

Centre Eau Terre Environnement

Variation du pH pour la production du Polyhydroxyalcanoate (PHA) à partir des boues secondaires de l'industrie des pâtes et papiers, avec renouvellement périodique des boues (50 et 75% v/v)

Par

Mohammed Adam El Bayoudi

Mémoire ou thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Bidiplomation INRS/ISHÉDD

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Drogui Patrick INRS
Examineur externe	Pr Fekhaoui Mohamed Institut scientifique de Rabat Écotoxicologie
Examineur interne	Pr Kokou Adjallé INRS
Directeur de recherche	Pr Rajeshwar Dayal Tyagi INRS
Codirecteur de recherche	Kamal El haji ISHÉDD

RÉSUMÉ

Dans la présente étude, les boues secondaires provenant de l'industrie de fabrication de pâtes et papiers ont été utilisées comme milieu de culture, pour produire du plastique biodégradable. Matériau naturel, le bioplastique pourrait remplacer le plastique conventionnel et contribuer grandement à la protection de la nature et l'environnement.

Le contenu de cette recherche comprend plusieurs évaluations de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) par culture microbienne mixte des boues activées (sans stérilisation). Plusieurs remplacements de boues fermentées de 50% et 75% (V/V) du volume de travail par des boues fraîches ont été expérimentés et analysés dans ce manuscrit.

Ensuite, quatre expériences ont été menées et leurs résultats ont été présentés dans la deuxième partie pour évaluer la capacité de stockage du PHA par les bactéries à différents pH (6,5-7-7,5 et 8).

Deux réacteurs de 15 litres ont été utilisés pour conduire ces expériences, maintenues à 30 degrés Celsius, et à une agitation entre 500 et 550 RPM ou TPM (tours par minute).

Le sodium d'acétate trihydrate est la seule source de carbone ajouté durant la fermentation pour augmenter l'accumulation accumuler du polyhydroxyalcanoates (PHA). En plus d'être utilisées comme une source de microorganismes, les boues secondaires activées de l'industrie de pâtes et papiers apportent également un supplément en carbone, en phosphore et en azote).

Des analyses physicochimiques (matière en suspension, concentration du PHA, l'oxygène dissous, etc.) et biologiques (unité de formation de colonie) ont été réalisées à la fin de chaque fermentation.

Parmi les différentes expériences menées au laboratoire, ce sont celles menées sous des conditions de pH autour de 7 et de concentration en acétate de 1 g/L, qui ont donné le plus d'accumulation de Polyhydroxyalcanoates. À 12 heures de fermentation (concentration de MES de 26.8 g/L), le maximum de PHA a atteint 69,9% (CDW) avec une concentration en PHA de 18,8 g/L. Il est à préciser que l'oxygène dissous a fluctué durant toute l'expérience en réponse à l'activité microbienne.

En fin, ce travail a démontré clairement la possibilité et le potentiel d'une production de PHA par culture microbienne mixte tout en contrôlant le pH à l'aide de l'acide acétique et du chlorure d'ammonium (comme source d'azote).

ABSTRACT

In the present study, secondary sludge from the pulp and paper manufacturing industry was used as a source of microorganisms to produce biodegradable plastic (PHA-PHB).

The entire process of this research includes several evaluations of PHA production by mixed microbial culture (CMM) of activated sludge. Replacements of fermented sludge of 50% and 75% (v/v) of the working volume by fresh sludge were tested and discussed in the first part of the results. Subsequently, four experiments were carried out and discussed in the second part to evaluate the storage capacity of the polymer at different pH (6.5-7-7.5 and 8).

Two 15-liter reactors were used to conduct these experiments, maintained at 30 degrees Celsius, and stirring between 500 and 550 rpm.

Sodium acetate trihydrate is the only source of carbon added during fermentation to accumulate polyhydroxyalkanoates (PHA). While secondary activated sludge from the pulp and paper industry provides the additional ratio of carbon, phosphorus, and nitrogen (as well as trace elements).

Physicochemical (suspended matter, PHA concentration, dissolved oxygen, etc.) and biological (colony formation unit) analyzes were carried out at the end of each fermentation.

Among the various experiments carried out in the laboratory, a neutral pH (7) as well as an acetate concentration of 1 g/L, proved to be the best combination to produce Polyhydroxyalkanoates with maximum accumulation. At 18 hours of fermentation (SS up to 26.8 g/L), the maximum PHA reached 69.9% (CDW) with a content of 18.8 g/L. Note that dissolved oxygen fluctuated throughout the experiment in response to microbial activity.

By the end, this work clearly demonstrates the possibility and potential of PHA production by CMM through a microbial PHA storage capacity, accompanied by pH control by acetic acid and ammonium chloride (4N).

TABLE DE MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DE MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	XI
SECTION I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1 INTRODUCTION	13
2 REVUE DE LITTÉRATURE	15
2.1 HISTORIQUE DU PHA ET SON POLYMÈRE LE POLY (3-HYDROXYBUTYRATE).....	15
2.2 PRODUCTION DE POLYHYDROXYALCANOATES (PHA).....	16
2.3 PRODUCTION DE PHA PAR CULTURE MIXTE.....	17
2.4 CARACTÉRISATION DES BIOPOLYMÈRES PHA.....	18
2.5 LES DIFFÉRENTS MILIEUX À CULTURE MIXTE POUR LA PRODUCTION DU PHA.....	19
2.6 FACTEURS INFLUENÇANT L'ACCUMULATION DU PHA.....	21
2.6.1 <i>Source de carbone</i>	21
2.6.2 <i>Variation de l'oxygène dissous</i>	22
2.6.3 <i>Variation du pH</i>	23
2.6.4 <i>Ratio C:N</i>	25
2.7 COÛT DE PRODUCTION DU BIOPOLYMÈRE PHA.....	25
2.8 GESTION DES BOUES SECONDAIRES DE L'INDUSTRIE DE PÂTES ET PAPIERS.....	26
SECTION II :	
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	28
1 OBJECTIFS DE RECHERCHE	29
1.1 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	29
2 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	29
SECTION III: DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE	31
1 PROCESSUS DE FERMENTATION ET D'ANALYSES	33
1.1 ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION DU SUBSTRAT DE CULTURE.....	33
1.2 MISE EN MARCHÉ DE LA FERMENTATION.....	34
1.3 ANALYSES DES MATIÈRES SOLIDES EN SUSPENSION.....	35
1.4 ANALYSE DU CONTENU DE PHA.....	35
1.5 ANALYSE DES UFC.....	36
1.6 RÉCUPÉRATION DES DONNÉES DES PARAMÈTRES PHYSICOCHIMIQUES.....	36

SECTION VI:	37
RÉSULTATS, ANALYSES ET DISCUSSIONS	37
1 REMPLACEMENT DE 50 % ET 70% DE BOUES	38
1.1 VARIATION DE LA CONCENTRATION DES MES ET DU PHA	38
1.2 UNITÉS DE FORMATION DE COLONIE.....	47
1.3 CONSOMMATION D'ACÉTATE.....	49
1.4 PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES.....	51
2 ÉTUDE DU PH 6.5 ET 7	54
2.1 MATIÈRE EN SUSPENSION	54
2.2 ANALYSE DU PHA.....	55
2.3 ANALYSE DES UFC.....	58
2.4 CONSOMMATION D'ACÉTATE.....	59
2.5 PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES.....	60
3 ÉTUDE DE LA VARIATION DU PH 7.5 ET 8	62
3.1 MATIÈRE EN SUSPENSION	62
3.2 ANALYSE DU PHA.....	63
3.3 ANALYSE D'UFC.....	64
3.4 CONSOMMATION D'ACÉTATE.....	65
3.5 PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES.....	66
4 CONSLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	68
5 BIBLIOGRAPHIE	69

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	GRANULES DE PHA OBSERVES PAR MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DANS DIFFERENTES CELLULES BACTERIENNES ISOLEES DE DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS....	16
FIGURE 2	STRUCTURE CHIMIQUE DU POLYHYDROXYBUTYRATE (PHA)	18
FIGURE 3	VARIATION DE LA CONCENTRATION DES MES ET DU PHA DES REACTEURS DE CONTROLE ET DE REMPLACEMENT DE BOUES DE 50% ET 75%(V/V) EN FONCTION DU TEMPS (H)	38
FIGURE 4	UNITE DE FORMATION DE COLONIE (LOG 10) DES REACTEURS DE REMPLACEMENTS DE BOUES DE 50 ET 75%, ET DE CONTROLE EN FONCTION DU TEMPS (H).....	47
FIGURE 5	CONSOMMATION TOTALE D'ACETATE (G/L) ET IONS D'ACETATE DES REACTEURS A REMPLACEMENT DE BOUES DE 50 ET 75%, ET LE REACTEUR DE CONTROLE.....	50
FIGURE 6	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A REMPLACEMENT DE BOUES DE 50%	51
FIGURE 7	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR DE CONTROLE	52
FIGURE 8	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A REMPLACEMENT DE BOUES DE 75%	53
FIGURE 9	VARIATION DE LA MATIERE EN SUSPENSION (G/L) DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7 EN FONCTION DU TEMPS (H), AVEC LES PERIODES D'ADDITION DE SODIUM D'ACETATE	54
FIGURE 10	VARIATION DU POURCENTAGE (CDW) ET DE LA CONCENTRATION (G/L) DE PHA DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7 AVEC LES PERIODES D'ADDITION DU SODIUM D'ACETATE	56
FIGURE 11	UNITE DE FORMATION DE COLONIES (LOG 10) DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7 EN FONCTION DU TEMPS (H)	58
FIGURE 12	CONSOMMATION D'ACETATE (G/L) ET TAUX DE CONSOMMATION D'IONS D'ACETATE (G/L) DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7.....	60

FIGURE 13	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A PH 6.5.....	60
FIGURE 14	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A PH 7.....	61
FIGURE 15	VARIATION DE LA MATIERE EN SUSPENSION (G/L) DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8 EN FONCTION DU TEMPS (H), AVEC LES PERIODES D'ADDITION DE SODIUM D'ACETATE	62
FIGURE 16	VARIATION DU POURCENTAGE (%) ET DE LA CONCENTRATION (G/L) DE PHA DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8 AVEC LES PERIODES D'ADDITION DU SODIUM D'ACETATE	63
FIGURE 17	UNITE DE FORMATION DE COLONIES (LOG 10) DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8 EN FONCTION DU TEMPS (H)	64
FIGURE 18	CONSOMMATION D'ACETATE (G/L) ET LE TAUX DE CONSOMMATION D'IONS D'ACETATE (G/L) DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8.....	66
FIGURE 19	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A PH 7.5.....	66
FIGURE 20	VARIATION DU PH, DE L'AGITATION (RPM), DU FLUX D'OXYGENE (L/MIN), DE L'OXYGENE DISSOUT (%) ET DE LA TEMPERATURE (C°) EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A PH 8.....	67

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1	MONTRANT PLUSIEURS RESULTATS DE DIFFERENTES EXPERIENCES AVEC DIFFERENTS SUBSTRATS ET SYSTEMES D'AERATION	20
TABLEAU 2	RESULTATS DES OBSERVATIONS DES BOUES SECONDAIRES RECOLTEES DE L'USINE DE PATES ET PAPIERS	33
TABLEAU 3	RECAPITULATIF DE LA VARIATION DE LA MATIERE EN SUSPENSION (G/L) EN FONCTION DU TEMPS DU REACTEUR A REMPLACEMENT DE BOUE DE 50%	40
TABLEAU 4	RECAPITULATIF DE LA VARIATION DE LA MATIERE EN SUSPENSION (G/L) EN FONCTION DU TEMPS DU REACTEUR DE CONTROLE	41
TABLEAU 5	RECAPITULATIF DE LA VARIATION DE LA MATIERE EN SUSPENSION (G/L) EN FONCTION DU TEMPS DU REACTEUR DE CONTROLE	42
TABLEAU 6	RECAPITULATIF DU POURCENTAGE (CDW) ET DE LA CONCENTRATION (G/L) DE PHA EN FONCTION DU TEMPS DU REACTEUR DE CONTROLE.....	43
TABLEAU 7	RECAPITULATIF DE LA VARIATION DE LA MATIERE EN SUSPENSION (G/L) EN FONCTION DU TEMPS DES REACTEURS A REMPLACEMENT DE BOUE DE 75% AVEC LES PERIODES D'ADDITION DE SODIUM D'ACETATE	44
TABLEAU 8	RECAPITULATIF DU POURCENTAGE (%) ET DE LA CONCENTRATION (G/L) DE PHA EN FONCTION DU TEMPS DES REACTEURS A REMPLACEMENT DE BOUES DE 75 %.....	46
TABLEAU 9	RECAPITULATIF DU CALCUL DES UNITES DE FORMATION DE COLONIES EN FONCTION DU TEMPS (H) DU REACTEUR A CHANGEMENT DE BOUES DE 50%	48
TABLEAU 10	RÉCAPITULATIF DU CALCUL DES UNITÉS DE FORMATION DE COLONIES EN FONCTION DU TEMPS DU RÉACTEUR DE CONTRÔLE.....	48
TABLEAU 11	RÉCAPITULATIF DU CALCUL DE L'UNITÉ DE FORMATION DE COLONIE EN FONCTION DU TEMPS (H) DU RÉACTEUR À CHANGEMENT DE BOUES DE 75 %.....	49
TABLEAU 12	RECAPITULATIF DES VALEURS DE LA MES EN FONCTION DU TEMPS (H) DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7 AVEC LES PERIODES D'ADDITION DE SODIUM D'ACETATE ..	55
TABLEAU 13	RECAPITULATIF DU POURCENTAGE (%) ET DE LA CONCENTRATION (G/L) DE PHA EN FONCTION DU TEMPS DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7.....	56

TABLEAU 14	UNITE DE FORMATION DE COLONIE (LOG 10) DES REACTEURS A PH 6.5 ET 7 EN FONCTION DU TEMPS (H).....	58
TABLEAU 15	RECAPITULATIF DES VALEURS DE LA MES EN FONCTION DU TEMPS (H) DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8 AVEC LES PERIODES D'ADDITION DE SODIUM D'ACETATE ..	63
TABLEAU 16	RECAPITULATIF DU POURCENTAGE (%) ET DE LA CONCENTRATION (G/L) DE PHA EN FONCTION DU TEMPS DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8.....	64
TABLEAU 17	UNITE DE FORMATION DE COLONIE (LOG 10) DES REACTEURS A PH 7.5 ET 8 EN FONCTION DU TEMPS (H).....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

PHB-PHV : Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxyvalerate

DBO : demande biologique en oxygène

C : N : rapport Carbone à azote (mol/mol)

C : P : rapport carbone/phosphore (mol/mol)

P/p : Poids par poids

CDW : poids sec des cellules

CG : glycérol brut

DCO : demande chimique en oxygène

OD : Oxygène dissout

GAO : Organismes accumulant du glycogène

HRT : Temps de rétention hydraulique

MN : numéro de distribution de la masse moléculaire

MW : poids moléculaire

PAO : Organismes accumulant du phosphate

PHA : polyhydroxyalcanoate

PHAAO : organismes accumulateurs de PHA

PHB : polyhydroxybutanoïque

RBS : réacteur à batch séquentiel

SRT : temps de rétention solide

STEP : station d'épuration

VSS : Solides volatiles en suspension

MES : Matières solides en suspension

SECTION I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 INTRODUCTION

Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) sont des biopolymères clés possédants le potentiel de remplacer les plastiques conventionnels produits à partir du pétrole, source de menaces pour l'environnement terrestre et aquatique aux quatre coins du monde.

Les principaux avantages de ces biopolymères résident dans le fait qu'ils offrent des propriétés, surtout physiques similaires à celles de nombreux plastiques dérivés de la pétrochimie. Les PHAs possèdent aussi la faculté de biodégradation complète dans tous les milieux naturels (Kim et *al.*, 1994 ; Lee et Yu, 1997 ; Chua et *al.*, 2003).

En plus de créer une économie verte, la production du PHA, permet aussi de réduire les quantités de déchets industriels tels que les rejets liquides (boues) des usines de production de pâtes et papiers. Ces effluents seront réutilisés sous une perspective de biovalorisation, réduisant ainsi les coûts de traitement, et créant une nouvelle façon de recycler le carbone grâce à la conversion des polluants organiques des déchets en produits de valeur.

La valeur économique du PHA est telle que, même après plusieurs années de recherches, le coût de production global demeure élevé (Poorna Chandrika et *al.*, 2020). Les coûts de production élevés de PHA ont été associés d'une part à la forte demande d'énergie requise pour la stérilisation à haute température utilisant la vapeur surchauffée et l'aération intensive sous pression, et d'une autre à la croissance lente des micro-organismes et des processus de production discontinus (K. Sudesh et *al.*, 2000 ; L.S. Serafim, 2008). La fermentation par culture mixte promet de réduire (en partie) le coût en proposant des méthodes et techniques de production beaucoup moins chère que celles que propose les méthodes nécessitant une stérilisation.

Problématique

Selon Justyna Mozejko-Ciesielska, la production globale de plastique (dans le monde), a atteint 299 millions de tonnes en 2013 dont seulement 2% ne proviennent pas des combustibles fossiles pétroliers. Avec un large éventail d'application, le plastique conventionnel représente une sérieuse problématique pour les procédés d'élimination et du recyclage particulièrement à cause de sa non-dégradabilité. La majorité de ce plastique se ramasse dans les océans du monde (Pham et *al.*, 2014 ; Ryan, 2015).

Les scientifiques et les chercheurs à travers le monde ont tenté de trouver des solutions durables et économiques à cette problématique en produisant du PHA et ses différents polymères. Plusieurs méthodologies et technologies (traitements chimiques, thermique et mécanique ; Feast/Famine ; ... etc.) ont été essayées et différents substrats ont été étudiés.

Les produits alimentaires comme les huiles de colza et de palme (Dai et *al.*, 2007, Dionisi et *al.*, 2005) ont été fermentés, mais pour des raisons sociales et éthiques, la communauté scientifique s'est tournée vers d'autres alternatives, notamment les boues secondaires et les effluents organiques de différentes natures et provenances. Contrairement aux boues secondaires des stations d'épuration, les boues secondaires de l'industrie de fabrication de pâtes et papiers ont montrées un potentiel de production très intéressant (S.Yan et *al.*, 2006).

Il est évident que chaque technique présente des avantages et des inconvénients, notamment en ce qui concerne la productivité, la complexité et le coût. La fermentation par souche pure nécessite des manipulations et des techniques beaucoup plus compliquées et fastidieuses (maintenir la stérilisation tout au long de la fermentation) qu'une fermentation par culture mixte. Mais le rendement de la fermentation à souche pure est régulier, et produit un polymère de qualité supérieur à celui de la culture mixte (L. Durso et *al.*,2003).

Nous avons opté pour une fermentation par culture mixte, combinant à la fois productivité et économie. Il s'agit, en fait, de l'utilisation des boues secondaires des industries de pâtes et papiers (riche en microorganismes et nutriments) issues du traitement biologique, avec un ajout de sodium d'acétate comme source supplémentaire de carbone.

Par ce travail, nous comptons répondre aux exigences du concept du développement durable, c'est-à-dire, participer à la création d'une économie verte, réduire la pollution de l'environnement et protéger par conséquent la santé humaine et les ressources naturelles.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

Pour être en cohérence avec le processus évolutif de la science, j'ai eu recours à une revue de littérature afin de déterminer l'état d'avancement des connaissances dans mon champ d'activité, et enfin de compte pour que cela me permette d'affiner mes objectifs, d'émettre mon hypothèse de travail et de me positionner par rapport aux autres chercheurs travaillant sur le même sujet.

2.1 Historique du PHA et son polymère le poly (3-hydroxybutyrate)

Comme mentionné préalablement, l'étude du biopolymère PHA a été initiée en 1970 selon l'étude menée par Chen en 2009. Le PHA a tout de suite été abordé comme substituant du plastique conventionnel notamment dans les domaines les plus susceptibles comme la médecine et le secteur d'alimentation.

Cependant, Le poly (3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] est le biopolymère le plus abondant. Il a été décrit pour la première fois en 1926 par Lemoigne, un scientifique français (Doi Y, 1990). Depuis lors, diverses souches bactériennes comme les archéobactéries (Doi Y, 1990), les bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que les bactéries photosynthétiques (Jiun-Yee Chee et *al.*, 2010) ont été identifiées comme accumulateur de P(3HB), à la fois de façon aérobie et anaérobie. Après, Macrae et Wilkinson ont remarqué que la bactérie *Bacillus megaterium* a amorcé l'accumulation d'homopolymère P(3HB) lorsque le rapport glucose/azote dans le milieu de culture était élevé (Macrae RM et Wilkinson JF, 1958) et la dégradation intracellulaire subséquente du P(3HB) s'est produite dans l'absence de carbone et de source d'énergie. La reconnaissance du rôle du P(3HB) en tant que polymère de stockage bactérien possédant une fonction presque similaire à l'amidon et au glycogène a été acceptée seulement en 1973 (Dawes EA et Senior PJ, 1973). Après sa confirmation comme étant un précieux matériau de stockage bactérien, l'idée de la singularité du monomère 3HB en tant que seul constituant de ce polymère a changé lorsque d'autres types de monomères ont été découverts dans les années suivantes. Depuis lors, beaucoup de nouvelles souches bactériennes ont été rapportées comme productrices de PHA ou un de ces polymères. En 2018, la production des biopolymères a augmenté de 35% pour atteindre un marché total de 5 milliards de dollars (Gumel et *al.*, 2013), avec une production mondiale de bioplastiques qui devrait passer d'environ 2,11 millions de tonnes en 2019 à environ 2,43 millions de tonnes en 2024 (European bioplastics conference, 2019).

2.2 Production de Polyhydroxyalcanoates (PHA)

Les polyhydroxyalcanoates sont une famille des biopolyesters produits par de nombreuses bactéries sous forme granulaire (Figure 1) jouant le rôle d'un stockage intracellulaire de carbone et source d'énergie combattant la famine. Pour de nombreuses bactéries, les PHA fournissent aussi une résistance contre la carence du milieu ou à l'apport insuffisant d'une ou de plusieurs substances nécessaires à leur croissance et équilibre, permettant ainsi aux bactéries de survivre dans les conditions les plus défavorables. (R.A.J. Verlinden et *al.*, 2007).

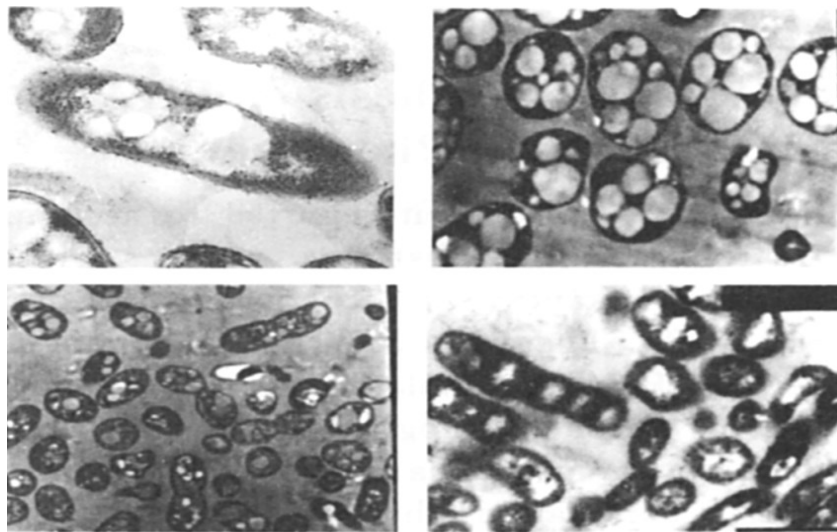


Figure 1 Granules de PHA observés par microscope électronique à balayage dans différentes cellules bactériennes isolées de différents environnements

Le Polyhydroxybutyrate (ou le poly- (R) -3-hydroxybutyrate, abrégé en PHB) a été le premier polymère de PHA découvert et méticuleusement étudié. En 1991, plus de 150 structures monomères ont été rapportées ; une telle variation dans les structures des monomères a donné lieu à des propriétés flexibles et diverses allant du fragile et élastique, jusqu'au collante (Chen et *al.*, 1991).

Parmi Les biopolymères les plus étudiés, on trouve le PHA, l'acide polylactique (PLA), le poly (butylène succinate) (PBS), le polyéthylène (PE), le poly (téréphtalate de triméthylène) (PTT) et le poly (p-phénylène) (PPP). Cela dit, le PHA est le seul biopolymère connu à ce jour pouvant être synthétisé dans un environnement peu exigeant, car d'autres nécessitent de l'eau libre, une catalyse des métaux, et une température élevée (Chen, 2009) La production du PHA est considérée comme la plus simple parmi tous les autres biopolymères (Chen, 2009). Et parmi les substrats qui paraissent des plus intéressants, les boues secondaires des différentes industries semblent se frayer un chemin dans les essais et les expériences scientifiques grâce à leurs incroyables potentiels en tant que porteurs d'une très riche diversité

microbienne, et un nombre important d'éléments nutritifs (comme le carbone, l'azote et le phosphore).

2.3 Production de PHA par culture mixte

L'utilisation d'une culture bactérienne mixte préalablement présente dans les boues secondaires activées a été proposée. En effet, la littérature témoigne de l'importance de cette perspective de recherche par le nombre de publications lié à la bioconversion des boues secondaires activées en bioplastique (S.Venkata Mohan et *al.*, 2013 ; J.C.Fradinho et *al.*, 2016).

Les PHA sont généralement produites par divers microorganismes qui les synthétisent et stockent dans des granules intracellulaires, appelés carbonosomes (Albuquerque et *al.*, 2010) et ce, en particulier durant le procédé d'élimination des phosphores biologiques (Mino et *al.*, 1998).

Durant ce procédé, les microorganismes se trouvant dans les boues activées consomment des polyphosphates comme source d'énergie. Cette énergie sera immédiatement mise à disposition pour l'absorption anaérobie de substrats de carbone qui seront ensuite stockés temporairement sous forme de PHA. En présence abondante d'oxygène, le PHA stocké sera utilisé pour la croissance et la régénération des polyphosphates (R. D. Tyagi et *al.*, 2007). Les microorganismes dans les boues activées de l'industrie de pâtes et papiers devraient donc être capables d'éliminer les phosphates et accumuler du PHA.

Contrairement à la production de PHA par cultures pures, l'utilisation de culture mixte réduirait les coûts, car un procédé de contrôle plus simple et des conditions non stériles sont requis. En outre, une culture mixte peut facilement s'adapter aux changements des différentes sources de carbone permettant une plus grande variété de substrats pouvant être utilisés à cette fin (Cavaillé et *al.*, 2016 ; Reddy et Mohan, 2012). En effet, diverses matières premières complexes, y compris les déchets organiques comme les boues secondaires, peuvent être utilisées comme substrat (Serafim et *al.*, 2008 ; Dias et *al.*, 2006 ; Albuquerque et *al.*, 2011 ; Bengtsson et *al.*, 2008 ; Dai et *al.*, 2007 ; Kleerebezem et van Loosdrecht, 2007 ; Reis et *al.*, 2003).

Gurieff et Lant (2007) ont évalué l'économie et l'empreinte carbone de la production de PHA en culture mixte en utilisant des eaux usées industrielles comme matière première, et ont constaté que les bioplastiques à base de polyhydroxyalcanoates issus de la production de PHA étaient préférables à la conversion des matières organiques en biogaz, et étaient financièrement attractifs par rapport à la production de PHA en culture pure. Tandis que les

deux processus de production de PHA avaient des empreintes carbone similaires qui étaient significativement inférieures à la production de polyéthylène à haute densité (PEHD).

Dans cette perspective, l'idée de la production de PHA par la bioconversion des boues activées de l'industrie pâtes et papiers a été initiée.

2.4 Caractérisation des biopolymères PHA

Parmi les biopolymères les plus connus jusqu'à présent, les acides gras polyhydroxylés et les polyhydroxyalcanoates sont les plus importants. Les polyhydroxyalcanoates sont chimiquement des polyesters accumulés aux niveaux intracellulaires par des bactéries, qui les utilisent comme source d'énergie dans des conditions de famine et de stress comme mentionné préalablement. Ces polymères sont constitués d'acides hydroxyalcanoïques. Les unités des monomères peuvent se constituer d'un acide 3-hydroxyalcanoïque ou d'un substitut complexe d'acides 4- ou 5- hydroxyalcanoïques. Le PHA semblablement aux autres polymères, peut se présenter sous forme d'un homopolymère ou d'un copolymère selon la composition de ses monomères. Les PHA sont des polyesters aliphatiques optiquement actifs. Dans la structure représentée sur la figure 2, le groupe remplaçable peut être un groupe méthyle, un groupe éthyle, un groupe propyle donnant respectivement le nom au polymère polyhydroxybutyrate, au polyhydroxyvalérate et au polyhydroxyhexanoate (Saurabh Kumar Ram, 2015).

D'un autre côté, le polymère le plus caractérisé est le polyhydroxybutyrate (PHB). Avec une structure isotactique complètement linéaire, le PHB est hautement cristallin (60-70%) (Endres et Siebert-Raths, 2011). Cela rend le PHB très fragile pour certaines applications. Il présente aussi une diminution dans sa résistance mécanique à cause de sa cristallisation secondaire et la perte de ses plastifiants au fil du temps.

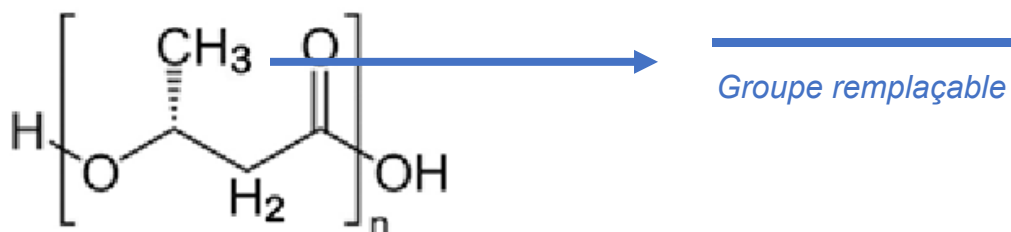


Figure 2 Structure chimique du Polyhydroxybutyrate (PHA)

Pour surmonter ces problématiques, ce polymère peut être substitué par des polymères plus ramifiés et structurés dans un état cristallin et plus ductiles, arrivant à la résistance requise. La première application commerciale du polymère servait de copolymère de PHB-PHV pour la fabrication des bouteilles. Les PHA sont généralement insolubles dans l'eau et

biologiquement dégradables. Ils montrent aussi une bonne résistance à la pénétration de l'oxygène, servant ainsi comme des matériaux d'emballage pour les produits périssables (Saurabh Kumar Ram, 2015).

2.5 Les différents milieux à culture mixte pour la production du PHA

Il existe plusieurs milieux de cultures susceptibles de favoriser l'accumulation du PHA par les bactéries. Les milieux favorables à la production d'un maximum de PHA sont ceux qui se caractérisent généralement par une grande teneur de composés carboniques et un certain rapport d'azote et de phosphore (C/N).

Présentement, beaucoup d'efforts et d'énergie ont été déployés pour développer un procédé de production de PHA à partir des déchets riches en matières organiques tels que les boues d'épuration, les déchets solides et les eaux usées industrielles (Jiang *et al.*, 2007; Bengtsson, 2008; Jiang, 2012;). D'une autre part, les scientifiques ont essayé toute sorte de milieux tels que l'huile de palme comme il a été reporté dans les travaux de Din *et al.*, 2006. Ils ont réussi à avoir un pourcentage de 44.5 de PHA. Les mélasses ont été aussi étudiées par Bengtsson *et al.*, 2010 et Albuquerque *et al.*, 2007 comme sources de carbone complexes. Respectivement, ils ont atteint un pourcentage de 32% et 33%, avec un rendement ($Y_{p/s}$) de 0.63 et 0.65 respectivement. Certains déchets alimentaires ont aussi fait l'objet d'une étude approfondie, arrivant à 60% de PHA et un rendement de 0.29 (Rhu *et al.*, 2003). Le tableau numéro 1 synthétise d'importants milieux de production de PHA par culture mixte, ainsi que la teneur (%) en PHA dans chaque étude.

Tableau 1 Montrant plusieurs résultats de différentes expériences avec différents substrats et systèmes d'aération

Système	Substrat	Rendement Yp/s	PHA %	Référence
Aérobie	Boues de pâtes et papiers		67.6	(D. Querios) et al., 2014)
Aérobie	Acétate	0.87	65	(Serafim et al., 2004)
Anaérobie	Déchets alimentaires	0.29	60	(Rhu et al., 2003)
Aérobie	Huile de palme	1	54	(Dionisi et al., 2005)
Aérobie	Boues de pâtes et papiers	0.71	48.2	(Bengtsson et al., 2008)
Aérobie	E.U des tomates en conserve	0.83	45	(Gurieff, 2007)
Aérobie	Huile de palme		44.5	(Din et al., 2006)
Aérobie	Acétate	0.85	41	(Dai et al., 2007)
Aérobie	Eaux usées municipales	0.94	40	(Coats et al., 2007)
Aérobie	Mélasses	0.65	37	(Bengtsson et al., 2010)
Aérobie	Mélasses	0.63	33	(Albuquerque et al., 2007)
Aérobie	Boues primaires municipales	0.84	32	(Gurieff, 2007)
Anaérobie/ Aérobie	Acétate	0.78	31	(Dai et al., 2007)

Aérobic	Effluents de papiers	0.64	42	(Bengtsson et <i>al.</i> , 2008)
Aérobic	Boues de pâtes et papiers		43	(S. Yan et <i>al.</i> , 2016)

2.6 Facteurs influençant l'accumulation du PHA

2.6.1 Source de carbone

Étant le facteur le plus limitant dans l'accumulation du PHA, il est extrêmement important d'étudier les différentes sources de carbone disponibles et accessibles pour la production du PHA. Parmi ces substrats, le glucose et l'acétate se font remarquer pour leurs structures carbonatées simples et leurs liaisons faciles à briser par les bactéries, contrairement aux sources de carbones complexes qui se distinguent par de longues chaînes de carbone et des liaisons plus ou moins rigides.

Plusieurs études ont montré que l'acétate et le glucose comme source de carbone sont grandement susceptibles de maximiser l'accumulation du PHA par les microorganismes. Dans les conditions limites du substrat (boues de pâtes et papiers), un ajout de 0,25 à 1.0 g d'acétate de sodium a favorisé l'accumulation du PHA en arrivant à sa concentration maximale. Elle a chuté après à cause de la limitation de la source du carbone.

Dans un modèle où l'acétate de sodium est abondant (entre 1.5 et 2.5 g/L), la croissance de la biomasse et l'accumulation du PHA se sont produites simultanément jusqu'à 24 h de fermentation. La concentration maximale de PHA de 43.06% a été obtenue à une concentration d'acétate de 1.0 g/L d'acétate de sodium, et ceci pendant 16h de fermentation (S. Yan, et *al.*, 2006).

D'autre part, le glucose en tant que sucre simple, a été l'un des premiers substrats qui ont été étudiés. Plusieurs concentrations de glucose ont été expérimentées pour la production du bioplastique. De 0,25 jusqu'à 2.5 g/L, en passant par 0.5, 1.0, 1.5 et 2 g/L.

Une expérience a été réalisée sur 4 types de boues secondaires activées : Boues activées municipales (MAS), boues activées laitières (DAS), boues activées d'amidon (SAS) et boues activées de pâtes et papiers (PAS). L'étude a montré que contrairement à l'acétate de sodium, le glucose ne représente aucun inconvénient relatif à l'inhibition, ce qui est le cas de l'acétate. Cependant, le pourcentage de concentration du PHA est grandement insignifiant par rapport

à l'acétate (3.66%). Aussi, le temps requis pour un maximum d'accumulation de PHA est de 24 heures, plus de 8 heures que le temps requis pour l'acétate (S. Yan, R.D. Tyagi et R.Y. Surampalli, 2006).

Une autre étude de production du PHA a été effectuée par Takabatake et *al.*, 2002 en utilisant 18 échantillons de boues secondaires activées récupérées de 4 stations de traitement des eaux usées, réalisées sous des conditions d'aérobie avec un excès d'acétate trihydrate comme unique source de carbone. La plus grande teneur en PHA obtenue était de 29,5%. La plus basse concentration est de 6,0% ainsi qu'une moyenne de 18,8% (p/p).

2.6.2 Variation de l'oxygène dissous

L'oxygène dissous est l'un des paramètres les plus importants et les plus étudiés pour l'accumulation de PHA. La présence ou l'absence d'oxygène entraîne une modification significative du métabolisme complet et éventuellement, de la production globale de PHA. La différence majeure a été démontrée par une étude récente utilisant une culture mixte par Reddy et Mohan (2012). L'étude a utilisé des modes aérobies et anoxiques d'accumulation de PHA en utilisant une culture enrichie pour assimiler les acides gras volatils générés dans le réacteur anaérobie producteur d'hydrogène. L'étude a été réalisée dans un flacon agité et a indiqué que le mode anoxique d'accumulation de PHA entraînait une quantité plus élevée (39,6% CDW) de PHA par rapport au mode aérobie (35,2% CDW) d'accumulation de PHA.

Senior et *al.*, (1972) ont signalé que la limitation de l'oxygène donne une teneur en polymère beaucoup plus élevée que la limitation de l'azote et que les quantités de polymère accumulées sont inversement proportionnelles au taux de croissance. L'étude explique que dans des conditions limitant l'oxygène, les électrons ne peuvent pas voyager à travers la chaîne de transport d'électrons vers l'oxygène, ainsi la synthèse de PHA agit comme des puits d'électrons.

L'enzyme protéase est impliquée dans la décomposition des molécules de protéines en acides aminés. Peu d'acides aminés peuvent être convertis en PHA par actions enzymatique. L'activité globale des protéases diminue au cours de la fermentation. En général, le micro-environnement anoxique présente une activité protéase plus faible que le micro-environnement aérobie. De même, la présence d'oxygène ou le type de micro-environnement affecte les taux d'absorption des acides gras volatils à la suite desquels le pH du milieu change. Ainsi, en conclusion, les environnements limitant l'oxygène favorisent fortement l'accumulation métabolique de PHA.

Pendant l'accumulation de PHA, il est recommandé d'avoir une activité protéasique élevée pour rendre les acides aminés disponibles pour une meilleure accumulation de PHA appelée

processus microaérophile-aérobie avec une boue activée acclimatée et une accumulation de PHA rapportée de 62% DCW. La communauté scientifique a estimé que dans l'étape anaérobie conventionnelle, l'énergie requise pour l'accumulation de PHA est limitée, tandis que dans la condition microaérophile, les microbes non PAO/GAO peuvent également accumuler du PHA et ainsi contribuer à une augmentation globale du PHA.

Pratt et *al.*, (2012) ont signalé la différence entre des fermentations à faible teneur en oxygène (0,2 mg/L) et à forte concentration (5,5 mg/L) utilisant une culture mixte pour accumuler du PHA à partir d'eaux usées synthétiques complétées par des aliments mélangés d'acétate et de propionate. Dans les deux cas, la teneur finale en PHA à la fin de la fermentation était la même (35% CDW).

Ainsi, la principale différence entre une concentration d'OD faible ou élevé est le taux d'accumulation de PHA. Dans les conditions de concentrations d'OD élevé, le taux d'accumulation de PHA est 2 à 3 fois plus rapide que dans les conditions de concentrations d'OD faible. Dans le cas de la fermentation à RBS, la présence d'OD régit la totalité de la phase de "Feast". Par conséquent, il est essentiel qu'une réponse de stockage ne soit observée que lorsque la phase de « feast » ne représente pas plus de 20% de la phase de réaction sous un régime RBS (Dionisi et *al.*, 2007).

En conclusion, le fait d'avoir des conditions limitantes en oxygène favorisera la production globale de PHA en termes de rendement, et une quantité inférieure de substrat est requise pour l'accumulation globale de PHA par rapport à l'homologue aéré. Les environnements microaérophiles réduisent l'activité de phosphatase qui, à son tour, favorise l'absorption du substrat pour l'accumulation de PHA. Une activité protéasique élevée nécessite de l'oxygène, il est donc préférable d'avoir un environnement microaérophile que des environnements anaérobies. Les unités de protéase bénéficieront d'acides aminés, qui à leur tour peuvent être convertis en intermédiaires PHA. La présence d'oxygène limitée aide à maintenir l'équilibre redox dans les microbes nécessaires pour la polymérisation de PHA. Une quantité minimale d'oxygène est requise pour maintenir des taux d'accumulation de PHA substantiels, car l'accumulation de PHA est plus lente dans le cas anaérobie que dans le cas aérobie. Ainsi, les conditions microaérophiles sont favorables en ce qui concerne le rendement du produit, mais les conditions aérobies peuvent donner des productivités plus élevées

2.6.3 Variation du pH

Parmi les paramètres responsables du taux de production global du PHA utilisant les boues activées, le pH se trouve en première place (Fang et *al.*, 2014). Durant tout le processus biochimique d'accumulation, il est le paramètre crucial affectant son efficacité en influençant

la population microbienne pendant les différentes phases d'acclimatation, d'absorption et d'assimilation d'acides gras volatils. Le processus d'accumulation du PHA est recommandé à pH neutre à légèrement basique. Il a été démontré que l'augmentation du pH de 8,5 à 9,5 est susceptible de modifier la composition du polymère plus vers HV que HB (Chen *et al.*, 2013).

Chua *et al.*, (2003) ont étudié l'effet du pH, du Temps de Rétention du Solide (TRS) et de la concentration d'acétate pour maximiser l'accumulation du PHA par les boues activées des installations de traitement des eaux usées des pâtes et papiers. Ils ont rapporté que l'accumulation du PHA dans un processus anaérobie-aérobie complété par de l'acétate atteignait une teneur en PHA d'environ 31%. Ils ont indiqué que l'accumulation de PHA était meilleure à pH basique de 8 qu'à pH acide de 6 en cause d'une meilleure dissociation de l'acétate au pH basique. Chen *et al.*, (2013) dans son étude a testé une gamme de pH de 5, 7, 9 et 11 et ont constaté que la génération d'acides gras volatils est favorisée à pH 9,0. Cela semble logique qu'à pH 9,0 les acides gras soient sous forme dissociée et donc en équilibre dynamique avec la réaction de conversion. Le pH 9,0 est un compromis entre le maintien d'un environnement de pH alcalin en voie d'obtenir une production maximale de VFA et maintenir un pH de 7,0 pour une activité biochimique et physiologique optimale de la culture mixte.

Le pH joue également un rôle très important pendant la phase d'acclimatation et d'accumulation du PHA par batch. Villano *et al.*, (2010) ont rapporté que durant la phase d'acclimatation de la biomasse dans une configuration RBS (réacteur à batch séquentiel) d'un pH à 7,5, 8,5 et 9,5 ; le pH 7,5 entraînait une teneur, des taux de stockage et une concentration de PHA supérieurs. En gardant les mêmes paramètres pour la phase d'accumulation, la teneur en PHA la plus élevée a été obtenue à pH 8,5 bien que des résultats très similaires aient également été obtenus à pH 7,5. Aucune différence significative n'a été observée à pH 7,5, 8,5 et 9,5, ce qui signifie que les microbes ont la capacité de s'adapter en fonction du pH du milieu.

D'autre part, d'autres études ont suggéré différentes valeurs d'un pH optimal de production de PHA. Cependant, les résultats publiés sur les processus de production aérobie de PHA avec culture mixte se sont révélés contradictoires (Montiel-Jarillo *et al.*, 2017). Par conséquent, dans cette étude l'effet du pH sur le potentiel d'accumulation du PHA est évalué. Une étude expérimentale du pH à 6,5, 7, 7.5 et 8 est menée utilisant les boues secondaires de l'industrie de pâtes et papiers. D'autre part, considérant que différents types de boues usées pourraient être utilisées, l'étude de l'influence des concentrations de pH doit apporter un éclairage sur l'amélioration du processus global de production de PHA.

2.6.4 Ratio C:N

La limitation des nutriments dans la plupart des cultures est essentielle pour l'accumulation de PHA. Une faible concentration d'azote et de phosphore favorise l'accumulation de PHB. Des concentrations limites optimisées de P peuvent multiplier par neuf l'accumulation de PHB (Lee et *al.*, 2000). Le rapport C:N est un facteur critique pour la production de PHA. Ce paramètre doit être optimisé et évolue avec la communauté microbienne ou la souche utilisée dans le cas d'une fermentation à souche pure. Au cours de la fermentation de *Alcaligenes latus* ATCC 29713 pour l'accumulation du PHA, il a été rapporté que l'accumulation la plus élevée se produit en présence d'un rapport C:N de 28,3 qui augmente l'accumulation de PHA 1,8 fois (Grothe et *al.*, 1999). Dans le cas des boues activées, un rapport C:N élevé d'un ratio de 144 s'est montré optimal (Kumar et *al.*, 2004).

2.7 Coût de production du biopolymère PHA

La plupart des études rapportées jusqu'à présent ont démontré avec succès l'utilisation de différents déchets industriels pour la production du PHA. L'enrichissement microbien de la culture joue un rôle important dans le processus de production. La composition des aliments et la communauté microbienne sont des facteurs critiques affectant l'accumulation globale de PHA. Ces substrats bon marché contribuent certainement à la réduction des coûts de production du PHA, mais l'étape d'enrichissement elle-même est un autre facteur d'intensification des coûts. Ainsi, le coût peut être encore réduit si l'étape d'enrichissement peut être totalement éliminée. Peu d'études récentes ont démontré la capacité inhérente des boues à accumuler du PHA sans enrichissement. D'ailleurs, c'est ce qui est examiné dans le reste de ce rapport.

Arcos-Hernández et *al.*, (2013) ont rapporté dans leur étude que les boues rapportées directement de l'industrie pouvaient être utilisées pour la production du PHA. Dans cette étude, une alimentation mixte à base d'acide acétique et d'acide propionique sous certaines concentrations OD a été utilisée comme substrat. Les boues ont été vigoureusement aérées jusqu'à saturation pendant quelques heures sans alimentation. Pour épuiser l'azote initial des boues brutes à des valeurs limites (4-56 mg de N-NH₄/l), du carbone a été ajouté 24 h avant l'expérience, et/ou les boues activées ont été aérées pendant la nuit avant l'expérience. Le PHA maximum obtenu était de 0,38 g PHA/g (VSS). Cette étude confirme spécifiquement la capacité des boues à accumuler du PHA sans aucun prétraitement chimique ou thermal.

2.8 Gestion des boues secondaires de l'industrie de pâtes et papiers

Similairement aux déchets plastiques, la production globale des boues résiduelles continuera d'augmenter avec la densification des villes liée à l'urbanisation galopante et à l'expansion industrielle.

Les boues secondaires des usines à pâtes et papiers générées à partir de la mise en application du traitement biologique des eaux usées créent plusieurs problématiques de gestion. L'activité de cette industrie augmente à un taux pouvant atteindre 30% par an (Azevedo et al., 2018). L'une des conséquences de cette augmentation est la génération inévitable de grandes quantités de déchets comprenant des boues extrêmement humides de kaolin et de cellulose grisâtre, qui sont considérées comme un effluent industriel impliquant la responsabilité environnementale du fabricant (Azevedo et al., 2018)

La plupart des effluents issus de la fabrication du papier sont éliminés dans des décharges sanitaires, mais parfois ces décharges ne sont pas correctement conçues ou préparées pour une élimination sans risque du matériau, qui contamine le sol et les eaux souterraines (Guerrini et al., 2017). Cependant, certains pays très pauvres jettent encore leurs déchets dans des décharges contrôlées, ce qui n'est rien de plus que de les déverser simplement dans des tranchées ouvertes de sol avec un compactage ultérieur, sans aucun mécanisme de protection du sol et de l'environnement, générant ainsi de nombreux problèmes (Costa et al., 2019).

Certains pays ont déjà amélioré leurs lois en vigueur afin d'assurer la construction de décharges sanitaires munies d'une sécurité environnementale appropriée suivant des normes d'ingénierie strictes qui, en cas de fuite, empêcheraient la contamination à la fois du sol et de l'eau (Azevedo et al., 2018).

Un autre problème environnemental grave lié à l'élimination de ces effluents est le déversement en mer. Cette pratique était autrefois assez courante dans certains pays d'Asie, mais les changements dans la législation locale ont considérablement réduit ces événements (Hong et al., 2018).

L'incinération est la méthode la plus populaire. Certaines industries ont progressé et aujourd'hui, disposent déjà d'un système complet de traitement et d'incinération des boues issues de la fabrication du papier dans leur propre usine. Néanmoins, ce processus doit être surveillé, car les gaz générés pendant le processus d'incinération peuvent causer des dommages à l'environnement en libérant des gaz toxiques. L'adoption d'un système de filtrage dans les cheminées réduit sensiblement la quantité de gaz libérés, permettant une adaptation aux législations environnementales existantes (Sebastian et al., 2019).

Ce processus évapore complètement l'eau des boues et oxyde efficacement les matières organiques à haute température en CO₂ et H₂O. Alors en plus d'être énergivore et donc coûteuse (Modell et al., 1992), l'incinération souffre généralement de problèmes de fonctionnement dans les incinérateurs et les chaudières à écorce. Les problèmes comprennent la manipulation des boues, les variations de consistance des mélanges d'écorces et de boues et la baisse de la capacité de la chaudière en raison de la forte teneur en eau (Nichols, 1992). Les émissions de particules et de gaz nécessitant un équipement de contrôle de la pollution atmosphérique restent des problèmes en plus avec l'incinération des boues.

Incinérer les boues dans des chaudières de récupération a été pratiquée dans l'industrie des pâtes et papiers depuis longtemps (Harila et Kaila, 1995). L'inconvénient est la réduction de la capacité de traitement de la liqueur noire de la chaudière de récupération. Hydro Québec a développé une technique d'incinération assistée par plasma, qui utilise une torche à plasma de faible puissance pour catalyser l'oxydation des matières organiques dans les boues. La teneur organique de la boue et sa valeur calorifique sont importantes dans l'économie des procédés car la chaleur dégagée par l'oxydation est utilisée pour évaporer l'eau et chauffer les sous-produits. Il a été rapporté que les boues contenant 20% de matière organique produisent suffisamment de chaleur pour maintenir le réacteur à 600 ° C. La consommation d'énergie électrique a été estimée à moins de 100 kWh / tonne de boues humides traitées (Chari, 2000). Il est important de mentionner aussi que les techniques d'enfouissement et d'incinération ont entraîné une sévère opposition publique et une pression réglementaire plus stricte (Talat Mahmood, 2006).

En réponse à la préoccupation mondiale par la surexploitation des énergies fossiles non renouvelables et la persistance du plastique dans l'environnement, ce mémoire propose une approche environnementale et économique pour répondre à la situation. Notre approche consiste en la biovalorisation par fermentation des boues secondaires, générées lors du traitement secondaire des eaux de l'industrie de pâtes et papiers.

SECTION II :
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

1 OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif ultime de cette recherche est de protéger la santé humaine et préserver l'environnement, en substituant les plastiques issus des hydrocarbures, qui sont de grands pollueurs de l'environnement, par du bioplastique facilement biodégradable.

Pour arriver à cette finalité, nous nous sommes fixés un objectif principal. Celui-ci consiste en l'optimisation du procédé de production du bioplastique (PHA) à partir des boues secondaires de l'industrie de pâtes et papiers.

En plus de réduire la pollution de l'environnement par le plastique d'origine pétrochimique, cette approche nous permettra de réduire aussi les quantités de boues secondaires produites par les stations de traitements des eaux usées de l'industrie de pâtes et papiers. Il est possible d'utiliser ces boues comme substrat organique et sources de nutriments nécessaires à la croissance bactérienne.

Par ailleurs, pour atteindre cet objectif principal, nous avons posé les objectifs spécifiques que nous énumérerons ci-après :

1.1 Objectifs spécifiques

- Prendre conscience du progrès et de l'état d'avancement des connaissances dans le domaine de la production du PHA ;
- Élaboration d'un processus expérimental de production continue de PHA à partir des boues secondaires des industries de pâtes et papiers et ;

2 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Grâce à la revue de littérature relative à mon sujet de recherche j'ai pu affiner mes objectifs de recherche et par la même occasion développer ma propre vision dans l'optique de contribuer à la mise au point du procédé de production du bioplastique à partir des boues secondaires des industries de pâtes et papiers. Cela m'a permis de formuler mes hypothèses suit :

La littérature montre que plusieurs études et recherches ont été menées pour mettre en évidence différents déchets solides ou liquides pouvant être utilisées comme matière première pour la production de bioplastique. Le but était d'évaluer leur potentiel à produire du bioplastique, et d'autres produits à valeur ajoutée.

Les substrats qui ont attiré le plus d'attention sont les boues secondaires issues des différentes industries. Et grâce à leurs activités bactériennes accrues, ainsi que leur teneur en nutriments les boues secondaires activées de l'industrie de pâtes et papiers feront l'objet de cette étude.

Plusieurs facteurs influencent le processus de fermentation, notamment la température du réacteur, le pH du substrat, l'agitation, et plus important encore, la biomasse. Les bactéries sont les protagonistes de la fermentation.

En présence suffisante de sodium d'acétate (à l'environ de 1 g/L) comme source de carbone, les bactéries accumulent du biopolymère efficacement. En revanche, dans une situation de stress (manque de nutriments) elles en consomment pour leurs propres survies. Et paradoxalement, un surplus de sodium d'acétate (plus de 1 g/L), pourtant l'une des sources de carbone préféré par les microorganismes, conduit à une inhibition comme il a été publié par R. D. Tyagi en 2006.

Il a été démontré aussi que les coûts énergétiques pour maintenir la stérilisation tout au long d'une fermentation à souche pure sont présentement beaucoup trop importants.

Dans cette perspective, une étude de production de PHA par culture mixte sans stérilisation sera très intéressante. Cela dit, il est primordial de prévoir un procédé de production en continu, pour un minimum de manipulations et un maximum de productivité.

SECTION III: DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

Pour aboutir à la finalité de cette étude, nous avons adopté une approche en plusieurs étapes citées ci-dessous :

- **Production du bioplastique (PHA) par fermentation aérobie des boues secondaires activées de l'industrie de pâtes et papiers à petite échelle (15 litres) :**

À cause de son prix très désavantageux par rapport au plastique conventionnel (voir section 1), la commercialisation du PHA se retrouve limitée. Par conséquent l'un des objectifs que nous avons établis est de développer un procédé économique in situ de fermentation dans le but de multiplier autant que possible les microorganismes capables de produire du bioplastique (PHA). Ceci, en utilisant les boues secondaires activées des industries de pâtes et papiers, dans une perspective de valorisation des déchets organiques en produisant un produit à valeur ajoutée, et protéger l'environnement et la nature (rabattement de C, P ...etc.).

- **Le remplacement des boues fermentées de 50% et 75% du volume de travail par des boues fraîches :**

Il s'agit de remplacer le volume de travail des réacteurs de 50% et 75% par de nouvelles boues secondaires fraîches. Ceci va permettre d'étudier et d'observer la réactivité des microorganismes à l'introduction d'un nouveau rapport nutritif et bactérien.

- **Évaluation du pH (6.5, 7, 7.5 et 8) de production du PHA à partir des boues secondaires de l'industrie de pâtes et papiers :**

Les analyses biologiques et chimiques de suivi sont annoncées comme suivantes : Échantillonnage et préparation du substrat, analyse de la matière en suspension, analyse du contenu de PHA, et l'analyse de l'unité de formation de colonies. La variation des paramètres physico-chimiques a été récupérée à la fin de chaque fermentation à partir du moniteur central sous format CSV.

1 PROCESSUS DE FERMENTATION ET D'ANALYSES

Après filtration et préparation du substrat, la fermentation peut finalement démarrer. Les étapes et procédures de celle-ci sont élaborées ci-dessous.

1.1 Échantillonnage et préparation du substrat de culture

Il est très important de mentionner que la méthodologie adoptée et décrite ci-dessous sera suivie pour les études de production, de changement de boues et de variation du pH pour un volume de travail de 15 L. Dans cette perspective, les boues collectées pour les études respectives seront collectées de la même industrie. Le tableau numéro 2 présente les différentes observations de l'équipe responsable de la collecte des boues.

Tableau 2 Résultats des observations des boues secondaires récoltées de l'usine de pâtes et papiers

Date	Solide en suspension (g/L)	pH	Polymères	Diverses caractéristiques
28/03/2016	21	6	oui	
06/04/2016	26,35	5,6	oui	
15/04/2016	17	6,1	Non	
25/04/2016	16.5	6,2	oui	
11/05/2016	44	6	oui	Couleur jaune et sans mauvaise odeur
24/05/2016	17,5	5,8	oui	
09/06/2016	14,82	5,7	oui	

29/08/1016 (municipal)	5			Très diluées et noirâtre avec mauvaise odeur
24/10/2016	10.9	6,2	oui	Couleur pas trop jaunâtre et pas de mauvaise odeur
01/11/2016	14	6,1	oui	Couleur pas trop jaunâtre et pas de mauvaise odeur
16/12/2016	8,4	6	oui	Pas de mauvaise odeur, mais noirâtre avec de la mousse

Les boues secondaires activées faisant l'objet de cette étude proviennent de l'industrie de pâtes et papiers « Papiers White Birch » située au 10 boulevard des Capucins, ville de Québec. Elles ont été collectées 1 jour avant le début des différentes expériences (parfois le jour même). Les boues seront filtrées d'abord par un tamis de 1mm pour éliminer toutes les matières non désirables et grossières susceptibles de diminuer le rendement et endommager les bioréacteurs comme les résidus de bois issus des processus de fabrication du papier. Les boues ont subi ensuite une agitation dans les chaudières pour homogénéiser la biomasse avec le liquide. Le tableau numéro 2 résume les dates et les premières observations des boues secondaires récoltées sur place.

Des boues ont été filtrées et 20 mL de celles-ci ont été ponctionnés pour procéder à la mesure de la matière en suspension (MES) par gramme par litre (g/L). Les boues filtrées ensuite ont été mises dans la chambre froide pour préserver la population bactérienne et les caractéristiques physico-chimiques des boues jusqu'au début de la fermentation.

1.2 Mise en marche de la fermentation

La mise en marche de l'expérience a eu lieu au laboratoire de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) au Québec. La fermentation a été effectuée à l'aide de deux bioréacteurs pilotes avec un volume de travail de 15 litres chacun (réacteur A et réacteur B). Ils ont été remplis d'eau de robinet tiède et un flux d'air maximal de 14 L/min a été fourni afin de calibrer la sonde de l'oxygène dissout. Entre temps, la calibration de la sonde de pH a été effectuée en alternant une solution acide et basique respectivement. Les sondes de pH, de

température et de l'O₂ dissouts ont été fixées dans le réacteur après calibration (pH et O₂). Les boues ont été amenées à 16 g/L par dilution et ont été versées à travers un entonnoir dans les réacteurs. La température des bioréacteurs est passée d'une température ambiante (environ 22 à 24 °C) à 30 degrés par double-Jacquette chauffante (composante électrique chauffante installé à l'intérieur des parois du réacteur).

Des échantillons de 20 mL ont été prélevés des deux réacteurs dans des tubes à essai de 25 mL avant et après le début de la fermentation. La température, le pH et l'oxygène dissout ont été enregistrés tout au long de la fermentation sur le moniteur de contrôle des réacteurs.

Entre temps une solution d'acide acétique et de chlorure d'ammonium de 4N et un rapport C:N a été préparé pour maintenir le pH à 7. La solution a été mise dans deux béciers de 2.5 litres. Ces béciers sont reliés aux réacteurs par un tube en plastique. Une pompe électrique va acheminer la solution du bécier vers le réacteur. Un gramme de sodium d'acétate trihydrate a été ajouté dans la première heure et à 3 heures de l'expérience. Une agitation de 450 rpm a été initiée pour distribuer les nutriments, l'acide acétique et l'oxygène dans le milieu, et ce, tout au long de la fermentation. Des échantillons de 20 mL ont été prélevés à 3h, 6h, 9h, 12h, 18, et 24h dans des tubes d'essais de plastique. La mousse générée par les boues secondaires a été neutralisée par un agent chimique. Un millilitre d'anti-mousse a été versé directement à travers un orifice du réacteur. Ils ont été mis dans la chambre froide en attendant de passer aux analyses. À la fin de l'étude expérimentale, le réacteur a subi une stérilisation par vapeur. Une vidange et un lavage du réacteur ont été effectués pour terminer. Les analyses ont suivi juste après en commençant par la matière en suspension. Les résultats des analyses seront présentés ci-dessous.

1.3 Analyses des matières solides en suspension

La matière en suspension (MES) a été mesurée par séchage simple en utilisant le four et évaporation du liquide (l'eau qui constitue la majeure partie des boues). 20 mL de boues bien mélangées ont été séparés dans 2 tubes de centrifugation (à 9000 G) pendant 15 minutes. Les culots ont été mis dans des assiettes d'aluminium préalablement pesées, ensuite ils ont été mis dans le four à 105 degrés Celsius pour se dessécher. Après 24 heures, le poids final des assiettes en aluminium contenant les culots a été pesé. Par soustraction du poids des assiettes d'aluminium du poids total, la concentration du MES est ainsi déterminée.

1.4 Analyse du contenu de PHA

L'analyse du PHA a été réalisée par chromatographie gazeuse GC-FID. Le PHA a été analysé à partir des échantillons du solide en suspension secs dont 50 mg ont été prélevés.

Ultérieurement, la méthodologie suivie durant l'analyse du PHA a été proposée par Comeau et al., (1988).

Les échantillons secs de boues ont été réduits en poudre (échantillons du solide en suspension) en utilisant un mortier et un pilon d'acier. 50 milligrammes de poudre ont été pesés de chaque échantillon en y ajoutant 1 mL de chloroforme et 2 mL de méthanol (3% V/V). Les tubes ont été mis dans un bain d'huile à 95 degrés Celsius pendant 3 heures.

Après le bain d'huile, les tubes ont été entreposé pour refroidir (entre 20 à 30 minutes) sous une haute à flux laminaire. Ensuite, 1 mL de chloroforme et 1 mL d'eau distillée ont été ajoutés aux tubes. Ils sont passés ensuite dans le vortex pour agitation.

Après un moment de repos, les séparations de phase sont visibles. Soigneusement, la phase contenant le PHA a été extraite (la phase huileuse inférieure) et a été mise dans les tubes d'analyse de chromatographie et fermentation scellés. Les échantillons ont été ensuite analysés par le GC-FID.

1.5 Analyse des UFC

En ce qui concerne l'UFC, 500 microlitres ont été pris de l'échantillon de boues diluées dans des tubes contenant une solution saline de chlorure de sodium NaCl de 4,5 mL de 0,85%. Les dilutions appliquées sont à l'ordre de 10^5 .

La dernière dilution de chaque échantillon a été prise par une pipette de 100 microlitres et dispersée dans des plats de BST-AGAR (bouillon de soja trypticase avec l'Agar) (1,5%) de 30 g/L préparé préalablement sous des conditions de stérilité sous un flux laminaire pour éviter toute sorte de contamination extérieure. Les boîtes pétries ont été incubées à 30 degrés Celsius pendant 24 heures. Les colonies formées ont été dénombrées après les 24 heures passées dans l'incubateur.

1.6 Récupération des données des paramètres physicochimiques

Le pH, l'oxygène dissout, l'agitation et l'air ont été contrôlés dans le réacteur de 15 litres par le moniteur associé aux réacteurs. L'information relative aux concentrations des paramètres mentionnés est transmise et enregistrée toutes les 345 secondes automatiquement à travers un programme informatique personnalisé (iFix 3.5, Intellution, É.-U.). L'information a été extraite est sous forme de CSV que nous avons transformé en document Excel. Les résultats seront exposés dans les sections qui suivent.

SECTION VI:
RÉSULTATS, ANALYSES ET DISCUSSIONS

1 REMPLACEMENT DE 50 % et 70% DE BOUES

1.1 Variation de la concentration des MES et du PHA

La figure 3 présente la variation des concentrations de matières en suspensions et du PHA des expériences de remplacements de boues de 50, de 75% et de contrôle.

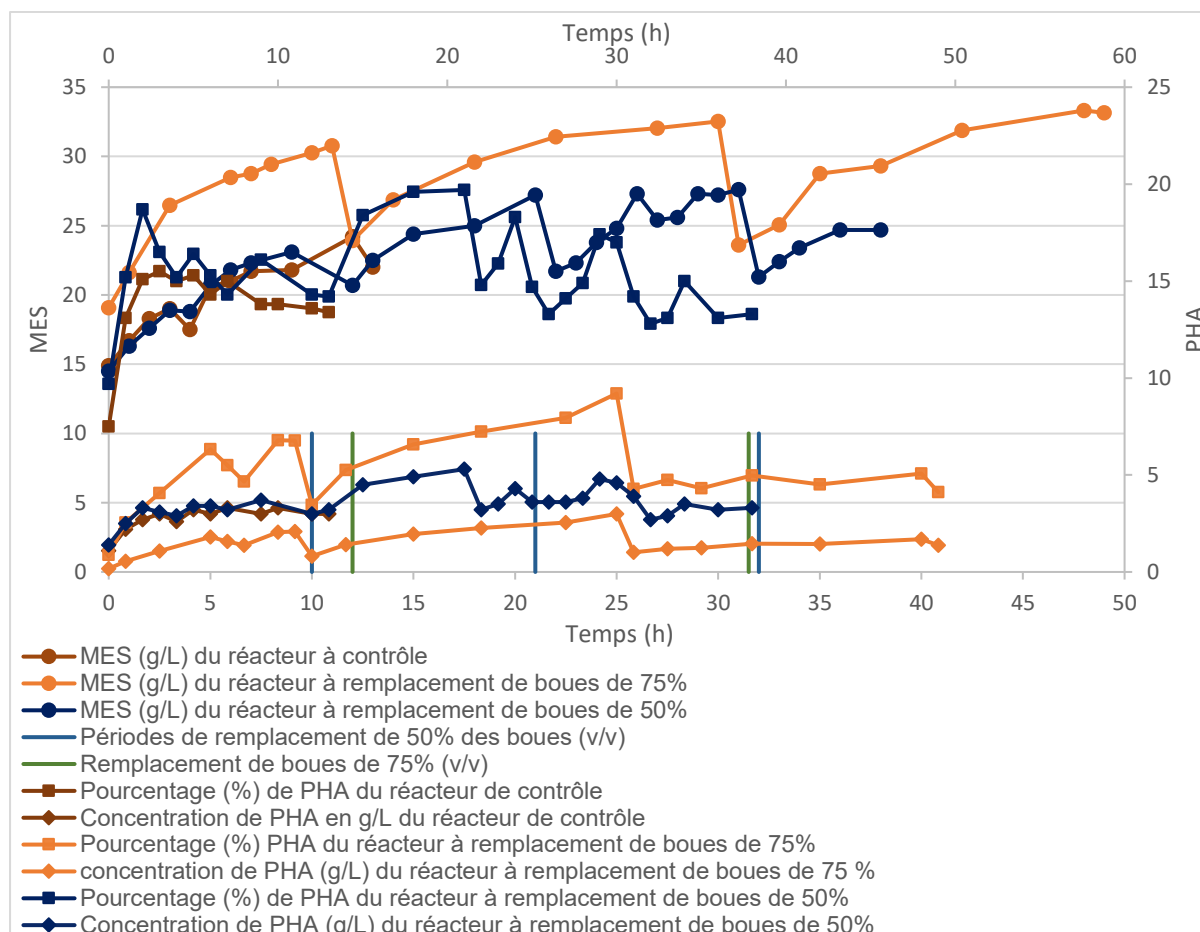


Figure 3 Variation de la concentration des MES et du PHA des réacteurs de contrôle et de remplacement de boues de 50% et 75%(v/v) en fonction du temps (h)

Les traits verticaux en discontinus présentent les différentes heures (11 h, 21 h et 31 h) où 50 % des boues du réacteur (v/v) ont été remplacés. Ce remplacement est effectué en fonction de la variation en temps réel de l'oxygène dissous et la consommation de l'acide acétique tout au long de l'expérience. En effet, la fluctuation du pourcentage de l'oxygène dissous affichée par le moniteur du réacteur, et la consommation de l'acide acétique observé sont les seuls paramètres permettant le suivi de la fermentation. Sans oublier de mentionner l'importance de ces derniers en tant que paramètres et facteurs limitants à la production du PHA (voir Section : Synthèse). Dans cette perspective, les 3 remplacements de boues ont été réalisés chaque fois que la consommation d'acétate a baissé en dessous de 30 mL/h, et que la concentration de l'oxygène dissout dépassait les 60-65%.

Il faut rappeler que la consommation du mélange d'acide acétique et le chlorure d'ammonium, accompagnée de la variation de la concentration de l'OD dans le milieu, représente une vision globale de l'activité bactérienne.

Comme montré dans la figure 3, la concentration des MES au début de l'expérience (0h) de remplacement de boues de 50% est de 15 g/L.

Pendant les premières heures de fermentation, les MES ont vu une augmentation suite à l'alimentation d'1 g/L de sodium d'acétate (0h, 2h, 5h, 9h, 21h et 32h) et la présence des nutriments (N et P) dans les boues.

Un contrôle de pH d'acide acétique avec du chlorure d'ammonium de 6N a été maintenu tout au long de l'expérience. Plusieurs études ont montré des résultats semblables en utilisant le sodium d'acétate comme source de carbone (S. Yan et al., 2006). Comme l'a démontré Yan en 2006 en mettant en évidence le potentiel des boues de papèterie. Il a atteint une concentration maximale de PHA de 43% (p/p) en utilisant 1 g/L de sodium d'acétate.

Un premier remplacement de boues a été effectué en réponse à la baisse de la consommation d'acide qui a atteint 30 mL/h.

Le réacteur de contrôle (expérience sans remplacement) a atteint une concentration maximale de MES de 24 g/L à 12h. Cela étant, il a vu une baisse de sa consommation d'acide (15 mL/h) et par conséquent sa concentration en MES a vraisemblablement chuté à la 13^{ème} heure.

Il est à remarquer que la concentration en MES dans le réacteur à changement de boues a dépassé les 27 g/L après le premier remplacement et le deuxième. Au troisième remplacement de boues, la concentration commence à diminuer et n'a pas pu arriver en termes de concentration au premier et au deuxième remplacement. Semblablement à d'autres expériences menées au laboratoire de l'INRS, après le troisième remplacement, la concentration des MES diminue. Nous pouvons constater que la communauté microbienne qui a demeuré dans le réacteur après remplacement représentant 50% du volume de travail est responsable de cette diminution. Après trois changements de boues, la nouvelle génération des bactéries ne parvient plus à rajeunir l'ancienne.

Il est évident que la courbe illustrant le pourcentage de PHA suit les variations de la courbe de la matière solide en suspension tout en augmentant durant les 21 premières heures jusqu'à 19,57 %. Par la suite, le pourcentage de PHA a commencé à baisser après le deuxième changement de boues pour se stabiliser à 13,42 %. Il est important de mentionner le pourcentage d'accumulation du PHA, qui après 21 heures de fermentation a commencé à chuter, contrairement à celui du MES qui a augmenté jusqu'au troisième remplacement de boues.

Tableau 3 Récapitulatif de la variation de la matière en suspension (g/L) en fonction du temps du réacteur à remplacement de boue de 50%

Temps (h)	MES (g/L)	Écart type	Sodium d'acétate (g/L)
0	14,5	0,03	1
1	16,3	0,03	-
2	17,6	0,41	1
3	18,9	0,37	-
4	18,8	0,18	-
5	20,7	0,65	1
6	21,8	0,01	-
7	22,3	0,47	-
9	23,1	0,46	1
12	20,7	0,71	-
13	22,5	0,79	-
15	24,4	0,37	-
18	25,0	0,60	-
21	27,2	0,25	1
22	21,7	0,54	-
23	22,3	0,06	-
24	23,8	0,12	-
25	24,8	0,02	-
26	27,3	0,42	-
27	25,4	0,18	-
28	25,6	2,17	-
29	27,3	0,18	-
30	27,2	0,44	-
31	27,6	1,07	-
32	21,3	0,40	1
33	22,4	0,52	-
34	23,4	0,79	-
36	24,7	0,17	-
38	24,7	0,06	-

Tableau 4 Récapitulatif de la variation de la matière en suspension (g/L) en fonction du temps du réacteur de contrôle

Temps (h)	MES (g/L)	Écart type	Sodium d'acétate (g/L)
0	14,9	0,54	1
1	16,7	0,41	-
2	18,3	0,08	1
3	19	0,74	-
4	17,5	1,24	-
5	20,6	0,48	1
6	21	0,24	-
7	21,7	0,62	-
9	21,8	0,66	-
12	24,2	0,14	-
13	22	3,34	-

La production dans la culture mixte est induite par une modification intracellulaire. Lorsque les cellules sont exposées à un milieu avec très peu de nutriments pendant une longue période, les bactéries sont altérées physiologiquement (Daigger et Grady 1982). Et l'augmentation soudaine des concentrations de substrat de carbone amène la cellule à changer à nouveau sa physiologie. Comme la synthèse du PHA nécessite moins d'adaptation que la croissance, la culture commence à produire du polymère. Ce type de fermentation est appelé « feast and famine » (Dias et *al.*, 2005 ; Lemos et *al.*, 2006).

Limiter les nutriments dans le milieu pousser les microorganismes à consommer les réserves de PHA qu'ils ont accumulé durant les premières heures de fermentation.

Tableau 5 Récapitulatif de la variation de la matière en suspension (g/L) en fonction du temps du réacteur de contrôle

Temps (h)	Pourcentage de PHA du réacteur à remplacement	Concentration de PHA en g/L du réacteur à remplacement	Écart type
0	9,7	1,4	0,26
1	15,2	2,5	0,05
2	18,7	3,3	0,00
3	16,5	3,1	0,57
4	15,2	2,9	0,94
5	16,4	3,4	0,14
6	15,3	3,4	0,22
7	14,3	3,2	0,53
9	16,1	3,7	0,11
12	14,3	3	0,23
13	14,2	3,2	0,40
15	18,4	4,5	0,35
18	19,6	4,9	0,54
21	19,7	5,3	0,15
22	14,8	3,2	0,10
23	15,9	3,5	0,42
24	18,3	4,3	0,14
25	14,7	3,6	1,19
26	13,3	3,6	0,70
27	14,1	3,6	0,14
28	14,9	3,8	0,01
29	17,4	4,8	0,05
30	17	4,6	0,07
31	14,2	3,9	0,34
32	12,8	2,7	0,45
33	13,1	2,9	0,76
34	15	3,5	1,26
36	13,1	3,2	0,43
38	13,3	3,3	0,18

Tableau 6 Récapitulatif du pourcentage (CDW) et de la concentration (g/L) de PHA en fonction du temps du réacteur de contrôle

Temps (h)	Pourcentage de PHA du réacteur de contrôle	Concentration de PHA en g/L du réacteur de contrôle	Écart type
0	7,5	1,1	0,93
1	13,1	2,2	0,52
2	15,1	2,7	0,03
3	15,5	3	0,22
4	15	2,6	0,23
5	15,3	3,2	-
6	14,3	3	0,17
7	15	3,3	0,43
9	13,8	3	0,49
10	13,8	3,3	0,42
12	13,6	3	0,48
13	13,4	3	0,04

Comme il est montré par la figure 3 et différemment des dernières expériences, nous avons commencé l'expérience de remplacement de boues de 75% (à 0h) avec une concentration de solide en suspension de 19 à 20 g/L. Les traits en bleu présentent les différents moments où nous avons remplacé 75 % des boues du réacteur. Le premier remplacement est à 11 heures de fermentation et le deuxième est à 30 heures.

Le tableau 9 montre la concentration du solide en suspension en fonction du temps. Comme il est mentionné l'expérience a pris départ avec une concentration de solide de 19 g/L. l'écart type montre la marge d'erreur représentant les imperfections de la manipulation des outils et d'équipements d'analyses.

Le changement ou le remplacement des boues du réacteur est en réponse à plusieurs paramètres tels que la consommation d'acide acétique (6 Normal) qui commence à diminuer (en dessous de 20 mL par heure), la consommation d'oxygène qui se retrouve de plus en plus abondant dans le réacteur ce qui nous informe que l'activité bactérienne est de plus en plus faible.

Tableau 7 Récapitulatif de la variation de la matière en suspension (g/L) en fonction du temps des réacteurs à remplacement de boue de 75% avec les périodes d'addition de sodium d'acétate

Temps (h)	SS (g/L)	Écart type	Sodium d'acétate (g/L)
0	19,08	1,24	-
1	21,62	0,09	-
3	26,46	1,48	1
6	28,48	0,75	-
7	28,77	0,01	1
8	29,42	0,33	-
10	30,27	0,69	-
11	30,77	0,57	1
12	23,94	0,32	-
14	26,87	0,64	-
18	29,59	1,75	1
22	31,42	0,47	-
27	32,05	0,06	-
30	32,53	0,82	1
31	23,60	0,36	-
33	25,06	0,51	-
35	28,77	1,74	-
38	29,32	0,58	1
42	31,89	0,71	-
48	33,32	1,11	-
49	33,15	0,23	-

Ces paramètres sont des indicateurs de performance et de suivi des activités au sein du bioréacteur.

Pour cette expérience, le solide en suspension est arrivé à son maximum en 48 heures de fermentation pour une concentration de 33,32 g/L. Nous pouvons voir à travers la courbe de la matière solide en suspension (figure 3) qu'après chaque remplacement de boues nous avons une grande augmentation de la matière en suspension dépassant la précédente.

Ceci est dû à la nouvelle génération de microorganisme qui s'adapte rapidement et efficacement aux conditions de fermentation et se multiplie par la suite en consommant les

nutriments qui se trouvent dans les boues. Une de nos théories aussi laisse savoir que plusieurs bactéries ont pu dégrader la matière organique qui se trouve dans les boues, mais sans l'accumuler à cause de son âge, ce qui présente une nourriture facilement assimilable par la nouvelle population bactérienne, qui contrairement à l'ancienne présente un grand potentiel. Sans oublier que pendant plusieurs heures, les bactéries sont restées dans une température de 4 degrés Celsius et en phase de famine.

Il est possible de séparer cette expérience en trois étapes. La première commence au début de l'expérience de 0 heure à 11 heures de fermentation. La deuxième a commencé juste après le remplacement de boues à la 11^e heure jusqu'au deuxième changement de boues réalisées à la 30^e heure qui a vu une augmentation de solide plus accrues que la première étape avec 32,53 g/L. Et dernièrement, la troisième étape commence à partir de 30 heures de fermentation jusqu'à la fin de l'expérience en 49 heures et qui enregistre le maximum de solide en suspension.

L'ajout de SAT a été en fonction de l'OD. Quand ce dernier commence à augmenter considérablement (voir courbe de DO dans la 5^e section), nous ajoutant le SAT pour garantir suffisamment de nutriment carbonaté pour les microorganismes.

Comme il est montré par la figure 3, l'accumulation du PHA s'est vu en augmentation durant toute l'expérience jusqu'à 30 heures de fermentation. Cela étant, nous avons enregistré une baisse qui a continué jusqu'à la fin de l'expérience.

Cela dit, après le premier changement de boues, l'accumulation du PHA s'est vu augmenter pendant les heures qui ont suivi le changement jusqu'au maximum en 30 heures qui a marqué le summum de cette expérience.

Il est important de mentionner que par rapport aux autres fermentations effectuées par notre équipe, celle-ci montre l'une des plus faibles capacités de production de PHA.

Avec une concentration de départ de 0,88 % (CDW) et un de maximum de 9,30 % (CDW), ces boues ont démontré un potentiel d'accumulation équivalent à celui des boues secondaires municipales qui se caractérise par un faible taux d'accumulation par rapport aux boues secondaires des industries de pâte et papier (R. Tyagi, 2012).

Il est à constater que les bactéries ont commencé par une accumulation de PHA aux environs de 6 %. Mais par la suite, nous pouvons distinguer une différence d'augmentation en faveur du réacteur à remplacement de boues. Les courbes de solides en suspension ont connu une augmentation presque similaire dans les 5 premières heures. Cela étant, une légère différence d'augmentation a été remarquée.

Sachant que pour les 9 premières heures, nous avons maintenu les mêmes paramètres de NAD et d'oxygène et d'agitation pour les deux réacteurs, nous pouvons expliquer cette variation entre les résultats des deux réacteurs par les erreurs relatives aux manipulations.

Il est évident que le réacteur de remplacement de boue a enregistré de meilleurs résultats que celui du control, en particulier après les 13 premières heures.

Tableau 8 Récapitulatif du pourcentage (%) et de la concentration (g/L) de PHA en fonction du temps des réacteurs à remplacement de boues de 75 %

Temps (h)	PHA (%)	PHA (g/L)	Écart type
0	0,88	0,17	0,62
1	2,54	0,55	0,08
3	4,07	1,08	0,01
6	6,33	1,80	0,20
7	5,51	1,58	0,06
8	4,66	1,37	0,18
10	6,79	2,05	0,30
11	6,77	2,08	0,03
12	3,45	0,82	0,16
14	5,25	1,41	0,11
18	6,58	1,95	0,61
22	7,23	2,27	0,78
27	7,94	2,54	0,89
30	9,20	2,99	0,33
31	4,28	1,01	1,09
33	4,75	1,19	0,11
35	4,31	1,24	0,26
38	4,98	1,46	0,34
42	4,52	1,44	1,21
48	5,07	1,69	0,36
49	4,12	1,37	0,77

1.2 Unités de formation de colonie

La figure 4 présente la variation des colonies bactériennes en fonction du temps des réacteurs de contrôle et de changement de boues de 50%.

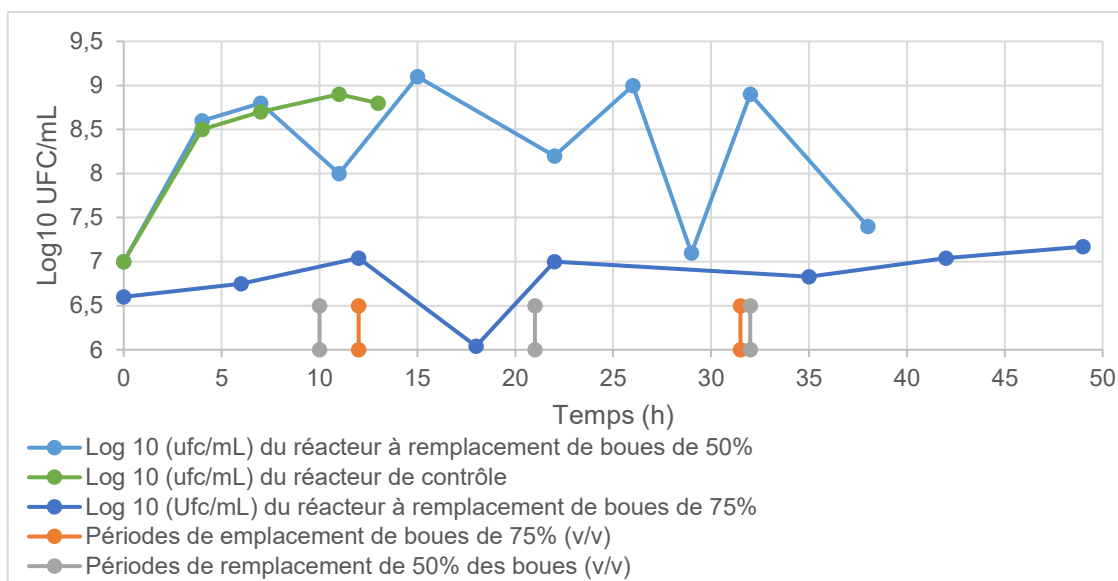


Figure 4 Unité de formation de colonie (Log₁₀) des réacteurs de remplacements de boues de 50 et 75%, et de contrôle en fonction du temps (h)

La fermentation a commencé avec une valeur de 7 Log₁₀ (ufc/mL) à 0 heure. Les colonies bactériennes ensuite se sont multipliées pour atteindre à 8 Log₁₀ (ufc/mL) avant le remplacement de boues.

Pendant le premier changement de boues, les unités bactériennes ont diminué considérablement pour atteindre un maximum de 9,1 Log₁₀ (ufc/mL). Semblablement au premier remplacement, le deuxième et le troisième ont vu une diminution pendant et après les premières heures de changement pour augmenter ensuite à 9 et 8,9 Log₁₀ (ufc/mL) respectivement.

Vers la fin de l'expérience, la population bactérienne a enregistré un déclin souligné par une vieillesse des microorganismes ainsi que la déplétion des nutriments. Le réacteur de contrôle a enregistré presque les mêmes valeurs que celui du remplacement de boues pour les 7 premières heures. La fermentation a commencé par 7 Logs (ufc/mL) à 0 heure, pour arriver à un maximum de 8,9 Logs (ufc/mL) à la 11^e heure de fermentation.

L'expérience a été arrêtée à la 13^e heure avec une valeur de 8,8 Log₁₀ (ufc/mL). L'arrêt du réacteur de contrôle a été décidé suite à la très faible consommation d'acide acétique (15 mL/h) et une faible activité bactérienne montrée par la concentration de l'OD qui ne cesse de diminuer.

Les tableaux numéro 7 et 8 récapitulent les résultats obtenus :

Tableau 9 Récapitulatif du calcul des unités de formation de colonies en fonction du temps (h) du réacteur à changement de boues de 50%

Temps (h)	Cellules comptées	Facteur de dilution	Log (ufc/mL)	Log 10 (ufc/mL)
0	10	5	1e+07	7,0
4	42	6	4,2e+08	8,6
7	60	6	6e+08	8,8
11	11	6	1,1e+08	8,0
15	117	6	1,2e+09	9,1
22	169	5	1,7e+08	8,2
26	90	6	9e+08	9,0
29	13	5	1,3e+07	7,1
32	74	6	7,4e+08	8,9
38	24	5	2,4e+07	7,4

Tableau 10 Récapitulatif du calcul des unités de formation de colonies en fonction du temps du réacteur de contrôle

Temps (h)	Cellules comptées	Facteur de dilution	Log ufc/mL	Log 10 (ufc/mL)
0	9	5	9, e+06	7,0
4	30	6	3e+08	8,5
7	51	6	5,1e+08	8,7
11	87	6	8,7e+08	8,9
13	63	6	6,3e+08	8,8

D'après les informations que notre équipe a pu avoir du personnel de l'usine de fabrication du papier, les boues collectées pour cette expérience semblent avoir des limitations nutritives et bactériennes. Dans cette perspective, le choix de nombre de dilutions a été fixé à 4.

Le nombre 5 de dilutions a été préalablement essayé sur un nombre d'échantillons, mais les résultats obtenus sont de nature insatisfaisante, puisque nous avons eu un nombre de colonies inférieur à 30 dans tous les échantillons.

Au début de la fermentation, les boues ont enregistré une valeur décimale de 6,6. À 12 h de fermentation, nous avons mesuré 7,4 Log₁₀ (ufc/mL), semblablement à la 42^e heure de l'expérience. Étonnamment, à 49 heures de la fermentation nous avons eu le maximum de colonies. Avec, un nombre de cellules comptées de 148 et une valeur décimale de 7,17, la

population bactérienne s'est multipliée vers la fin de la fermentation. Il est clair que les bactéries ont déployé leurs efforts pour assurer leur survie et métabolisme et non pas pour l'accumulation du PHA.

À partir des 2 tableaux précédents, nous pouvons dire que les résultats et le nombre de colonies bactériennes ont été prévisibles, car malgré les valeurs satisfaisantes de la matière en suspension, nous avons eu un pourcentage très faible en PHA (9,20 % CDW).

Tableau 11 Récapitulatif du calcul de l'unité de formation de colonie en fonction du temps (h) du réacteur à changement de boues de 75 %

Temps (h)	Cellules comptées	Facteur de dilution	Log Ufc/mL	Log 10 (Ufc/mL)
0	40	4	4,00 e+06	6,60
6	56	4	5,60 e+06	6,75
12	110	4	1,10 e+07	7,04
18	11	4	1,10 e+06	6,04
22	99	4	9,90 e+06	7,00
35	67	4	6,70 e+06	6,83
42	110	4	1,10 e+07	7,04
49	148	4	1,48 e+07	7,17

1.3 Consommation d'acétate

La figure 5 présente la consommation en acétate et les ions d'acétate. Nous pouvons voir que dans le deuxième et troisième changement de boues, la consommation des ions d'acétate a augmenté légèrement par rapport au premier changement de boues qui a atteint une consommation de 2,13 g/L/h.

La consommation totale d'acétate a suivi une augmentation presque stationnaire mis à part les moments au cours desquels nous avons changé les boues.

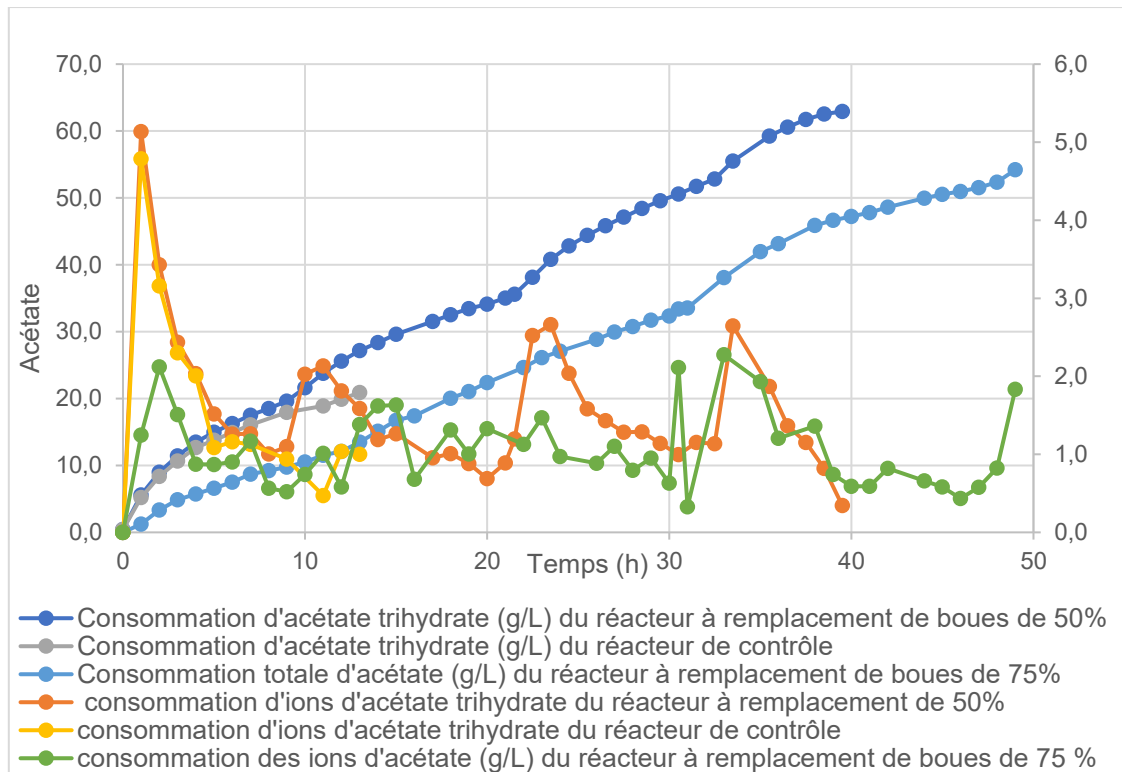


Figure 5 Consommation totale d'acétate (g/L) et ions d'acétate des réacteurs à remplacement de boues de 50 et 75%, et le réacteur de contrôle

La consommation des ions a augmenté d'une façon exponentielle durant les deux premières heures, due à la jeunesse et à la famine des bactéries qui ont résidé un temps considérable dans les chaudières et le réfrigérateur. Donc ils consomment rapidement les ions d'acétate. Et au fur et à mesure de la fermentation, la consommation baisse en fonction du temps.

En parallèle, le réacteur de contrôle a été lancé à 15 g/L de MES. Ensuite, la matière en suspension a suivi la même variation que celle du réacteur de changement pendant les 9 premières heures. La consommation de l'acétate une fois arrivée à 10 mL/h, l'expérience a été arrêtée.

La figure 5 présente aussi la consommation totale d'acétate et des ions d'acétate du réacteur de contrôle.

En raison de l'absence de changement de boues dans ce réacteur, nous pouvons voir que la consommation de l'acétate a suivi une courbe qui s'est traduite par une augmentation constante après 5 heures de fermentation. Et comme le fermenteur RBS, la consommation totale d'acétate a augmenté d'un seul coup dans la première heure puis elle a commencé à régresser petit à petit jusqu'à devenir presque stationnaire après 5 heures de fermentation.

Nous pouvons dire que le temps optimal de cette fermentation est 5 heures.

La consommation totale en acétate, comme pour les premières expériences, au laboratoire de l'université a connu une augmentation tout au long de l'expérience avec de légères

La consommation des ions d'acétate a connu une fluctuation tout au long de la fermentation, et aussi après le deuxième changement de boues nous observons un maximum de consommation de 2,28 g/L en 33 heures de fermentation.

Les tableaux 3,4 et 7 représentent les périodes d'ajout de l'acétate d'un gramme par litre. Et comme nous avons un volume de travail de 10 litres, le poids total par chaque ajout d'acétate est de 10 g/L.

1.4 Paramètres physico-chimiques

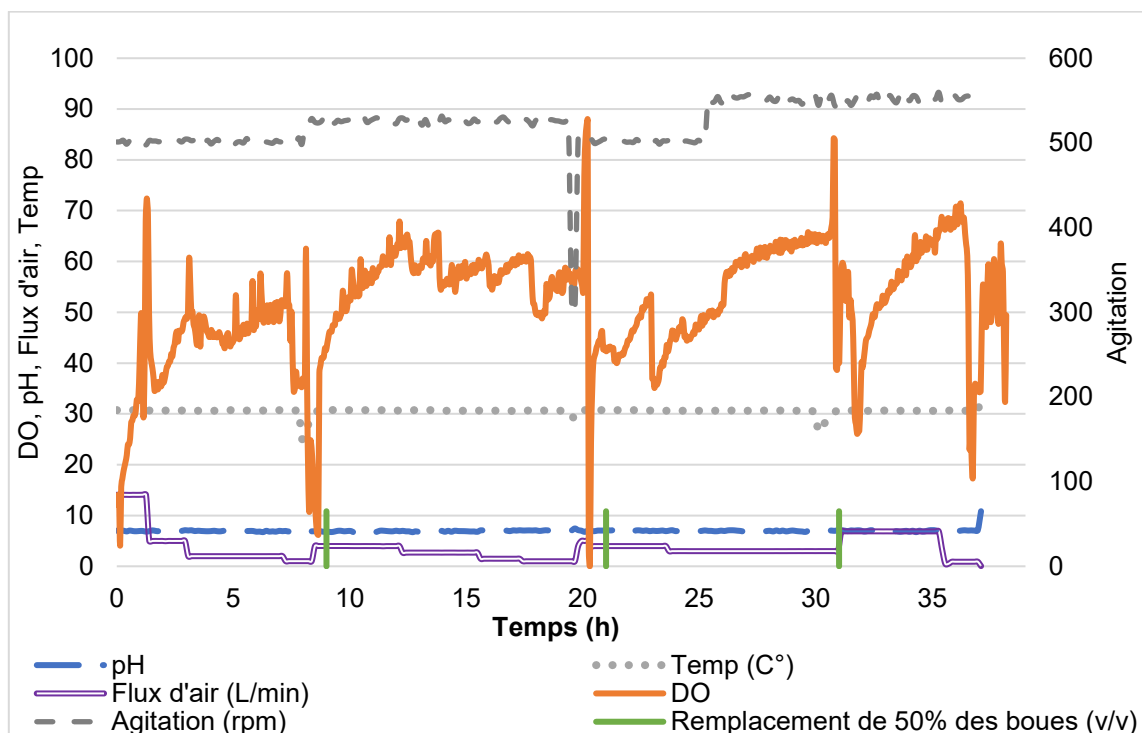


Figure 6 Variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur à remplacement de boues de 50%

La figure 6 présente les différents paramètres physico-chimiques du réacteur à changement de boues. L'agitation a été maintenue à 500 rpm durant environ 11 heures de fermentation avant le premier changement de boues.

L'agitation a été augmentée après la première fermentation parce que la viscosité des boues a augmenté grâce à la multiplication des cellules et à l'accroissement de la concentration en MES.

L'oxygène dissout a augmenté lorsque les bactéries commencent à vieillir. Et aussi lorsque le carbone présent initialement dans les boues commence à s'épuiser à cause de la consommation des bactéries. En réponse à cette augmentation, le flux d'air a été limité entre 40 % et 70 %.

Cela dit, lorsqu'on change les boues, l'oxygène dissout baisse très rapidement à cause des nouvelles colonies qui sont plus actives que celles qui sont présentes dans les boues.

La température est maintenue à 30 degrés Celsius et le pH fluctue entre 6,5 et 7,4.

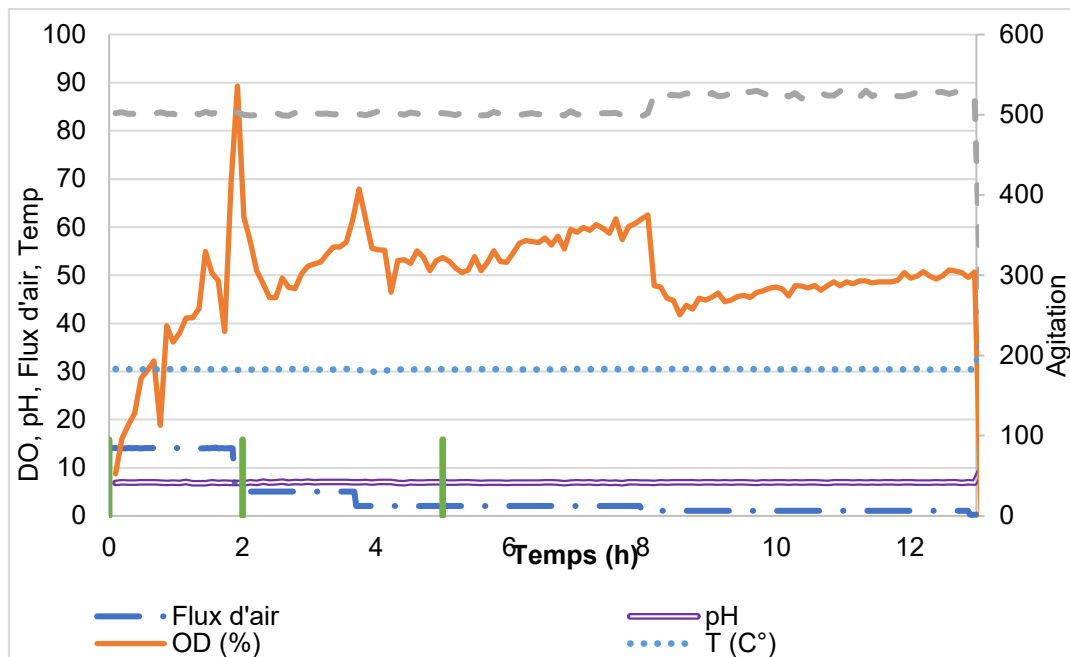


Figure 7 variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur de contrôle

La figure 7 présente l'évolution de l'oxygène dissout en augmentation vers les 2 premières heures. Après, l'OD a fluctué entre 45 % et 70 %.

La température semblablement au réacteur de changement a été maintenue automatiquement à 30 degrés Celsius pendant toute la fermentation. L'augmentation soudaine de la température vers la fin de la fermentation est expliquée par une stérilisation finale.

Le pH aussi a été maintenu automatiquement entre 6,5 et 7,4 pour maintenir une activité microbiologique optimale. L'agitation a été maintenue entre 500 et 550 rpm durant toute l'expérience.

La figure 7 présente les différents paramètres opérationnels du réacteur tout au long de l'expérience de remplacement de 50% de boues. Ces derniers ont gardé la même allure pendant toute la fermentation notamment le pH qui a été contrôlé par l'acide acétique (6N) durant toute la fermentation en fluctuant entre 6,9 et 7,1.

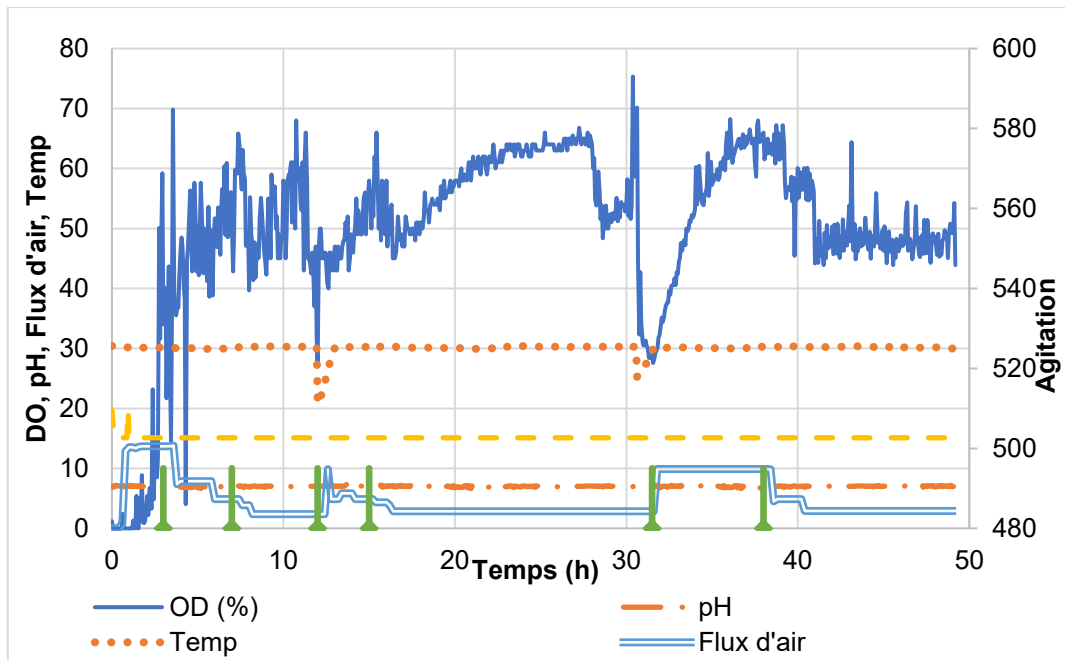


Figure 8 Variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur à remplacement de boues de 75%

La température aussi n'a pas changé pendant toute la fermentation exceptée les périodes de changement de boues où la température totale du réacteur a baissé pendant un court moment à 20 degrés Celsius, pour revenir à 31 pendant le reste de l'expérience.

Et semblablement aux précédentes expériences, l'agitation a été maintenue constante entre 500 et 550 rpm pendant toute l'expérience de remplacement de boues de 75%

L'oxygène dissout quant à lui augmente lorsque les bactéries commencent à vieillir. Et aussi lorsque le Carbone présent initialement dans les boues commence à s'épuiser grâce à la consommation des bactéries. En réponse à cette augmentation, nous avons baissé le flux d'air de 13,5 litres par minute au début jusqu'à ce qu'on maintienne un niveau d'air dissout entre 30 % et 70 %.

Cela dit, lorsqu'on change les boues l'oxygène dissout baisse très rapidement à cause des nouvelles colonies qui sont plus actives que celles qui sont présentes dans les boues.

2 ÉTUDE DU PH 6.5 ET 7

2.1 Matière en suspension

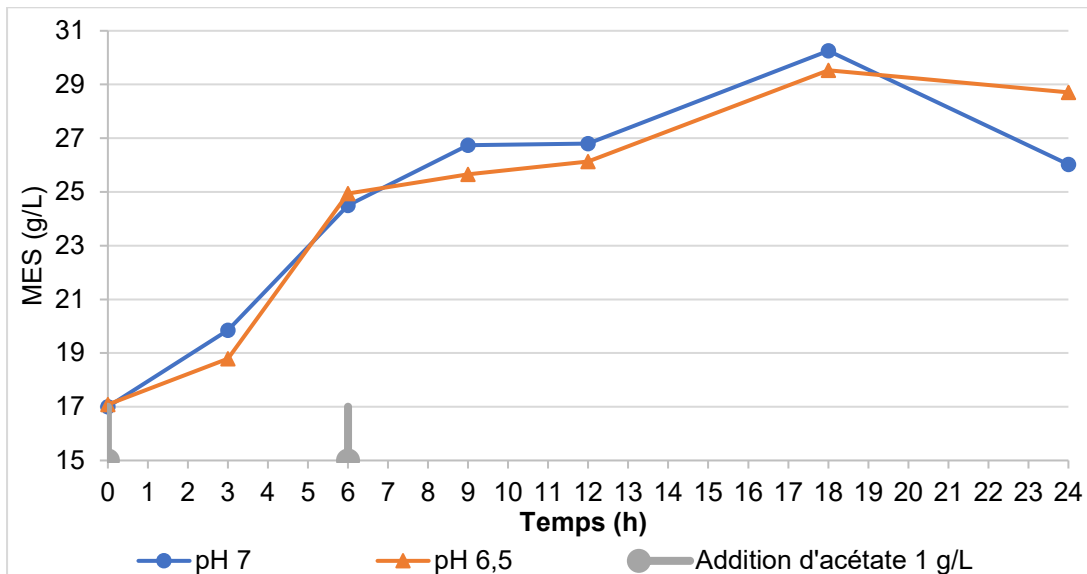


Figure 9 Variation de la matière en suspension (g/L) des réacteurs à pH 6.5 et 7 en fonction du temps (h), avec les périodes d'addition de sodium d'acétate

La figure 9 présente la variation de la matière en suspension (MES) en fonction du temps (heure). L'expérience a débuté avec 17 g/L de biomasse à 0 heure. La concentration de biomasse a commencé d'accroître dès la première heure, et ce jusqu'à 9 heures de fermentation où la biomasse a légèrement diminué. Puis après 12 heures de fermentation, la biomasse a augmenté exponentiellement jusqu'à 18 heures pour arriver au maximum de 30,2 g/L. Pour le reste de cette expérience, la biomasse a diminué, et ce jusqu'à la fin de la fermentation qui a duré 24 heures.

Après 12 heures de fermentation, les concentrations du PHA ont commencé à chuter jusqu'à 18 heures. Le pH 6.5 a enregistré 59,8 %, et le pH 7 avec 60,9 % de concentration pour se stabiliser ensuite à 59,6 % et 59,9 % respectivement, et ce jusqu'à la fin de l'expérience.

Tableau 12 Récapitulatif des valeurs de la MES en fonction du temps (h) des réacteurs à pH 6.5 et 7 avec les périodes d'addition de sodium d'acétate

	pH 7	pH 6.5	
Temps (h)	MES (g/L)	MES (g/L)	Acétate trihydrate (g/L)
0	17,005	17,085	1
3	19,845	18,785	1
6	24,5	24,945	-
9	26,745	25,65	-
12	26,805	26,135	-
18	30,255	29,53	-
24	26,02	28,71	-

Une addition de 1 g/L de sodium d'acétate a été effectuée au début de la fermentation (0 heure), puis à 6 heures de fermentation, pour un total de 2 g/L. Notons que le sodium d'acétate constitue le principal apport en carbone.

2.2 Analyse du PHA

La figure 10 présente la concentration en g/L et le pourcentage du PHA tout au long de l'expérience, en fonction du temps.

La teneur du PHA dans les micro-organismes a enregistré une concentration moyenne initiale de 16,4 % avant même le début de l'expérience. Les boues pour cette fermentation ont montré un grand potentiel pour l'accumulation du biopolymère.

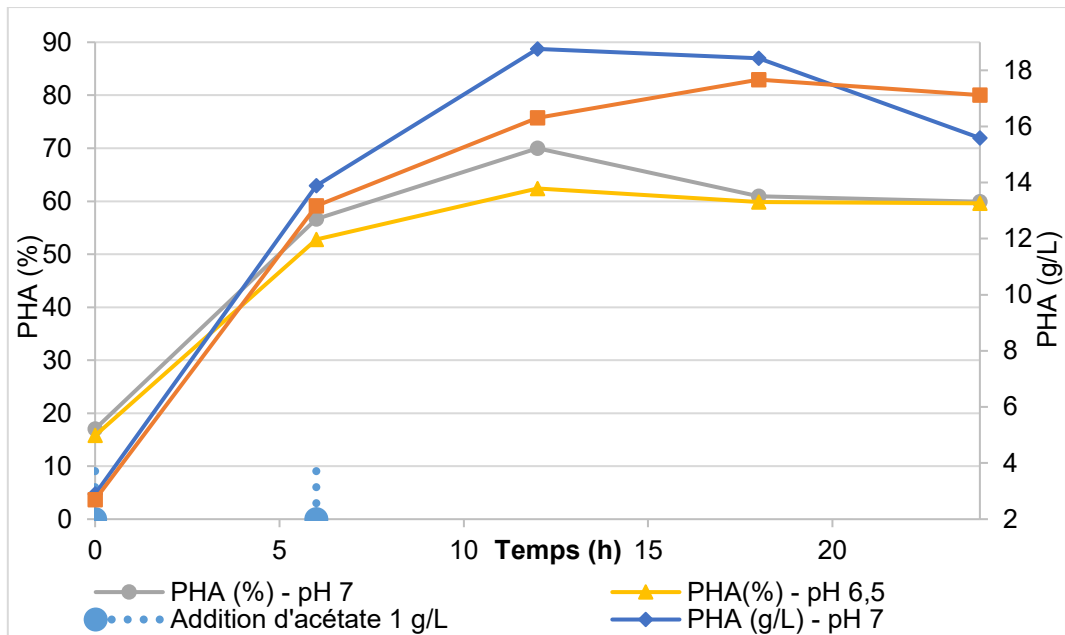


Figure 10 Variation du pourcentage (CDW) et de la concentration (g/L) de PHA des réacteurs à pH 6.5 et 7 avec les périodes d'addition du sodium d'acétate

Comme il est montré par la figure 10, la concentration du PHA a augmenté tout au long de la fermentation jusqu'à arriver au maximum de 64,4 % pour l'expérience au pH 6.5 et jusqu'à 70 % en faveur du pH 7.

La courbe de concentration de PHA en g/L a eu la même allure que celle du pourcentage, avec une légère différence qui se concrétise vers la fin de la fermentation par une baisse de concentration finale. Ceci est expliqué par la relation étroite du contenu en g/L du PHA aux cellules et la concentration de la biomasse qui a baissé dans les dernières heures de fermentation.

Tableau 13 Récapitulatif du pourcentage (%) et de la concentration (g/L) de PHA en fonction du temps des réacteurs à pH 6.5 et 7

Temps (h)	pH 7			pH 6.5		
	PHA (%)	PHA (g/L)	Écart type	PHA (%)	PHA (g/L)	Écart type
0	17,02	2,89	0,57	15,78	2,70	1,13
6	56,68	13,89	1,66	52,78	13,17	0,94
12	70	18,76	0,49	62,41	16,31	0,19
18	60,93	18,43	1,57	59,83	17,67	1,29
24	59,91	15,59	0,21	59,60	17,11	0,50

Le résumé des résultats à différentes heures est présenté dans le tableau 13 ci-dessus. À 12 heures de fermentation, nous avons obtenu le maximum de concentration de PHA.

Pendant la phase d'acclimatation (les premières heures de l'expérience), les bactéries se sont multipliées intensivement pour dépasser les 24 g/L de MES en 6h et une concentration de PHA de 56,68 à pH 7 et 52,78 % pour un pH de 6.5 %. La concentration de PHA a augmenté et a atteint un maximum de 70 % à 12h à pH 7 et 62,41 % à pH 6.5 en abondance de carbone (Sodium d'acétate), et en une limitation des nutriments de croissance telle que l'azote et le phosphore. Puis la concentration a diminué en raison de la limitation de source de carbone. Rappelons que les polyhydroxyalcanoates servent de composés de stockage synthétisés par des micro-organismes sous forme de granules pendant les périodes de stress environnemental (Schlegel et *al.*, 1961 ; Ciesielski et *al.*, 2010). Lorsque la source de carbone est épuisée vers les dernières heures de l'expérience, les biopolymères collectés sont dépolymérisés et leurs produits de dégradation peuvent être utilisés comme source de carbone et de matériaux énergétiques (Anderson et Dawes, 1990 ; Ciesielski et *al.*, 2010b).

Il est important de noter aussi que 70 % de PHA représente la concentration maximale que notre équipe a pu atteindre parmi toutes les précédentes expériences par culture mixte. Les raisons principales seraient la qualité des boues secondaires (développé dans la section suivante), le pH 7 qui fait particulièrement l'objet de cette expérience et la concentration du sodium d'acétate en tant que source de carbone. Effectivement, il est important de sélectionner la concentration optimale de source de carbone. À une concentration d'acétate supérieure à 1,0 g/L, le taux d'accumulation de PHA ainsi que la concentration de PHA sont susceptibles de diminuer, cela pourrait être dû à une inhibition causée par une concentration élevée en acétate (S. Yan et *al.*, 2006). Contrairement, une concentration inférieure pourrait se révéler insuffisante. S. Yan a montré en 2006 que la concentration maximale de PHA obtenue à une concentration d'acétate de 1,0 g/L était 2 fois celle obtenue à 2,5 g/L, et 3,8 fois celle obtenue à 0,25 g/L.

Aussi, il est bien connu que les PHA intracellulaires peuvent occuper le cytosol (qui se stabilise à pH 7), car l'accumulation de biopolymères à un niveau élevé pourrait influencer la cellule en inhibant leur croissance et affectant leur métabolisme (Lee, 1996). En d'autres termes, la productivité des PHA pourrait diminuer en raison d'une biosynthèse trop rapide des PHA, aussi bien qu'un processus d'accumulation de PHA trop lent puisse réduire la concentration de PHA à l'intérieur des cellules en gaspillant des sources de carbone pour la croissance bactérienne. Pour résumer, les boues secondaires activées de l'industrie de pâte et papier et le sodium d'acétate se sont révélées être la meilleure source de carbone pour l'accumulation la plus élevée de PHA (S. Yan et *al.*, 2006).

La courbe de concentration de PHA en g/L a eu la même allure que celle du pourcentage, avec une légère différence pendant 12 heures et 24 heures.

2.3 Analyse des UFC

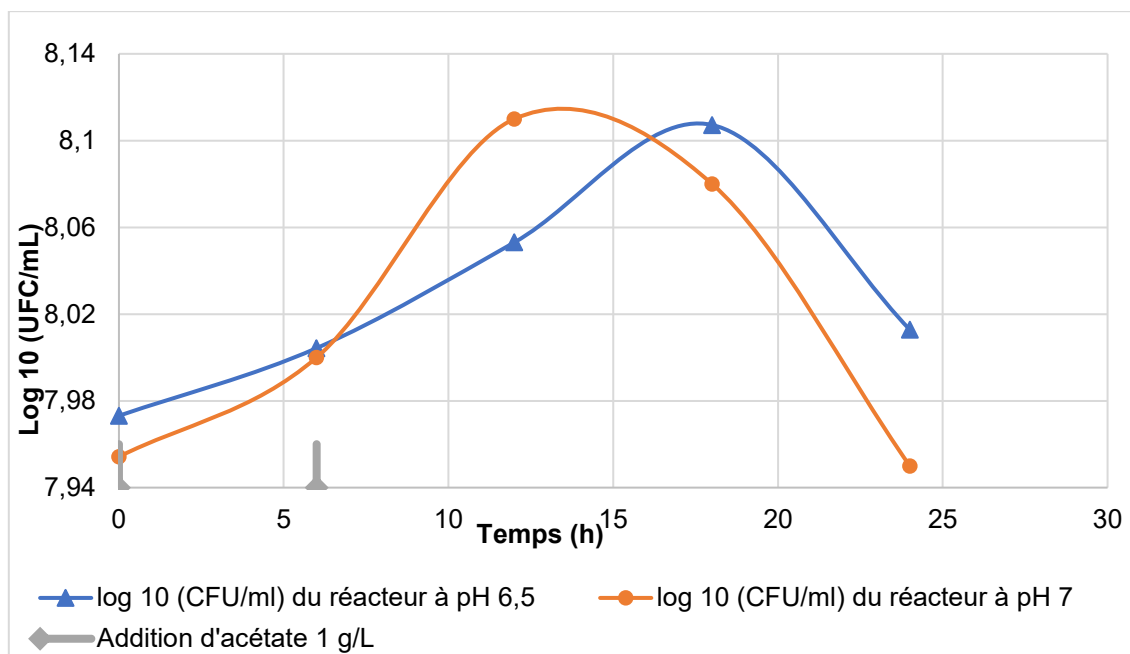


Figure 11 Unité de formation de colonies (Log 10) des réacteurs à pH 6.5 et 7 en fonction du temps (h)

La figure 11 présente la variation de l'unité de formation de colonies par millilitre en fonction du temps avec une dilution de l'ordre de 5. La concentration à 0h est de $7,95^E$ (ufc/mL) à pH 7 et $7,97^E$ ufc/mL à pH 6.5. À 12 heures de fermentation la biomasse s'est élevée à une concentration maximale de $8,11^E$ (ufc/mL) à pH 7 et $8,05^E$ (ufc/mL) à pH 6,5. Les courbes montrent une vitesse de croissance de biomasse à pH 7 supérieure à celle du pH 6,5. Après la consommation des nutriments disponibles vers les dernières heures de fermentation, la concentration de la biomasse a diminué (taux de mortalité à augmenter) à $7,95^E$ (ufc/mL) pour un pH de 7, et $8,01^E$ (ufc/mL) à pH 6,5. Il est à rappeler que plus la concentration de la biomasse vivante productrice de PHA est grande, plus les chances d'avoir des taux d'accumulation plus important.

Tableau 14 Unité de formation de colonie (Log 10) des réacteurs à pH 6.5 et 7 en fonction du temps (h)

Temps (h)	Log 10 (Ufc/mL) du réacteur à pH 7	Log 10 (Ufc/mL) du réacteur à pH 6,5
0	7,95E	7,97E
6	8,00E	8,00E
12	8,11E	8,05E

18	8,08E	8,11E
24	7,95E	8,01E

D'après les informations que nous avons rassemblées, principalement la concentration de la biomasse, la couleur et l'odeur, les boues collectées cette fois semblent de bonne qualité. En effet, les boues activées des industries de pâtes et papiers sont constituées de biomasse microbienne, de protéines (22-52 %), de glucides (0-23 %), de lignine (20-58 %), de cellulose (2-28 %), d'hémicellulose (12 %) et de lipides (2-10 %) (Jokela et *al.*, 1997; Kyllönen et *al.*, 1988; Edalatmanesh et *al.*, 2010).

Il a été signalé que les composants en lignine du bois sont fortement colorés en raison de la présence d'anneaux aromatiques difficilement assimilable par les bactéries et, par conséquent, ils sont résistants à l'élimination et à la biodégradation au cours de différents processus de traitement, se retrouvant ainsi dans les boues secondaires (Pu et *al.*, 2015). Cependant, leur concentration varie selon les différents procédés utilisés pour la production de pâte et papier, qui comprend généralement cinq étapes de base et, par conséquent, les eaux usées générées par chaque étape forment l'effluent final (Raj et *al.*, 2014).

Pour des boues jaunâtres claires sans présence de mauvaises odeurs, la teneur en lignine et en composé cellulosique n'est pas très importante, ce qui favorise la consommation et l'accumulation des molécules de carbone en PHA par les bactéries. Associé au sodium d'acétate (1 g/L), une grande concentration de PHA a été anticipée.

2.4 Consommation d'acétate

La figure 12 montre le taux de consommation d'ions d'acétates et l'acétate total tout au long de cette expérience. Les courbes, que la figure présente, servent comme indicateurs de performance et de suivi d'avancement de la fermentation.

La consommation en acétate total comme pour les premières expériences a connu une augmentation tout au long de l'expérience. La consommation des ions d'acétate quant à elle a connu une fluctuation tout au long de la fermentation, avec un maximum de 3,6 g/L à 3 heures de fermentation. À 0 heure et à 6 heures, un ajout de 1 g/L de sodium d'acétate a été effectué.

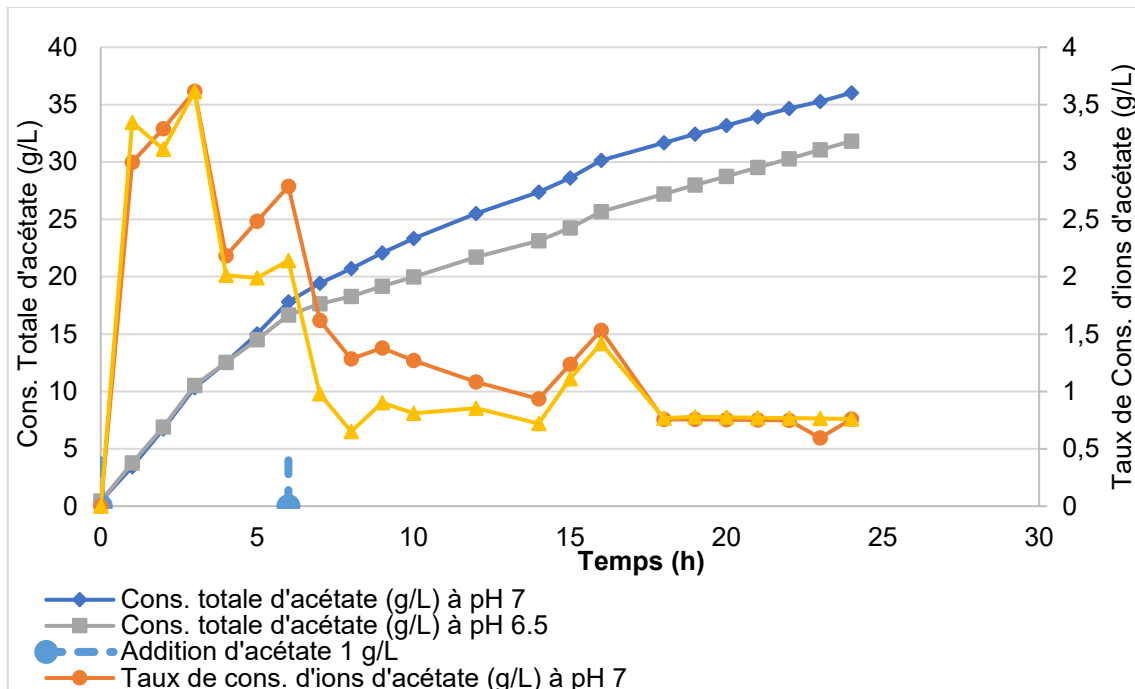


Figure 12 Consommation d'acétate (g/L) et taux de consommation d'ions d'acétate (g/L) des réacteurs à pH 6.5 et 7.

2.5 Paramètres physico-chimiques

Les figures 13 et 14 présentent les différents paramètres opérationnels du réacteur tout au long de l'expérience. Ces derniers ont gardé la même allure pendant toute la fermentation notamment le pH qui a été contrôlé par l'acide acétique [6N] durant toute la fermentation en fluctuant entre 6,9 et 7,1.

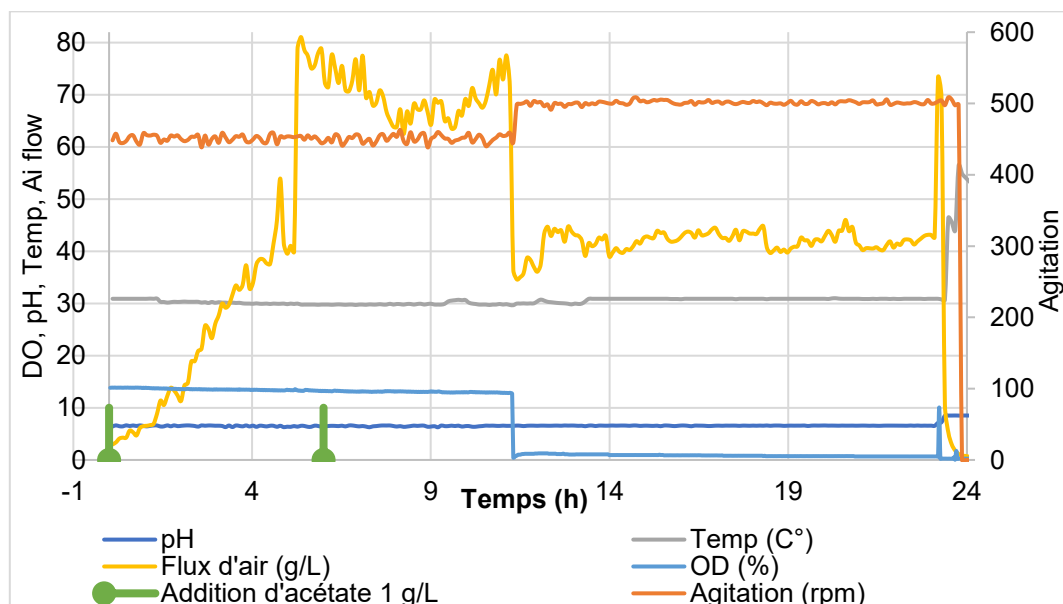


Figure 13 Variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur à pH 6.5

La température aussi n'a pas changé pendant toute la fermentation. Elle a été maintenue à 30 degrés Celsius.

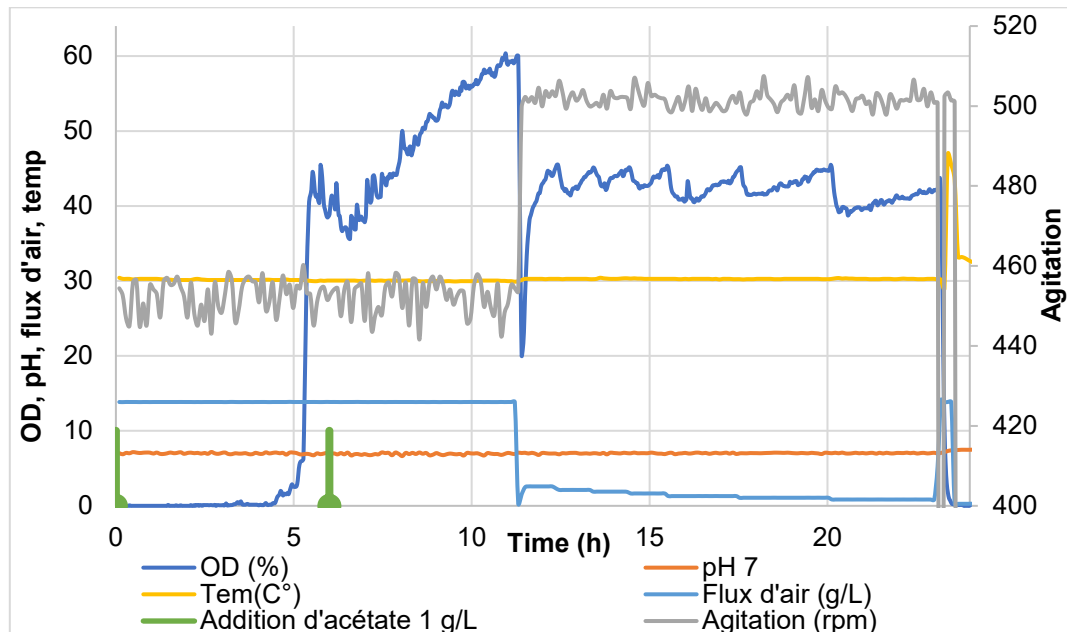


Figure 14 Variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur à pH 7

Semblablement aux précédentes expériences, l'agitation a été maintenue constante entre 450 et 500 rpm pendant toute l'expérience.

Les concentrations d'OD ont fluctué durant toute la fermentation. Après 6 heures de fermentation, nous avons ajouté le sodium d'acétate en réponse à l'augmentation de l'OD. Il a diminué juste après pour augmenter encore pendant 12 heures de fermentation.

À 12 heures de fermentation, nous avons diminué le flux d'air pour garder une concentration optimale en oxygène qui se situe entre 40 et 50 % d'oxygène. En tant que paramètre limiteur de la production du PHA, le milieu doit garder un apport important en oxygène dissout, en particulier pendant les premières heures de fermentation où l'activité bactérienne est à son apogée. Il est tout à fait naturel que la consommation de l'OD par les microorganismes diminue tout au long de l'expérience pour la principale raison que ceux-ci vieillissent et se multiplient de moins en moins.

3 ÉTUDE DE LA VARIATION DU PH 7.5 ET 8

3.1 Matière en suspension

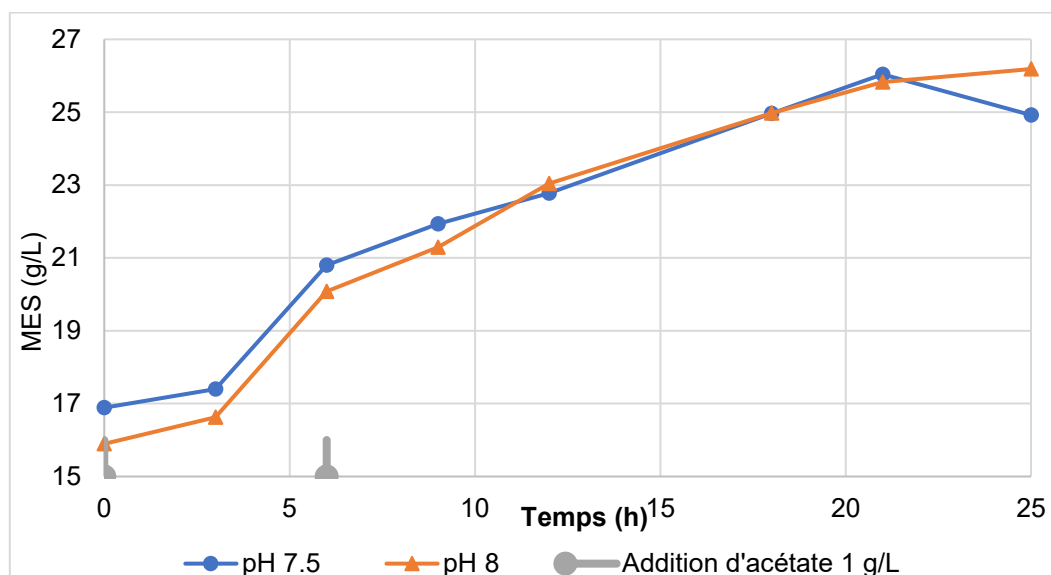


Figure 15 Variation de la matière en suspension (g/L) des réacteurs à pH 7.5 et 8 en fonction du temps (h), avec les périodes d'addition de sodium d'acétate

La figure 15 présente la variation du pH en fonction temps des pH 7.5 et 8. Pareil pour l'expérience précédente du pH 6.5 et 7, deux pulses de sodium d'acétate ont été ajoutés. Mais dans celle-ci, la concentration ajoutée était de 5 g/L. La source de carbone a été ajoutée à 0 h et à 21 heures. Pendant les premières heures de la fermentation, et ce jusqu'aux 21 heures, le solide en suspension a vu une augmentation sans interruption. Ceci est dû principalement à la grande concentration d'acétate ajoutée à 0 heure. Une présence importante de molécule de carbone a permis aux bactéries de se proliférer et se multiplier dans les deux conditions de pH.

À 21 heures, les deux concentrations du solide en suspension à pH 7.5 et 8 ont atteint à 26 et 25,8 g/L respectivement. Après l'ajout d'un deuxième pulse de sodium d'acétate, la MES de l'expérience à pH 7.5 a légèrement baissé pour arriver à 24,9 g/L contrairement à l'autre expérience (pH 8), le MES a augmenté de 0,35 g/L dans la dernière heure de fermentation. Pour de tels résultats, l'ajout du sodium d'acétate est soupçonné d'avoir généré une surconcentration et ainsi une inhibition de la croissance des bactéries.

Tableau 15 Récapitulatif des valeurs de la MES en fonction du temps (h) des réacteurs à pH 7.5 et 8 avec les périodes d'addition de sodium d'acétate

Temps (h)	pH 7.5		pH 8		Sodium d'acétate (g/L)
	MES (g/L)	Écart type	MES (g/L)	Écart type	
0	16,89	0,016	15,90	0,023	1
3	17,40	0,002	16,63	0,003	-
6	20,80	0,002	20,08	0,009	1
9	21,93	0,003	21,30	0,000	-
12	22,78	0,004	23,05	0,001	-
18	24,97	0,007	24,97	0,003	-
21	26,04	0,004	25,83	0,003	-
25	24,93	0,002	26,19	0,004	-

3.2 Analyse du PHA

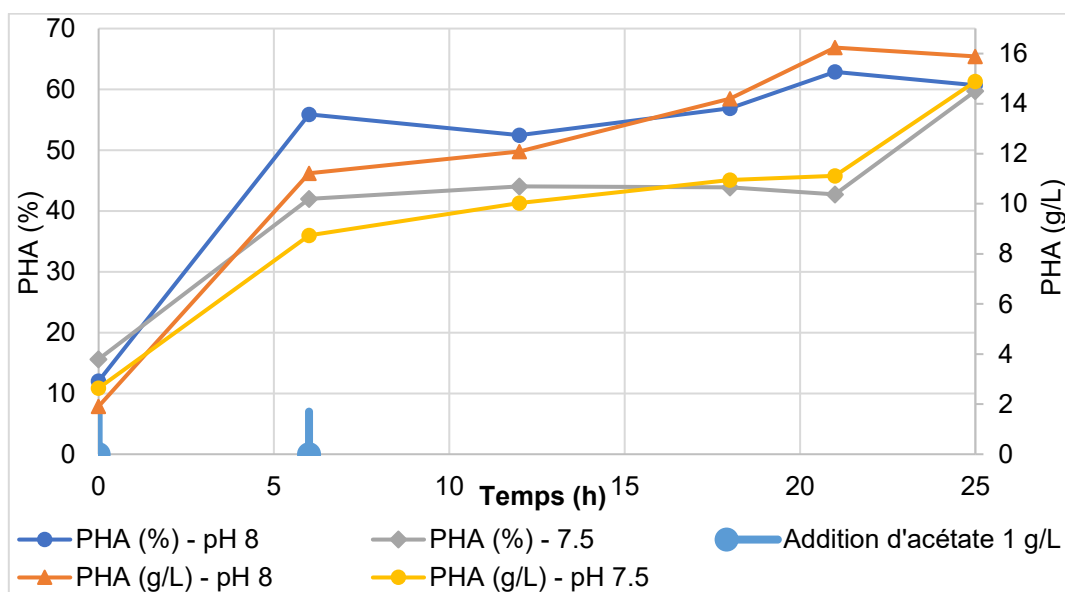


Figure 16 Variation du pourcentage (%) et de la concentration (g/L) de PHA des réacteurs à pH 7.5 et 8 avec les périodes d'addition du sodium d'acétate

La figure 16 montre une différence significative du pourcentage de PHA entre la fermentation à pH 7.5 et celle de 8 pendant les 21 premières heures où les concentrations ont atteint 42,7 et 62,8 % respectivement et un pulse de 5 g/L a été ajouté. De 21 heures jusqu'à la fin de l'expérience, le pourcentage de PHA à pH 7.5 a augmenté rapidement jusqu'à 59,7 % semblablement à celui de la fermentation à pH 8 où la concentration a augmenté de 2,2 % à

69,6 %. La fin de cette expérience a été marquée par un pourcentage d'accumulation de PHA des deux valeurs du pH presque similaires.

Les poids de PHA accumulés par les bactéries des fermentations à pH 7.5 et 8 ont de 14,8 et 15,8 g/L respectivement, avec des courbes à tendance et allure similaires à celle du pourcentage d'accumulation.

Tableau 16 Récapitulatif du pourcentage (%) et de la concentration (g/L) de PHA en fonction du temps des réacteurs à pH 7.5 et 8

Temps (h)	pH 7.5			pH 8		
	PHA (%)	PHA (g/L)	Écart type	PHA (%)	PHA (g/L)	Écart type
0	15,62	2,64	2,33	12,04	1,91	0,47
6	42,01	8,74	1,57	55,89	11,22	2
12	44,04	10,03	0,40	52,45	12,09	2,20
18	43,89	10,96	1,80	56,87	14,20	-
21	42,72	11,12	-	62,87	16,24	1,84
25	59,72	14,89	0,49	60,67	15,89	1,74

3.3 Analyse d'UFC

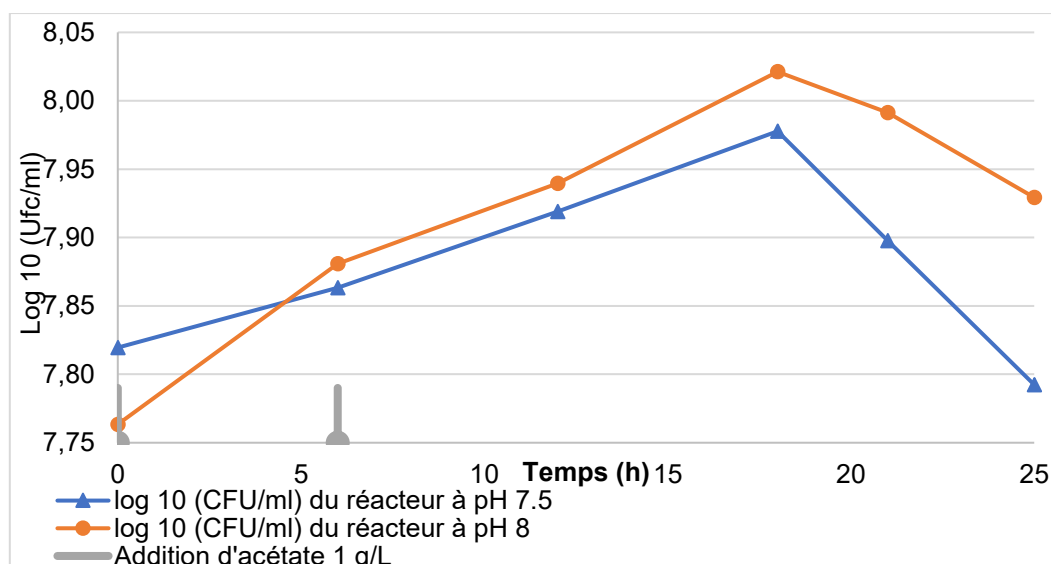


Figure 17 Unité de formation de colonies (Log 10) des réacteurs à pH 7.5 et 8 en fonction du temps (h)

La figure 17 présente la variation de l'unité de formation de colonies par millilitre en fonction du temps avec une dilution de l'ordre de 5. La concentration à 0 heure est de 7,82 log 10 (ufc/mL) à pH 7.5 et 7,76 log₁₀ (ufc/mL) à pH 8.

À 18 heures de fermentation, la biomasse s'est élevée à une concentration maximale de 7,98 Log 10 (ufc/mL) à pH 7,5 et 8,05 log 10 (ufc/mL) à pH 8.

À 18 heures, la population bactérienne a décliné fortement pour s'installer vers la fin de l'expérience à 7,79 à pH 7.5 et 7,93 à pH 8.

Les unités de formation de colonies à pH 6.5 et 7 sont légèrement supérieures à celles du pH 7.5 et 8. Cette différence s'est concrétisée davantage dans les concentrations de PHA obtenus par les différentes valeurs de pH. Il s'agirait principalement de la composition intrinsèque des bactéries qui se caractérise par un pH neutre, c'est-à-dire 7. On pourrait déduire que le pH 7 maintenu lors de l'expérience précédente est plus compatible que les autres (6,5 – 7,5 et 8).

Tableau 17 Unité de formation de colonie (Log 10) des réacteurs à pH 7.5 et 8 en fonction du temps (h)

Temps (h)	Log 10 (Ufc/mL) du réacteur à pH 8	Log 10 (Ufc/mL) du réacteur à pH 7.5
0	7,76	7,82
6	7,88	7,86
12	7,94	7,92
18	8,02	7,98
21	7,99	7,90
25	7,93	7,79

3.4 Consommation d'acétate

La figure 18 montre la consommation de l'acétate et des ions d'acétate tout au long de cette expérience. Comme mentionné auparavant, deux concentrations de 5 g/L litre ont été ajoutées séparément à 0 h et à 12 h. Contrairement à l'expérience des pH 6.5 et 7, les pulses de sodium d'acétate dans celle-ci ont été ajoutés de sorte que les microorganismes aient abondamment de source de carbone et pour voir quelles stratégie et concentration d'alimentation en nutriments carbonatés sont les plus favorables à la fois à la croissance des bactéries et l'accumulation du PHA.

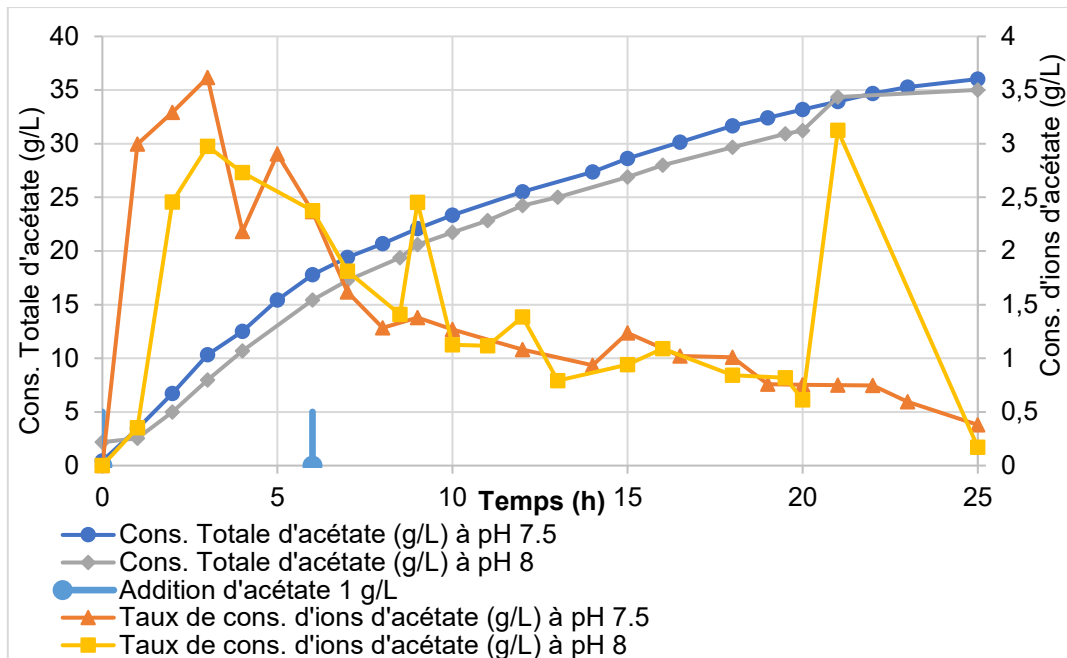


Figure 18 Consommation d'acétate (g/L) et le taux de consommation d'ions d'acétate (g/L) des réacteurs à pH 7.5 et 8

Les fermentations à pH 7.5 et 8 ont consommé une quantité d'acétate avec 32,9 et 36,01 g/L respectivement. L'ajout de 5 g/L d'acétate à 21 heures semble avoir affecté plus ardemment le taux de consommation des ions d'acétate avec un taux de 3,4 g/L à la troisième heure de fermentation en faveur du pH 7.5. Quant au pH 8, il a atteint à 2,9 g/L pendant les 3 premières heures de l'expérience pour descendre vers la fin de la fermentation à 0,4, semblablement au pH 8.

3.5 Paramètres physico-chimiques

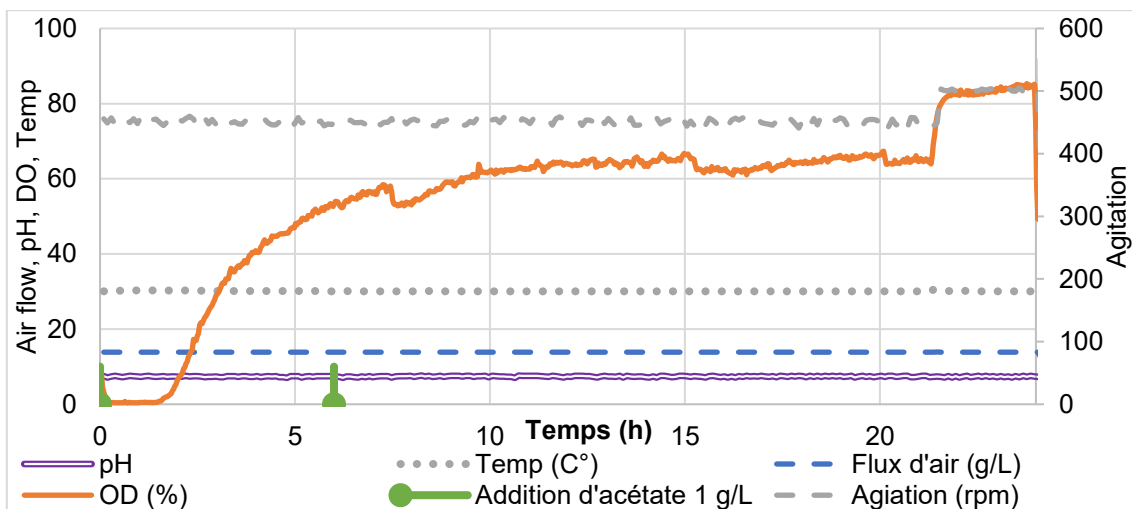


Figure 19 Variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur à pH 7.5

Les paramètres physico-chimiques comme les autres expériences qui ont précédé ont été maintenus sous contrôle durant toute la durée de celle-ci. La température maintenue à 30 degrés Celsius avec une agitation constante entre 450 et 500 rotations par minute pendant toute l'expérience.

L'oxygène dissout a enregistré une augmentation durant toute la fermentation. À 21 heures, une augmentation aiguë apparaît jusqu'à la fin de l'expérience.

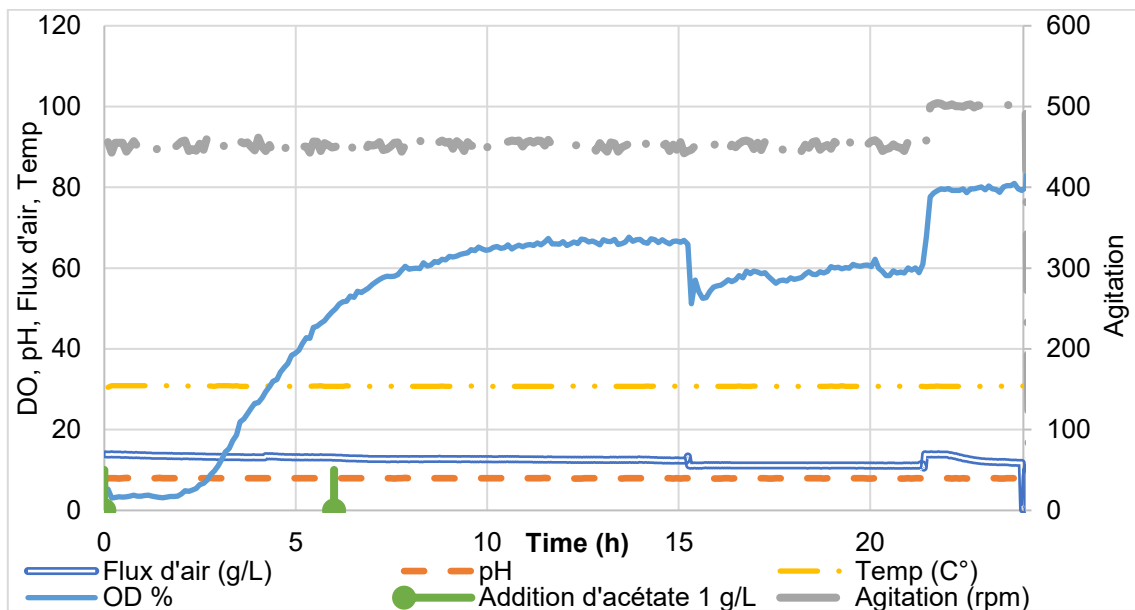


Figure 20 Variation du pH, de l'agitation (rpm), du flux d'oxygène (L/min), de l'oxygène dissout (%) et de la température (C°) en fonction du temps (h) du réacteur à pH 8

Le pH 8 a montré aussi une augmentation dans la valeur de l'oxygène dissout tout au long de l'expérience. Mais à 16 heures, une baisse d'OD a été aperçue. Les deux courbes des différentes valeurs de pH se ressemblent mis à part la baisse qui a été enregistrée par le pH 8 à 15 heures et demie de la fermentation.

4 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'accumulation et la production du bioplastique (PHA) à partir des boues secondaires activées des industries de pâtes et papiers par culture mixte a été étudié. Cette expérience se caractérise par un contrôle en continu de température, de pH, d'air et d'oxygène dissous. Les bactéries ont été alimentées tout au long de ces expériences avec du sodium d'acétate 1 g/L. Après plusieurs fermentations et à la fin de celles-ci, nous avons pu tirer les conclusions suivantes :

- L'accumulation du PHA dans le réacteur de contrôle commence à diminuer après les 11 premières heures de fermentation, contrairement à celle du réacteur de remplacement de boues qui continue d'augmenter.
- L'accumulation de PHA arrive à son maximum après 21 heures de fermentation. Par la suite, nous constatons une diminution de l'accumulation du PHA, mais le solide en suspension continue d'augmenter légèrement jusqu'à 31 heures puis il commence à chuter à son tour.
- Le changement de boues est effectivement un atout pour augmenter l'accumulation du PHA à partir des boues de papeterie, et cela maintenant une activité constante des microorganismes et une population bactérienne jeune.
- La combinaison de l'acide acétique et le sodium d'acétate en tant que source externe de carbone s'est montrée très prometteuse. Il s'agit aussi d'un produit beaucoup plus coûteux que le glucose.
- Quant au pH, il est recommandé sous la lumière de cette étude de maintenir un pH entre 6,5 et 7 pour une accumulation maximale du PHA avec un maximum 62 et 70 % (CDW) respectivement.

Il est clair que cette étude démontre la capacité des boues secondaires de pâtes et papiers à produire du bioplastique. En étudiant davantage la technique de changement de boues, nous pourrions potentiellement maintenir une chaîne de production en continu.

Il sera très important d'explorer d'autres perspectives pour produire du bioplastique dans l'avenir, comme l'étude des autres rejets industriels qui se caractérisent par un apport élevé en carbone et en phosphore.

La fermentation à souche pure semble plus difficile à mettre en œuvre, mais d'une autre part il a été montré que ce type de production est plus efficace que la culture mixte, mais très exigeante. Des études dans cette direction seront les bienvenues.

5 BIBLIOGRAPHIE

A. Carucci, D. Dionisi, M. Majone, E. Rolle, P. Smurra (2001) Aerobic storage by activated sludge on real wastewater, *Wat. Res.* Vol. 35, No. 16, pages 3833–3844.

A. J. Anderson, E. A. Dawes (1990) Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, Vol. 54, No. 4, p. 450-472.

Alexander Steinbüchel, Bernd Fuchtenbusch (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production, *Trend in biotechnology*, Volume 16, Issue 10, pp. 419-427

A. M. Gumel, M. S. M. Annuar, Y. Chisti (2013) Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates? *Journal of Polymers and the Environment*, Volume 21, Issue 2, pp 580–60

A.S.M. Chua, H. Takabatake, H. Satoh, T. Mino (2003) Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention Temps (SRT), and acetate concentration in influent, *Water Research*, Volume 37, Issue 15, pp. 3602–3611

Albuquerque MGE, V. Martino, E. Pollet, L. Avérous, M.A.M. Reis (2011) Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties, *Journal of Biotechnology*, Volume 151, Issue 1, Pages 66-76

A.E. Kizny Gordon, A.J. Mathers, E.Y. Cheong, T. Gottlieb, S. Kotay, A.S. Walker, T.E. Peto, D.W. Crook, N. Stoesser (2017) The hospital water environment as a reservoir for carbapenem-resistant organisms causing hospital-acquired infections—a systematic review of the literature, *Clinical Infectious Diseases*, 64(10), pages 1435-1444.

A.J. Anderson, E.A. Dawes (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54, pages 450–472.

A. Raj, S. Kumar, I. Haq, S.K. Singh (2014) Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp, *Ecological Engineering*, Volume 71, pages 355-362

A.S.M. Chua, H. Takabatake, H. Satoh, T. Mino (2003) Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention Temps

(SRT), and acetate concentration in influent, *Water Research*, Volume 37, Issue 15, pp. 3602–3611

B. Singh Kushwah, A.V.S Kushwah, Vishwajeet Singh (2016) Towards understanding polyhydroxyalkanoates and their use, *Journal of Polymer Research* volume 23, 153

B. Singh Kushwah, A.V.S Kushwah, Vishwajeet Singh (2016) Towards understanding polyhydroxyalkanoates and their use, *Journal of Polymer Research* volume 23, 153

C. M. Rochman, M.A. Browne, B. S. Halpern, B. T. Hentschel, Hoh E., Karapanagioti H. K. and Thompson R. C. (2013) Policy: classify plastic waste as hazardous, *Nature*, 494 (7436), pages 169–171.

C. Ratledge, B. Kristiansen (2001) *Basic Biotechnology*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

C. Kourmentza, J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H. N. Gavala, M. A. M. Reis (2017) Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate, *Bioengineering*, 4, 55

C. K. Pham, E. Ramirez-Llodra, C. H. S. Alt, T. Amaro, M. Bergmann, M. Canals, J. B. Company, J. Davies, G. Duineveld, F. Galgani, K. L. Howell, V. A. I. Huvenne, E. Isidro, D. O. B. Jones, G. Lastras, T. Morato, J. N. Gomes-Pereira, A. Purser, H. Stewart, I. Tojeira, X. D. Tubau, Van Rooij, P. A. Tyler, al. (2014) Marine litter distribution and density in European Seas, from the shelves to deep basins, ND

Davide Dionisi, Mauro Majone, Viviana Papa, Mario Beccari (2004) Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding, *Biotechnology and bioengineering*, Volume 85, Issue 6, pp. 569–579

D.H. Rhu, W.H. Lee, J.Y. Kim, E. Choi (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waster, *Water Sci Technol* (2003) 48 (8): 221–228.

D.J. Baumgardner (2017) Fungal Infections From Human and Animal Contact. *Journal of Patient-Centered Research and Reviews*, 4(2), pages 78-89.

Engler R. E. (2012) The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean, *Environmental Science and Technology*, 46(22), pages 12302–12315.

E.A. Dawes, P.J. Senior (1973) The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms, *Advances in Microbial Physiology*, Volume 10, pp. 135–266

F. Fang, H. Jiang, J. Wang, H.-Q. Yu (2014) Identifying the influential priority of the factors governing PHB production by activated sludge with integration of uniform design and grey relational analysis, *Separation and Purification Technology*, Volume 136, pages 111-114

- Guo-Qiang Chen, Karl-Heinz König, Robert M. Lafferty (1991) Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 84, Issue 2, November 1991, Pages 173–176
- G. Montiel-Jarillo, J. Carrera, M. E. Suárez-Ojeda (2017) Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of pH and N and P concentrations, *Science of The Total Environment*, Volume 583, pages 300-307
- G.N. Lee, J. Na (2013) Future of microbial polyesters, *Microbial Cell Factories* 12, pages 54–57.
- Guo-Qiang Chen (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry, *Chemical society reviews*, **38**, pp. 2434-2446
- Gurieff N, Lant P (2007) Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production, *Bioresource Technology*, Volume 98, Issue 17, Pages 3393-3403
- Hans-Josef Endres, Andrea Siebert-Raths (2011) Engineering Biopolymers, Manufacturing, Properties and Applications, Munich Hanser Publications, Sample Chapter 6: End-of-Life Options for Biopolymers, Pages I, III-XVI
- Hiroyasu Satoh, Takashi Mino, Tomonori Matsuo (1999) PHA production by activated sludge, *International Journal of Biological Macromolecules* Volume 25, Issues 1–3, Pages 105–1097
- H. Kyllönen, M. Lappi, R. Thun, A. Mustranta (1988) Treatment and characterization of biological sludges from the pulp and paper industry, *Water Science and Technology*, Volume 20, Issue 1, pages 183–192
- H. Satoh, Y. Iwamoto, T. Mino, T. Matsuo (1998) Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic, *Water Science and Technology*, Volume 38, Issue 2, pp. 103–109
- H. Takabatake, H. Satoh, T. Mino, T. Matsuo (2002) PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater, *Water Science Technology*, Volume 45, Issue 12, pp. 119–126
- H. Chen, H. Meng, Z. Nie, M. Zhang (2013) Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids, *Bioresource Technology*, Volume 128, Pages 533–538
- Jiun-Yee Chee, Sugama-Salim Yoga, Nyok-Sean Lau, Siew-Chen Ling, Raeid M. M. Abed, Kumar Sudesh (2010) Current Research, Technology and Education in applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp. 1935-1404
- J. Możejko-Ciesielska, R. Kiewisz (2016) Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, Volume 192, Pages 271-282

- J. Jokela, J. Rintala, A. Oikari, O. Reinikainen, K. Mutka, T. Nyrönen (1997) Aerobic composting and anaerobic digestion of pulp and paper mill sludges, *Water Science and Technology*, Volume 36, Issue 11, pages 181-188
- J.C. Fradinho, M.A.M Reis, A. Oehmen (2016) Beyond feast and famine: Selecting a PHA accumulating photosynthetic mixed culture in a permanent feast regime, *Water Research* Volume 105, Pages 421-428
- Jong-il Choi, Sang Yup Lee (2000) Efficient and economical recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals, *Biotechnol Bioeng*, Volume 62, Issue 55, pp. 546-553
- L. Cavallé, M. Albuquerque, E. Grousseau, A.-S. Lepeuple, J.-L. Uribelarrea, G. HernandezRaquet, E. Paul (2016) Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture, *Bioresource Technology*, Volume 201, Pages 65-73
- L. Cavallé, M. Albuquerque, E. Grousseau, A.-S. Lepeuple, J.-L. Uribelarrea, G. Hernandez Raquet, E. Paul (2016) Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture, *Bioresource Technology*, Volume 201, Pages 65-73
- Luísa S. Serafim, Paulo C. Lemos, Rui Oliveira, Maria A.M. Reis (2004) Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding condition, *Biotechnology and bioengineering*, Volume 87, Issue 2 pp. 145–160
- M.V. Reddy, S.V. Mohan (2012) Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment *Bioresource Technology*, Volume 114, Pages 573-582
- M. Edalatmanesh, M. Sain, S.N. Liss (2010) Cellular biopolymers and molecular structure of a secondary pulp and paper mill sludge verified by spectroscopy and chemical extraction techniques. *Water Science and Technology*, Volume 62, Issue 12, pages 2846–2853
- M. Aitken, B. Evans, J. Lewis (1998) Effect of applying paper mill sludge to arable land on soil fertility and crop yields, *Soil use and management*, 14(4), pages 215-222.
- M. Lemoigne (1926) Produits de deshydratation et de polymérisation de l'acideoxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol*, 8, pages 770–782.
- M. A. M. Reis, L. S. Serafim, P. C. Lemos, A. M. Ramos, F. R. Aguiar, M. C. M. Van Loosdrecht (2003) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures,

Bioprocess and Biosystems Engineering, Bioprocess and Biosystems Engineering, Volume 25, Issue 6, pp 377—385

M.A.M. Reis, L.S. Serafim, P.C. Lemos, A.M. Ramos, F. R. Aguiar, M. CM. Van Loosdrecht (2003) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, volume 25, pages 377–385

M.J. Jackson, M.A. Line (1997) Organic composition of a pulp and paper mill sludge determined by FTIR, ¹³C CP MAS NMR, and chemical extraction techniques, *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(6), pages 2354-2358.

M. Albuquerque, C. Torres, M. Reis (2010) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection, *Water Research*, Volume 44, Issue 11, Pages 3419-3433.

M.G.E. Albuquerque, M. Eiroa, C. Torres, B.R. Nunes, M.A.M. Reis (2007) Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses, *Journal of Biotechnology*, Volume 130, Issue 4, pp. 411–421

Ryan P. G. (2015) A brief history of marine litter, *Marine Anthropogenic*, ND

R Kleerebezem, M. CM. van Loosdrecht (2007) Mixed culture biotechnology for bioenergy production, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 18, Issue 3, Pages 207-212

R. M. Macrae and J. F. Wilkinson (1958) Poly-β-hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*, *MICROBIOLOGY* Volume 19, Issue 1, pp. 210-222

R. Kaur, R.D. Tyagi, X. Zhang (2020) Review on pulp and paper activated sludge pretreatment, inhibitory effects and detoxification strategies for biovalorization, *Environmental Research*, Volume 182, 109094

Roland Geyer, Jenna R. Jambeck, Kara Lavender (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made, *Law Science Advances*, Volume 3, no. 7

Ojumu. T. V, Yu. J, Solomon. B .O (2004) Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (1), pp. 18-24

PlasticsEurope (2006) The compelling facts about Plastics: An analysis of plastic production, Demand and recovery for 2006 in Europe.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms, *Water Science and Technology* Volume 48, Issue 8, pp. 175–180.

PlasticsEurope, *Plastics—the facts (2016): An analysis of European plastics production, Demand and waste data.*

Paulo C. Lemos, Luísa S. Serafim, Margarida M. Santos, Maria A. M. Reis, Helena Santos (2003) Metabolic Pathway for Propionate Utilization by Phosphorus-Accumulating Organisms in Activated Sludge: ¹³C Labeling and In Vivo Nuclear Magnetic Resonance, ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY AND BIODEGRADATION, Vol. 69, No. 1, pp. 241–251

P.C Lemos, C Viana, E.N Salgueiro, A.M Ramos, J.P.S.G Crespo, M.A.M Reiszcorr (1998) Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture ,Enzyme and Microbial Technology, Volume 22, Issue 8, June 1998, Pages 662-671

Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O.dece, br2003 African Journal of Biotechnology Vol. 3 (1), pp. 18–24, January 2004

P. Faubert, S. Barnabé, S. Bouchard, R. Côté, C. Villeneuve (2016) Pulp and paper mill sludge management practices: What are the challenges to assess the impacts on greenhouse gas emissions?, Resources, Conservation and Recycling, Volume 108, pages 107-133

S. Bengtsson, A. Werker, M. Christensson, Thomas Welander (2008) Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater, Bioresource Technology, Volume 99, Issue 3, Pages 509-516

S. Pratt, L.-J. Vandi, D. Gapes, A. Werker, A. Oehmen, B. Laycock (2019) Polyhydroxyalkanoate (PHA) Bioplastics from Organic Waste, Biorefinery, pages 615-638

S.Y. Lee, (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and bioengineering 49, pages 1–14.

S. Bengtsson, A.R. Pisco, M.A.M. Reis, P.C. Lemos (2010) Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms, Journal of Biotechnology, Volume 145, Issue 3, pp. 253–26

Santiago Rodriguez-Perez, Antonio Serrano, Alba A. Pantion, Bernabe Alonso-Farinas (2018) Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review, Journal of Environmental Management, Journal of Environmental Management Volume 205, Pages 215-230

S. Venkata Mohan, M. Venkateswar Reddy (2013) Optimization of critical factors to enhance polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by mixed culture using Taguchi design of experimental methodology, Bioresource Technology Volume 128, Pages 409-416

S. B. Sheavly, K. M. Register (2007) Marine Debris & Plastics: Impacts and Solutions. Journal of Polymers and Environment, volume 15, pages 301–305.

S. Yan, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli (2006) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms, Water science and technology, Volume 53, Issue 6, pp. 175–180

S. Yan, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli (2006) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms, Water Science and Technology, Volume 53, Issue 6, pages 175–180.

S. Ciesielski, T. Pokój, E. Klimiuk (2010) Cultivation-dependent and -independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw glycerol, J. Microbiol. Biotechnol. 20(5), pages 853–861.

Simon Bengtsson, Alan Werker, Magnus Christensson, Thomas Welander (2008) Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater, Bioresource Technology, Volume 99, issue 3, pp. 509-516

Talat Mahmood, Allan Elliott (2006) A review of secondary sludge reduction technologies for the pulp and paper industry, Water Research, Volume 40, Issue 11, Pages 2093-21

T. Chagas, L. Seki, J. Cury, J. Oliveira, A. Dávila, D. Silva, M. Asensi (2011) Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil, Journal of applied microbiology, 111(3) pages 572-581.

T. Miller (2014) Comparative environmental assessment of organic and mineral fertilizers—Case study of Biofertilizer produced from industrial waste, ND

T. Mino, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process, Water Research, Volume 32, Issue 11, pp. 3193–3207

Yang Jiang, Leonie Marang, Jelmer Tamis, Mark C.M. van Loosdrecht, Henk Dijkman, Robbert Kleerebezem (2012) Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic, Water Research, volume 46, issue 17, Pages 5517–5530

Y. Doi, A. Segawa, M. Kunioka (1990) Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*, International Journal of Biological Macromolecules Volume 12, Issue 2, pp. 106–111

Y. Comeau, K.J. Hall, W.K. Oldham (1988) Determination of poly- β hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography, Applied and Environmental Microbiology, p. 2325-2327

Y. Dai, Z. Yuan, K. Jack, J. Keller (2007) Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source, *Journal of Biotechnology*, Volume 129, Issue 3, Pages 489-497

Y. Pu, F. Hu, F. Huang, A.J. Ragauskas (2015) Lignin structural alterations in thermochemical pretreatments with limited delignification. *BioEnergy Research*, 8(3), pages 992- 1040

Zhang. J, Wang. X, Gong. J, Gu. Z (2004) A study on the biodegradability of polyethylene terephthalate fiber and diethylene glycol terephthalate. *J. Appl. Polym. Sci.* 93, 1089–1096.