir les résultats présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Cinétique de croissance des cinq souches de microalgues (4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST et 2 ST) par mesure de la DO à 680 nm.

Souches	4 CNR		D ST		5 CNR		10 ST		2 ST	
	DO ₆₈₀	Fd*	DO ₆₈₀	Fd	DO ₆₈₀	Fd	DO ₆₈₀	Fd	DO ₆₈₀	Fd
0	0,575	1	0,275	1	0,414	1	0,384	1	0,375	1
1	1,194	1	0,508	1	0,836	1	0,604	1	0,903	1
2	1,016	2	0,678	1	1,057	1	1,505	1	1,593	1
3	1,553	2	0,951	1	1,319	1	2,165	1	2,366	1
4	1,583	3	1,496	1	1,528	1	1,657	2	1,539	2
5	1,976	3	1,979	2	1,073	2	1,699	3	1,402	3

6	2,01	3	1,125	2	1,047	3	2,443	3	2,038	3
7	2,338	3	1,373	2	1,1	3	2,396	3	2,081	3
8	2,529	4	1,33	3	1,338	3	2,123	4	1,888	4
9	2,251	4	1,518	3	1,421	3	2,151	4	2,356	4
10	2,642	5	1,522	3	1,574	3	2,233	4	2,559	4
11	2,525	6	1,564	3	1,5	3	2,212	5	2,931	4
12	-	-	1,66	4	1,645	4	2,25	5	2,8	5
13	-	-	1,548	5	1,554	5	2,24	6	2,407	6
14	-	-	1,652	5	1,562	5	2,321	6	2,201	6

*Fd : facteurs de dilution

Comme on pouvait s’y attendre, la croissance sur milieu BG11 a donné la concentration cellulaire la plus élevée pour toutes les souches. De ce fait, nous avons procédé à diluer les suspensions de microalgues très tôt (à partir du jour 2 pour la souche 4 CNR, du jour 4 pour les souches 2 ST et 10 ST et à partir du jour 5 pour les souches 5 CNR et D ST). La souche 4 CNR marque une phase de latence la plus courte, suivie par les souches 10 ST et 2 ST, tandis que les souches 5 CNR et D ST montrent relativement, des vitesses de croissance les faibles (par rapport aux autres souches). Ces résultats mettent en évidence une croissance remarquable des souches étudiées. En effet, la croissance des souches de microalgues dans le milieu BG11 dépasse largement celle rapportée par Abdelaziz *et al.* (2014) qui ont rapporté une concentration cellulaire maximale d'environ 1,5 à 22°C pour la plupart des 50 isolats testés sur milieu synthétique (sans être obligé de diluer les cultures), à l'exception de deux isolats PCH22 et MA1B1 qui atteignaient la phase stationnaire plus rapidement en seulement 7 jours avec une DO de 1,0.

En outre, Santos-Ballardo *et al.*, (2015), ont rapporté une DO maximale de $(1,9481 \pm 0,0019)$ pour une souche de microalgues *Nannochloropsis gaditana* cultivée dans un milieu synthétique de Guillard et Ryther (1962) ; un milieu favorable similaire au milieu BG11. D’autre part, une densité optique maximale de *C. vulgaris* obtenue de $1,56 \pm 0,15$ dans le milieu BG11 a été rapportée par Fazal *et al.* (2021), très faible à la nôtre (DO_{max} de 2,407 à un facteur de dilution de 6 fois dans le 13^{ème} jour pour la souche 2 ST).

Dans les tests standards de croissance des microalgues par spectrophotométrie, la plage 664-690 nm est généralement recommandée, car ces valeurs sont en corrélation avec l’absorbance de la chlorophylle (Santos-Ballardo *et al.*, 2015). Toutefois, il est recommandé de diluer des suspensions de microalgues très denses (DO > 1,00) pour éviter les erreurs d’absorption de la lumière (Daneshvar *et al.*, 2021).

Le suivi de la cinétique de croissance des souches de microalgues par mesure de la densité optique uniquement, a été jugée insuffisante. D'après Anderson (2020), certaines espèces d'algues se développent en augmentant le nombre de leurs cellules (division cellulaire), plutôt que leur taille.

III.2.2. Cinétique et paramètres de croissance souches de microalgues par dénombrement cellulaire

III.2.2.1. Cinétique de croissance des souches par détermination du nombre de cellules

La figure 13 présente la cinétique de croissance de la culture des cinq souches de microalgues 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST dans un milieu BG11.

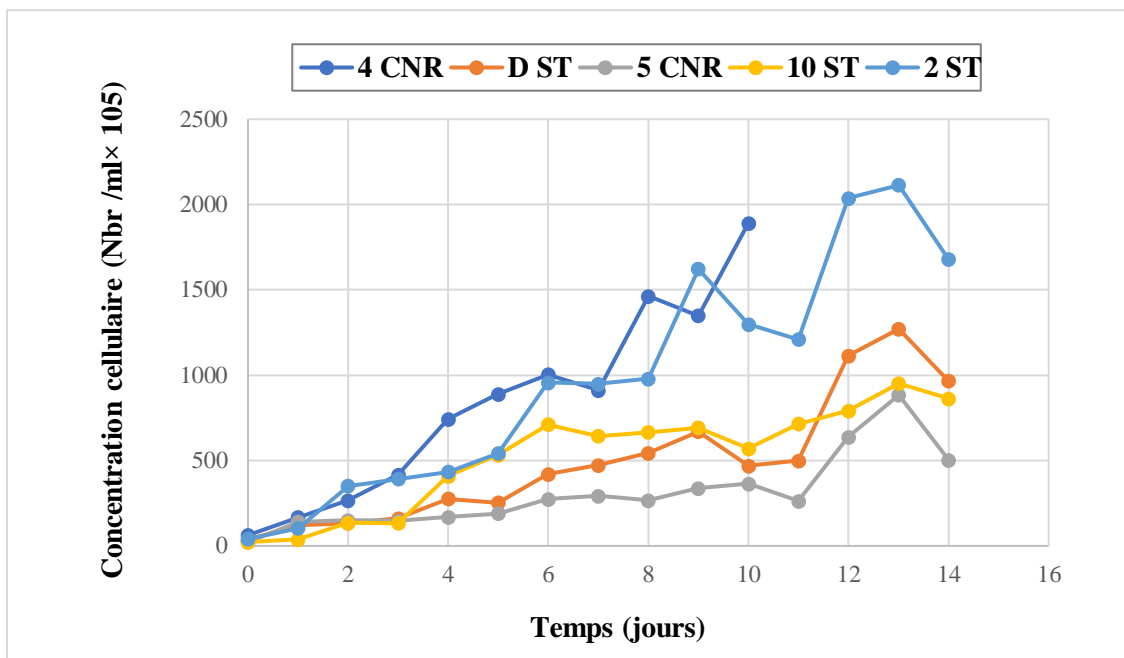


Figure 13 : Cinétiques de croissance des souches de microalgues étudiées (4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST) dans le milieu BG11.

Les courbes de croissance des cinq souches de microalgues dans le milieu BG11, révèlent un développement favorable de toutes les souches dans ce milieu. Une phase de latence très courte a été constatée pour la souche 2 ST (1 jour) suivi par la souche 4 CNR (2 jours). Les autres souches ont affiché une durée de latence de 3 jours. Après cette phase, une croissance exponentielle a été enclenchée pour toutes les souches, continuant jusqu'au sixième jour pour les souches 4 CNR, 2 ST et 10 ST, au neuvième jour pour la souche D ST et jusqu'au dixième jour pour la souche 5 CNR. Au-delà, on assiste à une phase stationnaire de croissance avec diminution compensée par une augmentation de la concentration cellulaire jusqu'à la fin de l'expérience.

Une évolution similaire de la croissance de deux souches de microalgues *Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp, isolées à partir des eaux d'un lac (El Goléa, W. Chardaïa) a été obtenue par Kherarba (2013) en cultivant les souches sur milieux TAP et 6N BBM+G, respectivement (phase de latence de 2 jours, phase exponentielle qui s'est étendue jusqu'au 5^{ème} et 7^{ème} jours).

III.2.2.2. Paramètres de croissance des souches par détermination du nombre de cellules

Les cinétiques de croissance des souches de microalgues 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST et 2 ST ont permis de déduire certains paramètres concernant les performances de croissance. Les résultats de ces paramètres sont portés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Performances de croissance des cinq souches de microalgues développés sur le milieu BG11.

Souches	N_{max} (Nbr /ml× 10 ⁵)	μ (j ⁻¹)	dt (j)	dt (h)
4 CNR	1891,6	0,58	1,195	28,67
D ST	1271	1,19	0,58	13,98
5 CNR	884	1,87	0,37	8,87
10 ST	951,6	1,26	0,547	13,14
2 ST	2113,2	1,23	0,56	13,55

Les résultats du tableau 5 montrent que la souche 5 CNR a un taux de croissance spécifique le plus élevée (1,87 j⁻¹) avec un temps de doublement rapide (d'environ 0,37 jours, soit 8,87 heures). Cela indique une croissance relativement rapide par rapport aux autres souches. Tandis que, la souche 2 ST est démarquée des autres souches étudiées, par une concentration microalgale maximale de 2113,2×10⁵ cellules/ml indiquant une bonne croissance, avec un taux de croissance d'environ 1,23 j⁻¹, Suivi par la souche 4 CNR (une concentration cellulaire de 1891,6×10⁶ cellules/ml).

La souche 10 ST, appartenant au genre *Scenedesmus*, présente un taux de croissance de 1,26 j⁻¹, avec un temps de dédoublement cellulaire de 0,547 jour. Ce taux est supérieur à 0,31 j⁻¹ celui obtenues par Kherarba (2013).

D'autre part, le temps de doublement (*dt*) déterminé, suggère respectivement, que les souches 5 CNR, 10 ST et 2 ST se reproduisent plus rapidement que les autres souches. Les performances de croissance de nos souches de microalgues sont meilleures par rapport à celles déterminée

par (Santos-Ballardo *et al.*, 2015). Dans cette dernière, le N_{max} , μ et dt de quatre espèces de microalgues (*Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis affinis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, et *Phaeodactylum tricornutum*), cultivées dans le milieu de Guillard et Ryther (1962), sont comprises respectivement entre $9,72 \times 10^6$ à $8,83 \times 10^7$ cellules/ml, 0,1464 à 0,3275 j^{-1} et 2,1186 à 4,7690 jours.

III.3. Criblage des souches de microalgues pour le traitement des effluents aquacoles

III.3.1. Caractérisation de l'effluent

Dans le but de sélectionner les meilleures souches possédant une efficacité épuratoire vis-à-vis des effluents réels, nous avons choisi une eau issue de l'élevage de Tilapia Rouge. Les paramètres physico-chimiques de l'effluent du Tilapia rouge est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Caractérisation physico-chimique de l'effluent du Tilapia rouge.

Paramètres	Valeur
pH	7,95
Conductivité ($\mu\text{S/cm}$)	1080
Salinité (PSU)	0,58
Oxygène dissous (mg/l)	6,56
Température ($^{\circ}\text{C}$)	21,6
N-NO ₂ (mg/l)	0,182
N-NO ₃ (mg/l)	2,296
N-NH ₄ (mg/l)	0,12
P-PO ₄ (mg/l)	0,02

Les résultats des paramètres physico-chimiques (Tableau 1) ont été comparée à ceux de mentionnée dans l'étude de (Ansari *et al.*, 2017). Ces résultats montrent des différences remarquables entre les effluents de Tilapia rouge (présente étude) et de Tilapia de Nil. Le pH de l'effluent du Tilapia rouge est plus élevé (7,95) que celui du Tilapia de Nil ($7,28 \pm 0,32$). La température de l'effluent du Tilapia de Nil ($27,3 \pm 1,5$ $^{\circ}\text{C}$) est supérieure à celle du Tilapia rouge (21,6 $^{\circ}\text{C}$). La salinité est plus élevée dans l'effluent du Tilapia rouge (0,58 PSU) par rapport à celle du Tilapia de Nil ($0,26 \pm 0,02$ mg/l). De plus, l'oxygène dissous présente un niveau supérieur dans l'effluent du Tilapia rouge (6,56 mg/l) comparé à celui du Tilapia de Nil ($4,17 \pm 0,31$ mg/l).

En ce qui concerne les composés azotés, l'effluent du Tilapia de Nil présente des concentrations plus élevées de NH₄⁺ ($5,32 \pm 0,45$ mg/l) et de NO₂⁻ ($5,52 \pm 0,18$ mg/l) par rapport à celles de

l'effluent du Tilapia rouge (NH_4^+ : 0,12 mg/l, NO_2^- : 0,182 mg/l). Les niveaux de NO_3^- sont également plus élevés dans l'effluent du Tilapia de Nil ($40,67 \pm 0,84$ mg/l) comparé à ceux de l'effluent du Tilapia rouge (0,23 mg/l). Enfin, la concentration de PO_4^{3-} est beaucoup plus élevée dans l'effluent du Tilapia de Nil ($8,82 \pm 0,02$ mg/l) par rapport à celle du Tilapia rouge (0,02 mg/l). En résumé, les effluents de Tilapia de Nil présentent des concentrations plus élevées en composés azotés et phosphatés, alors que les effluents de Tilapia rouge ont un pH, une salinité et une concentration en oxygène dissous plus élevés.

Selon Fazal *et al.* (2021), l'azote et le phosphore (N et P) sont les sources de pollution des eaux usées responsables du phénomène d'eutrophisation des plans d'eau qui provoque une diminution de la concentration d'oxygène dissous dans le milieu aquatique. Les microalgues peuvent utiliser le N et le P présents dans les eaux usées comme source de nutriments pour soutenir leur croissance.

III.3.2. Croissance des souches sur l'effluent du Tilapia

III.3.2.1. Cinétique de croissance

La figure 14 montre les courbes de croissances des souches de microalgues 4 CNR, D ST, 5 CNR, 10 ST, 2 ST cultivées dans l'effluent de Tilapia, déterminé par dénombrement cellulaire.

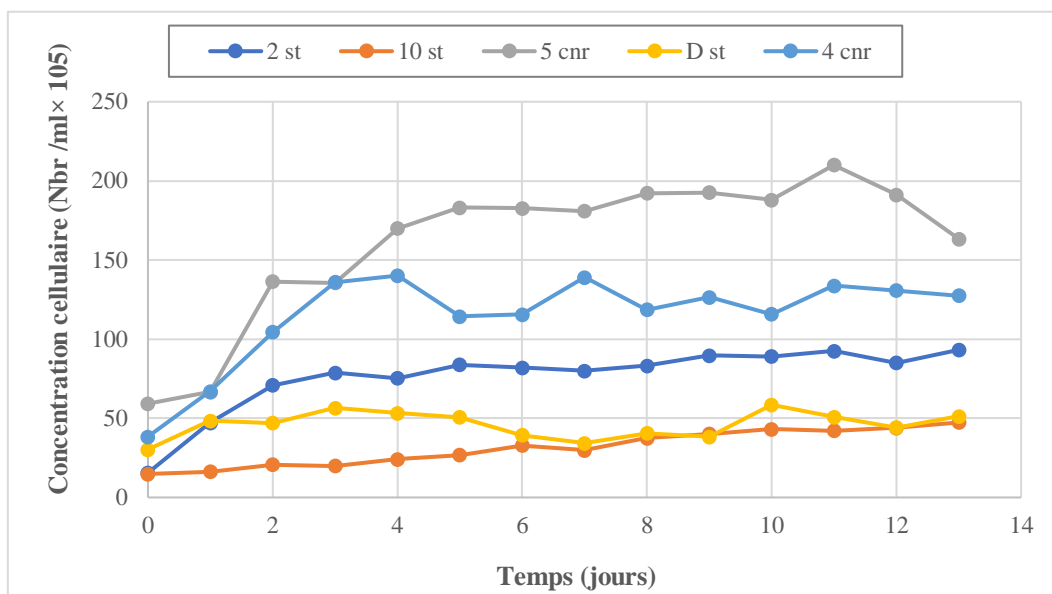


Figure 14 : Cinétiques de croissance des souches de microalgues déterminées par dénombrement cellulaire dans l'effluent de Tilapia rouge.

Les résultats ont indiqué que les cinq souches ont une croissance lente par rapport à celle obtenue dans le milieu BG11. La souche 5 CNR se distingue des autres souches de microalgues par une croissance rapide, suivie par la souche 4 CNR, avec une courte phase de latence ce qui montre la bonne adaptation de cette souche aux conditions de milieu (toxicité du rejet, la balance non équilibrée des nutriments, etc). Cette souche a atteint la phase exponentielle à partir du premier jour s'est terminé par un ralentissement de la croissance à partir du 5^{ème} jour indiquant le début de la phase stationnaire.

Les résultats de suivi de la croissance de *Chlorella vulgaris* obtenu par Ferro *et al.* (2018), ont montré que cette souche a présenté une phase de latence plus longue (la culture est entrée dans la phase de croissance exponentielle entre le jour 3 et le jour 7).

Toutefois, une concentration cellulaire optimale de $209,96 \times 10^5$ cellules/ml atteinte par la souche 5 CNR dans le 11^{ème} jours, supérieure aux concentrations cellulaires d'*Isochrysis zhangjiangensis* et de *Chlorella sp.* sont respectivement de $3,97 \times 10^6$ cellules/ml et de $9,25 \times 10^6$ cellules/ml au jour 11 en présence de Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} dans un effluent d'aquaculture (Fazal *et al.*, 2021).

Les souches *Chlorella sorokiniana* et *Chlorella saccharophilum*, ont eu une phase de latence très courte : après seulement 3 jours, les cultures étaient vertes. Cette durée, montré par Ferro *et al.*, (2018) dans une culture en eau usée municipale, a été similaire à la durée prise par nos souches 4 CNR et 2 ST. D'après Ferro *et al.*, (2018), *Scenedesmus obliquus* a atteint une concentration cellulaire considérablement plus élevée, 38×10^6 cellules/ml par rapport à la souche *Scenedesmus sp* avec 7×10^6 cellules/ml.

Selon Abdelaziz *et al.* (2014), la faible concentration cellulaire et la cinétique de croissance ralentie sont probablement dues à l'épuisement des nutriments, dans un laps de temps plus court pour les milieux d'eaux usées.

La figure 15 montre l'évolution de la densité optique (DO à 680 nm) pour les cinq souches de microalgues développées dans l'effluent de Tilapia rouge en fonction du temps.

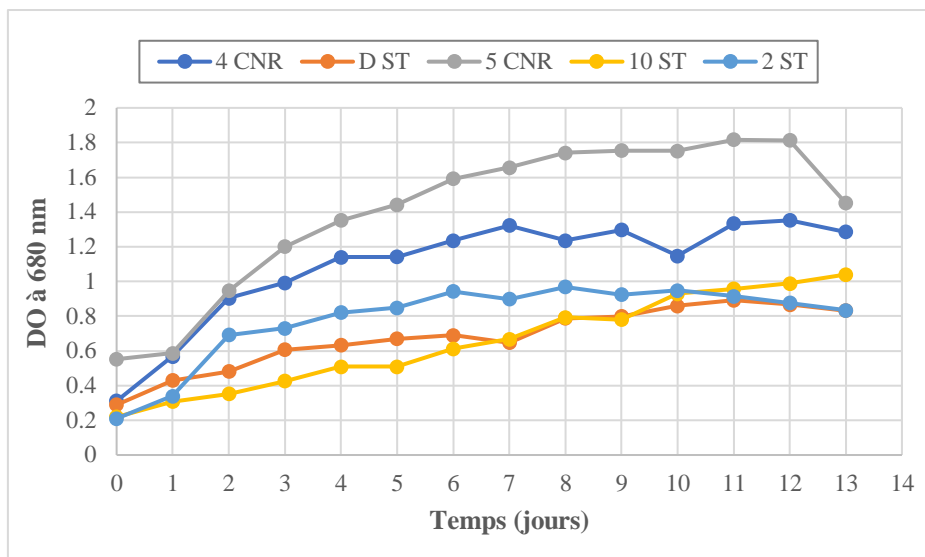


Figure 15 : Cinétiques de croissance des souches de microalgues déterminées par mesure de la DO à 680 nm dans l'effluent de Tilapia rouge.

Les cellules de microalgues ont montré une évolution similaire de la croissance par rapport à celle déterminée par dénombrement cellulaire. La souche 5 CNR étant la meilleure, suivie par la 4 CNR, la 2 ST, la D ST et la 10 ST.

III.3.2.2. Paramètres de croissance

Les cinétiques de croissance des cinq souches de microalgues ont permis de déduire certains paramètres concernant les performances de croissance. Les résultats de ces paramètres sont portés dans le Tableau 7 et 8.

Tableau 7 : Détermination des paramètres de croissance des souches de microalgues développées dans l'effluent de Tilapia par DO à 680 nm.

Souches	N_{max} (Nbr /mL $\times 10^5$)	μ (j^{-1})	dt (j)	dt (h)
4 CNR	140,16	0,56	0,97	23,25
D ST	58,52	0,47	1,24	29,85
5 CNR	209,96	0,71	1,48	35,50
10 ST	47,36	0,23	0,62	15,00
2 ST	93,24	1,10	3,02	72,55

Tableau 8 : Détermination des paramètres de croissance des souches de microalgues développées dans l'effluent de Tilapia par dénombrement cellulaire.

Souches	DO _{max}	μ (j ⁻¹)	dt (j)	dt (h)
4 CNR	1,352	0,53	1,299	31,18
D ST	0,892	0,397	1,74	41,86
5 CNR	1,816	0,48	1,44	34,65
10 ST	1,04	0,188	3,68	88,50
2 ST	0,968	0,71	0,97	23,45

Les deux tableaux ont montré des caractéristiques de croissance similaires des souches des microalgues ; la souche 5 CNR affiche des valeurs de croissance les plus élevées ($209,96 \times 10^5$ cellules/mL et 1,816) alors que la souche 2 ST est la meilleure en termes de μ et *dt* (qui traduisent les vitesses de croissance).

Ces valeurs sont inférieures à celles obtenue par Ferro *et al.* (2018), où les microalgues ont montré un taux de croissance spécifique d'environ 0,98 j⁻¹ dans une eau usée municipale filtré. En outre, Zhou *et al.* (2011), ont obtenu des taux de croissance inférieure à ceux de nos souches 4 CNR, 5 CNR et 2 ST (de 0,455 à 0,498 j⁻¹) pour des microalgues cultivées dans un effluent secondaire provient d'une station d'épuration. Cette différence peut être liée à différentes facteurs, tels que les caractéristiques de l'effluent aquacole, les conditions de culture et la robustesse des souches de microalgues utilisées pour le traitement.

D'autre part, le temps de doublement cellulaire (*dt*) déterminé, suggère respectivement, que les souches 2 ST, 4 CNR et 5 CNR se reproduisent plus rapidement que les autres. Le temps de doublement des cellules de nos souches de microalgues D ST, 5 CNR, 4 CNR et 2 ST affiche des durées plus courtes en comparaison, à celles rapportés par (Santos-Ballardo *et al.*, 2015) qui varient entre 2,1 et 4,76 jours, pour les quatre espèces de microalgues (*Chaetoceros calibras*, *Isochrysis affinis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*), cultivées dans le milieu de Guillard et Ryther (1962), bien qu'il soit considéré comme milieu plus favorable à la croissance des microalgues.

Nasir *et al.* (2023) a trouvé une concentration cellulaire maximale de 90×10^5 cellules/ml de la souche *Chlorella* sp cultivée dans l'eau d'élevage de crevettes à pattes blanches.

III.3.3. Elimination des nutriments par les souches de microalgues

La croissance rapide du secteur de l'aquaculture génère d'énormes quantités d'eaux usées aquacoles. L'élimination des nutriments des eaux usées avant leur déversement est importante pour prévenir l'eutrophisation. Les microalgues montrent un potentiel d'élimination efficace des nutriments des eaux usées par le biais d'un processus de phytoremédiation (Ansari *et al.*, 2017).

Les résultats des rendements d'élimination des nutriments, obtenus à la fin de l'expérience (13 jours de traitement) sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Les rendements d'élimination des élément nutritifs par les souches de microalgues étudiées.

Souches de microalgues	Rendement des traitements (%)			
	N-NO ₂	N-NO ₃	N-NH ₄	P-PO ₄
4 CNR	95,60	91,90	83,33	15
D ST	97,80	98,99	37,5	15
5 CNR	97,80	98,60	81,67	20
10 ST	98,35	99,21	82,5	10
2 ST	84,06	<1	<1	<1

Les résultats du tableau montrent une efficacité importante dans la réduction des nitrites pour toutes les souches. La souche 10 ST affiche la meilleure performance avec un rendement d'élimination des nitrites de 98,35 %.

Les constatations concernant la réduction des nitrites suite aux traitements de l'effluent du Tilapia par nos isolats sont cohérentes avec celles rapportées par Li *et al.* (2019). Les auteurs ont observé une diminution significative des concentrations de N-NO₂ (98,0 %) grâce à l'utilisation d'un assemblage de diverses espèces marines pour traiter un effluent d'aquaculture. Nos résultats s'alignent également avec les résultats de (Ansari *et al.*, 2017), qui ont cultivé par la souche *Chlorella sorokiniana* dans un effluent aquacole, et ont observé une élimination importante des nitrites (un rendement d'élimination de 81,79%).

Les résultats de l'élimination des nitrates par les cinq souches de microalgues sont similaires avec les observations antérieures de l'évolution des nitrites où une diminution notable de la concentration de nitrates a été observé par les souches 10 ST, D ST, 5 CNR et 4 CNR respectivement. Une faible élimination des nitrates a cependant été observée par la souche 2 ST.

Nos résultats s'alignent avec les conclusions de (Ansari *et al.*, 2017), qui ont rapporté un rendement d'élimination de nitrate de 75,76%.

En ce qui concerne l'ammonium, une réduction importante de la concentration d'ammonium a été observée pour certaines souches (4 CNR, 5 CNR et 10 ST, respectivement). Les souches D ST et 2 ST affichent, respectivement, les valeurs les plus faibles de rendement. (Ansari *et al.*, 2017) a révélé une élimination importante de l'ammonium par la souche *Chlorella sorokiniana* (un rendement d'élimination de 98,91%).

Les orthophosphates ont signalé la diminution la plus faible de leurs concentrations par rapport aux minéraux azotés. Le meilleur rendement d'élimination a été obtenu pour la souche 5 CNR suivi par les deux souches 4 CNR et D ST, puis la 10 ST et la 2 ST. Ces valeurs sont faibles par rapport à celles rapportées par Ansari *et al.* (2017), où le rendement pour l'élimination de l'orthophosphate dans un effluent de Tilapia de Nil, a presque atteint 100%.

Les résultats de la croissance des cinq souches de microalgues ensemble avec l'élimination des nutriments permet de sélectionner la souche 5 CNR comme meilleure souche à retenir pour la suite du travail.

III.4. Etude de la symbiose entre microalgues et bactéries dans le traitement des effluents aquacoles

III.4.1. Caractérisation de l'effluent synthétique

Le tableau 10 présente les caractéristiques physico-chimiques de l'effluent synthétique.

Tableau 10 : Caractérisation physico-chimique de l'effluent synthétique

Paramètres	Moyenne
pH	8,33
Conductivité $\mu\text{S}/\text{cm}$	837
Salinité (PSU)	0,41
OD (mg/l)	6,37
DCO (mg/l)	622
N NO_2 (mg/l)	1,46
N NO_3 (mg/l)	2,30
N NH_4 (mg/l)	5,38
P PO_4 (mg/l)	12,02

Le pH est légèrement alcalin à 8,33 a été ajusté comme ça pour favoriser la croissance des microorganismes (les microalgues en particulier). La conductivité est de 837 $\mu\text{S}/\text{cm}$, indiquant une présence modérée de sels dissous. Cependant, l'oxygène dissous (OD) est mesuré à 6,37 mg/l, reflétant une condition suffisamment oxygénée pour soutenir une certaine activité biologique. La demande chimique en oxygène (DCO) est de 622 mg/l, suggérant une forte charge de matières organiques susceptibles d'être oxydées. Les concentrations de l'effluent synthétique en azote nitreux et nitrique sont relativement faibles par rapport à l'ammonium, ou encore les phosphates. Les concentrations d'un effluent synthétique, préparé avec les mêmes sels dans l'eau de robinet, rapporté par Zhang *et al.*, (2023) est de 540 mg/l DCO, 26,7 mg/l N- NH_4 , 9,9 mg/l N- NO_2 , 19,3 mg/l N- NO_3 et 10 mg/l P- PO_4 . La formulation de l'effluent synthétique est basée sur une eau usée concentrée prélevé de fond du bassin d'élevage du Tilapia.

Selon (Zhang *et al.*, 2023), l'ammoniac et les sont des paramètres critiques de la qualité de l'eau parce que leurs formes non ionisées (ammoniac libre et acide nitreux) sont toxiques pour les poissons, et des concentrations de N- NH_4^+ de <0,4 mg/l et de N- NO_2^- <0,2 mg/l sont recommandées pour certaines espèces aquacoles à température ambiante à pH 7-8.

III.4.2. Traitement de l'effluent synthétique avec le consortium Microalgue-Boue en mode de culture suspendu

III.4.2.1. Croissance des microalgues en culture suspendue

La figure 16 illustre l'évolution temporelle de la concentration cellulaire des microalgues dans deux traitements : Microalgues seules en suspension (μA) et Microalgues en suspension + Boues en suspension ($\mu A+B$) dans l'effluent synthétique.

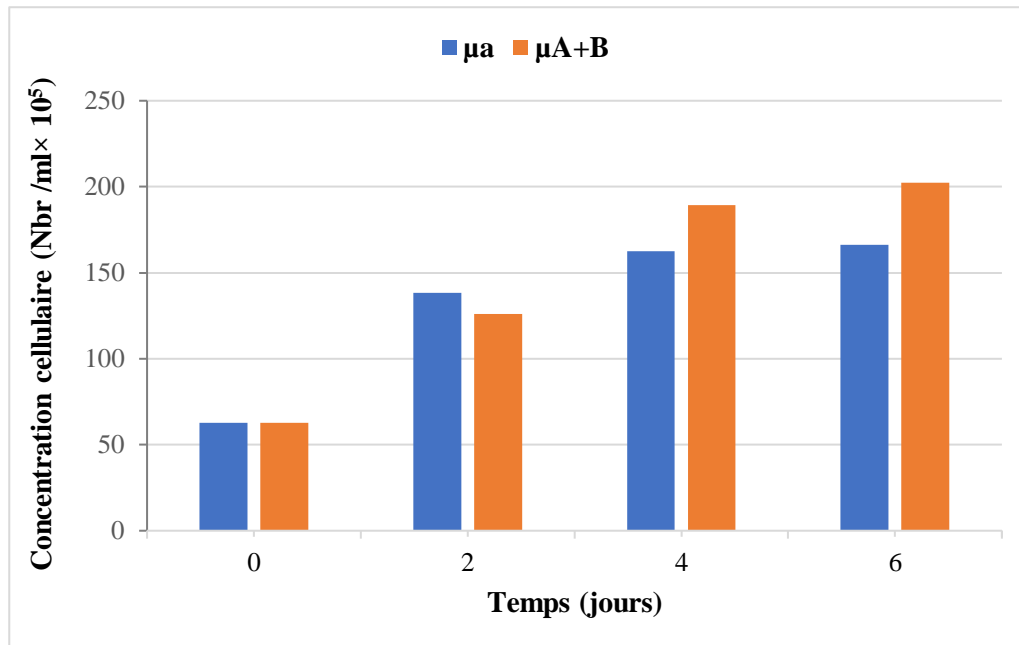


Figure 16 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire des microalgues seules en suspension et microalgues en suspension co-cultivée avec boue de l'effluent synthétique.

Les résultats montrent une augmentation progressive de la concentration cellulaire dans les deux cultures au fil du temps. La co-culture des microalgues avec les bactéries ($\mu A+B$) affiche une concentration cellulaire légèrement plus élevée que la culture des microalgues seules (μA) à partir du jour 4. Cette augmentation accrue dans le traitement combiné suggère que la présence de boues en co-culture contribue à la croissance des microalgues, probablement par un apport de carbone minéral fourni par les bactéries hétérotrophes de la boue activée.

Les résultats obtenus sont en désaccord avec celles rapportés par Mujtaba *et al.*, (2017) qui ont trouvé une croissance *Chlorella vulgaris* seule en suspension par rapport à la co-culture de *Chlorella vulgaris* avec *Pseudomonas putida*.

III.4.2.2. Croissance des bactéries en culture suspendue

La figure 17 montre les résultats de l'évolution des bactéries dans la co-culture des microalgues avec boues en suspension et boues seules de l'effluent synthétique.

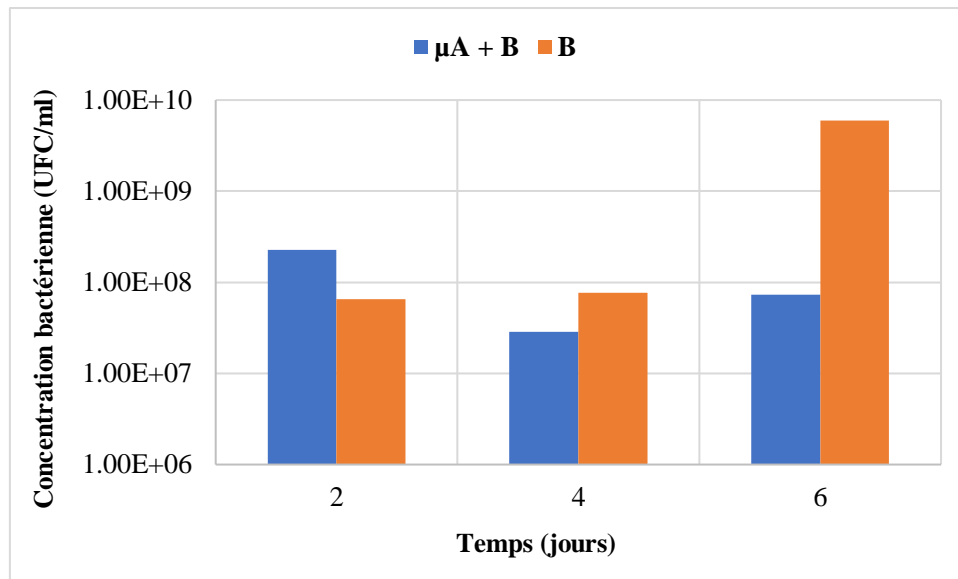


Figure 17 : Evolution temporelle de la flore bactérienne totale dans la co-culture des microalgue en suspension avec boue et boue seule de l’effluent synthétique.

La figure 18 montre qu’au bout de deux jours seulement on arrive à une croissance importante des bactéries dans les deux traitements. La souche 5 CNR a un effet positif qui stimule le développement bactérien mieux que en cas de la boue seule. Après cette période, la concentration bactérienne de la co-culture chute, probablement du fait d’une compétition sur le substrat (limitation des nutriments) et demeure constante jusqu’au 6^{ème} jour. Cependant, le traitement par la boue seule affiche une phase de latence de deux jours (du 2^{ème} au 4^{ème} jour) après la poussée initiale puis augmente à nouveau. Ceci pourrait être expliquer par dégradation préférentielle séquentielle des différents substrats présents dans l’effluent synthétique ; une fois que la boue dégrade un substrat, elle s’adapte au nouveau puis enchaine son oxydation.

III.4.2.3. Elimination de la DCO et des nutriments en culture suspendue

La figure 18 montre les résultats de l’évolution de la DCO de l’effluent synthétique suite aux traitements par microalgues seules en suspension (μA), microalgues en suspension avec boues et boues seules.

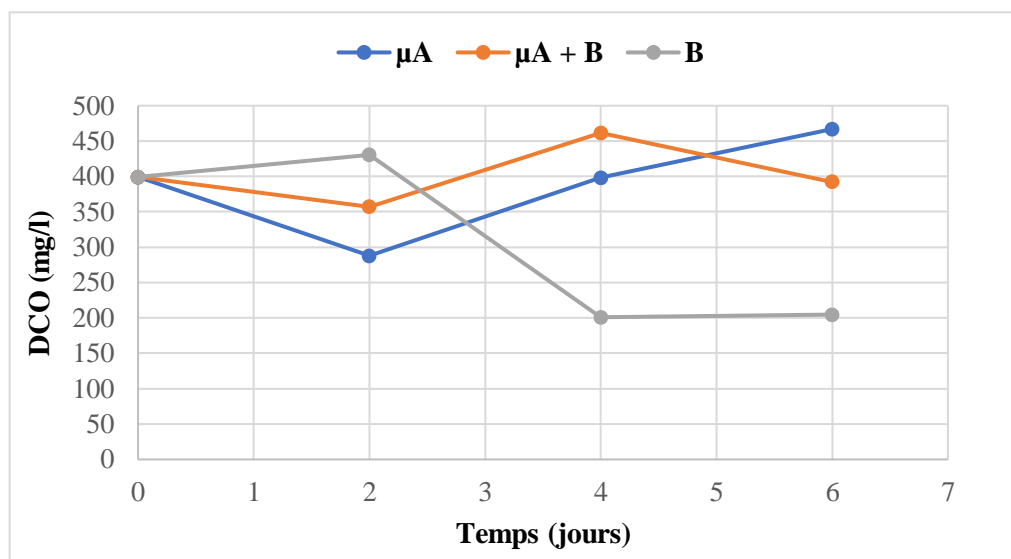


Figure 18 : Evolution temporelle de la DCO de l’effluent Synthétique traité par microalgues seules en suspension, microalgues en suspension avec boues en suspension et boues seule.

D’après cette figure, une diminution remarquable de la DCO au bout du 4^{ème} jours a été obtenue par le traitement de la boue seule (un rendement d’élimination de 49,62%). Le traitement avec microalgues seule a donné un rendement d’élimination en DCO de 27,82%, alors que le traitement avec co-culture a seulement permet une réduction de 10,52% de la DCO initiale dans le 2^{ème} jour. Mujtaba *et al.*, (2017) a noté que *C. vulgaris* seule en suspension et *C. vulgaris* en co-culture avec *P. putida* ont conduit à une réduction importante de la DCO. L’assimilation du carbone organique par la souche 5 CNR en monoculture indique un métabolisme mixotrophique du fait de la présence, à la fois, de la lumière et du carbone organique dans l’effluent synthétique (Mujtaba *et al.*, 2017). Yu *et al.*, (2023) a révélé que le consortium de *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.* avec la boue activée a un effet positif dans la réduction de la DCO d’une eau usée municipale artificielle (un rendement de 93,7%).

La figure 19 montre les résultats de l’évolution des nutriments (Ammonium NH₄, Nitrate NO₃, Nitrite NO₂, Orthophosphate PO₄), de l’effluent synthétique suite aux différents traitements en culture suspendue.

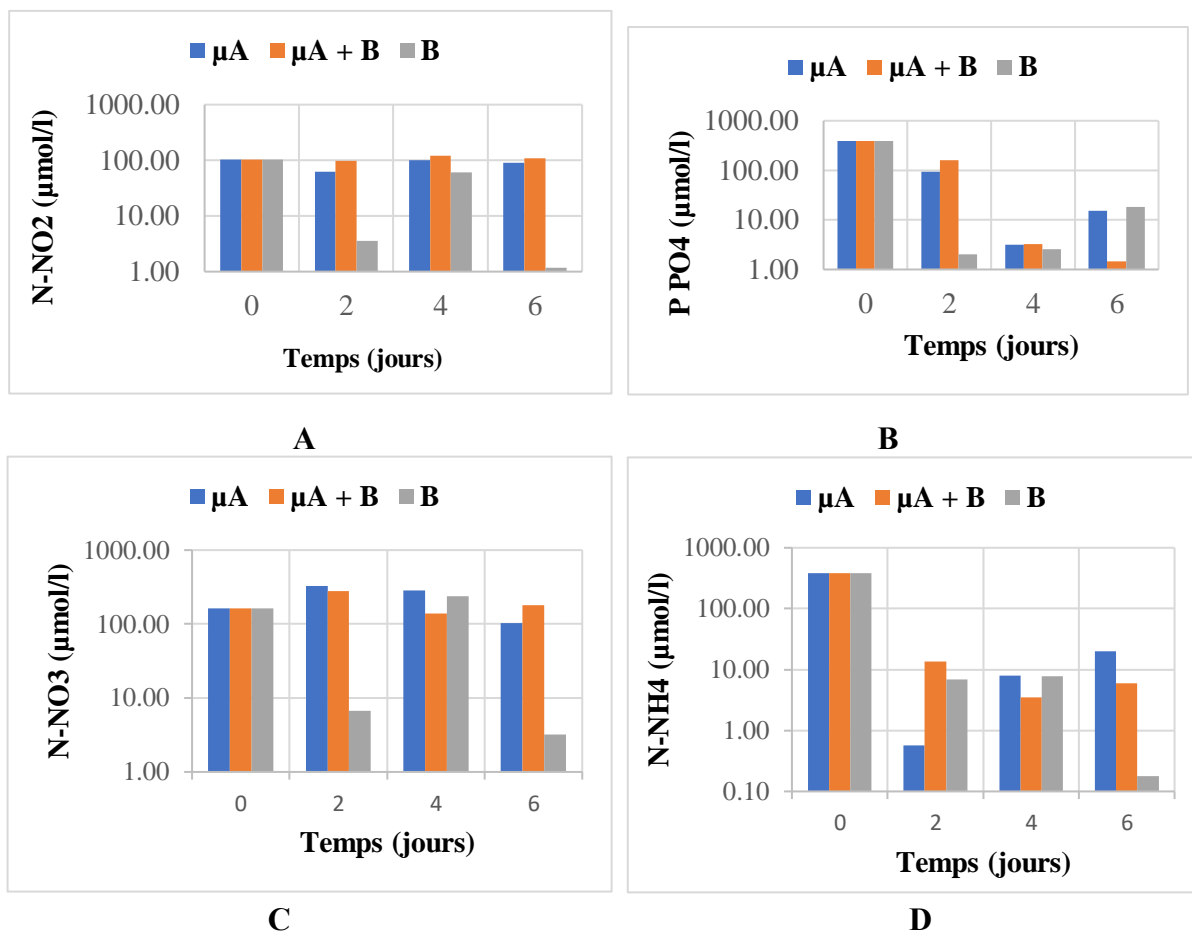


Figure 19 : Evolution temporelle des nutriments dans l'effluent synthétique suite aux traitements par microalgue seule en suspension, en co-culture avec boue et par boue **A. Nitrite**, **B. Orthophosphate**, **C. Nitrate**, **D. Ammonium**

Elimination des Nitrites : On peut voir sur (la figure19, A), l'évolution des concentrations en nitrites, où la boue seule a permis de diminuer leur concentration de 104,29 μmol/l à t₀ jusqu'à 1,18 μmol/l au 6^{ème} jour. La microalgue seule ou en co-culture avec la boue n'a aucun effet sur l'abattement des nitrites. Les nitrites sont un élément intermédiaire très instable qui se produit au cours du processus de la nitrification par les bactéries.

Elimination des orthophosphates PO₄ : Nous remarquons que les phosphates ont été bien réduites dans tous les traitements. Une diminution rapide des phosphates a été constatée dans le traitement par la boue seule, suivi par la microalgue seule puis le traitement de co-culture. Cependant, la co-culture de la souche 5 CNR avec la boue a montré la concentration la plus faible de cet élément (1,45 μmol/l) dans 6^{ème} jour. Nos résultats sont comparable à ceux obtenu

par Yu *et al.* (2023), où le rendement d'élimination de l'orthophosphate d'une eau usée municipale artificielle traité par *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.* en consortia avec la boue activé, été de 91,03% pour une concentration initiale de 9,5 mg/l. Des rendements plus élevés d'élimination des phosphates ont été achevés suites aux différents traitements par nos cultures (99%) (tableau 11). Mujtaba *et al.*, (2017) a trouvé un rendement d'élimination plus faible (60 %) par co-culture en suspension de bactérie et microalgues.

Elimination de Nitrate NO_3 : l'évolution des nitrates a été marqué par une production supplémentaire pour tous les traitements avec un abattement important des nitrates dans le traitement par la boue uniquement à la fin de l'expérience (98%, tableau 11). Cet apport de nitrate pourrait être dû au phénomène de nitrification bactérienne d'une part, et à la présence des nitrites qui inhibe la consommation des nitrates par microalgues selon (Moreno-Garrido, 2008). Yu *et al.* (2023) a obtenu un rendement d'élimination de nitrate de 100% (une concentration initiale de 13,4 mg/l) d'une eau usée municipale artificielle traité par *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.* en consortium avec la boue activé.

Elimination de l'ammonium NH_4 : une diminution rapide de l'ammonium a été constaté pour tous les traitements (un rendement >95% à partir du 2^{ème} jour). Un palier d'abattement a été constaté à partir du 4^{ème} jour où les différents traitements ont donné un rendement d'élimination de 99% (tableau 11). Ce rendement est supérieur à celui obtenu par Mujtaba *et al.* (2017), où seulement 13% de l'ammonium a été éliminé dans la culture de *Pseudomonas putida* en suspension dans une eau usée pendant 2 jours, avec une absence de progression au-delà de cette période. Dans une autre étude, menée par Yu *et al.* (2023), une élimination de 87,2% de l'ammonium (une concentration initiale de $\text{NH}_4 = 69,6$ mg/l) des eaux usées provient de l'élevage de porcs, a été rapporté par culture microalgues et bactérie en consortium.

Les algues pourraient favoriser l'assimilation de l'azote et enrichir les bactéries dénitrifiantes en conduisant davantage de flux organiques à l'élimination de l'azote, ce qui a amélioré l'efficacité globale de l'élimination de l'azote (Zhang *et al.*, 2023).

Tableau 11 : Récapitulatif des rendements d'élimination des nutriments suite aux différents traitements de l'effluent synthétique en mode de culture suspendu.

Traitements	N NO ₂		N NO ₃		N NH ₄		P PO ₄	
	Rendement (%)	Temps (jours)	Rendement (%)	Temps (jours)	Rendement (%)	Temps (jours)	Rendement (%)	Temps (jours)
μA	40,75	2	-98,52	2	99,85	2	76,08	2
	3,63	4	-73,56	4	97,91	4	99,19	4
	13,35	6	36,69	6	94,82	6	96,04	6
μA + B	5,27	2	-70,91	2	96,44	2	58,38	2
	-16,16	4	15,99	4	99,08	4	99,16	4
	-4,96	6	-9,02	6	98,43	6	99,62	6
B	96,57	2	95,91	2	98,21	2	99,48	2
	41,30	4	-45,04	4	97,95	4	99,34	4
	98,87	6	98,06	6	99,95	6	95,34	6

III.4.3. Traitement de l'effluent synthétique avec le consortium Microalgue-Boue en mode de culture immobilisé

III.4.3.1. Croissance des microalgues en mode de culture immobilisé

La figure 20 montre les résultats de dénombrement des microalgues dans les traitements par microalgues seules immobilisées (μA), Microalgues immobilisées + Boues ($\mu A+B$).

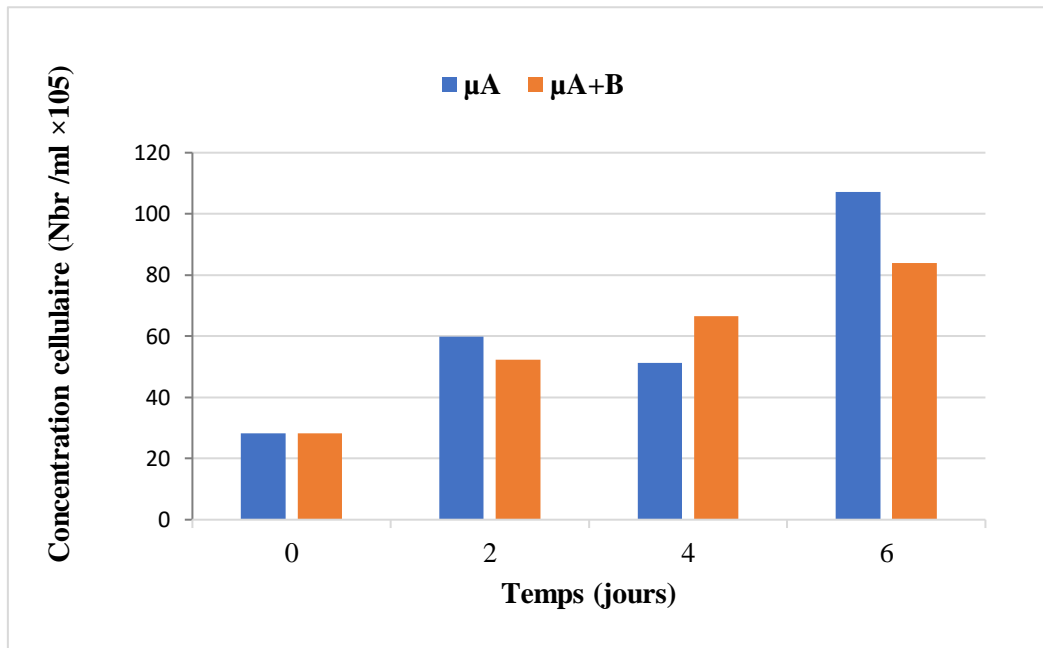


Figure 20 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire des microalgues seules immobilisée et microalgues immobilisée co-cultivée avec boue.

On remarque d'après cette figure qu'un nombre de cellules finale de $83,98 \times 10^5$ Cellules/mL a été atteint dans 6 jours par la souche 5 CNR de microalgues immobilisée dans le traitement contre $107,1 \times 10^5$ Cellules/ml pour la microalgue seule immobilisée. Cette concentration cellulaire reste faible par rapport à celle obtenue dans l'expérience en suspension dans la même, bien qu'elle demeure proche (166×10^5 et 202×10^5 cellules/ml, respectivement).

Les microalgues immobilisée seule montre une exponentielle de croissance plus poussée que celle de la co-culture, qui débute de $28,32 \times 10^5$ Cellules/ml et arrive à $59,94 \times 10^5$ Cellules/ml le jour 2.

En comparant ces résultats par ceux de Shen *et al.* (2017), une densité de $5,68 \times 10^6$ Cellules/ml de *Chlorella vulgaris*, après 2 jours de traitement par microalgues seules immobilisées, qui est

similaire à nos résultats. Également, une légère différence entre le nombre de cellules qu'on a obtenu, après 4 jours de traitement par notre co-culture ($6,664 \times 10^6$ Cellules/ml) dans des conditions similaires, avec ceux cités par (Mujtaba *et al.*, 2017), qui ont trouvé une densité de $5,7 \times 10^6$ Cellules/ml dans un traitement avec *C. vulgaris* immobilisée en co-culture avec boue activée. Cela montre que nos résultats sont comparables aux études de la littérature par rapport à la croissance des microalgues en mode immobilisé.

III.4.3.2. Croissance des bactéries en mode de culture immobilisé

La figure 21 montre les résultats de la densité des bactéries dans les traitements par boues en et par microalgues immobilisées avec boues en suspension dans l'effluent synthétique.

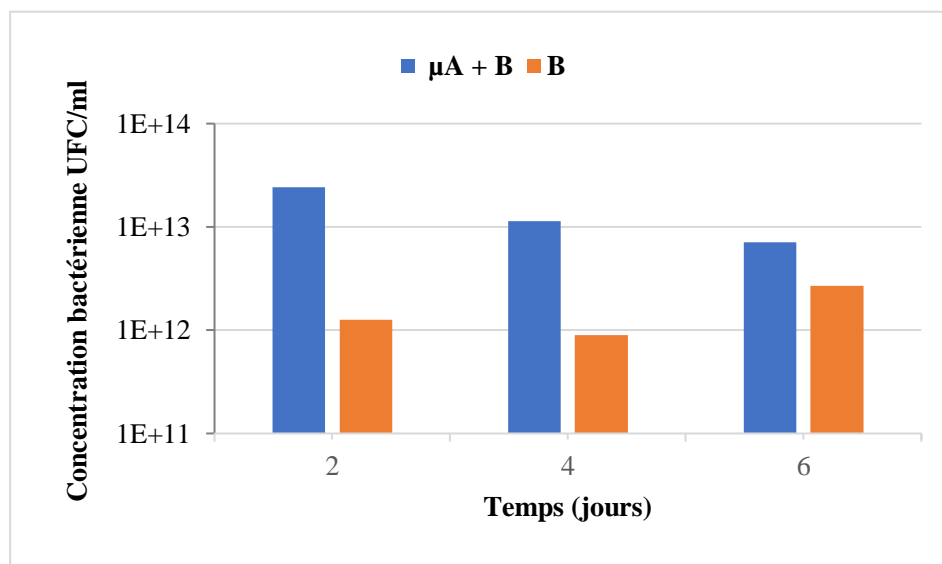


Figure 21 : Evolution temporelle de la flore bactérienne totale dans la co-culture des microalgues immobilisées avec boue et boue seule de l'effluent synthétique.

Les résultats montrent que la concentration bactérienne est plus élevée dans le traitement combiné ($\mu A+B$) par rapport au traitement avec les boues seules (B) à chaque point de prélèvement (de 19 fois de plus au 2^{ème} jour). Une diminution progressive de la concentration bactérienne a été observée au-delà du 2^{ème} jour à l'inverse de traitement par la boue où pratiquement un stationnement de la croissance a été régné. D'autre part, on remarque que la concentration bactérienne de la boue activée est plus dense par rapport à celle mesurée dans l'expérience en suspension (aux alentours de 10^{12} UFC/ml contre 10^7 UFC/ml), cela revient au stade de maturité de la boue activée, qui vraisemblablement, varie d'un prélèvement à l'autre.

Ces observations suggèrent que l'association des microalgues immobilisées et des boues en suspension favorise une prolifération bactérienne plus rapide et plus soutenue, potentiellement

en raison des interactions synergiques entre les microalgues et les bactéries qui améliorent les conditions de croissance et d'activité métabolique dans l'effluent traité. La diminution de la concentration bactérienne revient probablement à l'épuisement de milieu.

En comparaison, nos résultats obtenus pour le traitement ($\mu A+B$), sont supérieurs à ceux rapportés par (Mujtaba *et al.*, 2017), où une densité de $2,54 \times 10^5$ UFC/ml et de $2,68 \times 10^5$ UFC/ml après respectivement 2 jours et 4 jours ont été obtenues.

III.4.3.3. Elimination de la DCO et des nutriments en mode de culture immobilisé

La figure 22 montre les résultats de la demande chimique en oxygène pour les trois traitements : Microalgues seules immobilisées (μA), Microalgues immobilisées + Boues en suspension ($\mu A+B$), Boues seules en suspension (B), respectivement, sur un effluent synthétique.

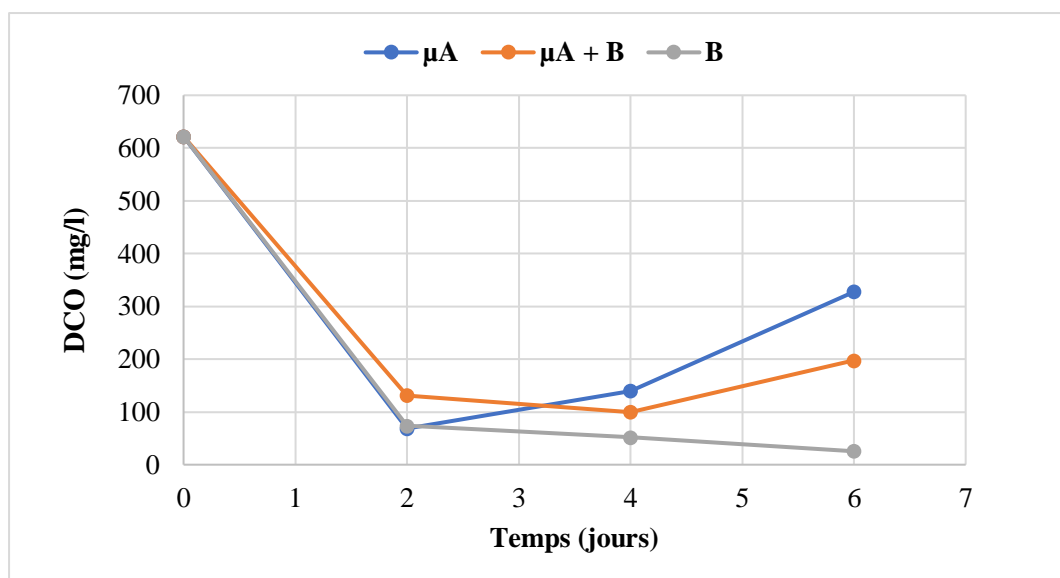


Figure 22 : Evolution temporelle de la DCO de l'effluent Synthétique traité par microalgues seules immobilisées, microalgues immobilisées avec boues en suspension et boues seule.

Les courbes de l'évolution de la DCO affichent une diminution considérable de la demande chimique en oxygène, après uniquement 2 jours de traitements pour les trois cultures. Cependant, la DCO continue à se diminuer dans le traitement par boues seules en suspension (B), jusqu'à le sixième jour pour atteindre une concentration finale de 25,45 mg/l (un rendement de 95,9 %). Elle s'en suit par le traitement de microalgues immobilisées seule qui a réduit efficacement sa concentration (DCO = 73,53 mg/l au bout du 2ème jour, un rendement de

88,17%). Le traitement par la co-culture a aussi provoqué une diminution notable de la DCO (de 622 jusqu'à 99,5 mg/l, un rendement de 84%).

Mujtaba *et al.* (2017), a rapporté qu'à la fin du traitement, le bioréacteur fonctionnant avec co-culture de *Chlorella vulgaris* immobilisée et *Pseudomonas putida* en suspension a permis l'élimination la plus importante de la DCO (86%). Ces résultats sont similaires à ceux de notre expérience.

Par rapport aux performances de traitement de la pollution organique dans deux modes de culture en suspension et immobilisé, nous avons remarqué que ce dernier est plus efficace dans l'abattement de la DCO, bien que la composition de la flore totale de la boue ait un rôle important dans le devenir de cette forme de pollution.

La figure 23 montre les résultats de l'évolution des nutriments de l'effluent synthétique suite aux différents traitements en culture immobilisée.

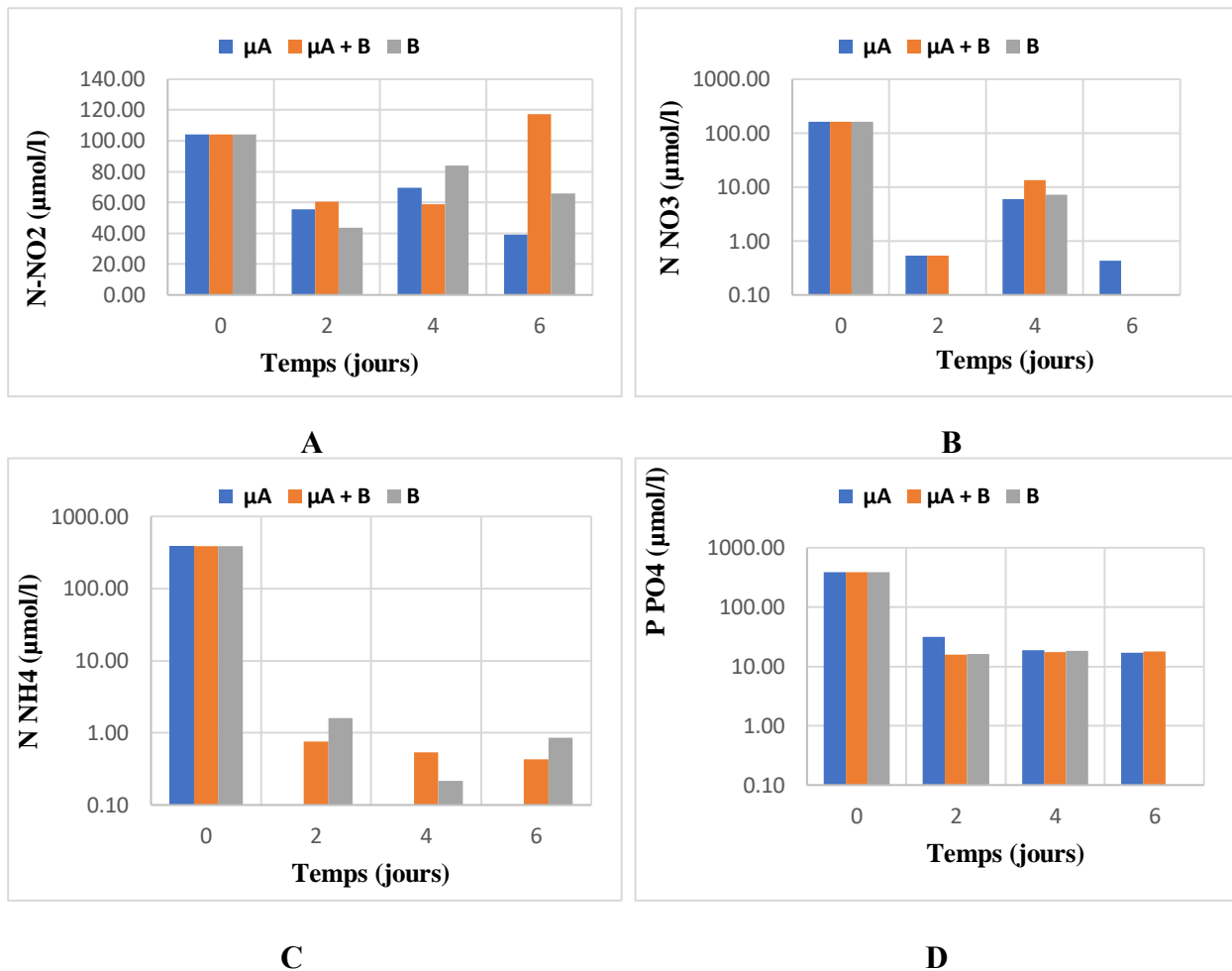


Figure 23 : Evolution temporelle des nutriments dans l'effluent synthétique suite aux traitements par microalgue seule immobilisée, en co-culture avec boue et par boue. **A.** Nitrites, **B.** Nitrates, **C.** Ammonium, **D.** Orthophosphates.

Elimination des Nitrites NO₂ : Le graphique A de la figure 23 montre que la concentration de nitrite (NO₂) diminue progressivement dans les trois traitements au fil du temps. Les plus faibles concentrations ont été obtenues au 2^{ème} jour pour le traitement par la boue (43,82 $\mu\text{mol/l}$), au 4^{ème} jour pour le traitement de la co-culture (59,04 $\mu\text{mol/l}$) et au 6^{ème} jour pour le traitement par la souche 5 CNR immobilisée (39,21 $\mu\text{mol/l}$). Les concentrations minimales trouvées dans les expériences d'immobilisation sont meilleures par rapport à celles obtenus dans le traitement en mode suspendu.

Elimination de l'orthophosphate PO₄ : Le graphique D indique une réduction substantielle de la concentration des phosphates (PO₄) dans les trois traitements, avec une efficacité particulièrement élevée dans le traitement combiné (μA+B) (une concentration de 15,64 μmol/l dans le 2^{ème} jour, un rendement de 96%, tableau 12). Cette efficacité est probablement due à une absorption améliorée des phosphates sur les billes d'alginate qui offrent un support de concentration des microalgues, ainsi qu'à l'amélioration de la biodisponibilité des phosphates grâce à l'activité des bactéries dans les boues. Les résultats montrent que le traitement combiné est plus efficace pour réduire les niveaux de phosphate dans l'effluent synthétique. Meril *et al.* (2022) ont rapporté que *Scenedesmus* sp. et *Chlorella* sp. immobilisés étaient capables d'éliminer 100 % du phosphate (en deux heures) d'un effluent typique.

Elimination de Nitrate NO₃ : La figure 23, B révèle une diminution significative de la concentration des nitrate (NO₃) dans les trois traitements. Ainsi, une accumulation des nitrates est aussi observée, avec une ampleur moins accentuée par rapport à l'expérience en suspension. Egalement, les rendements d'élimination obtenue dans cette expérience sont nettement supérieurs par rapport à ceux obtenus en mode suspendu (entre 90 à 100 % en mode immobilisé contre 63 à 98% en mode suspendu).

Elimination de l'ammonium NH₄ : Le graphique C montre une réduction rapide de la concentration d'ammonium (NH₄) dans les trois traitements après seulement deux jours de traitement. Particulièrement, le traitement par microalgues seule immobilisée a donné une élimination complète de l'ammonium jusqu'à la fin de l'expérience.

(Meril *et al.*, 2022) ont constaté que *Scenedesmus* sp. et *Chlorella* sp. immobilisés étaient capables d'éliminer 90 % de l'ammonium (en quatre heures).

Dans une étude similaire de traitement d'une eau usée, l'élimination la plus importante de l'azote ammoniacal a été obtenue par la co-culture de *Chlorella vulgaris* immobilisé et de *Pseudomonas putida* en suspension (élimination d'environ 85 % de l'ammoniac pendant 5 jours) (Mujtaba *et al.*, 2017).

Il faut noter que certaines bactéries peuvent ne pas avoir de relation symbiotique positive avec les algues à l'état co-immobilisé (Mujtaba *et al.*, 2017).

Le Tableau 12 suivant représente le rendement d'élimination des nutriments suite aux différents traitements en mode immobilisé.

Tableau 12 : Récapitulatif des rendements d'élimination des nutriments de l'effluent synthétique en mode de culture immobilisé.

Traitement	N NO ₂		N NO ₃		N NH ₄		P PO ₄	
	Rendement (%)	Temps (jours)	Rendement (%)	Temps (jours)	Rendement (%)	Temps (jours)	Rendement (%)	Temps (jours)
μA	46,78	2	99,67	2	99,77	2	91,79	2
	33,22	4	96,41	4	99,94	4	95,15	4
	62,34	6	99,74	6	99,94	6	95,65	6
μA + B	41,95	2	99,67	2	99,80	2	95,96	2
	43,39	4	91,84	4	99,86	4	95,48	4
	-12,60	6	100	6	99,88	6	95,43	6
B	57,98	2	100	2	99,58	2	95,81	2
	19,35	4	95,63	4	99,94	4	95,24	4
	36,71	6	100	6	99,77	6	95,71	6

Les résultats montrent que le traitement avec les microalgues seules (μA) atteint des rendements élevés pour l'élimination de N-NH₄ (99,7%) et PO₄ (91,79%) en 2 jours seulement. Le traitement combiné (μA+B) affiche également des rendements élevés, notamment pour N-NH₄ (99,7%) et P-PO₄ (95,91%) et N-NO₃ (100%) mais sur une période plus longue (de 6 jours) pour le phosphate. Les boues en suspension seules (B) montrent une efficacité remarquable pour l'élimination des nitrates (NO₃) avec un rendement de 100% en 6 jours, mais sont moins efficaces pour l'élimination des autres nutriments. Globalement, les traitements combinant les microalgues immobilisées et la boue semblent offrir une synergie avantageuse, améliorant l'efficacité d'élimination des différents nutriments.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Nous avons essayé à travers ce travail d'étudier l'effet de l'interaction entre microalgues et bactéries pour la remédiation des rejets aquacoles. Les microalgues étudiées ont été isolées antérieurement (Meberbeche et Hamadouche, 2023) à partir d'échantillons d'eaux usées, qui ont subi des étapes de purification périodiques.

Nous avons retenue et identifié, par microscope optique et par consultation des clés d'identification, quatre souches affiliées probablement au genre de *Chlorella* et une, affiliée au genre de *Scenedesmus*.

Tout d'abord, une étude des performances de croissance des souches de microalgues sur milieu favorable (BG11) a été envisagée. L'étude a permis d'en sortir quelques paramètres importants caractérisant la croissance de nos souches de microalgues. Il s'est avéré que notre collection est dotée de performances de croissances remarquables, qui dépassent quelques espèces de microalgues rapportés dans la littérature (dans des conditions similaires de culture). En terme de concentration cellulaire maximale, la souche nommée « 2 ST » est la meilleure dans la collection ($2,11 \times 10^8$ cellules/ml). Du point de vue vitesse de croissance, la souche 5 CNR se divise plus rapidement que les autres ($\mu = 1,87 \text{ j}^{-1}$ et $dt = 8,87 \text{ h}$).

L'étape suivante a consisté de sélectionner une souche—la plus tolérante et la plus efficace dans la croissance et l'élimination des nutriments des effluents aquacoles. Cela est fait par détermination des performances de croissance et des rendements d'élimination des nutriments d'une eau d'élevage du Tilapia, pendant une période suffisante de traitement (13 jours). L'expérience a abouti à des valeurs de concentration cellulaire de $2,1 \times 10^7$ cellules/ml, une DO à 680 nm de 1,8, un taux de croissance spécifique de $0,71 \text{ j}^{-1}$ et un temps de dédoublement cellulaire de 1,48 jours et une capacité d'élimination des nitrites de 97,8 %, de nitrates de 98,6%, d'ammonium de 81,67% et de phosphates de 20% pour la souche retenue « 5 CNR ».

Nous avons ensuite enchainé à traiter le noyau de la problématique « la symbiose microalgues-bactéries dans la remédiation des rejets aquacoles ». Nous avons utilisé dans ce cas une eau usée synthétique, d'une composition connue et qui reflète un rejet aquacole concentré.

La culture suspendue de la 5 CNR avec la flore totale de la boue activée a montré un effet positif tant sur la croissance des microalgues que les bactéries ; une croissance qui a dépassé celle des bactéries et des microalgues seules. En ce qui concerne le traitement de la pollution, le consortium microalgue-bactéries n'a qu'une influence mineure sur l'abattement de la DCO (un

rendement de 10,52 %). La boue seule prélevé dans cette expérience a éliminé la moitié de la DCO, tandis que la microalgue en suspension a contribué à une élimination de 27,82% de la DCO. Quant aux nutriments, l'ammonium et les phosphates ont enregistré une élimination presque totale dans tous les traitements. Les nitrates ont été caractérisés par une accumulation dans l'effluent, alors que les nitrites ont faiblement été réduites par le consortium en suspension (5,27 %) par rapport aux traitements par la boue et la microalgue seules.

En mode de culture immobilisé, l'ajout des bactéries au milieu n'a pas d'effet positif remarquable sur la croissance de la microalgue, tandis que les bactéries ont bénéficié de la présence des microalgue et donc, ont augmenté en nombre. Toutefois, une nette amélioration de l'élimination de la DCO a été enregistrée après immobilisation des microalgues (un rendement de 88,17% et de 84% respectivement pour la microalgue seule et le consortium). Cependant, la boue seule a éliminé 95,9 % de la DCO, ce qui met en question l'effet bénéfique de la symbiose entre bactéries et microalgues. Concernant l'élimination de nutriments, l'ammonium et les phosphates ont aussi été complètement éliminés par la culture immobilisée et par la boue. En outre, nous avons noté une nette amélioration dans l'abattement des nitrates et des nitrites dans les cultures immobilisées et dans la boue.

Il est intéressant ici de signaler que la boue de la station d'épuration est dotée d'une capacité importante (surprenante) d'élimination des nutriments, qui mérite d'être mise en exergue pour explorer les microorganismes responsables de ce pouvoir remédiant.

Comme perspectives de cette étude, il est recommandé de :

- D'étudier plus en détail l'effet de la symbiose microalgues-bactéries sur l'élimination de la pollution des rejets aquacoles (rejets réels sans stérilisation, composition différente en nutriments, effet des bactéries isolées sur la symbiose).
- D'étudier l'effet d'autres supports d'immobilisation sur l'élimination des nutriments.
- D'identifier par les moyens de la biologie moléculaire les souches de microalgues sélectionnées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdelaziz, A.E.M., Leite, G.B., Belhaj, M.A., Hallenbeck, P.C., 2014. Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. *Bioresource Technology* 157, 140-148.
- Abou-Shanab RAI, El-Dalatony MM, El-Sheekh MM, Ji M-K, Salama E-S, Kabra AN, Jeon B-H. 2014. Cultivation of a new microalga, *Micractinium reisseri*, in municipal wastewater for nutrient removal, biomass, lipid, and fatty acid production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19:510-518.
- Anderson, J., 2020. Key concepts in ELT: reflection. *ELT Journal* 74.
- Andreotti, V., 2019. Microalgae in aquaculture wastewater: a new forecasting method of production in a marine system.
- Ansari, F.A., Singh, P., Guldhe, A., Bux, F., 2017. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal Research* 21, 169-177.
- Barnharst, T., Rajendran, A., Sun, X., Hu, B., 2023. Process optimization of aquaculture wastewater treatment using a mycoalgae biofilm. *Algal Research* 70, 103020.
- Bourrelly, P. (1990). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome I: Les Algues vertes.* pp. 1-572. Paris: Société Nouvelle des Éditions Boubée.
- Daneshvar, E., Sik Ok, Y., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S.M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., Bhatnagar, A., 2021. Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource Technology* 329, 124870.
- Das, P.K., Rani, J., Rawat, S., Kumar, S.J.B.R., 2022. Microalgal co-cultivation for biofuel production and bioremediation: current status and benefits. *15*, 1-26.
- de Morais, E.G., Sampaio, I.C.F., Gonzalez-Flo, E., Ferrer, I., Uggetti, E., García, J., 2023. Microalgae harvesting for wastewater treatment and resources recovery: A review. *New Biotechnology* 78, 84-94.
- de Souza, W.F.C., Almeida, F.L.C., de Melo, A.M., Soares, A.S.P., Forte, M.B.S., de Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2022. Immobilization Techniques on Bioprocesses: Current Applications

Regarding Enzymes, Microorganisms, and Essential Oils. *Food and Bioprocess Technology* 15, 1449-1476.

de Vasconcelos, V.M., de Moraes, E.R.C., Faustino, S.J.B., Hernandez, M.C.R., Gaudêncio, H.R.d.S.C., de Melo, R.R., Bessa Junior, A.P.J.E.S., Research, P., 2021. Floating aquatic macrophytes for the treatment of aquaculture effluents. 28, 2600-2607.

de-Bashan LE, 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.

Eroglu, E., Smith, S.M., Raston, C.L., 2015. Application of Various Immobilization Techniques for Algal Bioprocesses. In: Moheimani, N.R., McHenry, M.P., de Boer, K., Bahri, P.A. (Eds.), *Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 19-44.

Fazal, T., Rehman, M.S.U., Javed, F., Akhtar, M., Mushtaq, A., Hafeez, A., Alaud Din, A., Iqbal, J., Rashid, N., Rehman, F., 2021. Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*). *Chemosphere* 281, 130758.

Ferro, L., Gentili, F.G., Funk, C., 2018. Isolation and characterization of microalgal strains for biomass production and wastewater reclamation in Northern Sweden. *Algal Research* 32, 44-53.

Gonzalez Luz E, Bashan Y. 2000. Increased Growth of the Microalga *Chlorella vulgaris* when Coimmobilized and Cocultured in Alginate Beads with the Plant-Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1527-1531.

Hindák F, Hindáková A. 2008. Morphology and taxonomy of some rare *chlorococcalean* algae (Chlorophyta). 63:781-790.

Hu X, Meneses YE, Hassan AA, Stratton J, Huo S. 2021. Application of alginate immobilized microalgae in treating real food industrial wastewater and design of annular photobioreactor: A proof-of-concept study. *Algal Research* 60:102524.

Huang K-X, Mao B-D, Lu M-M, Chen D-Z, Qiu J, Gao F. 2024. Effect of external acetate added in aquaculture wastewater on mixotrophic cultivation of microalgae, nutrient removal, and membrane contamination in a membrane photobioreactor. *Journal of Environmental Management* 349:119391.

ISO 8199 :2005. Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture. Edition 2, 2005.

Izadpanah, M., Gheshlaghi, R., Mahdavi, M.A., Elkamel, A., 2018. Effect of light spectrum on isolation of microalgae from urban wastewater and growth characteristics of subsequent cultivation of the isolated species. *Algal Research* 29, 154-158.

Javed MA, Alyammahi SMA, Alshehhi FAA, Aljneibi SAA, Alketbi SAO, Aly Hassan A. 2024. A novel two-stage immobilized bioreactor for biohydrogen production using a partial microalgal-bacterial (*Chlorella vulgaris* and wastewater activated sludge) co-culture. *Sustainable Energy Technologies and Assessments* 62:103624.

John, E.M., Krishnapriya, K., Sankar, T.V., 2020. Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium. *Aquaculture* 526, 735390.

KHERARBA M, 2013. Contribution à la culture des espèces de microalgues d'eau douce aquacole (*Chlamydomonas* sp. *Scenedesmus* sp. Mémoire de fin d'étude, Ecole Nationale Supérieure de Sciences de la Mer et d'Aménagement du Littoral.

Kholssi, R., Riouchi, O., Douhri, H., Debdoubi, A., 2023. Microalgae as a sustainable energy source: Growth and lipids production of *Nitzschia* sp., *Nannochloropsis* sp., and *Tetraselmis* sp. from Mediterranean seawater. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 50, 102720.

Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., Ruan, R., 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology* 291, 121934.

Ma R, Xie S, Jia H, Pu L, Peng L, Ge C. 2022. Nutritional Profile and Bioremediation of Tropical Marine Aquaculture with an Integrated Microalgae and Bacteria Symbiosis. *Water, Air, & Soil Pollution* 233:172.

Mahmoud RH, Kirah K, Gomaa OM. 2024. Light-induced aquaculture wastewater valorization, nutrient recovery, and microalgae biomass production in a biocathode-assisted microbial fuel cell. *Bioresource Technology Reports* 25:101733.

Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., Lopez-Elias, J.A., Porchas-Cornejo, M.A., 2014. 24 - Bioremediation of Aquaculture Effluents. In: Das, S. (Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, Oxford, pp. 539-553.

- Mehariya, S., Das, P., Thaher, M.I., Abdul Quadir, M., Khan, S., Sayadi, S., Hawari, A.H., Verma, P., Bhatia, S.K., Karthikeyan, O.P., Zuurro, A., Al-Jabri, H., 2024. Microalgae: A potential bioagent for treatment of emerging contaminants from domestic wastewater. *Chemosphere* 351, 141245.
- Meril, D., Piliyan, R., Perumal, S., Sundarraj, D.K., Binesh, A., 2022. Efficacy of alginate immobilized microalgae in the bioremediation of shrimp aquaculture wastewater. *Process Biochemistry* 122, 196-202.
- Minhas, L., Mumtaz, A., Kaleem, M., Waqar, R., Annum, J., 2023. A Prospective Study on Morphological Identification and Characterization of Freshwater Green Algae Based on the Microscopic Technique in District Rawalpindi. *Pakistan Journal of Agricultural Research* 36.
- Mishra, B., Tiwari, A., Mahmoud, A.E.D.J.C.T., Policy, E., 2022. Microalgal potential for sustainable aquaculture applications: bioremediation, biocontrol, aquafeed. 1-13.
- Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology* 99, 3949-3964.
- Mujtaba, G., Lee, K., 2017. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water Research* 120, 174-184.
- Mujtaba, G., Rizwan, M., Lee, K., 2017. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 49, 145-151.
- Nasir, N.M., Jusoh, A., Manan, H., Kasan, N.A., Kamaruzzan, A.S., Wan Abdul Karim Ghani, W.A., Kurniawan, S.B., Lananan, F., 2023. Utilization of microalgae, *Chlorella* sp. UMT LF2 for bioremediation of *Litopenaeus vannamei* culture system and harvesting using bio-flocculant, *Aspergillus niger*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 47, 102596.
- Niu, S., Xie, J., Wang, G., Li, Z., Zhang, K., Li, H., Xia, Y., Tian, J., Yu, E., Xie, W., Gong, W., 2024. Community assembly patterns and processes of bacteria in a field-scale aquaculture wastewater treatment system. *Science of The Total Environment* 907, 167913.
- Ryu B-G, Kim EJ, Kim H-S, Kim J, Choi Y-E, Yang J-W. 2014. Simultaneous treatment of municipal wastewater and biodiesel production by cultivation of *Chlorella vulgaris* with indigenous wastewater bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19:201-210.

Santos-Ballardo, D. U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R. V., Rendón-Unceta, M., Caro-Corrales, J., & Valdez-Ortiz, A. (2015). A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*, 448, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>

Sarma, U., Hoque, M.E., T, A., V, N., Rajagopal, S., 2024. Microalgae in removing heavy metals from wastewater – An advanced green technology for urban wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 100444.

Shen, Y., Gao, J., Li, L., 2017. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. *Bioresource Technology* 243, 905-913.

Ullah, N., Mumtaz, A.S., Minhas, L.A., Kaleem, M., Waqar, R., Jabeen, A., Hanif, A., 2023. Morpho-taxonomic identification and seasonal correlation between algal diversity and water physico-chemical parameters in District Bajaur Khyber Pakhtunkhwa. 36, 193–206.

Wang X-W, Huang L, Ji P-Y, Chen C-P, Li X-S, Gao Y-H, Liang J-R. 2019. Using a mixture of wastewater and seawater as the growth medium for wastewater treatment and lipid production by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technology* 289:121681.

Yu, Q., Pei, X., Wei, Y., Naveed, S., Wang, S., Chang, M., Zhang, C., Ge, Y., 2023. The roles of bacteria in resource recovery, wastewater treatment and carbon fixation by microalgae-bacteria consortia: A critical review. *Algal Research* 69, 102938.

Zhang, B., Bian, Y., Chen, J., Zhang, Z., Sun, S., Yang, F., Lei, Z., Huang, W., 2023a. Nitrogen reclamation from aquaculture wastewater as potential fish feed additives via bacterial and algal-bacterial granular sludge systems. *Bioresource Technology Reports* 24, 101609.

ANNEXES n°1

Préparation de milieu BG11

Tableau a : Composition du milieu BG11 et de la Concentration de la solution mère

	Composants	Quantité, ml/l	Concentration de la solution mère, g/ 200 ml de H ₂ O	Concentration finale, mM
1	NaNO ₃	10	30	17,6
2	K ₂ HPO ₄	10	0,8	0,23
3	MgSO ₄ •7H ₂ O	10	1,5	0,3
4	CaCl ₂ •2H ₂ O	10	0,72	0,24
5	Acid citrique •H ₂ O	10	0,12	0,031
6	Citrate d'ammonium ferrique	10	0,12	0,021
7	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	10	0,02	0,0027
8	Na ₂ CO ₃	10	0,4	0,19
9	BG-11 Solution pour métaux traces	1		
10	Thiosulfate de sodium penta hydraté (milieu agar uniquement, stérile)	1	49,8	1

Tableau b : Solution Trace métallique du milieu BG11

Composants	Quantité, g/l	Concentration finale, mM
1 □ H ₃ BO ₃	2,86	46
2 □ MnCl ₂ •4H ₂ O	1,81	9
3 □ ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,22	0,77
4 □ Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,39	1,6
5 □ CuSO ₄ •5H ₂ O	0,079	0,3
6 □ Co (NO ₃) ₂ •6H ₂ O	49,4 mg/L	0,17

Préparation des milieux :

Milieux liquides :

1. A environ 900 ml de d'H₂O, ajouter les 9 premiers composants dans l'ordre indiqué tout en agitant continuellement (tableau 2)
2. Porter le volume total à 1 L avec de l'eau distillée.
3. Couvrir et stériliser le milieu par autoclavage (120°C, 20 min).

4. Laisser refroidir puis conserver à la température du réfrigérateur.

Milieux solides :

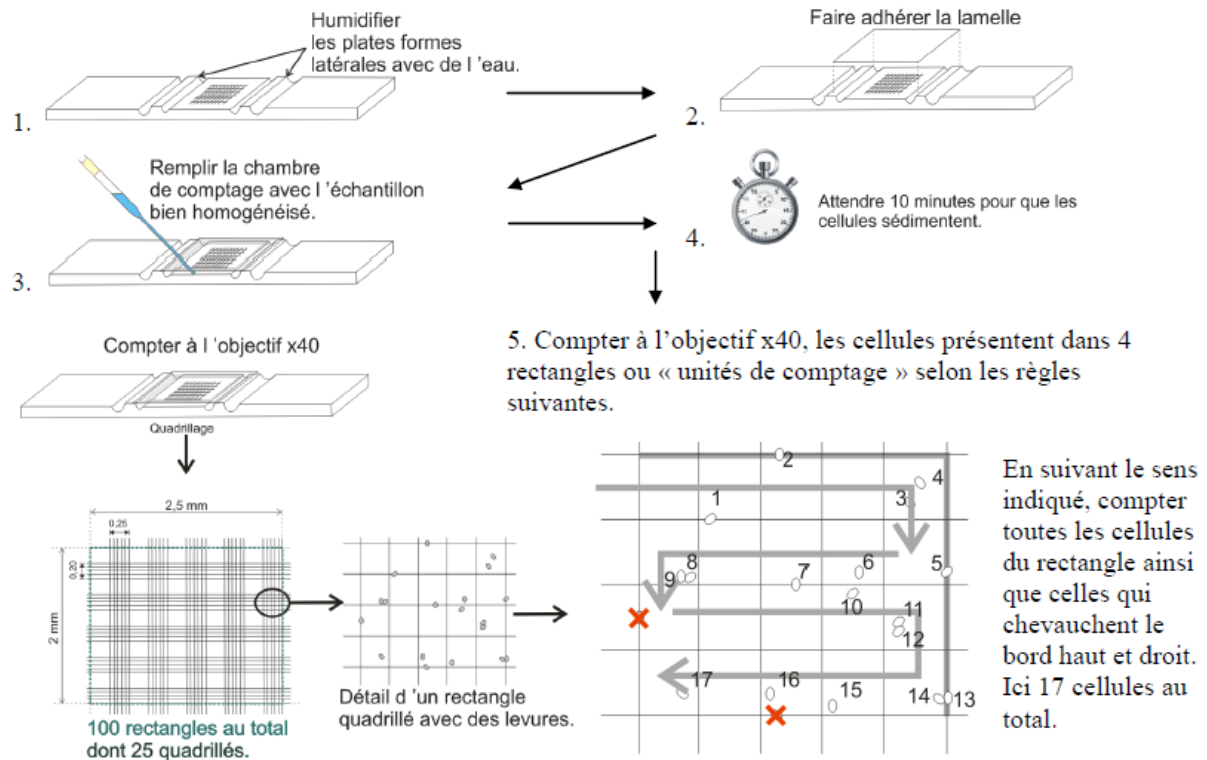
1. Dans environ 400 ml de d'H₂O, ajouter les 9 premiers composants dans l'ordre indiquétout en agitant continuellement (tableau 3).
2. Porter le volume total à 500 ml avec de l'eau distillée.
3. Dans un récipient séparé, ajouter 15 g d'agar à 500 ml d'eau distillée.
4. Couvrir et stériliser les deux solutions dans l'autoclave (120°C, 20 min).
5. Dans un bain-marie, laisser les deux solutions refroidies à 45-50°C.
6. Ajouter le thiosulfate de sodium stérile (par autoclavage, composant 10) à la solution d'agar et bien mélanger (tableauII.1)
7. Combiner les deux solutions d'agar et de liquide, bien mélanger. Noter que l'agar peut sesolidifier rapidement.
8. Laisser refroidir et conserver dans des boites des pétri à la température du réfrigérateur.

TECHNIQUE DE DENOMBREMENT

L'hématimètre de MALASSEZ : Numération directe

Un hématimètre est une lame spéciale, quadrillée, qui permet de dénombrer dans un volume précis et connu, tous les éléments visibles à l'objectif 40 du microscope (x400).

Mode opératoire :



Sur Malassez un rectangle ou unité de comptage contient $0,01 \text{ mm}^3$ c'est-à-dire $0,01 \mu\text{L}$ d'échantillon (rappel $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mL} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ L}$).

Calculs

Formule à appliquer :

$$N = \frac{n}{a \cdot v} \times Fd$$

Nombre de cellules par unité de volume

Nombre de cellules comptées

Facteur de dilution

Nombre d'unités de comptage dénombrées

Volume d'une unité de comptage

nombre de cellules par unité de volume

Exemple d'application :

Soit une suspension de levures diluée 1000 fois et dénombrée en cellule de Malassez. Le dénombrement de 4 rectangles donne les résultats suivant 17, 22, 15, et 20 cellules pour chaque unité de comptage (rectangle). Le volume d'une sous unité est $0,01 \text{ mm}^3$, si on veut le résultat en cellules/mL il faudra convertir le volume de l'unité de comptage en mL soit $0,01 \cdot 10^{-3} \text{ mL}$.

$$\text{Concentration} = \frac{N}{a \cdot v} \times Fd = \frac{(17 + 22 + 15 + 20)}{4 \times 0,01 \cdot 10^{-3}} \times 1000 = \frac{74}{4 \times 0,01 \cdot 10^{-3}} \times 1000 = 1,89 \cdot 10^9 \text{ cellules / mL}$$

Remarque : Il existe différents types d'hématimètres qui diffèrent de Malassez par le volume de l'unité de comptage ou par le nombre total d'unité de comptage. La formule pour le calcul est la même il faut juste adapter la valeur de v. Exemples : hématimètre de Thomas, cellule de Nageotte, cellule KovaSlide (analyse d'urines).

TAUX D'HUMIDITE

Afin de se rapprocher de cette concentration (0,4 g/l matière sèche), nous avons séché six répliquas de masses différentes afin d'en déduire leur humidité moyenne. Le détail de cette expérience est donné en annexe...

Le taux d'humidité est généralement calculé en déterminant la quantité d'eau présente dans une substance par rapport à sa masse totale. Voici les étapes courantes pour calculer le taux d'humidité :

1. **Pesée initiale** : Pesez un échantillon de la substance pour obtenir sa masse initiale (masse humide), notée M_{humide} .
2. **Séchage** : Séchez l'échantillon pendant une heure, dans l'étuve à une température de 105°C. Le but est de retirer toute l'eau contenue dans l'échantillon.
3. **Pesée finale** : Pesez l'échantillon sec pour obtenir sa masse après séchage (masse sèche), notée M_{sec} .
4. **Calcul du taux d'humidité** : Utilisez la formule suivante pour calculer le taux d'humidité :

$$Taux\ d'humidité(\%) = \frac{M_{humide} - M_{sec}}{M_{humide}} \times 100$$

- M_{humide} : la masse humide de l'échantillon en (g)
- M_{sec} : la masse sèche de l'échantillon en (g)

Tableau a : Représente le taux d'humidité calculé pour la boue activée

Poids (gramme)	Masse humide (g)	Masse sèche	Masse en eau (g)	Taux d'humidité (%)	Moyenne	Ecartype	Coefficient de variation (%)	Taux d'humidité
P1	0,2585	0,1136	0,1449	56,05415861	63,67	16,74465	26,29	0,636778184
P2	0,0471	0,0945	-0,0474	-				
P3	0,3391	0,0926	0,2465	72,69242111				
P4	0,1959	0,0783	0,1176	60,03062787				
P5	0,097	0,0689	0,0281	28,96907216				
P6	0,2457	0,0837	0,162	65,93406593				