HAL
open science

Modélisation multi-échelle de la culture de microalgues

Vincent Gernigon

To cite this version:

Vincent Gernigon. Modélisation multi-échelle de la culture de microalgues. Génie des procédés. INSA de Toulouse, 2020. Français. NNT : 2020ISAT0008 . tel-03151485

HAL Id: tel-03151485

https://theses.hal.science/tel-03151485

Submitted on 24 Feb 2021

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : INSA de Toulouse - Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse
Spécialité : GPE - Génie des Procédés et de l'Environnement
Ecole doctorale : MEGEP - Mécaniques, Energétique, Génie Civil et Procédés
Unité de recherche : TBI - Toulouse Biotechnology Institute
Thèse dirigée par : Pascal GUIRAUD et Jérôme MORCHAIN

Présentée et soutenue le 24/01/2020 par :

Vincent GERNIGON

Modélisation multi-échelle de la culture de microalgues

Jury

Mme. Ligia BARNA, Présidente
M. Jérémy PRUVOST, Rapporteur
M. Éric OLMOS, Rapporteur
Mme. Maeva SUBILEAU, Examinatrice
M. Alexandre BESSON, Invité
M. Pascal GUIRAUD, Co-directeur de thèse
M. Jérôme MORCHAIN, Co-directeur de thèse

I. Définition du Cadre de l'Étude

Résumé et *Abstract*

Résumé : S'inscrivant au sein du projet PLAISIR qui vise à la commercialisation d'outils de production de microalgue alimentaires, l'objectif du présent travail est d'aider à la conception et au dimensionnement de ces outils de production : les photobioréacteurs. Pour cela, on procède à la modélisation du comportement de la phase biologique et des propriétés du réacteur afin d'être capable de simuler la croissance de la biomasse. Le travail se décompose en deux parties. La première cherche à mettre en évidence les aspects du procédé ayant un impact sur la cinétique de croissance, puis à les quantifier. On s'appuie en premier lieu sur la littérature, puis sur plusieurs campagnes expérimentales dans le but d'affiner les connaissances au cas particulier de notre souche (*Arthrospira Platensis* alias Spiruline). La seconde étape consiste, pour un procédé donné (i.e. réacteur + protocole), à déterminer les conditions réactionnelles correspondantes et ainsi à pouvoir utiliser les modèles cinétiques établis précédemment. La plus-value de la démarche se trouve sur deux niveaux. La première se situe dans l'approche multi-échelle des phénomènes, à savoir que l'on se place ici à l'échelle de la cellule, tant pour l'écriture des cinétiques de croissance que pour les conditions réactionnelles. Une telle approche permet de prendre en compte l'impact du réacteur lui-même, notamment du aux hétérogénéités locales qu'il contient. On améliore ainsi l'acuité des simulations, en particulier face aux changements d'échelles : du laboratoire vers la production. L'autre aspect important, est de se placer dans un contexte multiphysique où les différents phénomènes sont fortement couplés. L'étude tente donc de rendre compte des conséquences des paramètres opératoires en interactions, plutôt que considérés individuellement. L'étude s'est alors déroulée autour de deux thématiques : l'étude de l'évolution de la composition du milieu d'un côté et l'étude de l'exposition à la lumière de l'autre. Elle met en évidence que l'écriture de la seule consommation des nutriments par la biomasse ne permet pas de décrire certains résultats sans y ajouter les équations propres aux réactions entre les constituants du milieu lui-même. Il est aussi proposé un modèle et une méthode pour décrire comment le mélange dans le photobioréacteur joue sur la croissance des microalgues via l'éclairement du volume réactionnel. A partir de quoi sont tirées des euristiques pour optimiser le procédé à travers ces trois points (milieu de culture, mélange et éclairement).

Mots clefs : Photobioréacteur, microalgues, mécanique des fluides, transfert radiatif, signal d'exposition à la lumière, expériences

Abstract: In the frame of the PLAISIR project, which is aiming at the commercialization of alimentary microalgae production devices, the objective of the present work is to improve the design of this production devices, named photobioreactors. We proceed to the modelization of the biological phase and of the properties of the reactor in order to simulate the biological growth. It is a two steps work. Firstly, it is about to highlight which ones of the process parameters that have an impact on the growth kinetic, then quantify them. It relies on a bibliographic study and after that on several experimental campaigns to refine the knowledge to the peculiar case of our strain (*Arthrospira Platensis* aka. Spirulina). The second step consist in the calculation reactional conditions in given process, and so enable the use of the previously determined kinetic models. This work benefit from a two-level added value. The first one is the multi-scale approach of the phenomena; this is to say that we write both the kinetic and the reactional conditions at the cell-scale. Such an approach enables to take into account the effect of the reactor itself, for instance thanks to the local heterogeneities it contains. We so improve the accuracy of the resulting simulations, especially in front of different reactor scales (laboratory one, vs. production one). The other aspect is to considerate the issue on a multi-physic way, because all the phenomena are strongly coupled each-others. The work is thus trying to depict the impact of the gathered parameters rather than to the same ones taken separately. The study then focuses on two topics: the evolution of the composition of the culture medium and the biomass exposition to the light. It is shown that the mere consumption of the nutrient by the biomass is insufficient to predict all the results without the addition of the inter-components chemical reactions. It is also proposed a methodology to describe how the mixing impact of the growth speed through the lighting of the vessel. Finally, some heuristics are deduced to optimize the process through these three points, namely: culture medium, mixing and lighting.

Keywords: Photobioreactor, microalgae, fluid mechanic, radiative transfer, fluctuating light signal, experiments

Sommaire

Résumé et *Abstract* 3

Sommaire 6

Nomenclature 12

Liste des Tableaux 16

Liste des Figures 18

Liste des Annexes 30

I. Définition du Cadre de l'Étude 31

1. Présentation du Contexte 32

2. État de l'Art Bibliographique 34

A. Spiruline 35

a. Biologie 35

b. Croissance 38

c. Valorisation 40

B. Photobioréacteurs 42

a. Caractéristiques Générales 42

b. Volume : Ouvert ou Fermé 43

c. Éclairement 44

d. Agitation 46

e. Contrôle de la Température 48

f. Conduite du Procédé 49

g. Récolte 50

h. Précautions 53

C. Dimensionnement 55

a. Exploitation des Cinétiques 55

b. Approche Macroscopique 56

c. Approche Locale 58
3. Démarche Scientifique 61
A. Méthodologie Générale 62
B. Choix de Modélisation 66
4. Synthèse 74
II. Caractérisation du Système Biologique 77
1. Moyens Matériels et Méthodes 78
A. Photobioréacteurs 79
a. Photobioréacteurs de paillasse 80
b. Photobioréacteur Pilote 82
c. Photobioréacteur Homogène 86
B. Métrologie 89
a. Choix du Suivi de la Quantité de Biomasse 89
b. Mesure de ma Matière en Suspension 90
c. Mesure de la Densité Optique 92
d. Cas Particulier du Photobioréacteur Homogène 97
C. Réalisation des Cultures 101
a. Conservation de la Spiruline 101
b. Milieu de Culture 102
c. Protocole de Culture 103
d. Considérations Pratiques 105
2. Discussion Préliminaire au Travail de Caractérisation et Modélisation 109
3. Impact de la Température et de la Composition du Milieu 115
A. Impact de la Température 116
a. Influence de la Température en Régime Permanent 116
b. Intercorrélation Entre Température et Lumière 117
c. Réponse à une Variation de Température 119

B. Impact de la Concentration en Nitrate 122
C. Impact de la Concentration en Bicarbonate 124
a. Modélisation des Données de le Littérature 124
b. Vérification Expérimentale du Modèle 129
D. Consommation des Nutriments 132
4. Impact de l'Éclairement 135
A. Échelle Macroscopique – Expériences préliminaires 136
B. Échelle Locale 138
a. Modèle de Réponse Irradiance - Croissance 138
b. Exploitation en Réacteurs Non-Homogènes 140
C. Comportement Dynamique 146
a. Observations dans la Littérature 146
b. Construction d'un Modèle Dynamique 149
c. Ajustement du Modèle Relativement à la Littérature 151
d. Conséquences et Propriétés du Modèles 154
e. Vérification Expérimentale 156
III. Modélisation des Conditions de Culture 161
1. Modélisation de la composition 162
a. Réduction du Système des Espèces Chimiques 162
b. Mise en Équations de la Chimie du Système 163
c. Validation 168
2. Modélisation de l'Éclairement 171
A. Méthode Numérique : Monte-Carlo 172
B. Implémentation 179
a. Construction de l'Algorithme 179
b. Calcul de la trajectoire des Photons 185
c. Initialisation de la Trajectoire des Photons 188

d. Conditions aux Limites 189
e. Calcul de l'Absorption de l'Énergie Lumineuse 190
f. Calcul de la Diffusion Lumineuse 191
g. Terminaison du Calcul de Trajectoire 193
h. Convergence de l'Algorithme 196
i. Validation sur un Cas Analytique 198
j. Application au Photobioréacteur Pilote 199
3. Modélisation de l'Agitation 205
A. Modélisation de l'Écoulement 206
a. Mécanique des Fluides Numériques 206
b. Convergence de la Simulation 212
c. Validation 216
d. Limites et Discutions 220
B. Simulation du Mouvement des Cellules 222
a. Lâcher de Particules Lagrangien 222
b. Simulation du Mouvement des Particules/Cellules 223
c. Exploitation des Résultats 227
d. Calcul de la Cinétique de Croissance Résultante 232
e. Discussion 237
4. Le Photobioréacteur Numérique 243
A. Implémentation 244
a. L'Algorithme 244
b. Les Sous-Fonctions 247
B. Résultats 251
IV. Conclusion 267
1. Démarche 268
2. Restrictions 270

3. Heuristiques 273

Bibliographie 279

Annexes 288

Nomenclature

Tableau 1 : Nomenclature utilisé dans le manuscrit.

Symbole	Unité / Nature	Signification
—, ~,<>	opérateurs	Resp. moyenne temporelle et sur les éléments d'une population ou volumique
[x]	$mol \cdot L^{-1}$	Concentration molaire de l'espèce chimique x
$[x]$	$mol \cdot L^{-1}$	Concentration de x
μ_k	fonction	Fonction dont les images sont comprises en 0 et 1, ayant pour argument $\mathcal{L}$, et modélisant l'influence du phénomène j sur la croissance de la spiruline dans le photobioréacteur
$\mu_k^{\mathscr{c}}$	fonction	Fonction dont les images sont comprises en 0 et 1, ayant pour argument $\mathcal{L}$, et modélisant l'influence de j sur la croissance d'une cellule $\mathscr{c}$
μ_k^{PBR}	fonction	Fonction dont les images sont comprises en 0 et 1, ayant pour argument $\mathcal{L}$, et modélisant l'influence de j sur la croissance dans le photobioréacteur
μ_{max}	$g \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$	Vitesse de croissance maximale de la spiruline dans le modèle
$\mathscr{c}$, p	exposant	Cellule particulière, élément de la population P, ou particule
C_{ma}, C_t	(-)	Resp. les coefficients de masse ajouté et de trainé d'une bulle
D	UA.	Matrice caractérisant la position d'un photon dans le plan Oxy
Da	(-)	Damköhler, nombre adimensionnel comparant le temps caractéristique d'une réaction avec celui des variations de $\mathcal{L}$
d_b	m	Diamètre équivalent en volume des bulles
dep	m	Déplacement élémentaire
dev_1, dev_2	(°)	Angles (resp. latitude, longitude) caractérisant la déviation d'un photon dans son repère de Frenet
$Diff_x$	$m^2 \cdot s^{-1}$	Coefficient de diffusion de l'espèce x dans l'eau
DO_x	(-)	Densité optique à la longueur d'onde x
Ea	$m^2 \cdot kg^{-1}$	Coefficient d'absorption lumineuse (moyenné sur le PAR)
Es	$m^2 \cdot kg^{-1}$	Coefficient de diffusion lumineuse (moyenné sur le PAR)

f	Hz	Fréquence d'un signal
F	m^{-1}	Facteur de forme du photobioréacteur
g	(-)	Coefficient d'anisotropie de la diffusion lumineuse selon une loi de Henyey-Greenstein (moyenné sur le PAR)
H_x	$L \cdot atm \cdot mol^{-1}$	Constante de Henry de l'espèce x
I	$\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Irradiance : l'intensité du flux surfacique de lumière, ici mesuré sur le PAR, (peut se trouver en "$\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$" dans la littérature)
$I_{@\ell/p}$	$\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Irradiance locale vue par une cellule ℓ ou la particule p
I_0	$\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Irradiance incidente
$i_{\ell/p}$	sans unité (-)	Variable interne à la cellule ℓ ou la particule p
I_{ens}	$\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Valeur moyenne des irradiances vues par l'ensemble de la population P pendant toute la durée de l'acquisition
k	indice	Référence à un phénomène ayant un impact sur la croissance
K_{ax}	(-)	Constante d'équilibre acido-basique x
K_g^x	s^{-1}	Coefficient de transfert de matière interfacial de l'espèce x
K_x	(UA.)	Constantes des différentes lois cinétiques (indicées en fonction)
M	$\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Matrice d'un champ d'irradiance
m_x	kg	Masse de x
M_x	$g \cdot mol^{-1}$	Masse molaire de l'espèce x
N	cardinal	Nombre de cellule de la population P
n_x	(-)	Indice de réfraction de x
$Oxyz$, $\{x ; y; z\}$	repère	Base orthonormée directe, identique à toutes considérations géométriques et les coordonnées métriques d'un point dans ce repère
p	s	Période d'un signal
P	ensemble	Population représentative des cellules dans le photobioréacteur
PAR	ensemble	Photons dont la longueur d'onde est comprise entre 400 et 700 nm, (acronyme de "*Photosynthetic Active Radiation*")
PO	m	Profondeur optique

prob(x), PROB(x)	(-)	Resp. fonction de répartition et densité de probabilité d'un évènement x
p_x	atm	Pression partielle de x
R	$g \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$	Vitesse de croissance biologique
R^2	(-)	Coefficient de détermination d'une corrélation linéaire
rand, randi	(-)	Nombre tiré de façon aléatoire uniforme entre 0 et 1, nombre entier équiprobable dans un intervalle donné en argument
R^{ℓ}	$g \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$	Vitesse de croissance d'une cellule ℓ dans le photobioréacteur
Re	(-)	Nombre de Reynolds d'un écoulement fluide
R^{pbr}	$g \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$	Vitesse de croissance globale de la spiruline dans le photobioréacteur
$\int, \iint, \iiint$	opérateurs	Intégrale selon resp. 1,2 et 3 variable(s)
seuil	(-)	Constante définissant le critère d'arrêt de la propagation d'un photon
t	s	Temps
T	°C	Température
V_x	L	Volume de x
v^x	$m \cdot s^{-1}$	Vitesse absolue de x
v^x_y	$m \cdot s^{-1}$	Vitesse absolue de x projetée sur l'axe y
X	$g \cdot L^{-1}$	Concentration massique en spiruline
y_x^y	(-)	Fraction massique de l'espèce x dans y
Π, Σ	opérateurs	Resp. produit et somme d'une liste d'éléments (à ne pas confondre avec la variable $\mathcal{L}$ qui est en italique)
τ_x	s	Temps caractéristique de x
$f(x)$	UA.	Fonction arbitraire ayant pour argument x
Γ	(-)	Taux d'intégration de la cinétique biologique
$\Delta x, \delta x$	opérateur	Variation d'une variable x entre deux états discrets (itérations, pas de temps), variation élémentaire de x
$\mathcal{L}$	ensemble	Paramètres opératoires considérés dans le modèle

$\Sigma_{@\ell}$	ensemble	Valeurs locales des paramètres opératoires de Σ à l'emplacement de ℓ
α	%	Taux de gaz
γ	$N \cdot m^{-1}$	Tension de superficiel du le milieu de culture
η_x	Pa·s	Viscosité dynamique de x
θ, φ	(°)	Angles (resp. longitude, latitude) caractérisant la direction du photon dans le repère $Oxyz$
λ_x	$mS \cdot m^2 \cdot mol^{-1}$	Conductivité molaire ionique de l'espèce x
ρ_x	$kg \cdot m^{-3}$	Masse volumique de x
υ_x	UA.	Coefficient stœchiométrique de l'espèce x dans la réaction considérée

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Nomenclature utilisé dans le manuscrit. 12

Tableau 2 : formulation du milieu de culture P3 tel qu'usuellement utilisé lors des expériences 103

Tableau 3 : Composition Minérale de la Spiruline [8] 133

Tableau 4 : **(a)** Conditions opératoires des différentes cultures, **(b)** Résultats de l'expérience et exploitation. Remarque : La croissance spécifique correspond à la vitesse de croissance divisée par le facteur de forme F de la culture considérée 137

Tableau 5 : Liste des grandeurs physiques utilisées pour représenter la physico chimie du milieu. 167

Tableau 6 : Liste des grandeurs physiques utilisées lors de la simulation du champ d'irradiance dans le photobioréacteur pilote 177

Tableau 7 : Liste des grandeurs physiques utilisées lors de la simulation CFD du photobioréacteur pilote. 210

Tableau 8 : Conditions opératoires des différentes cultures des expériences réalisées sur le photobioréacteur pilote 260

Liste des Figures

Figure 1 : Photographie d'une partie des membres de l'équipe TIM (15/06/2018)..... 32

Figure 2 : Observation au microscope optique de deux souches différentes de spiruline : **(a)** Paracas, **(b)** Lonar. Remarque : Les deux possèdent un agencement spatial en hélicoïde mais diffèrent par leur élongation (i.e. le pas de l'hélicoïde) 37

Figure 3 : Observation au microscope optique d'un trichome de spiruline le long duquel on constate la présence d'une nécridie 37

Figure 4 : Observation au microscope optique de la croissance des trichomes de spiruline depuis le stade unicellulaire, pour cela on part d'une culture dont on a dissocié les cellules par ultrason **(a)** observée au cours du temps, resp. à 4, 6 et 10 jours pour **(b)**, **(c)** et **(d)**. Remarque : on constate la présence de nombreux débris cellulaires dus à une lyse partielle induite par les forts cisaillements du bain à ultrasons. 38

Figure 5 : Photographies : **(a)** et **(b)** de recettes culinaires avec de la spiruline parmi les principaux ingrédients, **(c)** Phycocyanine (pigment bleu) extraite de la spiruline 41

Figure 6 : Graphique montrant la pression partielle en dioxygène dissout (à pression atmosphérique) dans une culture de spiruline pour laquelle le bullage est arrêté au bout de 48h (photobioréacteur pilote, 20 sources, 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, 35°C, 10 $L \cdot min^{-1}$). Remarque : il s'en est suivi un effondrement rapide de la culture (non quantifiable par le suivi en ligne du fait de la floculation de la biomasse due à l'arrêt de l'agitation, si ce n'est à travers l'arrêt de l'accumulation de dioxygène dans le milieu)..... 43

Figure 7 : Photographies, **(a)** prototype de cuve de culture de spiruline destinée à être placée en extérieur (Alg&You), **(b)** bassin de culture artisanale de spiruline sous serre ombragée (spiruline du sud-ouest, Cintegabelle) 44

Figure 8 : Graphique des spectres d'émission (Ocean Optics, USB2000+) de différentes sources possibles pour l'éclairement des cultures, à savoir : soleil, tube fluorescent (visible Figure 15) ou LED (BDL - vs-f600ww-12v-3528-10mm-2700k, visible Figure 21.(a)). Remarque : les spectres sont normalisés par les maxima pour une meilleure lecture 46

Figure 9 : **(a)** Photographie de cuves MACRO contenant des échantillons de spiruline ayant bio-floculé (à divers degrés), **(b)** vue au microscope optique, avec en vert les trichomes de spiruline et en bleu les exo-poly-saccharides révélé aux bleu d'alcian (0,6‰$_m$ + 1,2‰$_m$ d'acide acétique) 52

Figure 10 : Photographies, **(a)** gâteau de spiruline après filtration et pressage (depuis le bassin vu en Figure 7.(b)), **(b)** échantillon de spiruline après centrifugation et ayant relargué certains composés intracellulaires (phycoérythrine probablement) 52

Figure 11 : Croissances comparées sur 24h de deux cultures identiques (au sens de Σ l'ensemble des paramètres opératoires considérés) suivis par densité optique à 680nm (DO_{680}) 64

Figure 12 : Photographie montrant : **(a)** une forte population bactérienne au voisinage d'un fragment de trichome, **(b)** la coexistence d'une autre bactérie filamenteuse dans la culture..... 65

Figure 13 : Exemple du suivi quotidien sur trois semaines de la croissance de la spiruline dans un milieu contenant à la fois ammoniaque et nitrate et présentant un décrochement symptomatique de ce type de milieu, ici au jour 14, l'ammoniaque a par la suite été retirée de la composition du milieu (données Alg&You)..... 70

Figure 14 : Schéma synoptique du travail réalisé 75

Figure 15 : Photographie du 01/04/2016 (quatre mois après le début de ce travail) : **(a)** du premier banc de culture de spiruline, les cuves étaient alors des ballons à fond plat de volumes allant de 500 mL à 10 L et éclairés par des tubes fluorescents, la régulation en température n'était pas encore mise en place et la formulation milieu était en cours (milieu "P0") **(b)** preuve de concept d'un photobioréacteur à usage domestique : première pierre du projet PLAISIR 78

Figure 16 : Photographie du banc de photobioréacteurs de paillasse, en eau et en lumière 80

Figure 17 : Schéma en coupe horizontale d'un photobioréacteur de paillasse 81

Figure 18 : (a) rendu en 3D de la préconception assistée par ordinateur (CAO) du pilote, (b) photographie du dispositif final en eau, avec de gauche à droite : l'ordinateur dédié à l'acquisition de la microscopie en ligne, puis l'interface (écran, clavier, souris) de suivi et contrôle du pilote, la cuve dans son châssis caréné ouvert par l'avant et son bac de rétention en bas (c) photographie macro du pilote en présence de spiruline 82

Figure 19 : Schéma en coupe horizontale du photobioréacteur pilote (à l'échelle)..... 84

Figure 20 : Schéma global du photobioréacteur pilote 85

Figure 21 : Détails du pilote en photographies : **(a)** des rubans de LED du tube central immergé, **(b)** d'un bulleur, **(c)** d'un thermoplongeur, **(d)** de la boucle métrologique avec de

haut en bas : la pompe (posée sur une étagère), les sondes physicochimiques (finition inox), le dispositif de microscopie en ligne (le long d'un profilé) et le spectrophotomètre (juste en dessous) 86

Figure 22 : Photographies : **(a)** dispositif de microscopie en ligne avec de gauche à droite : une source de lumière LED (scotch vert vierge), une lentille divergente (au niveau de la bague de serrage), la cellule d'écoulement où circule la Spiruline (de bas en haut), un objectif de microscope x4 (EDMUND OPTICS, Micro Plan 4x), tout à droite la caméra (BASLER, acA2040-90um) dont le capteur est dans le plan focal de l'objectif , **(b)** Image brute délivrée par le dispositif (2000x2000 pixel), le champ d'observation fait 1x1 mm 86

Figure 23 : Photographies : **(a)** le photobioréacteur homogène hors de la carène avec sur le châssis (depuis le premier plan) : la caméra et son objectif, les deux volumes réactionnels immergés dans le bain-marie, et le panneau LED diffusant le tout sur un banc optique et de gauche à droite : le châssis, le bain thermostaté, l'alimentation électrique réglable, l'interrupteur commandé, un générateur basse fréquence, **(b)** le dispositif en algues à l'intérieur de sa carène ouverte sur l'avant et le dessus, une partie des précédents éléments sont placés à l'extérieur de celle-ci 88

Figure 24 : Comparaison de la distribution des longueurs de trichomes de spiruline (obtenue sur MALVERN Morphologi G3) de deux cultures de 1 mois réalisées dans des conditions d'agitation différentes mais issues d'un même inoculum. 90

Figure 25 : Photographie macro d'un gâteau de filtration obtenu sur Büchner 92

Figure 26 : Spectre sur le PAR d'un échantillon de spiruline immergé 10 min dans un bain à ultra-son (ELMA, s60h) pour atténuer l'effet de diffusion lumineuse (cf. partie III.2.A, Figure 56), on attribue respectivement les trois maxima locaux à la chlorophylle-a, la phycocyanine et à la chlorophylle-a (resp. situés à 440, 620 et 680 nm) 93

Figure 27 : Corrélation linéaire (R^2=0,988) entre la mesure de MES et la DO_{680} dans le cas de mesures faites sur le spectrophotomètre. Remarque : les différents points sont obtenus par dilutions successives d'une même culture concentrée 94

Figure 28 : **(a)** et **(b)** les corrélations linéaires entre les DO_{680} mesurés en ligne resp. sur le pilote et le photobioréacteur homogène (resp. R^2=0,998 et R^2=0.986) 95

Figure 29 : comparaison du suivi en $DO680$ d'une même culture réalisé sur le pilote : **(a)** mesures par prélèvements manuels d'échantillons et analysés au spectrophotomètre de paillasse, **(b)** mesures faites en ligne et après filtrage des données sur 30 min. Remarque : les valeurs absolues mesurées ne sont pas les même car le chemin optique et la largeur

spectrale (autour de 680 nm) diffèrent entre les deux outils. Seconde remarque : on trouve dans les données brutes de la sous figure (b) la signature d'un capteur numérique (la photodiode) dont la sortie est en BIT et donc réparties sur des valeurs discrètes 96

Figure 30 : Schéma en vue de côté du photobioréacteur homogène (à l'échelle) 97

Figure 31 : **(a)** étape préalable : établir une mesure du vignetage et encrassement par une moyenne sur cent images des cuves en eau seulement, **(b)** différentes étapes de traitement d'une image pour l'obtention de la densité optique sur le photobioréacteur homogène, **(c)** exemple de suivi en DO_{680} des deux cuves du photobioréacteur homogène obtenue après le traitement de l'ensemble des acquisitions réalisées 100

Figure 32 : Photographies : **(a)** de l'évent du photobioréacteur pilote dans le cas de production abondante de mousse, **(b)** de l'un des tubes immergés des photobioréacteurs de paillasse ternis par de nombreux nettoyages, **(c)** micro-craquelures de la paroi au contact prolongé d'une LED, on observe par ailleurs les restes d'un biofilm s'étant formé à proximité **(d)** biofilms formés au voisinage des LED..... 108

Figure 33 : Exemple de courbes de croissance typique obtenues sur chaque photobioréacteur, resp. **(a)** photobioréacteur pilote, **(b)** photobioréacteur de paillasse, **(c)** photobioréacteur homogène..... 110

Figure 34 : Influence de la température sur la croissance de la biomasse μT, comparaison entre experiences et modèle (formule (12), R^2=0,97) 117

Figure 35 : Résultat de l'étude de l'intercorrélation entre éclairement et température, avec : **(a)** en échelle de couleur : graphique du modèle obtenu pour $\mu I\text{-}T$ (formule (13), R^2=0,96), et l'emplacement des points expérimentaux ayant permis de l'obtenir en croix numérotées, **(b)** tableau de valeurs des conditions opératoires et des vitesses de croissances normalisées mesurées pour chacun des sept points (identique à la sous-figure (a)) 119

Figure 36 : Évolution de la concentration en biomasse au cours du temps lors de plusieurs échelons de température, avec : en **bleu** le suivi de concentration en spiruline par mesure de DO_{680} (deux points par minute + moyenne glissante sur 4 min) et en **orange** le suivi de température de la culture..... 121

Figure 37 : Adéquation modèle (formule (14), R^2=0,99) et expérience pour l'influence de la concentration en nitrate sur la croissance de la biomasse [17] 123

Figure 38 : Diagramme de prédominance des différentes formes du carbone inorganique en solution aqueuse en fonction du pH..... 125

Figure 39 : Influence de la concentration initiale en bicarbonate sur l'activité photosynthétique de la culture de la spiruline en fonction du pH (Numérisation de la figure 20 de C. Zarrouk [17]) 126

Figure 40 : Adéquation entre une corrélation de type loi de Monod (formule (15), R^2=0,75) et l'expérience concernant l'influence de la concentration en substrat carboné sur la croissance de la biomasse obtenu selon de protocole de C. Zarrouk [17]..... 127

Figure 41 : Écart absolu entre données et modèle en fonction de la concentration en carbonate en solution, avec en **croix bleues** : l'écart entre l'activité photosynthétique mesurée expérimentalement et calcul par la loi de Monod (formule (15)) et en **tirets noirs** une corrélation linéaire passant par l'origine d'équation (R^2=0,84) 128

Figure 42 : **(a)** Données expérimentale (normalisée) issue de [17], **(b)** les mêmes points expérimentaux décrits par le modèle de la loi (16), R^2=0,7..... 129

Figure 43 : Influence de la quantité de bicarbonate introduit initialement sur la croissance de la biomasse μc lorsque le pH est fixé à 9,6, comparaison entre nos experiences et modèle (formule (17), R^2=0,96) 130

Figure 44 : Comparaison entre expérience et modèle (formule (19), R^2=0,99) pour la description de l'influence de l'irradiance sur la cinétique de croissance de la spiruline..... 140

Figure 45 : Comparaison en **(b)** des cinétiques résultantes dans le cas d'une adaptation instantanée de la cinétique à la lumière en fonction de trois distributions-modèles de lumière **(a)** dans le volume présentant différents degrés de disparité (resp. d'écarts types relatifs : 0 ; 0,56 et 1,02) mais possédant toutes la même irradiance moyenne dans le volume 143

Figure 46 : Comparaison de l'influence de la lumière sur la cinétique de croissance globale du photobioréacteur (cf. III.2) en fonction de la concentration en biomasse pour le pilote éclairées par ses 20 sources LED à 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ en paroi éclairée 144

Figure 47 : Comparaison en **(b)** des cinétiques résultantes dans le cas une adaptation instantanée de la cinétique à la lumière en fonction de trois signaux modèles de lumière, en **(a)**, présentant différents degrés de disparité (resp. d'écarts types relatifs : 0 ; 0,71 et 1,00) mais possédant toutes la même irradiance moyenne dans le temps..... 149

Figure 48 : Comparaison des valeurs de la variable interne i relativement à un signal periodique de I en fonction du rapport entre la période p de ce signal et τbio. Remarque : le signal modèle utilisé est une fonction créneau d'amplitude 1 et de rapport cyclique 50% . 151

Figure 49 : Ajustement du paramètre τbio=0,3 s du modèle (formule (26)) sur les données expérimentales de Xue et al [75]. Remarque : les séries faible, moyenne et forte irradiance correspondent resp. aux graphiques (b), (c) et (d) figure 6 de l'article cité. Le graphique (a) n'a pas été utilisé car l'évolution de la cinétique est jugée de trop faible amplitude. 153

Figure 50 : Croissance spécifique relativement à la lumière en fonction de la fréquence du signal modélisé par les équations (24) et (25), pour les conditions opératoires de l'expérience de Xue et al (resp. (a),(b),(c) et (d) de la figure 6) 154

Figure 51 : **(a)** Valeurs expérimentales des vitesses de croissance mesurées en fonction de la fréquence d'exposition à la lumière dans le photobioréacteur homogène (signal créneau, rapport cyclique 50%, I_0=208 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, 35°C), **(b)** comparaison des données normalisée avec les valeurs précédemment extraites de la littérature [75] (resp. (b), (c) et (d) figure 6 pour #1, #2 et #3) 157

Figure 52 : Exemple typique d'une courbe de croissance enregistrée dans le photobioréacteur homogène (signal créneau, 1 Hz, rapport cyclique 50%, I_0=208 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, 35°C) 158

Figure 53 : Évolution du pH dans le pilote en présence du milieu de culture seul avec un bullage de 20L·min^{-1} et régulé à 35°C 166

Figure 54 : Comparaison de l'évolution du pH lors du titrage du milieu P3 à 20°C par de l'acide chloridrique (HCl) à 2 mol·L^{-1} obtenu expérimentalement et selon le modèle (formule (26)) 169

Figure 55 : Comparaison entre l'expérience et le modèle (formule (26)) de l'évolution du pH lors d'un bullage prolongé du milieu de culture P3 seul à 35°C à 20 L·min^{-1} d'injection de gaz. Remarque : bien que le sens du transfert ne soit pas respecté (cf. paragraphe précédent), la vitesse de celui-ci semble par contre cohérente. 170

Figure 56 : Photographie macro, avec : **(a)** un échantillon de spiruline ayant commencé à floculé (absence prolongé d'agitation), les propriétés optiques ne sont manifestement plus homogènes **(b)** un échantillon de spiruline telle qu'usuellement cultivée, il est turbide (diffusant), **(c)** un échantillon de spiruline dont on a partiellement détruit les parois cellulaires par cisaillement (ULTRA-TURAX) (dioptres responsable de la déviation de la lumière), il présente la même teinte que l'autre mais avec une diffusion moins importante de la lumière 173

Figure 57 : Photographies macro illustrant en **(a)** le gradient de lumière depuis une source, en **(b)** le phénomène de diffusion de la lumière avec l'incidence d'un laser (rouge) dans un échantillon de culture de faible épaisseur 174

Figure 58 : algorigramme de la méthode de Monte-Carlo pour le calcul des champs d'irradiance 180

Figure 59 : Illustration de l'implémentation des différents phénomènes sur un cas simple d'une source émettant un faisceau homogène de demie angle 45° dans une géométrie de 20x20 mm, avec en : -**(a)** la source émet selon une nappe plane, l'hétérogénéité en lumière provient seulement de la dilution géométrique de la lumière par conservation du flux -**(b)** le milieu possède une absorbance, la lumière perd de son énergie le long de la propagation -**(c)** on applique des conditions aux limites suivantes : symétrie pour y=0 ou 20 mm et réflexion total en x=20 mm (remarque : pour la lisibilité l'ouverture du faisceau est ici réduite à 10°) -**(d)** la source émet maintenant selon un cône 3D -**(c)** un coefficient de diffusion est appliqué au milieu mais celle-ci est isotrope -**(d)** la diffusion obéit à la fonction de phase dite de Henyey-Greenstein avec g=0,9 183

Figure 60 : Schéma dans l'espace du système de coordonnées utilisées dans le calcul de la trajectoire du photon, avec : - **en noir** : le repère Oxyz avec u, v et w resp. les vecteurs unitaires associées à Ox, Oy et Oz - **en traits gris** : les traits de construction aidant à la lisibilité - **en traits pointillés** : les différentes projections dans le repère Oxyz - **en rouge :** le photon, son vecteur directeur (et son représentant dans Oxyz), et en **rose** son nouveau vecteur directeur après déviation -**en violet**, **vert, bleu** et **jaune** : les différents angles, resp. $\theta, \varphi, \mathrm{dev1}$ et $\mathrm{dev2}$ 187

Figure 61 : Logarithme népérien du champ d'irradiance dont les incidences ont été tirées par une loi uniforme **(a)**, par la loi (32) en **(b)**. Remarque : les conditions de calcul sont décrites en Figure 59 189

Figure 62 : Densité de probabilité de l'angle de diffusion $\mathrm{dev1}$ (formule (36)) en fonction du paramètre 'g' 192

Figure 63 : Comparaison de l'aspect de la fonction déduisant l'angle de déviation $\mathrm{dev}\ 1$: - si la variable aléatoire suit une distribution cosinusoïdale (i.e. composé par : $\mathrm{f} : \mathrm{x} \rightarrow \cos(\mathrm{x})$) - si la variable aléatoire est uniforme (i.e. composé par $\mathrm{f} : \mathrm{x} \rightarrow 2 \cdot \mathrm{x}\text{-}1$) Remarque : la fonction en question a image sur [-1 ; 1] 193

Figure 64 : Logarithme népérien d'un même champ d'irradiance en fonction de la valeur du seuil, à savoir 10, 100, 1000 et 10000 resp. pour **(a)**, **(b)**, **(c)** et **(d)** 195

Figure 65 : Logarithme népérien d'un même champ d'irradiance en fonction du nombre de trajectoires de photon calculés : 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 et 10^6 resp. pour **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**, **(e)** et **(f)** 197

Figure 66 : Comparaison du niveau d'irradiance normalisée issue resp. de notre algorithme de Monte-Carlo et d'une résolution analytique (formule (38), R^2=0,997) sur un cas simple décrit ci-avant..... 199

Figure 67 : Logarithme népérien d'un quart du champ d'irradiance selon une section horizontale du photobioréacteur pilote éclairé par les 20 sources en fonction de la concentration en spiruline : 0,1 $g \cdot L^{-1}$, 0,3 $g \cdot L^{-1}$, 0,6 $g \cdot L^{-1}$, 1,0 $g \cdot L^{-1}$, 1,4 $g \cdot L^{-1}$, 2,0 $g \cdot L^{-1}$, resp. pour **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**, **(e)** et **(f)** 200

Figure 68 : Logarithme népérien du champ d'irradiance selon une section horizontale du photobioréacteur pilote en présence de 0,5 $g \cdot L^{-1}$ de spiruline en fonction du nombre de sources LED utilisées : 6, 10, 16 et 20, resp. pour **(a)**, **(b)**, **(c)** et **(d)** 201

Figure 69 : Densités de probabilité volumique des niveaux d'irradiances au sein du photobioréacteur pilote en présence de plusieurs concentrations de spiruline différentes et éclairé par la totalité des 20 sources LED délivrant 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ en parois 202

Figure 70 : différentes distributions du rapport termes à termes des distributions volumiques d'irradiance obtenues dans le photobioréacteur pilote en présence de 0,8 $g \cdot L^{-1}$ de spiruline est 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ délivrée en parois 203

Figure 71 : Géométrie 3D du photobioréacteur pilote utilisé dans la simulation CFD, avec : en **nuances de gris** les parois (à l'exception du cylindre externe, transparent, pour la lisibilité), en **bleu** les zones d'injection de gaz, en **rouge** surface de dégazage (cf. ci-dessous), les **croix noires** indiquent quant à elles la position des sondes de mesure qui seront utilisés par la suite. 207

Figure 72 : Détails du maillage utilisé dans les simulations CFD, en (a) selon le plan médian vertical et en (b) selon le plan médian horizontal 207

Figure 73 : Acquisition optique (côte à côte) de bulles issues de nos injecteurs (traitées ici spécifiquement pour la visualisation)..... 211

Figure 74 : Graphique en échelle logarithmique des courbes de viscosité à 35°C de l'eau ultrapure (ELGA, purelab ultra) du milieu de culture P3 seul et d'une culture de spiruline à une concentration de 1,5 $g \cdot L^{-1}$ 212

Figure 75 : Graphiques en fonction du temps de simulé : **(a)** le taux de rétention volumique du gaz dans l'enceinte du réacteur, **(b)** le débit volumique de gaz s'échappant par la condition limite de dégazage (i.e. ciel de réacteur) 213

Figure 76 : Graphique en fonction du temps simulé de deux mesures de vitesses ascensionnelles (projeté sur Oz) du liquide à mi-hauteur de réacteur à l'aplomb d'un panache de bulle et entre deux panaches 214

Figure 77 : Représentations graphiques de la fraction volumique locale du gaz en échelle de couleur (-), **(a)** en 3D, **(b)** selon le plan médian Oxy et **(c)** selon le plan médian Oxz, pour la simulation du photobioréacteur pilote avec une injection de 10 L·min^{-1} d'air après 100 s simulées 215

Figure 78 : Représentations graphiques de la vitesse ascensionnelle (selon Oz) du liquide vzliq en échelle de couleur (m·s^{-1}), **(a)** selon le plan médian Oxy et **(b)** dans le plan médian Oxz, pour la simulation du photobioréacteur pilote avec une injection de 10 L·min^{-1} d'air après 100 s simulées 215

Figure 79 : Mesures expérimentales du profil radial (**croix bleues**) de vitesse ascensionnelle du liquide vzliqentre deux panaches de bulles à 220 mm au-dessus du fond et en **pointillés noirs** les limites spatiales du domaine 216

Figure 80 **(a)** Graphique en fonction du temps de simulation des taux de gaz globaux, εG, pour une gamme de débit d'injection de gaz, **(b)** graphique en fonction du débit d'injection de gaz des taux volumiques de gaz globaux moyens (calculés sur les dernières 50 s de simulation) et la corrélation linéaire correspondante (R^2=0,9999) 217

Figure 81 : **(a)** mesures expérimentales de la concentration en oxygène dissous au cours du temps pour différents débits d'injections de gaz à 35°C (après avoir purgé le liquide par un bullage prolongé de diazote (N_2) pur), **(b)** coefficients de transfert de matière apparent à l'interface liquide/gaz, kLG, mesurés expérimentalement sur le photobioréacteur pilote pour les différents débits d'injection, et la corrélation linéaire correspondante (R^2=0.997) 218

Figure 82 : Comparaison des temps de mélange τm obtenus expérimentalement (cuve thermostatée à 35°C) et numériquement (dans le cas d'une simulation laminaire) et fonction du débit d'injection de gaz 220

Figure 83 : Représentations graphiques de la vitesse ascensionnelle (selon Oz) du liquide vzliq en échelle de couleur (m·s^{-1}) dans le plan médian Oxz , pour la simulation du photobioréacteur après 100 s simulées, resp. pour les différents débits d'injection de gaz : 2,5 ; 5,0 ; 7,5 ; 10,0 ; 12,5 ; 15,0 et 17,5 L·min^{-1} pour **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**, **(e)**, **(f)** et **(g)** 221

Figure 84 : représentation 3D de la trajectoire suivie par une particule, **trait plein vert**, dans le photobioréacteur pilote pendant 100s avec un bullage de 10 L·min^{-1} avec en **pointillés gris** les parois interne et externe de la cuve, avec en **(a)** le cas d'une simulation k-**ε**, **(b)** une simulation k-**ε** avec le modèle de marche aléatoire et en **(c)** une simulation en laminaire. 224

Figure 85 : Répartitions normalisées des particules resp. pour **(a)** et **(b)** : selon le rayon et selon la hauteur dans le réacteur, en fonction du modèle hydrodynamique utilisé et sur l'ensemble de la base de données (i.e. cumulées sur toutes les particules et tous les pas de temps) 226

Figure 86 : projection sur Oxy de la superposition en **trait plein noir** la trajectoire de la Figure 84.(c) et d'un champ d'irradiance normalisé en échelle logarithmique en **nuances de couleurs** (20 sources LED, 0,6 g·L^{-1} , Figure 67.(c)) 227

Figure 87 : Extrait du signal temporel de lumière vue par la particule de la Figure 86 pendant 20 s (photobioréacteur pilote, 0,6 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmolPAR·m^{2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz)..... 228

Figure 88 : Comparaison des distributions des niveaux d'irradiance du champ spatial de lumière et celles échantillonnées par la base de données du lâcher de particules (photobioréacteur pilote, 1g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmolPAR·m^{2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz) 229

Figure 89 : Convergences de la moyenne et de l'écart type normalisés des variations d'irradiances échantillonnées par les particules au cours des 100 s de simulation (photobioréacteur pilote, 1 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmolPAR·m^{2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz) 230

Figure 90 : Densités de probabilité de la moyenne d'irradiance vue par l'ensemble de la population à chaque instant I@p et de la moyenne temporelle vue par chaque particule I@p (photobioréacteur pilote, 1 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmolPAR·m^{2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz) 232

Figure 91 : Comparaison des cinétiques de croissance relatives à la lumière selon les deux hypothèses (réaction instantanée ou intégrée) qu'elles soient calculées à partir du champ spatial de lumière ou de la base de données du lâcher de particules, resp. traits et marques (photobioréacteur pilote, 20 sources LED, 350 µmol$_{PAR}$·m^{2}·s^{-1})..... 234

Figure 92 : Représentation de l'influence de la lumière sur la cinétique globale du réacteur en fonction de la valeur du module Γ, relativement aux deux cas limite déjà mis en évidence (Figure 91)..... 235

Figure 93 : Pour une particule pendant 15 s (photobioréacteur pilote, 0,5 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmolPAR·m^2·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz), **(a)** comparaison entre l'irradiance $\mathrm{I@p}$vue par une particule arbitraire et la valeur correspondante de sa variable interne i, **(b)** les croissances spécifiques correspondantes. Remarque : $\tau\mathrm{bio} = 0 \implies \mu\mathrm{lumip} = \mu\mathrm{lumI@p}$ 236

Figure 94 : Le module Γ en fonction de la concentration en spiruline X (photobioréacteur pilote, 20 sources LED, 10 L·min^{-1}, 350 µmol$_{PAR}$·m^2·s^{-1}) 238

Figure 95 : Graphique représentant en **croix bleues** l'évolution de Γ (issus des simulations) en fonction du débit d'injection de gaz (i.e. condition d'agitation) et en **pointiller noirs** la corrélation linéaire correspondante (R^2=0,96), elle est utilisé dans la partie suivante III.4.A dans la formule (55) 239

Figure 96 : Algorigramme du programme de simulation de la croissance biologique. 245

Figure 97 : Graphiques des courbes de croissance simulées lorsque : **(a)** le taux de croissance est imposé à 1 j^{-1} avec une concentration initiale de biomasse X_0=1 g·L^{-1}, **(b)** le taux de croissance tiens compte de l'influence de la température selon la loi (12) et que l'on impose une augmentation linéaire de la température de culture entre 10 et 50°C sur deux jours et X_0=1 g·L^{-1} 251

Figure 98 : Courbes de croissance et de substrat simulées lorsque le taux de croissance est aussi fonction de la concentration en nitrate selon la loi (14) (avec : X_0=1 g·L^{-1}, T=35°C, milieu P3) 252

Figure 99 : Courbes de croissance, de substrat et de pH simulées (resp. en **(a)** et **(b)**) lorsque le taux de croissance est aussi fonction des concentrations des formes du carbone inorganique en solution selon la loi (16) (avec : X_0=1 g·L^{-1}, T=35°C, milieu P3). Remarque : Les trois influences regroupées (i.e. température, nitrate et forme du carbone) donne l'expression (51) décrite en III.4.A ci-avant. 253

Figure 100 : Courbes de croissance, de substrat et de pH simulées (resp. En **(a)** et **(b)**) lorsque le taux de croissance obéit à la loi (51) et que l'on impose d'une régulation en pH entre pH_0 et pH_0+0,5 par ajout ponctuel d'un acide faible (avec : X_0=1 g·L^{-1}, T=35°C, milieu P3). Remarque : il reste du carbone à l'instant final car la croissance est d'abord stoppée par un défaut de nitrate (après production de 5 g·L^{-1} de spiruline, cf. Figure 98) 255

Figure 101 : Courbes de croissance simulées lorsque le taux de croissance prend en compte l'influence de la lumière selon les formules (52), (53) et (54) (avec : X_0=1 et 0,01 g·L^{-}

[1] resp. en **(a)** et **(b)**, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, géométrie photobioréacteur pilote 20 sources) 256

Figure 102 : Courbes de croissance simulées dans le cas des expériences #1, #4, #2 et #3 sur les cuves de paillasse décrites en II.4.A (resp. **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**), en **croix noires** les mesures expérimentales correspondantes. Avec en : -**(a)**, X_0=0,384 $g \cdot L^{-1}$, T=30°C, milieu P3, I_0=350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, PBR. paillasse tube large -**(b)**, X_0=0,315 $g \cdot L^{-1}$, T=30°C, milieu P3, I_0=350 µmolPAR·m2·s^{-1}, PBR. paillasse tube unique -**(c)**, X_0=0,333 $g \cdot L^{-1}$, T=30°C, milieu P3, I_0=350 µmolPAR·m2·s^{-1}, PBR. paillasse trois tube -**(d)**, X_0=0,346 $g \cdot L^{-1}$, T=30°C, milieu P3, I_0=350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, PBR. paillasse tube unique 258

Figure 103 : Courbes de croissance simulées dans le cas des expériences #1, #2, #3 et #3bissur le pilote (resp. pour les sous-figures **(a)**, **(b)**, **(c) et (d)**), en **croix noires** les mesures expérimentales correspondantes. Avec en : -**(a)**, X_0=0,286 $g \cdot L^{-1}$, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, PBR. pilote 6 sources -**(b)**, X_0=0,395 g·L-1, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, PBR. pilote 10 sources -**(c)**, X_0=0,278 g·L-1, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, PBR. pilote 16 sources 262

Figure 104 : Comparaison des taux de croissance expérimentaux et simulé avec µbioPBR, resp. pour les séries #1, #2 et#3 en **(a)** et #4, #2 et #5 en **(b)** 263

Figure 105 : Comparaison pour les photobioréacteurs pilote et de paillasse de leur distribution normalisée de taux de croissance en fonction de l'irradiance (i.e. |µlumI · PROBI|max |µlumI · PROBI| 264

Liste des Annexes

Annexe A : Liste des références matérielles utilisées 288

Annexe B : Composition nutritionnelle de la Spiruline 291

Annexe C : Poster présenté lors du WORLD CONGRESS OF CHEMICAL ENGEENIRING (WCCE) du 1 au 5 octobre 2017 à Barcelone-Espagne 292

Annexe D : UDF pour prendre en compte une loi de trainé de type Karananev pour les bulles sous FLUENT 293

Annexe E : Script calculant le champ d'irradiance pour le photobioréacteur pilote ... 294

Annexe F : Script calculant la DO_{680} pour le photobioréacteur homogène ; Remarque : il doit être placé dans dossier contenant les acquisitions (le FLAT étant dans un sous-dossier "FLAT") 296

Annexe G : Code du photobioréacteur numérique et de ses sous-fonctions 298

Annexe H : Article 304

Annexe I : Article 323

I. Définition du Cadre de l'Étude

1. Présentation du Contexte

Le présent travail a été réalisé au sein de l'équipe TIM (Transfert Interface Mélange) du pôle SChE (*Sustanaible Chemical Engineering*) du LISBP (Laboratoire d'Ingénierie des Système Biologique et des Procédés), actuellement TBI (*Toulouse Biotechnology Institute*). Le TBI est une UMR (Unité Mixte de Recherche) entre l'INSA-Toulouse (Institut National des Sciences Appliquée de Toulouse), le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). L'équipe a pour activité de recherche, entre autres, l'étude : de l'hydrodynamique des réacteurs, les écoulements réactionnels, les procédés biologiques.

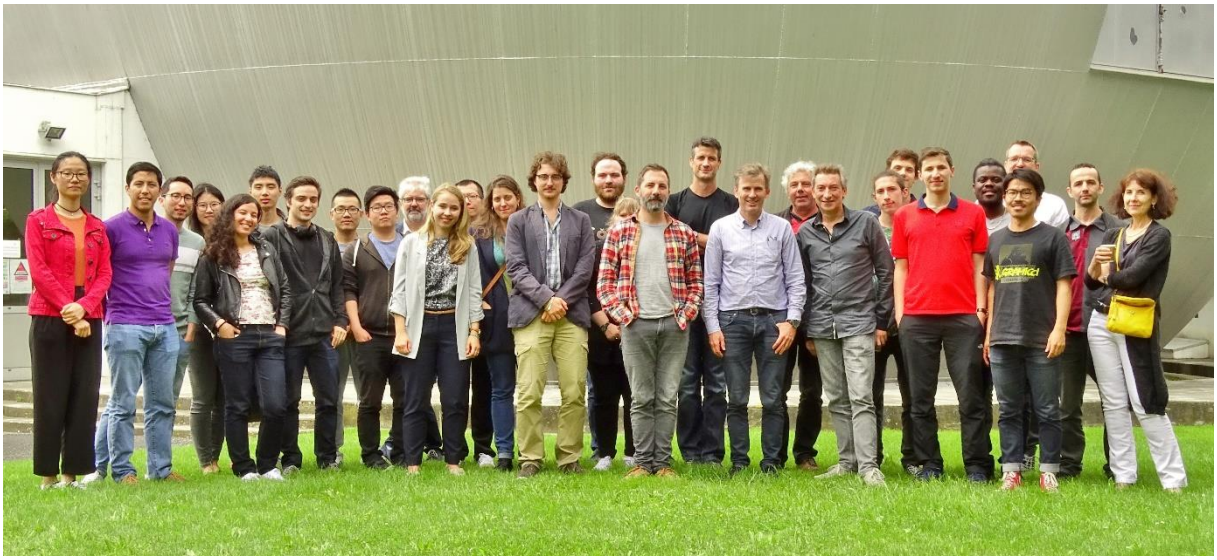


Figure 1 : Photographie d'une partie des membres de l'équipe TIM (15/06/2018)

Le travail s'inscrit dans le projet PLAISIR (Production Locale d'un Aliment Immergé, Sain, Innovant et Renouvelable), lauréat du CMI (Concours Mondial de l'Innovation) phases I et II et financé par ce biais par BPI (Banque Publique d'Investissement) pour une durée de deux ans. Le projet PLAISIR est animé par un consortium d'acteurs académiques et industriels :

- Alg&You (porteur de projet) : cofondé par un ancien doctorant du laboratoire et hébergée à ses débuts au sein du campus, la jeune entreprise a/avait pour objectif de développer et commercialiser des outils de culture de microalgues (et plus particulièrement de spiruline) destinés à l'usage particulier et professionnel

- SEB (Société d'Emboutissage de Bourgogne) : entreprise bien connue du secteur du petit électroménager en France, intervient sur le développement d'un éventuel l'appareil domestique de production de Spiruline

- Prayon : multinationale Belge du secteur des matières premières minérales (alimentaires notamment), intervient dans la fourniture et la conception du milieu nutritif nécessaire à la culture de la spiruline

- La Voie Bleue : association (loi 1901) qui vise à la démocratisation de la consommation de microalgues à vocation alimentaire, via la création d'une filière de production et de distribution de celles-ci

- IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) : étudie l'écophysiologie des conditions de production de la spiruline

Le projet PLAISIR a pour visée le développement et la commercialisation d'outils de culture de spiruline, appelés photobioréacteurs (ou phytotières dans le cadre de la communication du projet), à échelles domestique et professionnelle. Il tentait de relever nombres de défis et verrous sociaux, commerciaux, techniques et scientifiques. Le LISBP a pris part sur ce dernier point en apportant des (débuts de) réponses concernant la conception du procédé de culture de la microalgue, tant des étapes de récolte (DSP pour *Down Stream Process*) que de production, tout en s'inscrivant dans une démarche académique de production et partage de connaissances. La participation du LISBP a pris la forme de plusieurs stages, d'un post-doctorat et d'une thèse. La thèse (dont il est question ici) se focalise exclusivement sur la question de l'étape de production de la spiruline. Les postulats techniques du projet concernant le développement de photobioréacteur sont : une valorisation de la biomasse entière (i.e. pas d'extraction), un volume de culture clos, un éclairage artificiel, une agitation par bullage, et une régulation en température. En se basant là-dessus, l'objectif est d'aboutir à des pistes d'optimisation de la conception de réacteurs répondant à ce cahier des charges, idéalement d'un outil de simulation de l'évolution de la biomasse. Il est à signaler que le présent travail se poursuit à travers un second projet, nommé INSPIRO, dont une nouvelle thèse, avec cette fois un regard plus global sur l'ensemble du procédé.

2. État de l'Art Bibliographique

Cette partie bibliographique se veut être une présentation de faits généraux liés à la biomasse et aux photobioprocédés, afin d'appréhender les contextes technique et scientifique dans lesquels se déroule l'étude. Il ne s'agit toutefois pas d'un recueil exhaustif des informations qui seront extraites et exploitées de la littérature.

A. Spiruline

En premier lieu, il convient de commencer par introduire la biomasse dont il est question. Cependant, comme cela est discuté dans la partie I.3 qui suit, l'approche adoptée dans ce travail est essentiellement orientée vers le génie des réacteurs et non vers la biologie des microalgues. C'est pourquoi le paragraphe concernant la biomasse se veut volontairement succinct, contrairement par exemple au paragraphe I.2.B traitant des photobioréacteurs.

a. Biologie

Nous étudions ici la spiruline, communément/abusivement classée comme une microalgue. Néanmoins, cette classification comprend une très grande diversité biologique, [1]–[3], et n'a d'ailleurs pas de signification au sens phylogénétique, [3], [4], car elle regroupe les cyanobactéries aussi appelées algues bleues (procaryotes), les algues brunes (eucaryotes) et les algues vertes (apparentées aux plantes supérieures, sans non-plus constituer un groupe phylogénétique). La spiruline, quant à elle, est une cyanobactérie, c'est-à-dire une bactérie procaryote, asexuée et mixotrophe (i.e. capable d'assimiler du carbone organique ou inorganique pour croître). Les cyanobactéries constituent une part importante de la biomasse terrestre (notamment avec *prochlorococcus*) et contribuent par photosynthèse à une part substantielle de la production de dioxygène de la biosphère [2]. Par ailleurs, la taxonomie même de la spiruline pose problème puisqu'elle comprend de nombreuses sous-espèces et souches dont les dénominations peuvent être redondantes voire contradictoires (i.e. plusieurs noms pour une spiruline ou un même nom pour des spirulines différentes) [5]. Une problématique étant que les propriétés qui vont nous intéresser par la suite sont pour beaucoup souche-dépendantes [6] et plus particulièrement les cinétiques ; cela met alors en question toute exploitation de propriétés de biomasse issues de la littérature scientifique. Dans notre cas, spiruline (utilisé tout au long du manuscrit) est le nom vernaculaire d'*Arthrospira platensis var. Paracas*. Et en toute rigueur, le genre *Spirulina* fait référence à d'autres cyanobactéries, qui d'ailleurs n'ont aucune valeur nutritionnelle (car potentiellement toxiques) [5].

Notre algue, elle, vit sous la forme de colonies filamenteuses non ramifiées, appelées trichomes (ou simplement brins) qui sont constituées d'un chapelet de cellules indifférenciées. La particularité de ces trichomes est leur agencement spatial en hélicoïde (i.e. en forme de

ressort) visible en Figure 2. De cet aspect spiralé lui vient le nom spiruline. La croissance de ces colonies se fait par division cellulaire le long de celles-ci, [7]. Le brin en croissance ne s'allonge pas indéfiniment, soit il rompt au niveau de la liaison entre deux cellules à cause des cisaillements hydrodynamiques, soit par l'apparition d'une nécridie (seule exception à la non-différenciation des cellules), cellule qui par sa dégradation structurelle engendre la scission du trichome en deux, visible en Figure 3. Le brin, d'une épaisseur comprise entre 6 et 13 µm, [8], comprend usuellement quelques spires (i.e. nombre de rotation de l'hélicoïde) pour une longueur de quelques centaines de microns et est la plupart du temps discernable à l'œil nu. Cette description n'est toutefois pas une constante, par exemple une cellule isolée de spiruline reste viable (cf. Figure 4) et des trichomes de plus de cinquante spires peuvent être observés (en l'absence totale d'agitation) pour des longueurs approchant le millimètre. Evidemment, tous les trichomes au sein d'une même culture ne sont pas identiques. De plus, les caractéristiques générales de la morphologie, telles la longueur ou l'élongation des trichomes sont variables [5], [8] avec la souche considérée. Par exemple, la spiruline de type *paracas* utilisée ici est relativement allongée par rapport à une spiruline *lonar*, qui est une autre souche très répandue en algoculture, toutes deux visibles Figure 2. Mais ces caractéristiques peuvent aussi varier avec les conditions de culture comme l'agitation, l'éclairement ou la température (un exemple est donné plus tard en partie II.1.B, Figure 24). Il faut noter l'existence d'un dimorphisme [9], plus rare (non survenu pendant les trois années de l'étude), pour lequel le brin ne possède pas sa structure tridimensionnelle classique en hélicoïde et se résume donc à une structure longiligne, appelée communément spiruline "droite". Dans certains cas, les deux populations, droite et spiralée, peuvent coexister ou bien l'une peut apparaître et prendre le pas sur l'autre, sans que les mécanismes n'en soient connus. D'autre part, les trichomes sont capables de phototaxie, c'est-à-dire d'adapter leur flottabilité via des vacuoles de gaz [5], certainement afin de maîtriser leur exposition à la lumière qui dans un environnement naturel provient du soleil et n'est donc disponible qu'en surface.

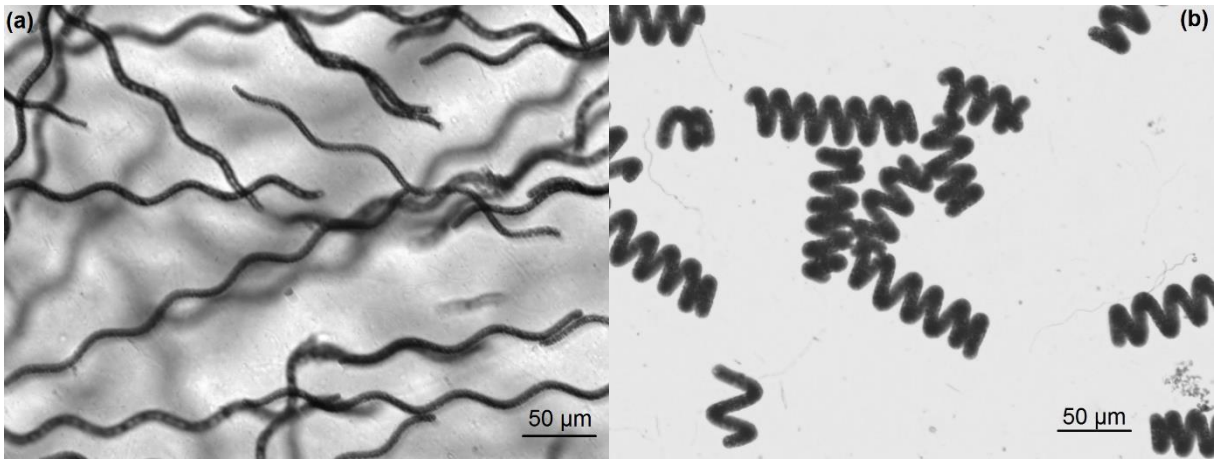


*Figure 2 : Observation au microscope optique de deux souches différentes de spiruline : **(a)** Paracas, **(b)** Lonar. Remarque : Les deux possèdent un agencement spatial en hélicoïde mais diffèrent par leur élongation (i.e. le pas de l'hélicoïde)*

Figure 3 : Observation au microscope optique d'un trichome de spiruline le long duquel on constate la présence d'une nécridie

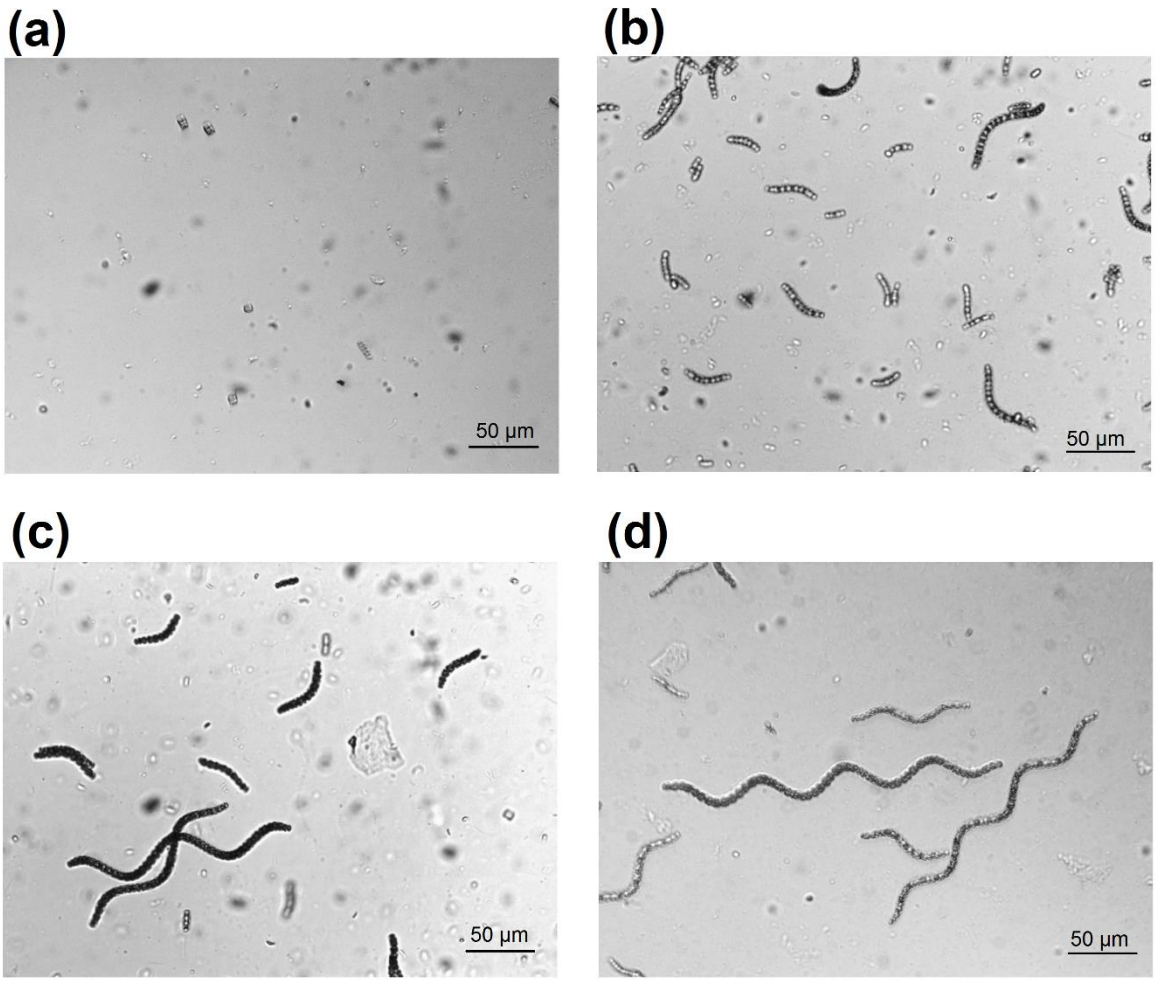


Figure 4 : Observation au microscope optique de la croissance des trichomes de spiruline depuis le stade unicellulaire, pour cela on part d'une culture dont on a dissocié les cellules par ultrason ***(a)*** *observée au cours du temps, resp. à 4, 6 et 10 jours pour* ***(b)****,* ***(c)*** *et* ***(d)****. Remarque : On constate la présence de nombreux débris cellulaires dus à une lyse partielle induite par les forts cisaillements du bain à ultrasons.*

b. Croissance

Du point de vue métabolique, deux caractéristiques sont importantes pour la suite de l'étude : la capacité de la spiruline à réaliser la photosynthèse et celle à assimiler le bicarbonate, dont les mécanismes associés sont décrits respectivement par [2], [5], [8] et [10]–[12]. Cela implique tout d'abord qu'elle est capable de croître par assimilation de carbone inorganique (autotrophie). L'énergie nécessaire à la croissance ne pouvant être tirée de ce substrat inorganique (degré d'oxydation maximal, thermodynamiquement stable [13]), l'énergie alors nécessaire à la création de matière biologique est apportée sous forme lumineuse grâce l'ionisation de photosystèmes dédiés (via les pigments) et d'une chaîne de

réactions d'oxydo-réduction (photophosphorylation) permettant de convertir l'énergie captée sous forme chimique : NADPH (réducteur) et ATP utilisable par le métabolisme. L'autre aspect concerne la transformation du carbone issu du substrat en matière organique grâce à l'ATP et au NADPH produit en parallèle, appelé cycle de Calvin (ou phase sombre de la photosynthèse). Cette étape s'opère sur le dioxyde de carbone (CO_2), néanmoins le dioxyde de carbone n'est que faiblement présent dans l'eau et ce d'autant moins au pH basique auquel vit la spiruline (cf. paragraphe suivant). Mais la spiruline (et les cyanobactéries en général) possède un organite, appelé carboxysome, permettant de s'affranchir de la présence de dioxyde de carbone dans le milieu et ainsi être capable d'assimiler le carbone sous forme de bicarbonate potentiellement présent en plus grande concentration (plus soluble et prédominant, comme on le verra partie III.1), et ce bien que le cycle de Calvin s'effectue toujours sur le dioxyde de carbone (grâce à l'anhydrase carbonique). De plus, l'assimilation de carbone inorganique par la photosynthèse mène à la synthèse de dioxygène (O_2) qui est relargué dans le milieu par les cellules (cf. Figure 6). Le dioxygène en trop forte concentration entrave la croissance biologique, processus semblable à *Saccharomyces cerevisiae* dont la croissance est inhibée par l'éthanol (C_2H_3O/EtOH) qu'elle-même produit. Bien que le cas de figure ne soit pas envisagé dans notre étude, la spiruline est mixotrophe, c'est-à-dire qu'elle est aussi capable d'assimiler du carbone organique pour sa croissance si le milieu lui en dispense.

Dans la nature on retrouve la spiruline dans les eaux de surface stagnantes (i.e. les lacs et étangs) des régions chaudes et qui ont la particularité d'être alcalines et saumâtres. On citera en exemple les lacs Tchad, Natron et Texcoco [9], [14]. La spiruline utilisée ici est originaire du lac Paracas au Pérou mais n'y existe plus à l'état naturel.

Classiquement, le domaine de viabilité de la spiruline est donné pour des eaux entre 3 et 43°C, 20 et 40°C pour une croissance significative, avec un optimum entre 35 et 37°C [8], [9], [15], [16] . Les milieux de culture artificielle de spiruline, milieu Zarrouk pour le plus connu d'entre eux [17], sont donc eux aussi basiques (pH compris entre 8,4 et 11,4), salés et riches en carbone inorganique. De plus, il leur est généralement ajouté une source d'azote, de phosphore ainsi que des oligo-éléments pour aider la croissance biologique. Quant à l'agitation, en milieu naturel, elle n'est due qu'aux seules actions du vent et de la convection thermique. Pour l'exposition à la lumière, la spiruline en environnement naturel est soumise aux cycles nycthéméraux (alternance du jour et de la nuit) et aux variations climatiques et topologiques (ombrage dû aux nuages, reliefs, canopée, etc.). Il est souvent relevé une baisse de la quantité de biomasse lors des phases nocturnes [8], [9], [14]. De même, il existe une valeur seuil

d'intensité lumineuse, appelée point de compensation, pour laquelle la spiruline commence à croître [18]. *A contrario,* une trop forte intensité provoque une inhibition de la croissance. Est aussi mentionné un phénomène de photolimitation qui lie température du milieu et exposition à la lumière et selon lequel un éclairement intense est incompatible avec les températures les plus basses et induit une dégradation de la culture. Par ailleurs, la spiruline réalise la photosynthèse en absorbant la lumière, cette dernière n'est alors plus disponible pour les autres cellules : il y a gradient d'intensité lumineuse suivant la direction de propagation de la lumière à travers la suspension de microalgues. C'est ce que l'on appelle l'auto-ombrage, cela sera amplement étudié dans les chapitres suivants. Aux variations temporelles d'exposition à la lumière déjà citées, cycle jour/nuit, nuages, etc., s'ajoutent celles dues aux mouvements des trichomes dans ce même gradient de lumière, mouvements induits soit par le mouvement du liquide contenant les algues, soit par l'habilité des algues à maitriser leur flottabilité.

c. Valorisation

L'intérêt industriel pour la spiruline et les microalgues réside autour des différentes valorisations possibles. Ainsi, la culture de microalgues, comme pour les bioprocédés en général, permet d'accéder à des composés de moyenne ou haute valeur ajoutée via des conditions réactionnelles modérées (i.e. pression, température) et économiques en intrants. On cite en exemples la production d'antioxydants (caroténoïdes, phycocyanine Figure 5.(c)), d'acide-gras polyinsaturés (DHA/oméga3), d'huile ou de protéines végétales [19]. Dès lors, nombre d'applications s'ouvrent à la biomasse après extraction/raffinage : cosmétique, pharmaceutique ou comme précurseur dans l'industrie chimique. D'autre part, les microalgues peuvent aussi être exploitées pour ce qu'elles permettent de dépolluer, comme la bioremédiation ou le traitement des effluents. Cependant des conditions réactionnelles modérées ne sont pas synonymes de coûts modérés, du moins pas suffisamment pour que les applications à basse valeur ajoutée ne soient encore envisageables, comme par exemple la production de biocarburant (alors appelé de troisième génération [1], [3]). Dans la même logique [20], l'utilisation de lumière artificielle (décrite ci-après) ou d'une culture en mixo/hétérotrophie est réservée aux productions dégageant suffisamment de valeur ajoutée [9], [20], [21] pour permettre une rentabilité du procédé.

Dans notre cas, c'est la biomasse elle-même qui est le produit d'intérêt pour une valorisation dans la filière alimentaire [1], [3], [20] pour la consommation humaine. Elle fait partie des trois microalgues autorisées sur le marché avec l'odontella (*Odontella aurita*) et la

chlorelle (*Chlorella vulgaris*) [22]. La spiruline est la plus distribuée des trois. On peut en mentionner une quatrième, qui elle aussi est disponible dans le commerce : la klamath (*Aphanizomenon flos aquae*), avec toutefois des mises en gardes concernant sa cytotoxicité [23]. En raison de sa composition nutritionnelle, disponible en Annexe B, la spiruline occupe actuellement la position de complément alimentaire, vendue sous forme déshydratée en comprimés, gélules ou poudre/paillettes. Le projet dans lequel s'inscrit le présent travail vise à démocratiser la consommation de spiruline, en passant du complément à l'aliment à part entière, exemple Figure 5.(a) et (b). La spiruline est alors positionnée comme source de protéine végétale (~60‰$_m$), au même titre que le soja et son dérivé le tofu. La démarche s'appuie sur une démarcation au niveau de la distribution du produit, en passant de la forme déshydratée/sèche à la forme dite fraîche (i.e. uniquement séparée de son milieu de culture). Cela implique un raccourcissement de la date limite de consommation (qui passe à quelques jours, comparable à la viande ou au poisson) mais avec une nette amélioration des propriétés gustatives comparativement à la forme sèche. L'usage de la spiruline dans l'alimentation est considéré comme prometteur, [24]–[26], car pouvant offrir à terme une source de protéines alimentaires potentiellement plus économe en ressources (eau et énergie) que les protéines animales, sans pour autant nécessairement devoir rentrer en concurrence avec l'agriculture pour les terres arables [3], [20].

*Figure 5 : Photographies : **(a)** et **(b)** de recettes culinaires avec de la spiruline parmi les principaux ingrédients, **(c)** Phycocyanine (pigment bleu) extraite de la spiruline*

B. Photobioréacteurs

a. Caractéristiques Générales

Les bioréacteurs classiques (ex. fermenteurs) sont comparables à ce que l'on peut trouver par ailleurs pour les procédés chimiques, à ceci près qu'ils contiennent de la biomasse et que leurs métrologie et dimensionnement sont adaptés à la culture de cette biomasse. En revanche, les photobioréacteurs qui, on le rappelle, ont pour but de permettre la photosynthèse, possèdent la caractéristique technique peu répandue dans l'industrie de permettre à la lumière d'accéder au milieu réactionnel. Cela conduit alors à avoir une (ou plusieurs) paroi transparente ou d'être, tout simplement, ouvert sur l'extérieur. Autre contrainte dans le cas des photobioprocédés, le dioxygène produit par la photosynthèse est rarement le produit d'intérêt. Cela implique que l'étape de production de biomasse doit aussi être un procédé séparatif capable d'éliminer l'accumulation de dioxygène dans le milieu (illustration en Figure 6) et ainsi éviter l'auto-inhibition. Pour cela, on utilise le transfert de matière interfacial imposé par l'équilibre des potentiels chimiques entre les deux phases, imposant alors systématiquement la présence de gaz dans les réacteurs, que ce soit par la présence d'une surface libre ou de bulles. Son élimination par voie chimique (ex. introduction de sulfites) ou par perméation membranaire n'est, à notre connaissance, jamais envisagée.

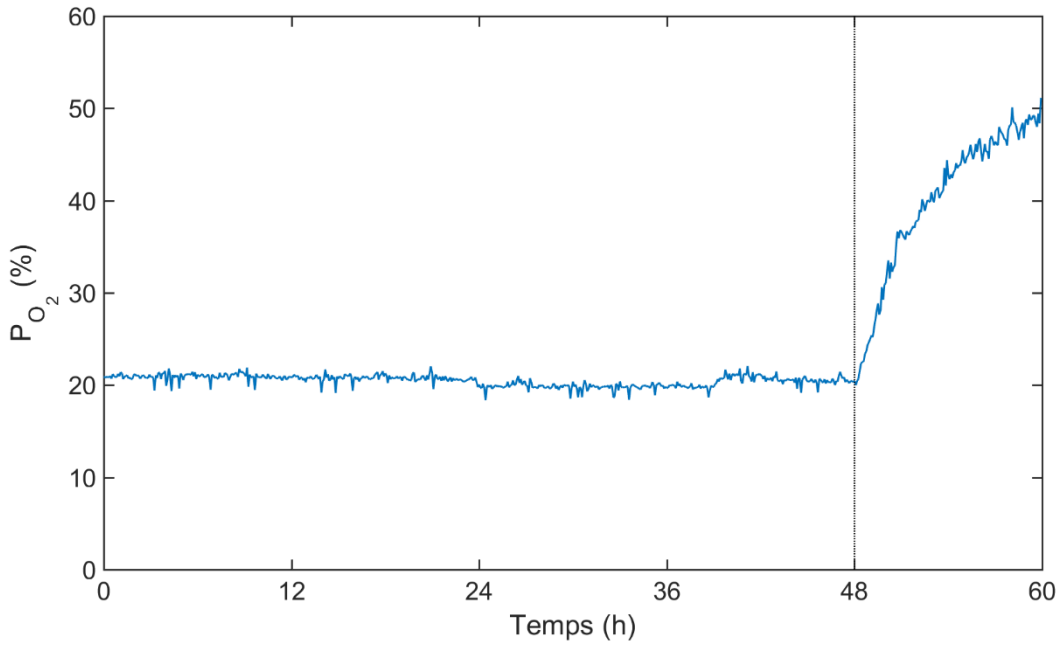


Figure 6 : Graphique montrant la pression partielle en dioxygène dissout (à pression atmosphérique) dans une culture de spiruline pour laquelle le bullage est arrêté au bout de 48h (photobioréacteur pilote, 20 sources, 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 35°C, 10 $L \cdot min^{-1}$). Remarque : Il s'en est suivi un effondrement rapide de la culture (non quantifiable par le suivi en ligne du fait de la floculation de la biomasse due à l'arrêt de l'agitation, si ce n'est à travers l'arrêt de l'accumulation de dioxygène dans le milieu)

b. Volume : Ouvert ou Fermé

Dès lors, on recense une vaste typologie de photobioréacteurs, la principale catégorisation se situant justement sur le fait que le volume soit clos (i.e. aucun contact avec l'extérieur) ou ouvert (i.e. présente la surface libre du milieu réactionnel à l'environnement extérieur). Ils peuvent aussi être respectivement qualifiés d'intensifs et d'extensifs. La grande différence entre les deux (ouvert vs. clos) est le degré de contrôle possible du procédé. Ainsi les photobioréacteurs ouverts sont, pour certains d'entre eux, soumis aux conditions climatiques telles l'évaporation due au vent, la dilution par les intempéries, les variations saisonnière et quotidiennes de la température et de l'éclairement et sont aussi exposés aux contaminations biologiques extérieures (ex. fientes d'oiseaux). Les photobioréacteurs clos, eux, offrent la possibilité du contrôle des conditions réactionnelles (volume, température, éclairement, etc..) et de la biomasse (dans le cas de cultures axéniques).

Les photobioréacteurs ouverts se retrouvent classiquement sous deux formes. La première, le bassin (ou lagune suivant la taille) peut être naturel ou artificiel, exemple

Figure 7. L'autre grande catégorie de photobioréacteur ouvert est le bassin à recirculation (artificiel), constitué d'une boucle le plus souvent en forme d'hippodrome (*Raceway*), et peut parfois présenter des formes plus complexes. Pour ce qui est des photobioréacteurs clos, l'éventail est encore plus grand avec toute l'offre que propose l'ingénierie aux services de procédés, avec toujours cette adaptation qui consiste à avoir une ou plusieurs parois transparentes. Mais là encore on peut distinguer deux catégories quant à la structure du réacteur : la présence d'une recirculation ou non. Ainsi, on a d'un côté les cuves agitées, qui peuvent être de toute forme. Les cuves cylindriques sont les plus communes mais peuvent être très diverses, les petites cultures (<1 L) sont, par exemple, réalisées en erlenmeyer avec déflecteurs (*baffle*) ou sur plaque multi-puits (<1 mL). De l'autre, on a les photobioréacteurs construits autour d'une recirculation forcée, le plus courant étant un système de canalisations tubulaires. Celles-ci peuvent être disposées horizontalement, verticalement, ou bien incliné. On relève même l'existence d'un photobioréacteur tubulaire hélicoïdal et d'un autre torique à section carrée [27]. Une autre géométrie possible pour le réacteur clos à recirculation est le plan, souvent de faible épaisseur.

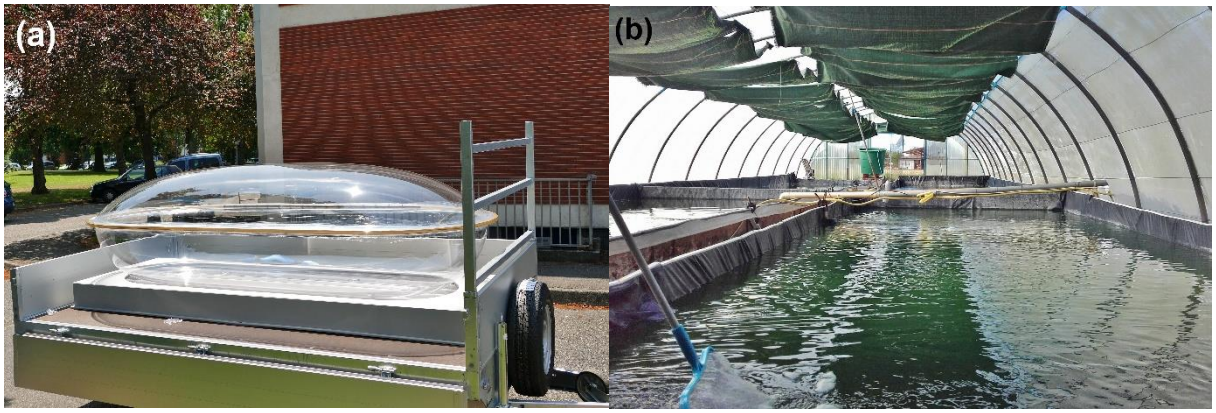


*Figure 7 : Photographies, **(a)** prototype de cuve de culture de spiruline destinée à être placée en extérieur (Alg&You), **(b)** bassin de culture artisanale de spiruline sous serre ombragée (spiruline du sud-ouest, Cintegabelle)*

c. Éclairement

Tout ceci concernait seulement la géométrie des enceintes de cultures, mais il existe aussi une grande variété de solutions pour l'éclairement du volume réactionnel. Là encore, on dissocie deux grandes familles : éclairage naturel ou artificiel. Usuellement, les photobioréacteurs ouverts sont soumis à la lumière solaire. Concernant les photobioréacteurs clos : ceux à recirculation sont plus souvent exposés à une lumière naturelle, et les cuves

agitées à des sources artificielles. Au-delà de ces grandes tendances, le type d'éclairage n'est pas spécifique à une catégorie de réacteurs. Ainsi, on peut rencontrer des bassins ouverts sous éclairage artificiel (notamment pour améliorer le contrôle des paramètres opératoires et aider à sa conception), ou des cuves agitées en extérieur soumises à l'ensoleillement, par exemple lorsque la topologie du terrain ne permet pas la fabrication d'un bassin (typiquement un toit ou façade d'immeuble). Ensuite, des nuances peuvent encore être apportées. Les photobioréacteurs exposés au soleil peuvent être soit en extérieur soit situés dans une serre, avec pour avantage d'offrir plus de possibilités de contrôle face aux conditions climatiques, notamment en permettant une action sur la température et sur l'éclairement de la culture (via un ombrage volontaire) ou encore en protégeant des effets du vent et de la pluviométrie. Quant aux sources de lumière artificielles, plusieurs technologies existent. Les plus communes actuellement sont les diodes électroluminescentes (LED) en raison de leur faible consommation électrique. Leur faible voltage permet de plus une sécurité accrue en milieu humide. Ensuite, viennent les tubes fluorescents (abusivement appelés néons) en raison de leur faible coût, mais qui présentent cependant un spectre discontinu (due aux luminophores utilisés). Les lampes à incandescence sont, elles, tombées en désuétude, notamment à cause de l'excès de chaleur produit qui est néfaste aux cultures et de leur forte consommation d'électricité, mais elles sont les seules à avoir un spectre d'émission de type corps noir comme le rayonnement solaire. Enfin, l'usage de lampes à décharge (ex. lampe à vapeur de sodium) reste relativement marginal malgré leur bon rendement énergétique et bien qu'elles soient utilisées par ailleurs en horticulture (photosynthèse). Ces sources de lumière, quelles qu'elles soient, sont le plus souvent situées en périphérie du volume de culture et rayonnent vers celui-ci à travers la paroi extérieure (transparente) du réacteur ou de la surface libre, mais le cas de sources directement immergées dans la culture est aussi rencontré (cf. les photobioréacteurs de paillasse que nous avons utilisés, décris en parti II.1). De même, il peut être ajouté un intermédiaire pour apporter la lumière depuis les sources vers la culture, typiquement via des fibres optiques (ex. FODL [28], [29]). Cela permet de découpler la conception des sources de lumière de celle de la cuve, élargissant donc les possibilités en matière de géométrie. Lorsqu'une serre est utilisée, il est possible d'opter pour une solution hybride entre éclairement naturel et artificiel permettant de prolonger les cycles d'exposition au-delà de la durée du jour. Dans notre étude, la biomasse est soumise à une exposition artificielle et continue, dès lors dans les cas de fluctuation de lumières, ne subsistent plus que celles imposées par l'agitation de la culture sauf, on le verra, en cas de modulations volontaires de la source lumineuse. Enfin, toutes ces sources de lumière potentielles (naturelle comprise) possèdent des spectres distincts. Or l'influence de

l'éclairement sur la biomasse est aussi fonction du spectre [28], [30]–[32], son choix ou son changement ne sont donc pas anodins (cf. Figure 8).

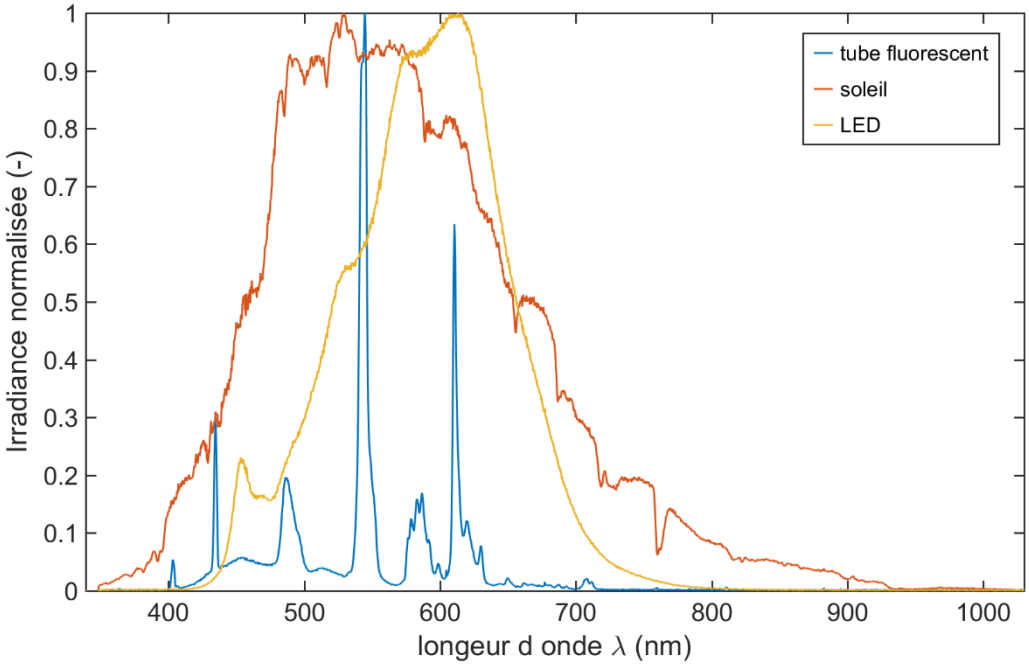


Figure 8 : Graphique des spectres d'émission (Ocean Optics, USB2000+) de différentes sources possibles pour l'éclairement des cultures, à savoir : soleil, tube fluorescent (visible Figure 15) ou LED (BDL - vs-f600ww-12v-3528-10mm-2700k, visible Figure 21.(a)). Remarque : Les spectres sont normalisés par les maxima pour une meilleure lecture

d. Agitation

On rencontre aussi tout un panel de technologies possibles pour l'agitation des cultures dans les photobioréacteurs. La finalité de l'agitation est d'une part de garder une suspension homogène de microalgues en suspension, c'est-à-dire d'éviter d'éventuelles séparations/ségrégations telle une sédimentation, flottation, floculation (i.e. formation d'agglomérats) ou formation de biofilms, D'autre part, il s'agit aussi de renouveler la fraction de la population biologique exposée à la lumière lorsque le réacteur ne délivre pas une illumination homogène sur l'ensemble de son volume (cas le plus commun) [1], [28], [33]. De façon moins limitante cela permet également d'homogénéiser les espèces chimiques/nutritives en solution. En conditions artificielles, l'agitation doit être modérée, sous peine que les cisaillements hydrodynamiques ne fassent rompre les trichomes de façon excessive et mènent à long terme au décès de la culture.

Trois technologies d'agitation sont possibles, [1], [34]. La première consiste en une agitation mécanique. Dans le cas des photobioréacteurs sans recirculation, c'est le plus souvent via l'immersion d'un agitateur (radial ou axial), voire d'un barreau aimanté ou d'une table agitante pour les réacteurs de petite taille. Dans le cas d'une exploitation artisanale, l'agitation peut aussi être manuelle. Il est des cas où l'agitation est d'origine naturelle, par exemple provoquée par le vent (pour les lagunes) [9], [14], ou bien même par la houle (bassin flottant) [35].

Pour ce qui est des réacteurs à recirculation, cela peut prendre la forme d'un entraînement par roue à aubes dans le cas de grands bassins ou bien encore par une hélice marine [36]. Néanmoins lorsque l'agitation est mécanique, cela nécessite de prendre garde aux cisaillements hydrodynamiques induits, souvent délétères pour la biomasse. Une autre technologie est possible : les pompes fluidiques. Lorsqu'elles sont employées, on préfère les pompes volumétriques (i.e. qui déplacent un volume, ex. les pompes péristaltiques ou à membrane) aux pompes cinétiques/rotatives qui sont vecteurs de cisaillements.

Et enfin, le plus couramment privilégié est une agitation par bullage de gaz, usuellement de l'air atmosphérique. Cette solution est prédominante car les contraintes induites sont modérées et qu'elle est souvent plus économe en énergie. De plus, la fonction du bullage est double : en plus du mélange, il permet de désorber le dioxygène produit par la photosynthèse qui inhibe la croissance biologique pour des concentrations trop élevées, et éventuellement aussi d'opérer une régulation du pH grâce à l'injection de dioxyde de carbone (CO_2 à hauteur de quelques pourcents) mélangé à l'air [17], [37], [38]. On a alors des colonnes à bulles (cf. nos PBR, décris en II.1), ou des bassins d'aération (cf. traitement des eaux). Pour ce qui est des réacteurs à recirculation, c'est le principe du gazosiphon (*airlift*) qui est à l'œuvre, à savoir un écoulement conduit par les gradients de densités (i.e. le liquide est entrainé vers le haut au niveau du panache de bulle car la région du volume est localement moins dense que le reste de la culture). Dès lors, les recirculations sont généralement composées d'une partie en écoulement gravitaire (inclinaison), et d'une autre de relevage (*upriser*) par gazosiphon [33], [39]. Techniquement, l'injection du gaz peut se faire au moyen d'orifices (ex. plaque perforée), d'une membrane dont les orifices s'ouvrent avec la déformation de celle-ci ou via un media poreux [40]. Cette dernière solution est déconseillée dans le cas de cultures biologiques en raison du risque d'encrassement des aspérités de l'injecteur. Il faut savoir que dans les conditions usuelles de culture de spiruline, la rhéologie de la culture est similaire à celle de l'eau (cf. III.3.A.), néanmoins il est mentionné qu'au-delà d'une concentration de 4 $g \cdot L^{-1}$ en

spiruline, il faut s'attendre à une évolution de la rhéologie vers une plus grande viscosité et éventuellement un comportement pseudo-plastique [14], [28] (i.e. une décroissance de la viscosité avec l'augmentation du cisaillement) explicable par un réagencement stérique des trichomes, comme dans le cas des polymères).

e. Contrôle de la Température

Concernant la régulation en température des cultures et étant donnée la différence entre la température ambiante et la température de culture, il s'agit généralement d'un chauffage modéré. Pour les photobioréacteurs clos, cette chauffe est alors réalisée via l'immersion de thermoplongeurs ou d'une canalisation dans laquelle circule un caloporteur (plus rare). Une précaution est toutefois de mise : il faut éviter un trop fort dégagement de chaleur qui localement pourrait être néfaste à la biomasse (approx. 1 $W \cdot cm^2$). L'usage de cuves doubles parois avec caloporteur est peu rependu étant donnée la nécessité de rester transparent pour la transmission de la lumière à la culture.

Une part parfois non négligeable de l'augmentation de température de la culture provient de l'éclairement. Elle peut être imputée à la part de rayonnement infrarouge (IR) dans le spectre d'émission des sources lumineuses aussi bien qu'aux sources elles-mêmes, avec l'énergie qu'elles dégagent pour produire la lumière (y compris les LED) qui peut être transmise à la culture, volontairement ou non. Il y a aussi une fraction du rayonnement lumineux absorbé par la culture qui est dissipée sous forme de chaleur et qui contribue donc à l'augmentation de température du liquide.

Les cultures situées en extérieur (réacteurs ouverts) sont, par contre, rarement chauffées, si ce n'est passivement par l'usage d'une serre. Par contre, elles peuvent devoir être rafraîchies l'été car une trop forte température serait fatale à la culture. À cette fin, on procède au moyen d'un aéroréfrigérant, soit à l'échelle de la serre lorsqu'il y en a une soit directement par aspersion des parois du réacteur [41]. Enfin, on relève aussi l'opportunité d'appliquer le principe de l'économie circulaire, en récupérant l'énergie résiduelle d'effluents industriels (via un échangeur de chaleur), par exemple depuis les fumées d'une centrale thermique, d'une cimenterie ou d'un crématorium. Cela est aussi vrai pour la récupération du dioxyde de carbone rejeté par ces mêmes installations, pour lequel un captage est possible (milieu de culture basique). Il peut alors servir de substrat carboné pour les microalgues [37].

f. Conduite du Procédé

Le suivi des photobioréacteurs, abordé plus en détails en partie II.1.B, revêt deux aspects. Premièrement, celui de la biomasse consiste *a minima* à déterminer sa concentration, parfois à la caractériser via une quantification de son contenu intracellulaire ou de sa morphologie. Ces suivis autour de la biomasse sont le plus souvent réalisés par prélèvement d'un échantillon de culture. En second lieu, sont aussi fréquemment effectués des contrôles de l'environnement de culture et du respect des conditions opératoires comme la température, le pH, ou la concentration en oxygène dissous. Celles-ci, qui ne nécessitent pas de protocoles de mesure complexes, peuvent être opérées *in situ* et en continu. Le cas échéant, il est alors possible d'opérer des régulations respectivement par chauffage, injection de $CO_{2(g)}$ ou d'un acide faible (ex. acide acétique) et aération du réacteur. Par contre, la complexité de la composition des milieux de culture et la présence possible de métabolites extracellulaires rendent difficile toute détermination des concentrations restantes en nutriments en cours de culture [42]. On raisonne alors relativement à la croissance de la biomasse, qui via la connaissance de la stœchiométrie de croissance permet de déduire par différence la concentration des nutriments (discuté en partie II.3.0). La carence en nutriments peut être une chose volontairement recherchée, car elle permet dans certains cas de provoquer ou d'augmenter la production d'un métabolite d'intérêt. On citera en exemple l'accumulation de lipides par *Phaeodactilum* ou *Nannochloropsis* en privation d'azote pour la production de biocarburant de troisième génération [1].

Pour ce qui est de la conduite des photobioréacteurs, ils peuvent comme tout autre procédé être opérés de façon continue ou discontinue (*batch*), ou bien encore selon un fonctionnement intermédiaire semi-continu (*fed-batch*) où la soustraction de biomasse et l'apport de nutriments sont ponctuels. Parmi les procédés continus, deux cas particuliers se différencient : le chemostat et le turbidostat. Ils sont souvent utilisés comme outils d'analyse des cinétiques biologiques et sont envisageables pour piloter une production industrielle. Le premier, dit chemostat, se définit par un ajout continu de milieu neuf et d'un prélèvement à débit égal de culture. Il se caractérise par un taux de dilution, donné par le rapport entre le débit d'entrée/sortie sur le volume de culture, à partir de quoi la connaissance de la concentration de biomasse dans le réacteur permet de déduire une vitesse de croissance. Le turbidostat, lui, consiste à adapter le taux de dilution pour obtenir une concentration de biomasse cible. Pour les photobioréacteurs discontinus une politique de conduite de la culture se démarque aussi : le régime cinétique [43], [44]. Celle-ci vise à adapter la lumière délivrée

à la culture avec l'augmentation progressive de la biomasse avec pour consigne qu'à chaque instant la fraction la moins éclairée du volume le soit à la valeur du point de compensation (pour rappel : intensité lumineuse pour laquelle la biomasse commence à croître). La finalité étant un usage optimal de l'énergie lumineuse : rien n'est perdu en sortant du volume, et aucune fraction du volume n'équivaut à une croissance nulle voir négative.

g. Récolte

Après la réalisation d'une culture de microalgues, une autre étape importante est bien évidemment leur récolte, c'est-à-dire séparer la biomasse de son milieu afin de pouvoir la valoriser. Bien que des études aient été réalisées sur cet aspect [45] et sont présenté en annexe I, cela ne rentre pas dans le cadre de la présente étude et ne bénéficiera donc pas d'un développement ultérieur. La contrainte étant essentiellement qu'il est question de valoriser la phase minoritaire, ainsi la concentration finale des cultures de microalgue avoisine généralement les quelques grammes par litre soit moins que 1% massique [20]. Il est alors préférable de privilégier les valorisations possibles en voie humide et ainsi s'affranchir de cette étape qui représente une part importante du coût énergétique total du procédé [42]. De plus, la matière à extraire est fragile et est facilement détériorée par des procédés impliquant de fortes contraintes physiques, thermiques ou chimiques.

Cependant, là encore, toute une gamme de technologies est applicable. La plus répandue d'entre elles est la filtration frontale [46], de par sa simplicité opératoire, le coût modéré des dispositifs requis, et sa capacité à ne pas détériorer la biomasse. Pourtant, elle possède quelques inconvénients, ainsi faut-il par exemple traiter l'intégralité du flux (les quasi 100% d'eau). De plus, c'est le produit d'intérêt lui-même (la biomasse) qui ralentit la séparation au fur et à mesure qu'il est obtenu, cela est dû au colmatage progressif des filtres avec la formation du gâteau de filtration (*cake*). Dans certains cas (non maitrisés) des exo-poly-saccharides (EPS, ou AOM pour *Algal Organic Mater*) sont relargués dans le milieu et ont la propriété d'accélérer le processus de colmatage (illustré Figure 9.(b)). On peut remarquer qu'l est mentionné que les spirulines dites "droites" sont plus difficiles à filtrer [9] . D'un point de vue technique, les installations les plus simples se contentent d'une filtration gravitaire (notamment chez les spiruliniers artisanaux) en compensant la faible différence de pression par de grandes surfaces de filtration (toile textile polymère : polyamide, polyester) [9]. À côté de cela, il est possible d'aider au passage de l'eau à travers le filtre et le gâteau par application d'une surpression (filtre Gautier) ou dépression (filtre Buchner), ou encore par vibration du

media filtrant (pour ralentir le colmatage). De même, il est possible de s'affranchir de la formation du gâteau (et de la résistance qu'il induit) par un raclage du filtre. La filtration peut aussi être opérée en continue (ex. filtration sur tambour rotatif).

La centrifugation est aussi utilisée, nettement plus coûteuse tant à l'investissement qu'au fonctionnement, elle est réservée à des productions à très haute valeur ajoutée. Autre inconvénient, il est possible que cela endommage structurellement la biomasse (fort cisaillement), cf. Figure 10.(b). Cependant, cela peut ne pas être un problème s'il est prévu ultérieurement un raffinage de celle-ci (i.e. extraction d'un produit d'intérêt particulier issue de la microalgue). Son usage peut être séquentiel ou continu.

Et enfin, la récolte peut être faite par flottation [42], technologie moins répandue dans son application à l'algoculture, mais maîtrisée dans d'autres filières comme le traitement des effluents ou la production de minéraux (ex. métallurgie). Elle n'est pas moins prometteuse, car son mécanisme permet de ne traiter que la phase solide (peu concentrée) et donc requiert un apport énergétique bien moindre. En revanche, les taux de récupération de la récolte par ce procédé sont généralement inférieurs à ceux obtenus par filtration ou centrifugation si elle n'est pas précédée d'une étape supplémentaire : la floculation. La formation de flocs (i.e. agglomérats) peut être soit naturelle, on parle alors de biofloculation (ex. Figure 9.(a)), ou induite par l'introduction d'un floculant/coagulant (classiquement des sels métalliques d'aluminium, fer ou calcium) qui neutralise les forces électrostatiques répulsives entre les particules de matière en suspension. Pour une valorisation alimentaire, on préférera la biofloculation ou l'usage d'un floculant d'origine naturel, tel le chitosan [45]. Tout comme le colmatage lors des filtrations, la biofloculation semble étroitement lié à la présence d'exo-poly-saccharides dans le milieu [45]. La flottation en elle-même est obtenue par l'introduction de fines bulles dans le milieu qui viennent emporter les flocs sur leur passage. La taille des bulles nécessaires (de l'ordre de 50-70 µm) ne peut être obtenue par une injection classique de gaz ; on utilise alors la dépressurisation d'une solution préalablement comprimée à quelques bars (flottation à air dissout : DAF). Plus rarement, de telles bulles peuvent être produites par électrolyse ou cisaillement mécanique. Après flottation, la biomasse se retrouve sous forme d'un gâteau air-milieu-biomasse en surface et est simplement récupérée par écrémage/raclage.

Une fois récoltée, elle peut alors être valorisée, elle peut par exemple subir un broyage (à billes) puis une extraction d'un composé intracellulaire (ex. chromatographie préparative).

Dans le cas qui nous intéresse (valorisation pour la filière alimentaire), la biomasse est encore trop chargée en eau et doit encore être pressée/essorée pour atteindre une siccité de 20% pour sa forme "fraîche" (visible Figure 10.(a)) et ensuite séchée jusqu'à une siccité supérieure à 90% pour sa forme "sèche" et une longue durée de conservation. Il peut parfois aussi être envisagé de rincer la biomasse récoltée avant cette étape de valorisation afin d'éliminer le milieu de culture résiduel (même si celui-ci n'est pas problématique pour un usage alimentaire) mais il faut par contre prêter attention à ne pas provoquer un choc osmotique qui endommagerait la biomasse, pour cela une solution saline peut être utilisée.

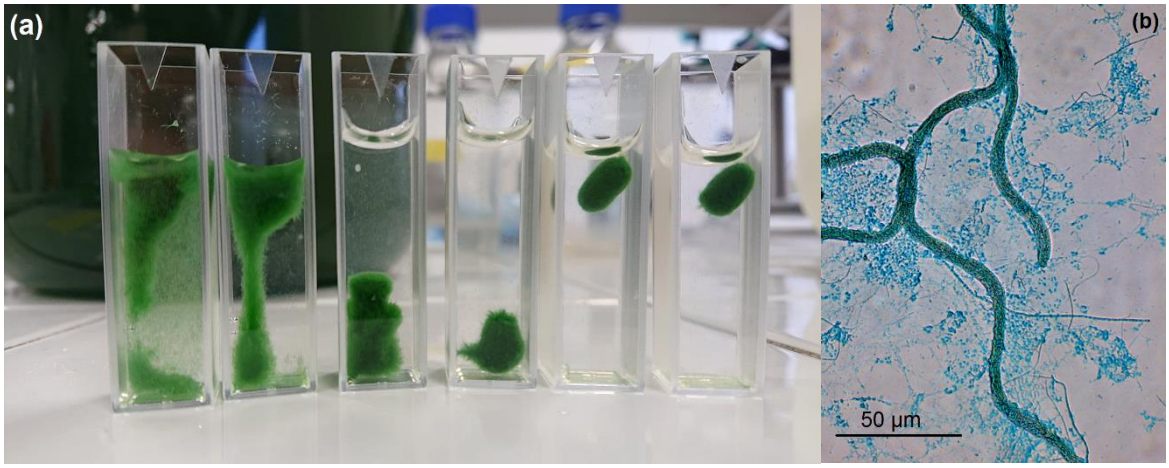


*Figure 9 : **(a)** Photographie de cuves MACRO contenant des échantillons de spiruline ayant bio-floculé (à divers degrés), **(b)** vue au microscope optique, avec en vert les trichomes de spiruline et en bleu les exo-poly-saccharides révélé aux bleu d'alcian (0,6‰$_m$ + 1,2‰$_m$ d'acide acétique)*

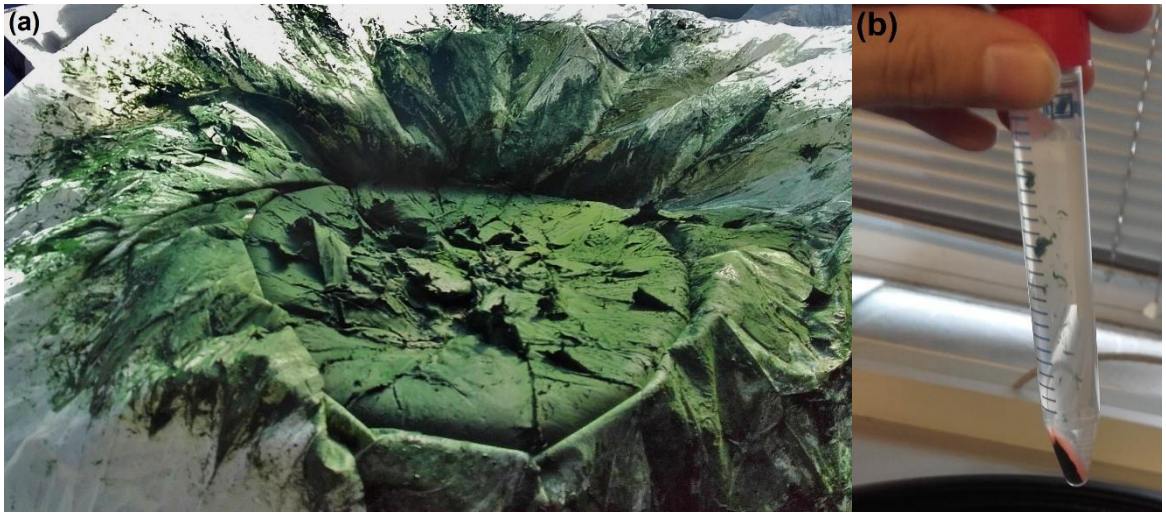


*Figure 10 : Photographies, **(a)** gâteau de spiruline après filtration et pressage (depuis le bassin vu en Figure 7.(b)), **(b)** échantillon de spiruline après centrifugation et ayant relargué certains composés intracellulaires (phycoérythrine probablement)*

h. Précautions

Viennent ensuite un certain nombre de considérations sur l'ensemble du procédé et spécifiques à la culture de microalgues. Premièrement, l'ensemble du matériel (cuve, métrologie, récolte, etc.) utilisé doit obéir à certaines contraintes. Tout d'abord, le milieu de culture (avec son pH élevé et la présence de sel) est corrosif [9], [42], les matériaux doivent alors être des métaux inoxydables (ex. acier 316L) ou non-soumis à la corrosion (ex. verre, plastique), cela comprend aussi les joints d'étanchéité, les sondes de mesure et la visserie. Ainsi, les parois transparentes sont souvent faites de PMMA (aussi appelé verre acrylique), plus particulièrement pour les grandes pièces, car moins cher et surtout plus facile à usiner que le verre. Par contre, comme pour beaucoup de polymères il peut se dégrader en cas d'exposition prolongée aux ultra-violets (UV) [1], ce qui est donc problématique en cas d'usage d'une lumière naturelle pour les cultures. Le PMMA et autres matières polymères possèdent aussi des incompatibilités avec certain solvants (éthanol) et biocides (javel) en trop forte concentration [47]. De même, pour réaliser des cultures axéniques, il est souhaitable d'utiliser des réacteurs autoclavables, ou alors des réacteurs stériles et à usage unique. Par ailleurs, bien que peu exploités pour les applications aux photobioréacteurs, il existe des traitements de surfaces (chimique ou physique) permettant de prévenir la formation de biofilms en parois et avec cela une possible occultation de la lumière préjudiciable à la croissance [48], [49].

À cela s'ajoute que dans le cas d'une valorisation alimentaire de la biomasse produite, il faut que les matériaux soient certifiés compatibles avec le grade alimentaire, c'est-à-dire : "ne cédant pas aux denrées des composés susceptibles de présenter un danger pour la santé" [50], [51] et plus largement ne modifiant pas les propriétés organoleptiques de la denrée (c'est le cas du verre et du PMMA). Idem, les composés chimiques introduits dans le milieu de culture doivent posséder le grade alimentaire ou être présents à certaines concentrations maximales (dans le produit final) définies dans la législation, afin que le produit final ne contienne pas d'impuretés éventuellement dommageables pour la santé humaine (ex. métaux lourds). Il en va de même pour l'ensemble des intrants chimiques, comme par exemple les floculants. Il convient aussi pour les opérateurs de respecter les précautions d'hygiène en vigueur dans le domaine de l'agroalimentaire [52]. Toujours relativement à la vocation alimentaire de la production, la législation en vigueur (en France) prohibe tout usage de modifications génétiques des microalgues (OGM), ce qui pourrait être envisagé (comme pour l'agriculture conventionnelle dans certains pays) pour améliorer la croissance, la quantité de certains composés intracellulaires, ou encore faciliter l'étape de récolte. À ces fins, on s'orientera donc

plutôt vers un criblage de la très grande variété biologique présente parmi les microalgues. De même, avant commercialisation, il convient de soumettre la production à des tests microbiologiques pour valider son innocuité et déterminer sa date limite de consommation [8], [53]–[55]. La spiruline est justement plébiscitée du fait que ses conditions de culture (alcaline et saline) font que peu de pathogènes pour l'homme peuvent s'y développer, assurant ainsi une forme de sécurité sanitaire [8], [9], [56].

C. Dimensionnement

a. Exploitation des Cinétiques

La filière des photobioprocédés représente encore une fraction négligeable de l'industrie chimique, et présente la particularité de voir se rencontrer les extrêmes en matière de solutions techniques [1], [57]. Ainsi, comme on a pu le voir dans le paragraphe précédent (I.2.B), il existe une vaste gamme de moyens de productions : du simple bassin en extérieur avec même une part de la production revenant à l'artisanat [58], jusqu'aux développements les plus pointus, comme la dilution contrôlée du flux de lumière en volume (DiCoFLuV) [28], [29]. Quand bien même les objectifs (et les contraintes correspondantes) pourraient ne pas être les mêmes, sans doute faut-il y voir un manque de convergence des outils vers un optimum opérationnel/industriel, sans pour autant que cela soit étonnant ou anormal étant donnée l'apparition encore récente de la filière. Il est à supposer que les photobioprocédés ne sont pas encore suffisamment technologiquement maitrisés pour se faire une réelle place dans l'industrie où seuls les bénéfices sont vecteurs d'investissement [4], [59]. Ainsi, existe-t-il toujours un besoin de connaissances pour aboutir à des méthodes de conception des réacteurs avec une prédictibilité des productions, ce qui est un réel frein à l'essor de la filière.

Comme on vient de le voir, la croissance des microalgues résulte de la combinaison de plusieurs facteurs : la température, la composition du milieu et l'exposition à la lumière. Comme cela est plus longuement discuté dans la partie I.3 qui suit, tous ont un impact sur la biomasse et inversement. Vient alors la question de connaître ces impacts. Or on l'a aussi vu, les cinétiques biologiques sont souches-dépendantes et la nomenclature des souches manque de fiabilité. Idéalement, il faut alors procéder à la mesure expérimentale systématique des cinétiques avant toute tentative de dimensionnement prédictif d'un nouveau photobioréacteur. De même, il existe une grande variété de modèles (empiriques) pour décrire les résultats. Il est recensé [60] par exemple plus d'une douzaine de lois pour décrire l'influence de la concentration des nutriments et plus d'une vingtaine de lois relatives à la lumière ou à la température. On relève aussi le problème d'ajustement des modèles, ainsi étant donné le nombre de paramètres présents dans certains d'entre eux, il devient difficile de les déterminer expérimentalement avec exactitude. Parfois même, un même modèle contient suffisamment de degrés de liberté (i.e. paramètres) pour décrire des comportements distincts voire contradictoires, c'est ce que l'on appelle le sur-ajustement (*over-fitting*) [60].

Quand bien même souhaiterait-t-on utiliser les mesures issues de la littérature, les conditions de cultures ne sont détaillées que très rarement de façon exhaustive pour une réexploitation quantitative [61]. Ainsi, la composition du milieu et les méthodes de régulation sont systématiquement détaillées. Il en est tout autre de la géométrie du réacteur ou de celle du dispositif lumineux, qui ne sont qu'exceptionnellement données. Les conditions d'éclairement sont des paramètres significativement déterminants, ils influent sur la vitesse de croissance finale à l'échelle de plusieurs décade [1]. Il est donc vain de vouloir comparer les valeurs absolues de vitesse de croissance, sans la connaissance complète de la géométrie et de la mise en lumière du volume réactionnel.

De même, il n'y a pas de consensus à propos de l'unité de mesure du flux lumineux (paramètre important du dimensionnement) : $W \cdot m^{-2}$, $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ et plus rarement en lux (lx). Remarque : PAR (ou parfois noté ν) viens spécifier que l'on décompte la quantité de photon sur une gamme appelée PAR pour *Photosynthetic Active Radiation* comprise entre 400 et 700 nm (et exceptionnellement sur le PUR : *Photosynthetic Usable Radiation* entre les bandes 400 - 550 nm et 620 - 700 nm). Dès lors, l'extrapolation des résultats à un autre cas de figure que celui de l'étude d'origine est hasardeuse, avec par conséquent des lois cinétiques qui sont souvent réacteur-spécifiques. Ce problème est encore plus criant lorsqu'il s'agit d'effectuer un changement d'échelle pour le dimensionnement d'une installation industrielle.

b. Approche Macroscopique

Il est communément reconnu que l'éclairement est le paramètre de dimensionnement prépondérant [28], [44], [62]. La température de culture ou la composition du milieu n'en sont pas moins des postes de dépenses importants, mais ils sont aisément évitables en tant que paramètres limitants (chauffage et nutriments en excès). De plus l'éclairement est directement lié à la géométrie du photobioréacteur et est donc pleinement concerné par la question des changements d'échelle. L'approche du dimensionnement de l'éclairement consiste alors généralement à conserver le rapport de quantité de lumière et quantité de culture constant lors du changement d'échelle. La quantité de lumière étant souvent exprimée en surface de réacteur éclairée, ce qui mène généralement au simple calcul du facteur de forme F (équation (1)) [63]–[65] du volume de culture. Parfois même, pour les bassins ouverts, on trouve des raisonnements écrits en productivité surfacique (i.e. quantité de biomasse produite par unité de temps et par superficie occupée par l'installation), c'est-à-dire indépendamment du volume/profondeur de culture. L'augmentation de la production se faisant à travers

l'accroissement des dimensions de la surface éclairée (à F constant). Dans le cas de sources lumineuses immergées, le calcul se fait par conservation de la concentration volumique des sources (i.e. quantité de sources lumineuses par unité de volume de culture). Dès lors, le dimensionnement de la production se fait au regard du volume du photobioréacteur (sans que sa forme ne soit importante).

$$\boldsymbol{F} = \frac{\boldsymbol{S}}{\boldsymbol{V}} \tag{1}$$

*Avec : **F** le facteur de forme du volume réactionnel, **S** la surface de réacteur (éclairée), **V** le volume de culture*

Quoi qu'il en soit, dans les deux cas, le changement d'échelle se fait par multiplication (*numbering up*) d'un motif élémentaire de réacteur dont les performances sont connues à échelle laboratoire ou pilote (et éventuellement optimisées). Ainsi, s'attend-t-on à ce que la production d'une lagune de 20 ha soit le double d'une lagune de 10 ha, de même pour un réacteur tubulaire de 500 m linéique et un second de 250 m. Cependant, cela implique de toujours être dépendant d'un premier motif élémentaire empêchant d'aborder la conception directe du réacteur à l'échelle finale souhaitée. Des limitations techniques peuvent apparaître à la multiplication de la taille d'un réacteur. Par exemple, accroitre la taille linéique d'un réacteur tubulaire finit par poser la question de son agencement. Dans le cas d'un éclairement solaire, les différents râteliers (*rack*) de canalisations peuvent s'ombrager entre eux, ce qui pose la question d'être ou non capable de réellement conserver les caractéristiques d'éclairement quelle que soit la taille du réacteur. Peuvent aussi apparaître de nouvelles contraintes comme par exemple (toujours pour un photobioréacteur tubulaire) l'apparition de poches de dioxygène dans les conduites lorsque la fréquence de passage par la zone d'aération devient trop faible. Et enfin, cette méthode ne permet une économie d'échelle que modérée, puisqu'elle consiste en la multiplication d'un réacteur élémentaire et donc une multiplication du coup d'investissement qui lui est lié (CAPEX, pour *Capital Expenditure*).

L'agitation de la culture est aussi un facteur signalé comme jouant un rôle dans les cinétiques de croissance [29], [66] sans que le lien ne soit maitrisé puisqu'aucune corrélation n'est proposée (à notre connaissance) pour faire le lien entre agitation et croissance. Or, il est connu du génie de réacteur qu'il est difficile de conserver les mêmes caractéristiques d'agitation avec le changement d'échelle. Ainsi, pour que la démarche de dimensionnement

exposée ci-avant soit valide, il faut conserver à la fois le facteur de forme F mais aussi les caractéristiques de l'hydrodynamique, ce qui n'est pas une évidence avec l'augmentation de l'envergure du réacteur. De même, optimiser un photobioréacteur via F mène souvent à des géométries planes de réacteur (i.e. grande surface éclairée pour un faible volume), de faible épaisseur qui plus est. Cependant, les géométries confinées et anguleuses ne sont pas sans impact sur l'écoulement de la culture dans le volume, ce qui peut conduire à l'apparition de zones mortes avec pour conséquence une modification des conditions d'agitation et donc des cinétiques (ex. une partie de la biomasse reste en permanence dans l'ombre). Cela peut aussi se traduire par l'apparition de biofilms modifiant d'autant plus les conditions réactionnelles avec une fraction de la biomasse se développant hors suspension et une diminution de la lumière transmise.

Quoiqu'il en soit, ceci revient à ne considérer la lumière qu'au seul moyen de l'échelle globale des photobioréacteurs (i.e. quantité à l'entrée du réacteur). Or, comme nous l'avons dit, dès lors qu'il y a photosynthèse, il y a absorption de la lumière et donc hétérogénéité du volume en lumière. On le verra (partie II.4) l'influence de la lumière sur la croissance n'est pas linéaire, ce qui rend donc impossible l'évaluation de la croissance globale via la connaissance seule de l'énergie lumineuse dissipée dans le réacteur. De là vient la dépendance du dimensionnement par multiplication a son motif élémentaire, car pour qu'il soit valable il faut conserver la même forme d'hétérogénéité en lumière dans le réacteur, c'est ce qui était implicitement voulue avec la conservation de F Pour le dimensionnement des photobioréacteurs, est aussi régulièrement introduite la notion de profondeur optique PO, c'est-à-dire la distance que doit parcourir la lumière depuis la face éclairée pour que la culture soit entièrement en lumière. PO et F sont deux grandeurs visant à caractériser la géométrie du réacteur du point de vue de l'éclairement, sans pour autant être strictement équivalentes.

c. Approche Locale

Pour faire en sorte que la conception du photobioréacteur devienne indépendante d'une même forme d'hétérogénéité en lumière, il faut tout d'abord être capable d'évaluer localement l'éclairement afin de le prendre en compte par la suite, ce qui rend l'entreprise de dimensionnement plus complexe. De même, cela présuppose de connaitre l'impact des différents niveaux d'éclairement sur la croissance. Par ailleurs, dans les conditions usuelles de mélange et de croissance, les photobioréacteurs ne présentent pas d'hétérogénéité en concentration (ex. carence ou excès locaux en nutriments). Par conséquent, l'influence de

l'agitation ne peut s'expliquer qu'à travers les fluctuations de lumière induites (vu I.2.A) (dues au déplacement de la biomasse dans le champ non-homogène de lumière présent dans la cuve). On retrouve la description de ce phénomène sous le nom de *Flashing Light Effect* dans la littérature [39], [67]. Dès lors, il faut aussi ajouter un aspect temporel tant aux cinétiques qu'à l'évaluation des conditions réactionnelles. Pour ce qui est de la cinétique biologique, plusieurs modèles sont proposés [68]–[71], Eilers et Peeters pour n'en citer qu'un, avec néanmoins des difficultés pour mesurer expérimentalement leurs paramètres [72], [73]. Concernant le calcul temporel de l'exposition à la lumière, quelques études préexistent [36], [74] (expérimentales et numériques), mais toutefois sans jamais que cela ne constitue une réelle méthode de dimensionnement des photobioréacteurs.

En revanche, on note l'existence de deux cas limites possibles concernant la prise en compte de l'agitation sur la cinétique de croissance. Baptisés comportement intégré (*full-integration*) et adaptation instantanée (*instantaneous adaptation*) [75], [76], ils font respectivement l'hypothèse que le mécanisme de la photosynthèse est soit très lent soit très rapide devant celui des variations de lumière perçues par la biomasse dans le réacteur. Par là même, le cas d'un comportement intégré suppose que la loi cinétique relative à la lumière peut s'écrire relativement à la lumière moyenne à laquelle la biomasse est exposée. Celui d'une adaptation instantanée suppose que chaque cellule voit sa croissance régie en chaque instant par la lumière du lieu où elle se trouve. Ce qui revient soit à écrire la cinétique en fonction de la moyenne volumique du champ de lumière soit à faire l'intégrale du calcul de la cinétique en chaque point du réacteur. Ceci est plus longuement discuté en partie II.4. Il en vient une autre approche de conception des photobioréacteurs, moins répandue, qui cherche en priorité à intensifier les variations de lumière perçue par la biomasse, soit en disposant les sources lumineuses le long de la trajectoire des cellules soit en forçant ces trajectoires à passer des zones sombre aux zones éclairées du réacteur [39], [77], [78]. La finalité étant d'augmenter la vitesse de variation de la lumière (du point de vue de la microalgue) et alors tirer parti de l'effet cité ci-avant en tendant vers le comportement intégré, qui, on le verra est plus favorable.

En conclusion, la conception d'un photobioprocédé doit prendre en compte : la température de la culture, la composition du milieu et l'exposition de la biomasse à la lumière. Les deux premières (température et composition) ont l'avantage de ne pas être dépendantes de la géométrie du réacteur (*a minima* dans notre cas). En revanche, comme dans tout réacteur, la composition évolue avec l'avancement et est donc retro-couplée avec la cinétique. Il faut donc connaître à la fois l'effet de la composition sur la biomasse, mais aussi celui de la

biomasse sur la composition. Ce n'est pas le cas de la température, car la croissance de la biomasse n'est, ici, ni endothermique ni exothermique ou bien l'est de façon négligeable comparativement aux échanges thermiques. L'exposition à la lumière est, quant à elle, souvent citée comme le paramètre limitant des croissances photosynthétiques, une attention particulière doit donc y être portée. L'éclairement du photobioréacteur dépend de la concentration en biomasse (via l'auto-ombrage), et donc de la croissance et doit donc être évalué à chaque instant de la culture. De plus, l'éclairement est aussi fonction de la géométrie du réacteur (via les gradients de lumière) et donc spécifique à chaque dispositif. Et enfin, étant donné l'inhomogénéité du volume en lumière, les algues sont exposées à une intensité lumineuse fluctuante le long de leur trajectoire (via l'agitation). Du fait de l'existence d'une dynamique de réponse aux fluctuations de lumière, le couplage entre le champ d'intensité et le champ de vitesse est nécessaire pour évaluer l'impact sur la croissance.

3. Démarche Scientifique

"En génie des procédés, la modélisation consiste en un ensemble d'équations mathématiques construit sur la base de données expérimentales et permettant de représenter les relations entre les sorties et les entrées du système." [79]. Ainsi commence le résumé de l'article *Modélisation en génie de procédés* par X.M. Meyer dans lequel préfigure une grande partie du cadre méthodologique employé dans cette étude, car il s'agit du sujet même de ce travail.

La question de la modélisation en bioprocédés est, au-delà même des développements techniques, fondamentalement complexe. La conduite de ce travail nécessite donc, tant sa maitrise complète est illusoire, bon nombre de restrictions, de choix, d'hypothèses, de compromis, ce qui implique d'avoir chaque fois un peu plus de rigueur si l'on souhaite garantir sa qualité et sa validité. Et bien que bon nombre de ces derniers soient des lieux communs (tacites) du génie chimique, il n'en demeure pas moins nécessaire de commencer par les énoncer. Cela est d'autant plus vrai lors des étapes de capitalisation, documentation et transfert de la connaissance scientifique, comme ici. Ainsi, après l'exposé de l'état de l'art et la mise en évidence des besoins techniques, cette partie abordera la manière par laquelle on tente de répondre à ces besoins. Tout d'abord est exposé l'énoncé de la méthodologie générale qui a été adoptée puis celui des choix de modélisation qui, tous deux, constituent les prérequis nécessaires à la compréhension du travail expérimental et numérique.

A. Méthodologie Générale

Premièrement, il faut appréhender la complexité fondamentale dont il est question dans l'introduction de ce chapitre. Il est ici question de photobioprocédés, soit en d'autres termes (cf. partie précédente) : un réacteur agité et éclairé mettant en jeu un système biologique en suspension dans un électrolyte, c'est-à-dire pas moins de cinq thématiques (i.e. le génie des réacteurs, la chimie, la mécanique des fluides, le transfert radiatif, et la biologie), sans compter la pratique expérimentale et les méthodes numériques aussi utilisées. Chacune faisant l'objet d'une discipline à part entière et méritant une étude complète quant à leurs applications aux photobioprocédés [16], [17], [27]–[31], [33], [38], [49], [62], [73], [80]–[84]. On comprend donc aisément qu'il ne peut être ici question d'aborder chacune d'entre elles de façon complète et approfondie. De plus, au-delà de la pluralité des disciplines entourant la modélisation des photobioréacteurs, l'aspect multiphysique du problème ne s'arrête pas là, car un degré de complexité supplémentaire s'ajoute en cela qu'elles sont hautement couplées les unes aux autres. Il s'agira donc en revanche d'une tentative de compréhension de la synergie qu'elles peuvent avoir sur le résultat final, à savoir l'évolution de la biomasse, et ce grâce à leurs mises en œuvre conjointes. À titre d'exemple : l'hydrodynamique a un impact sur la composition du milieu réactionnel via le transfert entre phases, la composition impacte l'évolution de la biomasse à travers les cinétiques réactionnelles, la biomasse elle-même agit sur le milieu réactionnel en consommant certaines espèces et enfin le milieu réagit avec lui-même dans des réactions d'équilibre chimique. L'évolution de la biomasse est alors fonction, directement ou non, de la totalité des thématiques précédemment citées, et plus encore de leurs conjugaisons en un même procédé. Il est alors question ici de l'étude de ces effets couplés des différents phénomènes et non de l'étude détaillée de chacun ou de l'un d'eux en particulier.

Par ailleurs, un autre aspect important de la problématique est que l'objet central de l'étude est une cyanobactérie (i.e. un organisme vivant), puisqu'il ne s'agit pas moins que de décrire son évolution lorsqu'elle est exposée à telle ou telle conditions opératoires. Or, il n'est pas réaliste de prétendre à la description complète, exacte et rigoureuse de celle-ci. Un organisme vivant par son immense complexité fait qu'il ne peut être établi de modèle de connaissance pure à son propos, car il est non-identifiable, quasiment par essence. Quasiment car il existe, encore une fois, une discipline à part entière qui étudie cela : les métaomiques (ex. génomique, protéomique, transcriptomique, etc.), désignant les technologies permettant d'appréhender dans leurs globalités les systèmes biologiques complexes et dynamiques [85], grâce à la description des mécanismes internes des cellules : le métabolisme. Et l'existence de ce

problème de la complexité apparente des organismes vivants, due à l'état actuel de la connaissance, saurait sans doute être réfutée par des développements futurs. Quoiqu'il en soit le choix a été ici fait de traiter la biomasse en tant que boîte noire. Les modèles la concernant seront donc de type empirique et entièrement induits des observations expérimentales. De cela découle, tout d'abord, que le champ des phénomènes prédictibles grâce aux simulations se trouve restreint par celui des observations qui auront pu être et ont été menées expérimentalement, qui plus est dans le cadre technique restreint du projet. L'extrapolation à des cas de figure différents de celui de l'étude ne peut être qu'hypothétique, et ce d'autant plus que la différence est grande, typiquement lors des changements d'échelles. Donc autant que possible : "on ne cherche pas à transformer une intuition physique en une structure mathématique, mais on cherche à forcer une structure mathématique donnée à obéir à des observations expérimentales." [79].

Concernant l'aspect expérimental, il nous faut aussi considérer son manque de reproductibilité. Malgré toute la bonne volonté qui a pu être mise en œuvre lors de la pratique expérimentale, il y a toujours plus d'incertitudes sur le résultat issu d'un système biologique que sur celui d'une réaction entre un acide et une base. Cela peut en partie s'expliquer par la pluralité des phénomènes pouvant avoir un impact sur le résultat, et résultant donc en une première difficulté dans la capacité (ou plutôt l'absence de capacité) à contrôler pleinement les conditions opératoires. Mais le problème réside aussi dans le type de mécanismes en jeu (métaboliques) dans le passage des entrées aux sorties du système, des conditions opératoires aux résultats observables. Ainsi sans même aller jusqu'à parler d'une forme de "libre arbitre" de la microalgue (cyanobactérie), la notion même de déterminisme appliquée à un organisme vivant peut plausiblement faire l'objet d'un questionnement. Quoi qu'il en soit, dans la pratique, la spiruline peut sembler apparaître comme un système chaotique.

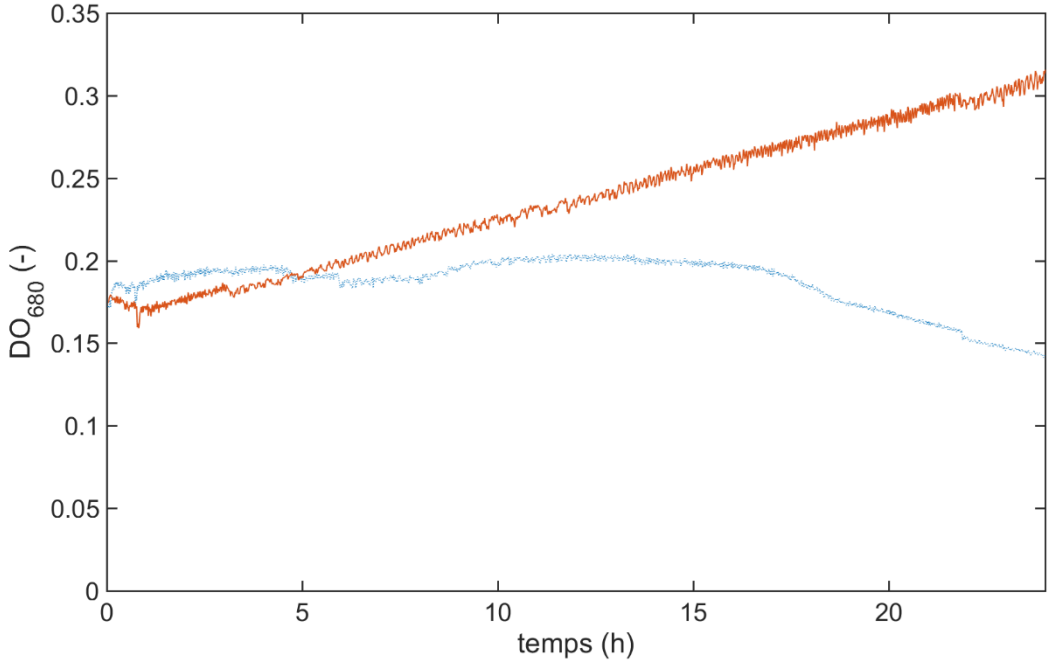


Figure 11 : Croissances comparées sur 24h de deux cultures identiques (au sens de Σ l'ensemble des paramètres opératoires considérés) suivis par densité optique à 680nm (DO_{680})

On a par exemple conduit en parallèle dans un même photobioréacteur (qui sera décrit dans le chapitre suivant), deux cultures issues d'un même inoculum dans un même milieu, à une même température, exposé à un même éclairement et agitation. Ce sont donc les conditions de culture les plus rigoureuses que l'on ait pu envisager et réaliser puisqu'elles permettent semble-t-il un contrôle satisfaisant de l'ensemble des paramètres de culture considérés comme ayant un impact. Même dans de telles conditions, on a pu observer les deux cultures croître de manière significativement différente, comme on peut le voir Figure 11. Cela met en évidence soit qu'il existe un paramètre inconnu qui en plus des autres peut lui aussi influencer le devenir de la biomasse et qui n'est pas identique entre ces deux cultures, soit que le système n'est pas pleinement déterministe. Sans chercher à expliquer les raisons de ce problème il faut pour autant traiter avec et *a minima* en avoir conscience. On remarquera qu'une piste de réponse peut se trouver dans le fait que nous n'opérons pas en conditions axéniques, la spiruline est donc systématiquement en symbiose, favorable ou non, avec d'autres espèces sans que celles-ci ne soient connues et maîtrisées. Il y a là une hypothèse forte : la zoologie bactérienne de nos cultures doit être constante, et il est ardu de la vérifier. Mais il est parfois des cas extrêmes, où la visualisation au microscope optique révèle la présence d'une population bactérienne différente d'ordinaire (spiruline non-incluse). On parle

alors de "contamination", occurrences qui de plus semblent corrélées à certain cas de manque de reproductibilité des résultats.

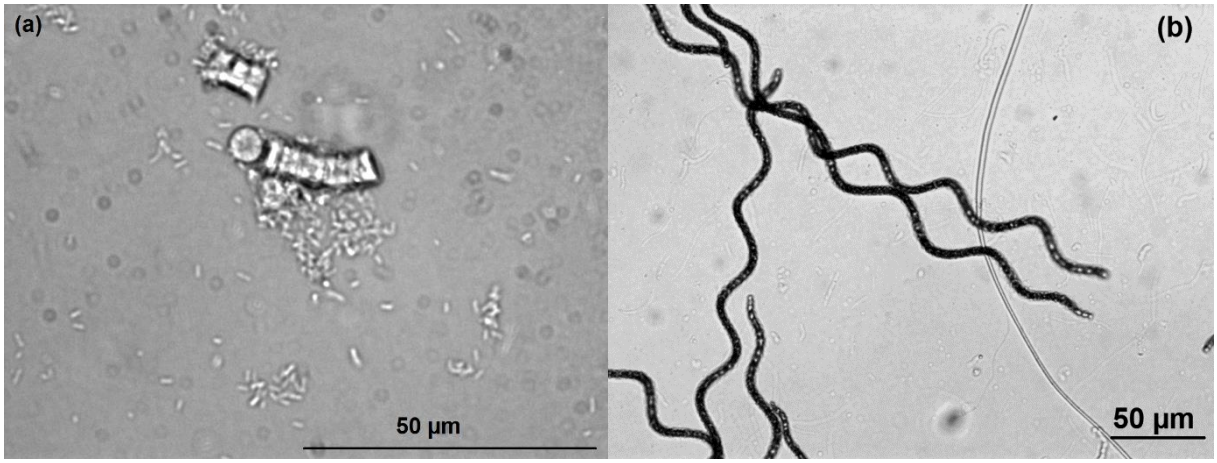


*Figure 12 : Photographie montrant : **(a)** une forte population bactérienne au voisinage d'un fragment de trichome, **(b)** la coexistence d'une autre bactérie filamenteuse dans la culture*

Ici, ce que l'on appelle traditionnellement points aberrants ne sont pas, pour la plupart, des erreurs commises lors de mesures mais sont bien une réalité expérimentale. Ainsi traiter avec fait alors inévitablement intervenir le jugement de celui qui fait le modèle, ce qui est en contradiction avec la volonté qui a été donnée précédemment, qui est d'avoir des modèles qui ne soient rigoureusement que la description des observations. Au contraire même, ici aucun traitement systématique des données ne peut être envisagé, un regard critique devant nécessairement être appliqué à chacune d'entre elles. On généralisera en quelques sortes les propos de C. Chatfield à toutes nos données : "*Anyone who tries to analyse a time series, without plotting it first, is asking for trouble.*" [86]. De même lorsqu'il y a un manque de reproductibilité sur un résultat d'expérience on suppose aussi que celui qui est retenu par le modélisateur fait bien figure de règle et non d'exception (si tant est que cela ait un sens). Néanmoins afin d'éviter ce type de complications : une donnée n'est jamais obtenue et étudiée individuellement mais s'inscrit toujours dans une évolution relative des résultats par rapport à la variation d'un paramètre, tout comme la précision d'une corrélation linéaire va en s'améliorant avec l'augmentation du nombre de points. Cependant, il demeure que deux personnes distinctes peuvent très bien obtenir, en toute bonne foi, deux corrélations différentes de mêmes données. Et par là même les modèles ne sont plus que tendances et perdent leur potentiel à être rigoureusement prédictifs, ainsi peut-on lire dans une publication traitant de la modélisation des photobioprocédés : "*Can we accurately predict -a priori- large-scale process performance ? […] Obviously the honest answer is… No.*" Par R. Takors [85].

B. Choix de Modélisation

"La simulation dynamique des réacteurs biologique repose sur la modélisation d'un nombre important de phénomène physique et biologique couplés. Une caractéristique prédominante est la large gamme d'échelles spatiales et temporelles impliquées. Cette modélisation s'appuie sur l'analyse théorique des phénomènes et, lorsque les techniques existent, sur l'analyse de données expérimentales. Les recherches réalisées depuis deux décennies amènent à considérer aujourd'hui qu'écoulements turbulents, transfert entre phases, états de mélange, réaction biologique et dynamique des populations microbiennes doivent être considérés avec le même intérêt et, dans la mesure de moyens, simultanément." [87]. Peut-on lire dans l'avant-propos du livre *Modélisation des bioréacteurs* par J. Morchain, or c'est exactement ce que l'on tente d'entreprendre ici, nombre choix de modélisations adoptés dans la suite de ce chapitre viennent et sont déjà discutés dans celui-ci, notamment pour ce qui est de l'approche Lagrangienne et dynamique de la biomasse. Sont ici formulés différents choix qui sont effectués concernant la construction du modèle lui-même.

Il s'agit tout d'abord de caractériser le système biologique au regard des observations expérimentales. On usera pour cela d'une approche multi-échelle, car elle permet une compréhension ainsi qu'une description plus fine des mécanismes en jeu, qui ne pourraient être pris en compte correctement, si ce n'est pas du tout, de façon macroscopique par une vision globale des photobioréacteurs, à cause notamment du couplage des différents phénomènes. Pour illustrer ce propos : il a été vu dans la littérature des résultats montrant l'impact du pH du milieu de culture sur la croissance algale [17], bien que l'observation soit un fait véridique, elle pose par contre un vrai problème quant à son exploitation. Car le pH est une construction humaine représentant le potentiel d'une solution à échanger des protons H^+ (pH>7=acide=donneur, pH<7=basique=accepteur, cette gamme n'est vraie qu'en solution aqueuse) à travers le logarithme de leur concentration. Et il existe une infinité de couples acide-base (variant de nature et de concentration), donnant la même valeur à lecture de leurs pH. Or est-il plus probable que les cellules voient leur croissance fonction des quantités d'espèces nutritives en solution ou alors de la capacité du milieu global à échanger des protons H^+? Sans doute les deux dans la pratique. Mais la notion de pH ne représente ici que très partiellement les conditions de culture, puisqu'elle n'en est qu'une conséquence. Un tel résultat donnant l'influence du pH sur la croissance n'est alors valide que pour les conditions données de composition du milieu de l'expérience elle-même, et ne peuvent sortir de ce cadre et donc être appliqués à un autre cas de figure. C'est pour cela qu'autant que faire se peut, il est tenté

ici de s'affranchir des grandeurs macroscopiques (intégrées à l'échelle du réacteur tout entier) dans le calcul des cinétiques biologiques.

De plus, les photobioréacteurs étudiés n'offrent pas *a priori* ni *a posteriori* de conditions réactionnelles homogènes sur l'ensemble de leurs volumes. Ce qui fait que les grandeurs macroscopiques, telles la moyenne d'une concentration sur le volume du réacteur, ne sont pas forcément représentatives de ce à quoi les cellules sont réellement exposées.

$$\boldsymbol{R^{PBR}} = \iiint_{V_{PBR}} \boldsymbol{R(\Sigma(x; y; z)) \cdot \delta v} \tag{2}$$

Avec : $\boldsymbol{R^{PBR}}$ *la croissance algale du photobioréacteur,* $\boldsymbol{R}$ *la vitesse locale de croissance de la biomasse,* $\boldsymbol{V_{PBR}}$ *le volume du photobioréacteur,* $\boldsymbol{\Sigma}$ *l'ensemble des paramètres opératoires utilisés pour le calcul des cinétiques,* $\{\boldsymbol{x}\ ;\ \boldsymbol{y}\ ;\boldsymbol{z}\}$ *coordonnées spatiales dans le repère* $\boldsymbol{Oxyz}$

On remarquera toutefois que cela diffère de l'approche classique des réacteurs non-idéaux qui consiste classiquement en l'intégration sur le volume du réacteur des cinétiques évaluées localement en ses différents volumes élémentaires (cf. équation (2)), ce qui permet donc de ne pas recourir aux seules grandeurs macroscopiques et ainsi de prendre en compte les hétérogénéités au sein du réacteur.

A la nécessité de tenir compte des hétérogénéités s'ajoute que les systèmes biologiques ont cela de particulier qu'ils ne sont pas instantanés. Ils sont, au moins en partie, la conséquence de leur propre histoire de plus il faut considérer également les transferts entre phase liquide et cellules (la biomasse étant un solide dispersé) nécessaires au métabolisme, ce que l'on appellera par la suite dynamique biologique. Cette notion d'histoire ne peut pas être traitée par la seule évaluation locale des paramètres réactionnels. La détermination de la croissance globale dans le réacteur demande l'ajout au calcul soit d'un terme temporel, soit d'une caractérisation de l'état des cellules. Ainsi, la cinétique en un point du réacteur n'est plus la stricte fonction des coordonnées dans l'espace mais elle est aussi fonction de l'état des cellules qui s'y trouvent et se déplacent de proche en proche. Un même volume élémentaire voit sa cinétique varier au cours du temps avec les cellules qui le traversent.

La méthode adoptée ici, consistant à regarder à l'échelle des cellules ce à quoi elles sont exposées, permet à la fois d'avoir l'effet d'éventuelles hétérogénéités, mais aussi d'observer

l'effet temporel de l'exposition successive des cellules à ces différentes conditions. On remarque que, si le système n'a pas d'effet d'histoire, alors les hétérogénéités peuvent être traitées simplement avec un calcul de R^{PBR} en fonction des variables locales des paramètres (i.e. intégrale volumique, équation (2)). S'il n'y a pas d'hétérogénéité (en espace et en temps) alors l'éventuel effet d'histoire est invisible sur le procédé. Si l'effet existe mais que les conditions ne varient que dans le temps, alors la cinétique peut être traitée par une équation écrite à l'échelle macroscopique.

Cela implique de revoir la façon d'aborder les calculs, cinétiques et la façon de concevoir et exploiter les expériences. Premièrement les équations ne sont plus attachées au réacteur mais à une cellule en particulier, or cette cellule dans son individualité ne renseigne en rien ce qu'il se passe dans le réacteur. Le calcul sur une cellule seule n'est en soi pas signifiant, et n'est de toute façon qu'un cas particulier des occurrences possibles au sein d'un réacteur. Il faut alors introduire la notion de population, équation (3), notée P, c'est-à-dire une collection de cellules sur lesquelles sont mises en œuvre les équations des modèles. Et pour pouvoir en tirer des conclusions sur le réacteur, il faut faire l'hypothèse que cette population est statistiquement représentative de la biomasse présente dans le réacteur. La validation de cette hypothèse sera évidemment l'objet de discussions lors de la mise en pratique. D'autre part, bien que les termes de population et de modèles biologiques soient ici utilisés conjointement, il ne s'agit pas pour autant d'un bilan de population, qui est une méthode consistant à décrire une population à travers l'évolution de ses éléments (division cellulaire typiquement). Ici la population, telle qu'elle est utilisée, n'est qu'un outil statistique pour la description de conditions réactionnelles et n'intervient que comme argument des modèles cinétiques, ces derniers ne sont pas directement transportés par les éléments de la population ou n'ont pas de rétroaction sur la population. Et la mise en pratique doit elle-même être réfléchie, car un compromis doit être fait entre quantité d'information nécessaire à une correcte représentation statistique (i.e. choix du cardinal de la population) et temps de calcul, puisqu'il est question de faire le calcul autant de fois qu'il y a d'éléments dans la population. Il s'agit donc de faire en sorte que le calcul soit réalisable tout en contenant suffisamment d'informations pour être convergé.

$$\boldsymbol{R^{PBR}} = \lim_{N\to\infty} \frac{1}{N} \sum_{\varrho=1}^{N} (\boldsymbol{R^{\varrho}}) \tag{3}$$

Avec : $\boldsymbol{R^{PBR}}$ la croissance algale sur tout le photobioréacteur, ϱ cellule appartenant à P, $\boldsymbol{N}$ le nombre d'éléments dans la population P, $\boldsymbol{R^{\varrho}}$ la vitesse de croissance de la cellule ϱ,

La cinétique biologique fonction d'un ensemble de conditions opératoires Σ, est écrite comme étant le produit de fonctions normalisées $\mu_i$représentant l'influence des différents paramètres, indicée i, et d'un terme μ_{max} [88]. Ce dernier représente la vitesse de croissance obtenue lorsque qu'aucun des paramètres n'est limitant, soit : $\forall i \epsilon \Sigma \ \mu_i = 1$, c'est-à-dire la vitesse maximale de croissance de la biomasse envisageable dans des conditions données.

$$\boldsymbol{R} = \boldsymbol{\mu_{max}} \cdot \prod_{i} \boldsymbol{\mu_i(\Sigma)} \tag{4}$$

Avec : $\boldsymbol{\Sigma}$ l'ensemble des paramètres opératoires, $\boldsymbol{\mu_i} \in [0;1]$ les différentes lois i décrivant l'influence des composantes de Σ [88]

Cette écriture suppose que la cinétique biologique puisse effectivement être modélisée de cette manière, cette hypothèse est essentiellement restrictive en ce qu'elle impose une forme unique dans l'écriture de la cinétique. Par exemple, ne peut être pris en compte le cas de la présence de deux substrats azotés dans le milieu qui seraient consommés l'un après l'autre, comme illustré Figure 13, avec des cinétiques différentes et souvent avec un temps de latence lors de la transition de l'un vers l'autre. De même, pour le cas où pourraient avoir lieu deux cinétiques distinctes issues de deux métabolismes indépendants, régis par deux Σ différents, et conditionnés par l'existence de phases diurnes et nocturnes lors de la culture. En l'état cette structure choisie ne pourrait y répondre, toutefois d'autres solutions plus adaptées à ces cas de figures existent et pourraient être utilisées le cas échéant, mais sans que cela ne soit ici nécessaire. D'autre part, cette approche a été choisie pour la simplicité de sa structure qui permet de garder la main sur la compréhension de l'origine des résultats obtenus. De plus cette structure correspond assez bien à la démarche qui est de vouloir ajouter des termes au fur et à mesure de l'amélioration progressive de la qualité du modèle. On pourrait assimiler cela à une dégénérescence d'ordre en cinétique chimique, c'est-à-dire à être capable de dire

"toutes choses étant égales par ailleurs". Ce qui se traduit expérimentalement par fixer tous les paramètres sauf un. Alors, si effet il y a, il provient de celui qui a varié.

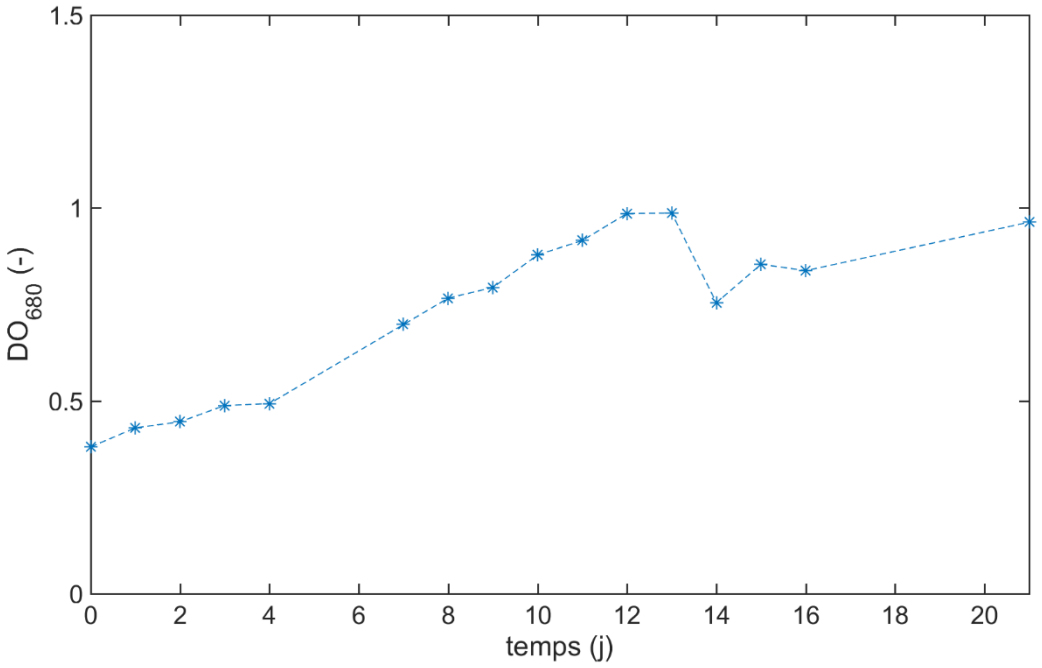


Figure 13 : Exemple du suivi quotidien sur trois semaines de la croissance de la spiruline dans un milieu contenant à la fois ammoniaque et nitrate et présentant un décrochement symptomatique de ce type de milieu, ici au jour 14, l'ammoniaque a par la suite été retirée de la composition du milieu (données Alg&You)

Ensuite il faut prendre en compte que l'on a opté pour une approche multi-échelle avec l'objectif qui est, on le rappelle, de décrire au mieux ce à quoi la biomasse est réellement exposée en matière d'environnement. En ce sens le calcul des cinétiques tel qu'il est fait traditionnellement dans la littérature n'est pas adapté, à savoir : $\mu_i = f(\Sigma)$, avec Σ l'ensemble des paramètres opératoires déterminés à l'échelle macroscopique. Il est donc modifié pour devenir :

$$\boldsymbol{\mu_i^{\ell} = f(\Sigma^{@\ell})} \tag{5}$$

Où cette fois : $\boldsymbol{\Sigma}^{@\ell}$ l'environnement régnant localement (signification du @) à la position de la cellule ℓ, $\boldsymbol{\mu_i^{\ell}}$ est l'influence normalisée du phénomène i sur la cellule ℓ, $\boldsymbol{f}$ une fonction arbitraire

Et comme annoncé précédemment, la cinétique de croissance est écrite comme une fonction des conditions réactionnelles à l'échelle de la cellule, puis l'on remonte à l'information à l'échelle du réacteur global par convergence statistique de la moyenne sur une population représentative P de cellules dans le réacteur :

$$\boldsymbol{R^{\wp} = \mu_{max} \cdot \prod_{i} \mu_i^{\wp}} \tag{6}$$

$$\boldsymbol{R^{PBR} = \lim_{N \to \infty} \frac{1}{N} \sum_{\wp=1}^{N} \left(\mu_{max} \cdot \prod_{i} \mu_i^{\wp} \right) = \widetilde{R^{\wp}}} \tag{7}$$

Avec : $\boldsymbol{R^{\wp}}$ *la vitesse de croissance de la cellule* $\wp$, $\boldsymbol{R^{PBr}}$ *la croissance algale total dans le photobioréacteur,* $\boldsymbol{\mu_i^{\wp}}$ *l'influence normalisée du phénomène* i *sur la cellule* $\wp$, $\boldsymbol{N}$ *le nombre d'éléments* $\wp$ *dans la population* P, $\boldsymbol{\mu_{max}}$ la vitesse de croissance maximale de la biomasse, $\sim$ représente la moyenne sur la population des $\wp$ de P

Les paramètres opératoires dont il est prouvé qu'ils sont homogènes sur tout le réacteur sont vus de la même façon par l'ensemble de la population. Comme on a déjà pu le voir, il en résulte que les termes $\mu_i^{\wp}$ qui ne sont fonction seulement de paramètres homogènes sont identiques pour l'ensemble de la population.

$$\boldsymbol{\forall \sigma \subset \Sigma \ \ \forall p \in V_{PBR} \ \ \sigma(p) = cte \ \ \Rightarrow \ \widetilde{\mu_i^{\wp}} = \mu_i(cte)} \tag{8}$$

Avec : $\boldsymbol{\Sigma}$ *est l'ensemble de paramètres opératoires,* $\boldsymbol{\sigma}$ un sous ensemble de Σ, $\boldsymbol{p}$ *des coordonnées dans l'espace* $Oxyz$, $\boldsymbol{V_{PBR}}$ *le volume du photobioréacteur,* $\boldsymbol{\widetilde{\mu_i^{\wp}}}$ *la moyenne de l'influence normalisée du phénomène* i *sur la population* P, $\boldsymbol{cte}$ *une constante*

Ces termes peuvent donc être passés en facteurs dans le calcul de la croissance globale sur le photobioréacteur car pour chaque élément $\mu_i^{\wp}$ est égale à la moyenne $\widetilde{\mu_i^{\wp}}$, alors notée plus simplement μ_i. On verra par la suite que seul l'éclairement du photobioréacteur est inhomogène, et nécessite le recours à une population représentative de cellules pour l'évaluation de son influence μ_I sur la cinétique biologique.

Il n'en reste pas moins qu'après cette étape de modélisation des cinétiques de la spiruline il faut encore déterminer les entrées de ces modèles, c'est l'objet du chapitre III. Toutes ne sont pas directement accessibles, puisque non mesurées ; elles doivent donc elles-mêmes faire l'objet de modélisations et de validations. Toutes n'engendreront pas les mêmes niveaux de difficulté. La température de culture, par exemple, est parfaitement contrôlée et mesurable, il n'y a pour ainsi dire pas de difficulté. La géométrie du photobioréacteur, paramètre entièrement connu, n'intervient jamais directement dans les modèles cinétiques, mais intervient en revanche sur d'autres aspects, comme le mélange ou l'éclairement, et joue bien en définitive un rôle dans la détermination de la croissance de la spiruline, sans pourtant que ce rôle ne soit simple à interpréter. La composition du milieu joue, elle, directement sur les cinétiques, mais n'est maîtrisée qu'à l'instant initial et évolue par la suite à travers ses différents liens avec les autres aspects, comme la biomasse ou le transfert entre phases. Il faut alors modéliser cette évolution. On considérera le volume comme parfaitement mélangé, hypothèse qui est vérifiée dans la partie expérimentale. Ainsi température et composition ont un impact identique sur l'ensemble de la biomasse car homogènes sur le volume, cf. équation (8). Quant à l'éclairement du photobioréacteur, il n'est contrôlé qu'en sa condition aux limites de la géométrie (i.e. le niveau d'irradiance en parois) et varie lui aussi dans le temps, à mesure que la biomasse gagne en concentration. Il varie aussi dans l'espace pour les mêmes raisons puisqu'il y a en tout instant de la biomasse présente et donc absorption et diffusion. Il faut donc être capable de connaître, par modélisation, cette hétérogénéité en lumière et ce à plusieurs stades de la culture. Pour parachever le tout, il est constaté un effet d'histoire des cellules concernant leur exposition à la lumière, non-homogène. Les cinétiques concernant la lumière bénéficient alors de l'approche multi-échelle décrite en début de partie. Par ailleurs, est implicitement supposé (et vérifié ?) qu'il n'y a pas d'effet d'histoire relativement à la température ou à la composition du milieu. Expérimentalement, la quantification de cet effet d'histoire requiert le contrôle de ce à quoi les microalgues sont exposées, pour cela on choisit de s'affranchir de la disparité d'exposition à la lumière de la biomasse. Est alors spécifiquement conçu un photobioréacteur suffisamment fin pour émettre l'hypothèse qu'il ne présente pas d'hétérogénéité d'éclairement sur son volume et ne garder donc que la variation temporelle et ainsi pouvoir étudier la dynamique de la cinétique. Pour ce qui est de déterminer l'exposition à la lumière fournie par un photobioréacteur réel, sous-entendu non-idéal, cela sollicite deux informations. La première est la connaissance du champ volumique des niveaux d'irradiances (i.e. l'éclairement), la seconde étant la donnée temporelle. Cette dernière est obtenue par l'étude de l'hydrodynamique du photobioréacteur, ici intervient donc l'influence de l'agitation. Ces deux aspects sont réunis de façon Lagrangienne. Ainsi, notre population représentative P

de cellules se traduit ici par un lâcher de particules Lagrangien, dont l'objectif est d'échantillonner les trajectoires due aux mouvements hydrodynamiques. Celles-ci sont reportées sur les champs d'irradiance et donnent au final une collection de signaux temporels d'irradiance vue, supposée représentative des conditions réactionnelles fournies par le photobioréacteur en question. Eux-mêmes servent d'entrée au modèle cinétique, dont la structure est décrite plus haut, résultant en une valeur de croissance biologique.

4. Synthèse

Pour finir et pour mieux aborder la partie appliquée de l'étude, on procède à la synthèse de ce premier chapitre. Le travail s'inscrit, on le rappelle, dans un projet en collaboration avec un consortium d'industriels qui se donne pour but de démocratiser la culture de microalgue alimentaire, et plus spécifiquement de spiruline. Le présent travail intervient alors sur les outils de production de cette Spiruline. Plus concrètement, afin d'aider à la conception et à l'usage des photobioréacteurs via la construction d'un outil de simulation, pour comprendre comment optimiser ces deux aspects en termes de production microalgale. Au regard des briques technologiques imposées par le projet pour les photobioréacteurs et de l'état de l'art, il est déterminé un ensemble Σ de paramètres qui sont prises en compte car ayant potentiellement un impact sur la croissance de la Spiruline et le cas échéant leurs influences sont modélisées [60].

$$\Sigma = \left\{ \begin{array}{c} la\ biomasse \\ la\ géométrie\ du\ réacteur \\ la\ température\ de\ culture \\ la\ composition\ du\ milieu \\ l'agitation \\ l'éclairement \end{array} \right\} \tag{9}$$

Avec : $\boldsymbol{\Sigma}$ l'ensemble des paramètres opératoires considérés dans le modèle

Cette démarche s'inscrit dans un cadre méthodologique dont on rappelle maintenant quelques grandes lignes. On choisit d'écrire la cinétique biologique comme le produit de l'influence des différents phénomènes sources d'incidences sur la biomasse. En particulier, le couplage des champs d'irradiance et des conditions d'agitation requiert une approche multi-échelle pour sa description. L'organisation de la démarche dans son ensemble peut se représenter par l'infographie en Figure 14 ci-après.

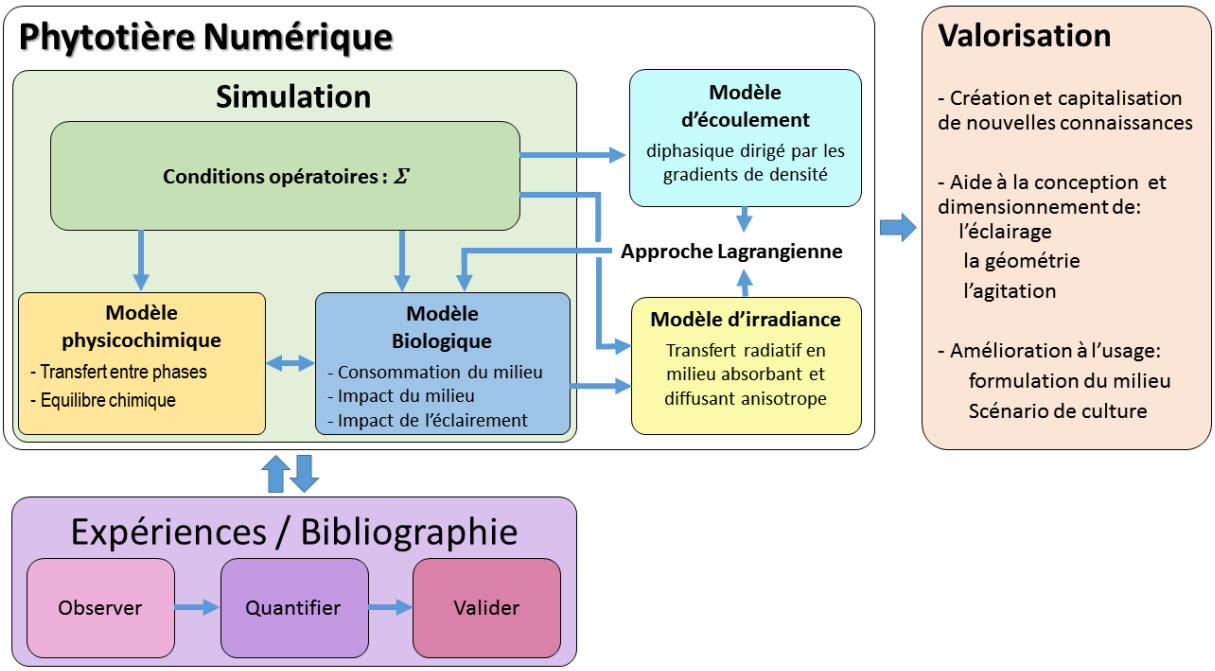


Figure 14 : Schéma synoptique du travail réalisé

Et on conclut par le plan de l'étude ainsi résumé :

- I. Définition du Cadre de l'Étude
  Dans le premier, et présent, chapitre on s'attache à présenter le contexte de l'étude, définir les problématiques auxquelles il va falloir répondre, expliquer le plus précisément et exhaustivement possible la méthode, les hypothèses et le schéma des équations employées pour y répondre

- II. Caractérisation du Système Biologique
  Dans ce chapitre il s'agit de caractériser le plus complètement possible le sujet d'intérêt de l'étude, à savoir le système biologique : la spiruline. Cela passe par :

  - La qualification de l'ensemble des phénomènes pouvant avoir un impact sur l'évolution de la biomasse dans notre cadre technique

  - La quantification de chacun de ces impacts

  - La modélisation des liens entre paramètres et résultats par des lois mathématiques

- III. Modélisation des Conditions de Culture :
  Ce chapitre traite de la façon d'évaluer l'ensemble de l'environnement fourni dans un photobioréacteur donné, sous-entendu différent de ceux (connus et maitrisés) utilisés pour l'établir les modèles précédents. Puis on joint les deux briques précédentes :

  - On procède aux simulations et regarde l'évolution des modèles écrits sur la biomasse (chapitre II), dans l'environnement opératoire d'un photobioréacteur (chapitre III)

  - On confronte ces simulations avec la réalité, grâce à des résultats expérimentaux n'ayant pas servi à évaluer les modèles

- IV. Conclusion : On finit par rappeler les grandes lignes du travail et tirer les enseignements des différents résultats

II. Caractérisation du Système Biologique

Ce chapitre II a pour vocation d'exposer le lien entre les différents paramètres opératoires de la culture et la croissance de la spiruline. Dans la droite ligne du chapitre I on cherche à procéder à la caractérisation du système biologique (la spiruline) à la manière d'une boîte noire, c'est-à-dire sans présupposer ses mécanismes internes. Ainsi est ici étudié expérimentalement l'effet de la variation de tous les paramètres désignés selon la littérature comme ayant une influence sur la croissance de la spiruline (relativement au contexte technique), de manière indépendante ou non en fonction des couplages possibles. Les données expérimentales ainsi utilisées proviennent de plusieurs sources. Soit elles ont été directement obtenues au cours de la thèse, soit par les partenaires du projet PLAISIR (Alg&You et l'IFREMER notamment) ou bien encore elles ont été extraites de travaux publiés. Pour la production des données au cours de cette thèse, trois types de photobioréacteurs ont été utilisés, dont un conjointement avec Alg&You. Les données produites par l'IFREMER sont obtenues sur un autre dispositif de culture, décrit par ailleurs dans la littérature [36]. On s'attache dans un premier temps à décrire ces différents outils, à détailler la façon dont ils ont été utilisés, c'est à dire le suivi des cultures et le protocole lui-même. Par la suite, chacune des influences qui ont été observées et mesurées est modélisée, c'est-à-dire que l'on tente de les restituer le plus fidèlement possible grâce à des lois mathématiques. Lors de ce processus, l'influence de la lumière sur la biomasse, désignée comme la plus significative, a une place un peu à part car elle exige une approche multi-échelle plus complexe que pour l'étude des autres paramètres et fait l'objet de paragraphes spécifiquement dédiés.

1. Moyens Matériels et Méthodes

Avant-propos : Les paragraphes ci-après sont un état des lieux des moyens expérimentaux opérationnels au moment de la rédaction de ce manuscrit de thèse, et tous sont le fruit des trois années de ce travail de thèse ainsi que des collaborations avec les partenaires industriels bien entendu. Par exemple, ni les photobioréacteurs ni les protocoles ne préexistaient, ils ont respectivement été conçus et établis pendant la durée de cette étude.

*Figure 15 : Photographie du 01/04/2016 (quatre mois après le début de ce travail) : **(a)** du premier banc de culture de spiruline, les cuves étaient alors des ballons à fond plat de volumes allant de 500 mL à 10 L et éclairés par des tubes fluorescents, la régulation en température n'était pas encore mise en place et la formulation milieu était en cours (milieu "P0") **(b)** preuve de concept d'un photobioréacteur à usage domestique : première pierre du projet PLAISIR*

A. Photobioréacteurs

Trois sortes de photobioréacteurs ont été utilisées pour un total de dix outils de cultures. Aucun n'est un modèle commercial et tous ont été conçus au LISBP (TBI) et réalisés à façon et/ou avec la collaboration du partenaire Alg&You. Tous trois reposent sur l'assemblage des mêmes bases et briques technologiques à savoir : une culture séquentielle (*Batch*) et non-axénique, chauffée, éclairée artificiellement et agitée par bullage. Les sources lumineuses sont des rubans de diodes électroluminescentes (LED) blanches, d'une teinte chaude (2700K) et délivrant un faisceau de demi angle 60°. Le bullage se fait par injection d'air issu du réseau d'air comprimé du laboratoire sous une pression de 2 bar. Seul le plus petit d'entre eux se démarque par sa méthode de chauffage. Il est immergé dans un bain-marie tandis que les autres possèdent des résistances chauffantes immergées (thermoplongeurs). De plus, toutes les cuves sont faites du même matériau, le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) qui est un polymère plastique d'une grande transparence dans le visible [89], [90], biocompatible, et disponible en grade alimentaire. La principale différence entre les trois sortes réside essentiellement sur le volume et la géométrie de l'enceinte réactionnelle. Ainsi deux sont cylindriques, le troisième est plan et il y a plus d'un facteur dix entre les différents volumes réactionnels (resp. 100 L, 6 L et 150 mL). Sur un autre registre, ils ne sont pas non plus comparables par leurs métrologies, tous n'ayant pas la même fonction ou les mêmes contraintes de fonctionnement. Par ailleurs, l'ensemble des références matérielles égrainées au fil du chapitre sont aussi présentes en Annexe A.

a. Photobioréacteurs de paillasse

Figure 16 : Photographie du banc de photobioréacteurs de paillasse, en eau et en lumière

Les premiers que l'on présente sont les photobioréacteurs de paillasse : un groupe de sept unités réunies en un unique banc d'essai (photographie en Figure 16). Ils ont pour vocation d'être conduits en parallèle afin de cribler simultanément toute une gamme de conditions opératoires. Ils possèdent un volume utile de culture de 6 L contenu dans une géométrie cylindrique à fond plat (hauteur de liquide : 237 mm, diamètre intérieur : 193 mm), la mise en lumière se fait par l'immersion de trois tubes (diamètre extérieur : 41 mm) contenant chacun 1 m de ruban de LED (BDL, vs-f600ww-12v-3528-10mm-2700k) disposé de façon à éclairer l'ensemble de la surface immergée, auxquels s'adjoint un thermoplongeur (diamètre : 14 mm) fabriqué sur mesure (SCIENTAX, 50 W, 12 V, acier inoxydable), une canne de bullage (diamètre : 10 mm) et une sonde de température (ARDUINO, DS18B20), tous disposés verticalement. La disposition de l'ensemble est illustrée en Figure 17. Les cuves sont situées dans des alcôves faites en bois, afin qu'elles ne s'éclairent pas entre elles et qu'elles ne soient pas exposées à la lumière directe du soleil depuis la baie vitrée adjacente. Les cultures sont donc exposées quasi-exclusivement par l'unique apport des sources LED.

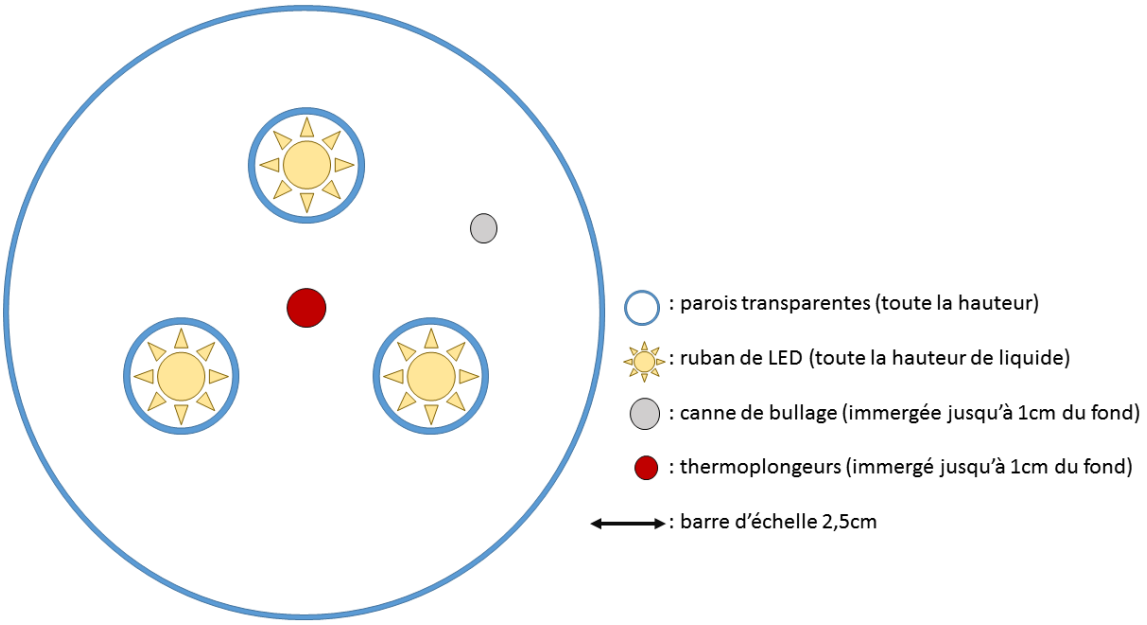


Figure 17 : Schéma en coupe horizontale d'un photobioréacteur de paillasse

Concernant le contrôle, ces photobioréacteurs sont en partie gérés en continu par un couple formé d'un nano-ordinateur (RASPBERRY, pi3 - B v1.2) et d'un microcontrôleur (ARDUINO, MEGA). La température est alors régulée en tout ou rien, et l'intensité lumineuse en paroi imposée (après étalonnage) par modulation de largueur d'impulsion (ou pwm pour *Pulse Width Modulation*, 1 kHz). Les deux consignes sont programmables par cycle de 24H et indépendamment pour chaque cuve. De plus, un système aéroréfrigérant peut être adjoint afin de pouvoir accéder à des régulations en température proche ou inférieure à la température ambiante, ce qui peut être nécessaire l'été notamment. Ce système se compose d'un papier absorbant au contact de la paroi extérieure de la cuve et partiellement immergé dans une réserve d'eau (bécher) et sur lequel souffle une ventilation mécanique forcée (ADDA, AD1212HB-A70GL), le refroidissement est alors causé par l'évaporation endothermique de l'eau et conduction à travers la paroi. Les valeurs de consignes ainsi que les températures relevées sont enregistrées dans une base de données et consultables sur internet à tout instant par l'expérimentateur sur une interface dédiée (GRAFANA). Le réglage du débit gaz se fait, quant à lui, manuellement via 7 débitmètres dédiés (BROOKS, 2520A4A41BVBN), de même la régulation du niveau d'eau est manuelle et se fait grâce à une jauge située sur chaque cuve (avec le bullage arrêté). Ces photobioréacteurs, de par leur nombre, ne possèdent pas de métrologies en ligne, hormis la température pour la régulation. Les mesures se font donc sur des échantillons prélevés et analysés manuellement par l'expérimentateur (les protocoles sont décrits dans la partie suivante).

b. Photobioréacteur Pilote

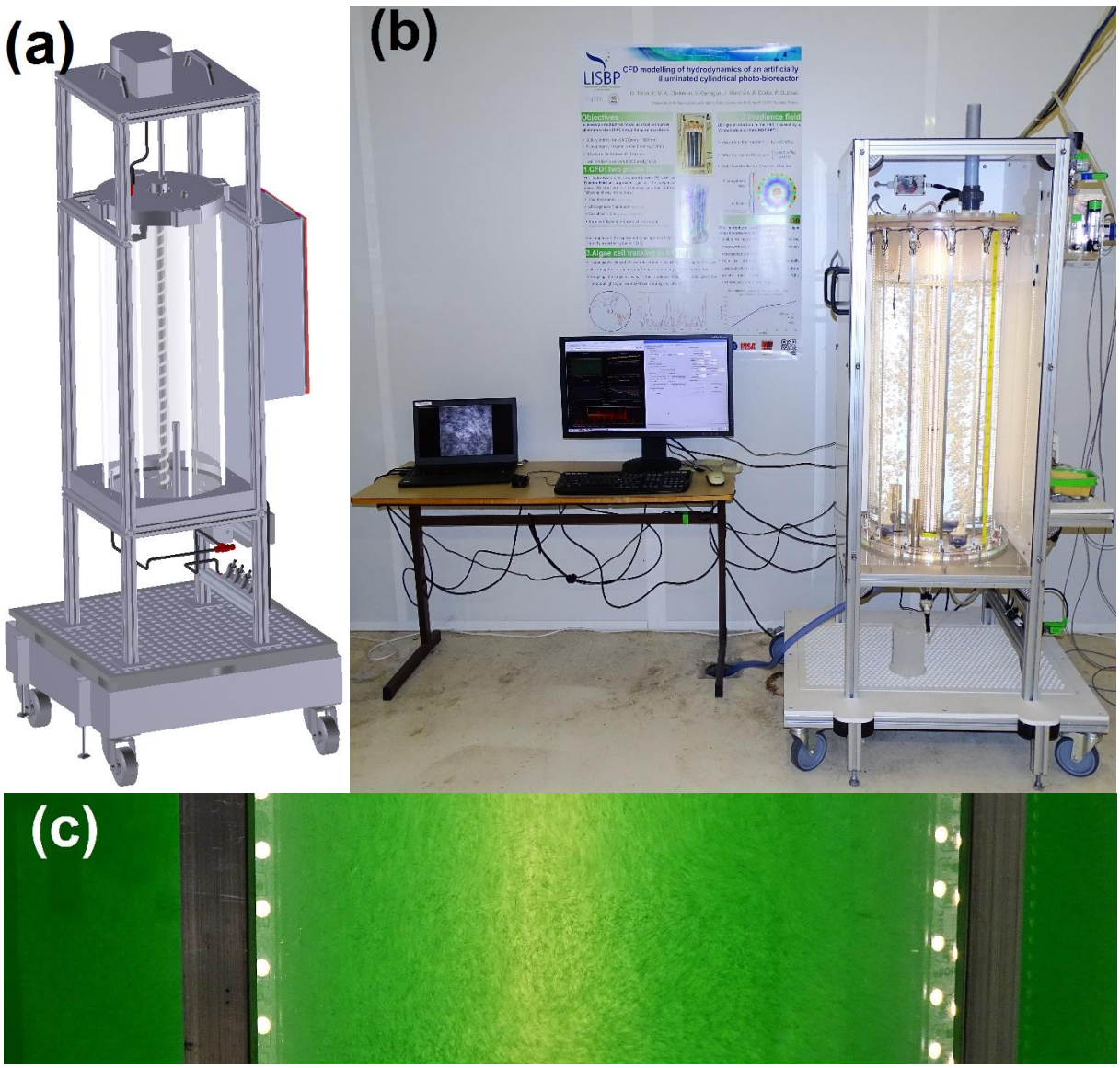


Figure 18 : (a) rendu en 3D de la préconception assistée par ordinateur (CAO) du pilote, (b) photographie du dispositif final en eau, avec de gauche à droite : l'ordinateur dédié à l'acquisition de la microscopie en ligne, puis l'interface (écran, clavier, souris) de suivi et contrôle du pilote, la cuve dans son châssis caréné ouvert par l'avant et son bac de rétention en bas (c) photographie macro du pilote en présence de spiruline

Le deuxième réacteur est appelé pilote, illustré en Figure 18, et il possède lui aussi un volume de culture de forme cylindrique à fond plat, mais d'un volume de 100 L (846 mm de hauteur pour 390 mm de diamètre interne), soit vingt fois celui des photobioréacteurs de paillasse. Sa vocation n'est pas de participer en tant que tel au travail de caractérisation de la spiruline mais de fournir des données pour vérifier (ou non) si la validité du modèle global de

photobioréacteur numérique est conservée lors d'un changement d'échelle. En cela le chapitre III est appliqué au cas de figure du présent photobioréacteur pilote. Il est éclairé sur toute sa hauteur par 20 rubans de LED verticaux régulièrement espacés le long de sa paroi externe et d'un tube immergé le long de l'axe central de la cuve (diamètre externe : 50 mm), il y en a respectivement 12 et 8. La surface éclairée par les LED sur la face interne des parois fait 2,5 cm de large. Le photobioréacteur est placé à l'intérieur d'une carène entièrement fermée et opaque, ainsi les cultures en son sein ne subissent pas la lumière ambiante, seules les sources LED interviennent dans l'éclairement. Le mélange par bullage se fait au travers de trois buses cylindriques escamotables (50 mm de hauteur pour 50 mm de diamètre) positionnées au fond de cuve, à égale distance des parois interne et externe selon un triangle équilatéral. Ces buses libèrent le gaz via leurs plaques supérieures qui sont percées de 19 trous de 0,8 mm de diamètre. De plus, la verticalité de la cuve est ajustée grâce à ses quatre pieds réglables, à l'aide d'un niveau à bulle numérique (BOSCH, DNM 60L). Le gaz injecté est évacué de la cuve par une cheminée située sur la platine du ciel du réacteur. Cet évent est mis en place afin d'éviter l'accumulation de condensation à l'intérieur du carénage, due à l'air chaud et humide, qui pourrait oxyder la visserie et endommager les LED qui sont à l'air libre. Le chauffage se fait par l'intermédiaire de deux thermoplongeurs cylindriques (hauteur : 170 mm, diamètre : 20 mm) de 100 W chacun (SCIENTAX, sur mesure : 100 W, 230 V, acier inoxydable). Ces éléments sont illustrés en Figure 21, et leur agencement montré en Figure 19.

Le contrôle se fait aussi grâce au même couple nano-ordinateur/microcontrôleur, et est lui aussi programmable selon des cycles de 24 h. Cela concerne : l'intensité lumineuse délivrée en paroi par chacun des quatre sous-groupes de rubans de LED (par moitiés intérieures et extérieures), la température du milieu et l'activation du bullage via une électrovanne en amont. Contrairement aux photobioréacteurs du banc d'essai, celui-ci possède une métrologie en ligne. Celle-ci est située sur une boucle de recirculation à l'extérieur de la cuve qui est mise en mouvement par une pompe péristaltique (MASTERFLEX, L/S + Tygon 17), comme détaillé en Figure 20 et Figure 21. La métrologie est constituée entre autres de quatre sondes physicochimiques commerciales (HAMILTON) mesurant : la conductivité (Conducell 4USF Arc PG-120), le pE potentiel d'oxydo-réduction (Polilyte Plus ORP Arc 120), le pH potentiel hydrogène (Polilyte Plus H Arc 120), le P_{O2} dioxygène dissout (VisiFerm DO Arc 120).

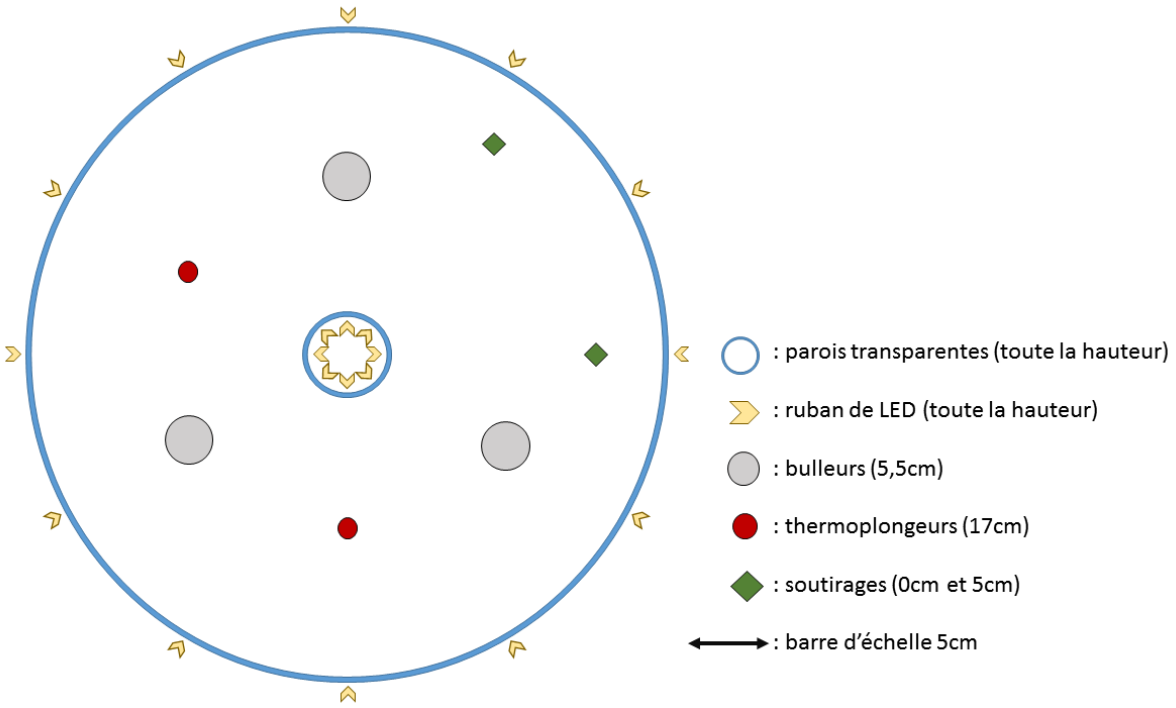


Figure 19 : Schéma en coupe horizontale du photobioréacteur pilote (à l'échelle)

Elle contient aussi deux dispositifs créés à façon (resp. par Alg&You et le LISBP) : un capteur spectrophotométrique sur cinq longueurs d'ondes fixes (400, 490, 624, 680 et 770 nm), et un outil optique de visualisation microscopique (cf. Figure 22). Ces deux outils opèrent sur la culture au travers de cellules d'écoulement quadrangulaires en quartz de 1 cm² de section de passage (HELLMA,130-10-40). Le premier permet d'avoir un suivi de la densité optique qui mesure la quantité de Spiruline en suspension. Le second, de pouvoir visualiser la biomasse en continu et donc d'avoir une information visuelle/morphologique regard sur l'état de celle-ci. Dans la continuité de ce dernier, était prévu le développement d'un programme d'analyses d'images avec pour but d'être capable d'extraire des visualisions les distributions de grandeurs caractéristiques de la morphologie de la population microalgale, telles la longueur, l'élongation ou l'épaisseur des trichomes, et leurs évolutions au cours du temps. Malheureusement faute de temps cela ne s'est pas fait et le traitement des images acquises reste en suspens. Ce dispositif apporte donc la preuve de concept de la possibilité de réaliser de la microscopie en ligne ainsi que potentiellement de la cytométrie.

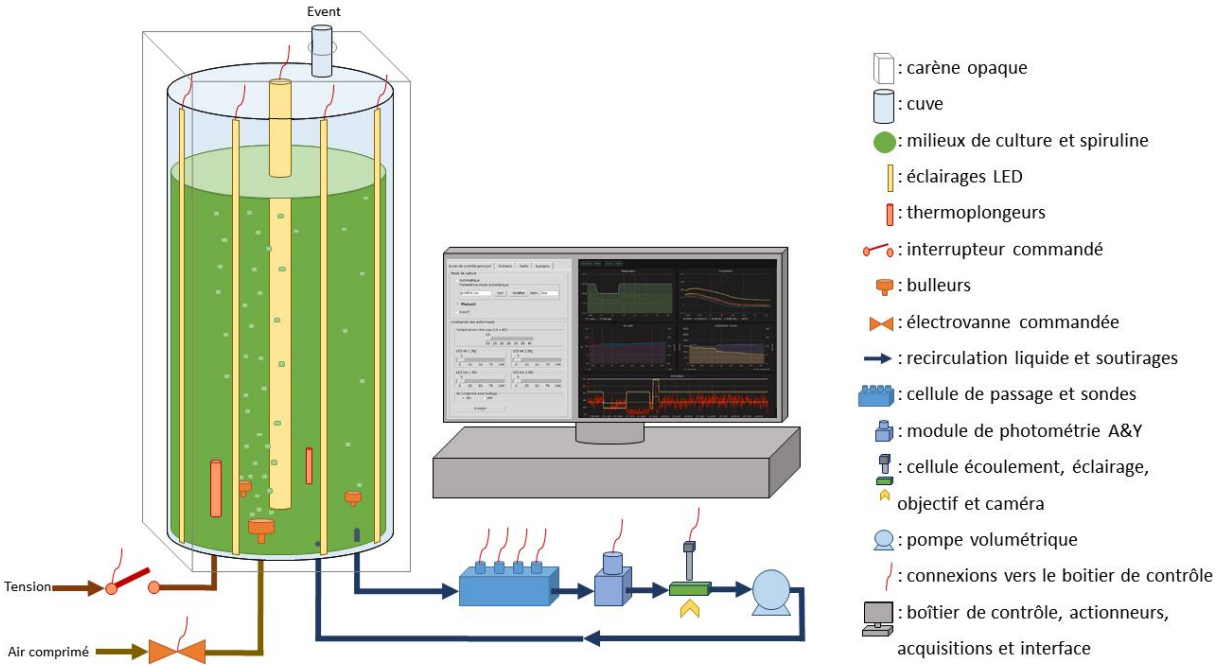


Figure 20 : Schéma global du photobioréacteur pilote

Il reste un dernier capteur, la sonde de température, qui est la seule à être positionnée au cœur de la cuve, cela permet une meilleure régulation. Comme pour les photobioréacteurs de paillasse, toutes les valeurs de consignes et mesures sont enregistrées dans une base de données consultable à distance via l'interface GRAFANA. Pour la validité des mesures obtenues sur ce photobioréacteur, on suppose que le passage dans la boucle métrologique n'a pas d'impact sur les mesures ou sur la cinétique de croissance de la culture (i.e. variation de quelques degrés Celsius et éclairement différent). Pour s'en assurer, on peut comparer les temps de séjour dans la recirculation et dans le pilote qui sont respectivement inférieur à 1 min et supérieur à 10 h. Seule la régulation du volume de culture est manuelle, et se fait via une graduation en paroi du niveau d'eau et d'une vanne quart de tour d'alimentation en eau raccordée au réseau.

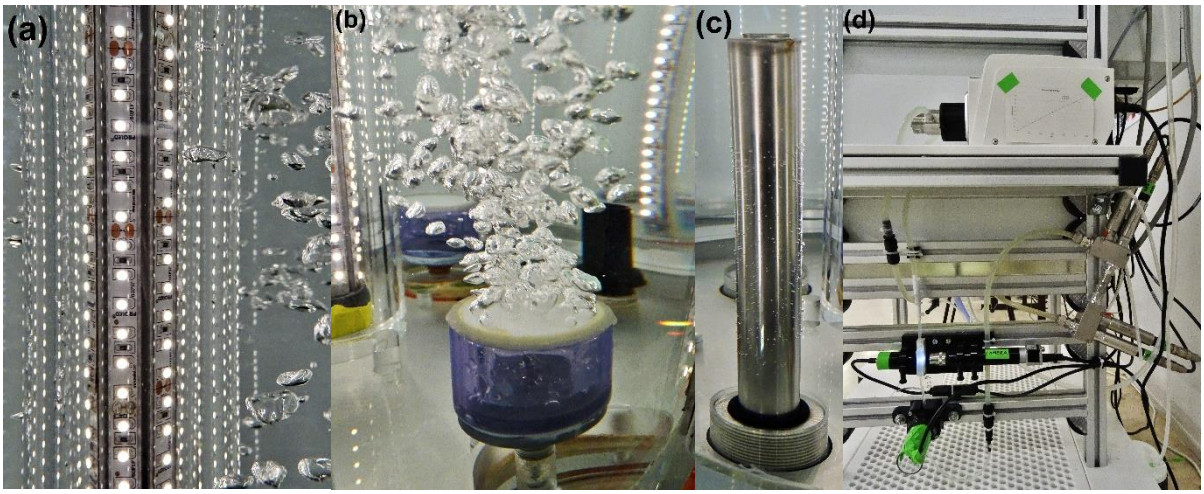


*Figure 21 : Détails du pilote en photographies : **(a)** des rubans de LED du tube central immergé, **(b)** d'un bulleur, **(c)** d'un thermoplongeur, **(d)** de la boucle métrologique avec de haut en bas : la pompe (posée sur une étagère), les sondes physicochimiques (finition inox), le dispositif de microscopie en ligne (le long d'un profilé) et le spectrophotomètre (juste en dessous)*

*Figure 22 : Photographies : **(a)** dispositif de microscopie en ligne avec de gauche à droite : une source de lumière LED (scotch vert vierge), une lentille divergente (au niveau de la bague de serrage), la cellule d'écoulement où circule la Spiruline (de bas en haut), un objectif de microscope x4 (EDMUND OPTICS, Micro Plan 4x), tout à droite la caméra (BASLER, acA2040-90um) dont le capteur est dans le plan focal de l'objectif , **(b)** Image brute délivrée par le dispositif (2000x2000 pixel), le champ d'observation fait 1x1 mm*

c. Photobioréacteur Homogène

Dernier photobioréacteur, aussi le dernier en date : le photobioréacteur dit homogène. Comme son nom l'indique, il a pour objectif de fournir des conditions de culture homogènes et connues, permettant ainsi de s'affranchir des disparités de conditions réactionnelles perçues au sein de la population biologique, et donc d'accéder à de nouvelles possibilités de caractérisation de la biomasse pour une approche multi-échelle. Plus concrètement, sa géométrie vise à s'affranchir le plus possible des variations spatiales de l'éclairement, en plus

de l'homogénéité en concentration (via le mélange) déjà présent dans les autres photobioréacteurs. Sa vocation première étant d'étudier la réponse des microalgues aux variations de lumière, d'où la nécessité de maitriser l'éclairement. Des dispositifs semblables existent dans la littérature [75]. Encore une fois, il constitue aussi un changement d'échelle par rapport au photobioréacteur de paillasse car il possède deux volumes de culture de 150 mL, soit quarante fois plus petits.

Il comporte deux cuves planes adjacentes à fond triangulaire à 90° (pour éviter les zones mortes) de 10 mm d'épaisseur pour 100 mm de large. Entre ces deux cuves de culture se trouve aussi un troisième volume de 10 mm de large, celui-ci servira de référence lors de la mesure de densité optique détaillé un peu plus tard. La chauffe se fait, cette fois-ci, grâce à l'immersion du photobioréacteur dans un bain-marie circulant. L'agitation s'opère par l'injection de trains de bulles par les deux fonds de cuve, l'air est préalablement filtré avant injection (3M - lifeassure 70357 pfs020). L'éclairement est réalisé au travers d'une des deux faces du photobioréacteur grâce un panneau LED diffusant (PHLOX, ledW-BL-40x200xSLLUB-Q-IR-24). Encore une fois les volumes réactionnels sont placés dans une carène opaque pour ne pas être exposés à la lumière ambiante. Comme pour le pilote on évite aussi l'accumulation de condensation, pour cela est utilisée une ventilation mécanique forcée (SUNON, EEC0381B1-000U-A99).

Ici par contre, nul automatisme programmé, la température du bain réglée en fonction d'un thermomètre à immersion (H-B, ENVIRO SAFE S20110) et régulée par le bain thermostaté (LAUDA, Thermostat K2) faisant circuler de l'eau permutée dans le bain-marie. Les températures des cultures elles-mêmes sont ponctuellement suivies grâce à un thermomètre digital à sonde déportée (HANNA, checktemp1) inséré par l'évent en ciel de cuve. Le niveau d'eau est ajusté manuellement grâce à une jauge en paroi. L'irradiance délivrée est réglée via la tension de sortie de l'alimentation électrique variable (ALC, ALF2902M). Celle-ci a la particularité d'être reliée au panneau LED via un interrupteur commandé (DATA REPEATER, RP310) dont la consigne est produite par un générateur basses fréquences (GBF) (RS, AFG-21225). Ceci permet de choisir la fréquence du signal lumineux auquel sont soumises les algues, et ce dans le but d'étudier spécifiquement la dynamique de l'influence de la lumière. La forme du signal a été vérifiée (les temps de monté et descente sont négligeables face aux fréquences étudiées).

De plus, il permet un suivi optimal de la croissance grâce une mesure en ligne de la densité optique par un dispositif optique original, décrit dans la partie suivante. Dès lors qu'une absorbance est mesurée (non nulle), c'est qu'il y a atténuation du flux lumineux à la traversée de la culture, l'hypothèse d'un éclairement identique sur l'ensemble du volume n'est donc jamais rigoureusement respectée. Par exemple, une densité optique d'une valeur de 0,1 (approximativement le point initial d'une culture) équivaut déjà à une variation de 25% de l'éclairement sur l'épaisseur du réacteur. Mais on suppose tout de même cela acceptable, au regard des deux autres photobioréacteurs où l'atténuation est totale et pour lesquelles une fraction du volume n'est tout simplement pas éclairée.

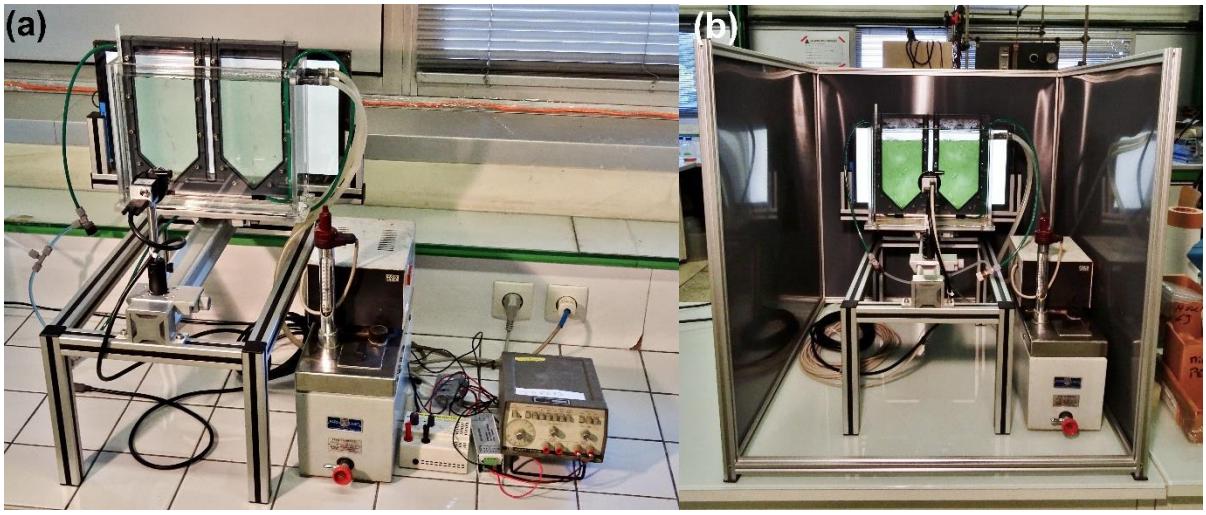


*Figure 23 : Photographies : **(a)** le photobioréacteur homogène hors de la carène avec sur le châssis (depuis le premier plan) : la caméra et son objectif, les deux volumes réactionnels immergés dans le bain-marie, et le panneau LED diffusant le tout sur un banc optique et de gauche à droite : le châssis, le bain thermostaté, l'alimentation électrique réglable, l'interrupteur commandé, un générateur basse fréquence, **(b)** le dispositif en algues à l'intérieur de sa carène ouverte sur l'avant et le dessus, une partie des précédents éléments sont placés à l'extérieur de celle-ci*

B. Métrologie

a. Choix du Suivi de la Quantité de Biomasse

L'objectif est ici d'obtenir une quantification de la biomasse en fonction de tout un jeu de conditions opératoires possibles, et ce au cours du temps puisqu'il s'agit de quantifier les cinétiques résultantes. Cependant, comme il a été dit dans l'état de l'art, un grand nombre d'aspects peuvent être quantifiés à propos de la biomasse, par exemple : la concentration totale, des concentrations intracellulaires (pigments, lipides, vitamines, etc.) ou même encore la morphologie. Les éléments qui sont caractérisés et suivis définissent ce sur quoi les modèles sont écrits et donc ce que l'on va pouvoir simuler et potentiellement chercher à optimiser par la suite. Or, il se trouve que dans le contexte de l'étude, c'est la spiruline en tant que telle qui est valorisée, et non pas la production d'un métabolite d'intérêt particulier, comme par exemple un lipide (ex. biocarburant de troisième génération). On a donc cherché en priorité à mettre en place une instrumentation qui permette le suivi de sa concentration ou de sa croissance. D'autre part, ce n'est pas parce que les modèles ne cherchent à décrire que la croissance biologique seule que des mesures autres que la concentration de biomasse n'ont pas été réalisées. Ainsi, d'autres mesures sont nécessaires pour le contrôle des conditions opératoires, comme celle de la température ou bien du pH. Par exemple le pH est monitoré en ligne sur le pilote mais peut aussi être mesuré si nécessaire sur les autres cuves par prélèvement et analyse (TÜV, PH539). Néanmoins, les mesures de température et de pH ne prêtent pas à discussion tant elles sont connues et maîtrisées. D'autres mesures ont, elles, été mises en place à titre exploratoire, afin de mettre en évidence si d'autres types de suivi de culture pouvaient s'avérer pertinents dans notre contexte. C'est le cas du pilote où les sondes de conductivité et de potentiel d'oxydoréduction n'ont jamais semblé montrer de résultats significatifs, quand ceux provenant de la sonde à oxygène peuvent se trouver corrélés avec une dégradation qualitative des cultures (formation d'agglomérats et/ou augmentation de la charge bactérienne).

Pour en revenir à la biomasse, il existe là aussi plusieurs moyens de réaliser son suivi, qu'il a d'abord fallu discriminer [2], [31], [42]. Ainsi le dénombrement cellulaire, classique en microbiologie, n'est pas une mesure adaptée à notre biomasse qui se trouve sous la forme de trichomes, à savoir de chapelets de cellules indifférenciées et difficilement discernables par les méthodes de microscopie optique classique. De plus, les trichomes en question ne sont pas

constants en longueur et ne peuvent donc constituer une unité de mesure, comme montré en Figure 24. C'est d'ailleurs la raison qui nous a poussés, sur le pilote, à concevoir un dispositif d'observation en ligne de la morphologie de la population. De même, la mesure par disque de Secchi est jugée trop imprécise et d'autres n'ont tout simplement pas été envisagées, comme celles basées sur la mesure de l'activité photosynthétique ou sur la permittivité diélectrique des cellules. Au final, ce sont les deux techniques simples et courantes qui ont été choisies pour le suivi des concentrations en biomasse, à savoir : la mesure de matière biologique sèche et de la densité optique de la culture.

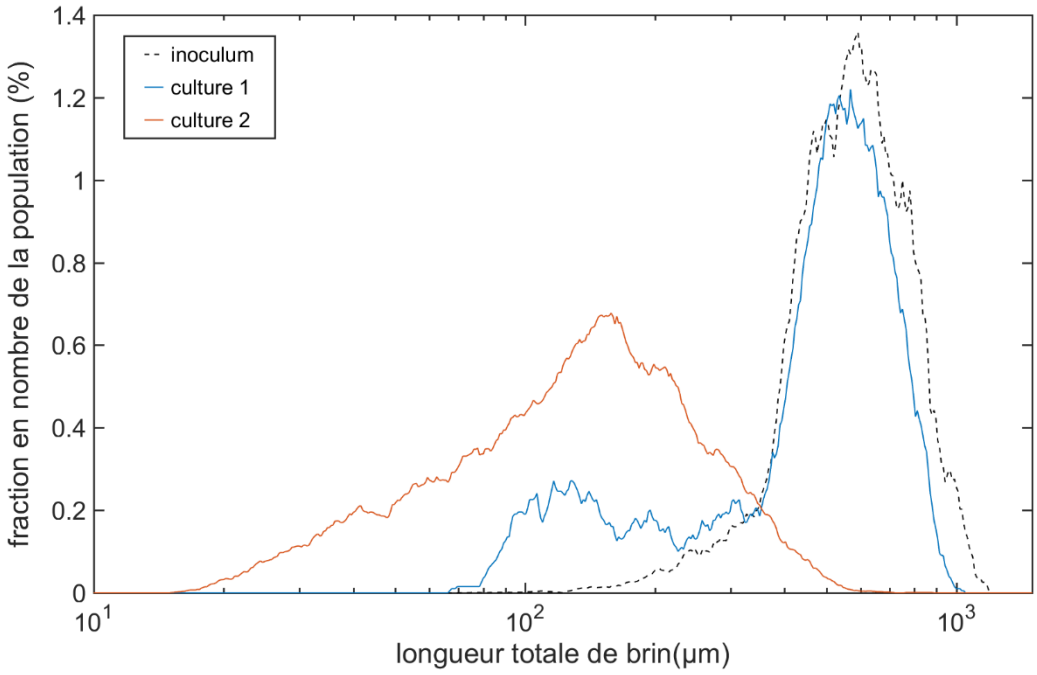


Figure 24 : Comparaison de la distribution des longueurs de trichomes de spiruline (obtenue sur MALVERN Morphologi G3) de deux cultures de 1 mois réalisées dans des conditions d'agitation différentes mais issues d'un même inoculum.

b. Mesure de ma Matière en Suspension

Le premier suivi possible de la biomasse est donc la mesure de matière en suspension (notée MES), en voici le protocole [91] :

- Prélèvement à la pipette jaugée d'un échantillon d'un volume connu (50 ml en général)

- Filtration frontale par dépression (VACCUMBRAND, ME1) avec un Büchner sur filtre à 0,45 µm (WATTMAN, GF6) préalablement séché 24 h à l'étuve 105°C (MEMMERT, ULM500) et pesé (SARTORIUS ED2242), illustration en Figure 25
- Séchage du filtre et du gâteau formé de la même façon
- Pesée du filtre avec son gâteau
- Obtention de la valeur par application de la formule (10)
- Remarque : Le transport du filtre séché (avant ou après filtration) entre l'étuve et la balance se fait au moyen d'un dessiccateur à gel de silice

$$\boldsymbol{X} = \frac{\boldsymbol{m_{filtre+gâteau\ de\ filtration}} - \boldsymbol{m_{filtre}}}{\boldsymbol{V_{échantillon}}} \tag{10}$$

Avec : $\boldsymbol{X}$ la concentration en spiruline de l'échantillon ($g \cdot L^{-1}$), $\boldsymbol{m_x}$ la masse de x (g), $\boldsymbol{V_x}$ le volume x (L)

On prendra garde à l'abus de langage fréquent qui consiste à qualifier ce protocole de "matière sèche", or rigoureusement une mesure de matière sèche se fait par séchage d'un échantillon sans que celui-ci ne soit filtré. Une matière sèche rend donc compte de l'intégralité des espèces en solution, or une telle mesure ne serait pas pertinente car en solution on trouve à la fois les espèces nutritives et la biomasse elle-même. Par bilan de matières sur le volume réactionnel, l'évolution de la matière sèche ne peut être due qu'au transfert seul (à l'interface avec le gaz de bullage) et non à la croissance biologique. L'étape de filtration permet justement de ne retenir et mesurer que la phase biologique. Autre remarque : Le volume filtré se trouve souvent ajusté, car le gâteau de filtration peut colmater le filtre de sorte que la mesure serait impossible sans revoir le volume à la baisse. Pour tenter de compenser ces défaillances dans le protocole, les mesures de matière en suspension sont systématiquement faites en dupliquas. De même, il faudrait normalement rincer le gâteau de filtration à l'eau distillée et refiltrer afin d'évacuer les derniers éléments nutritifs présents dans le liquide interstitiel du gâteau, mais cela est rendu impossible pour ces mêmes raisons de colmatage. D'un point de vue pratique cette mesure n'est pas idéale car elle nécessite une anticipation de la mesure (séchage préalable du filtre), elle est chronophage (en cas de colmatage) et ne fournit le résultat qu'après un délai de 24 h (séchage du gâteau). D'autre part, on suppose que la mesure n'altère pas sensiblement la culture car les volumes prélevés sont négligeables par rapport à celui de

la culture, le volume global donc quasiment inchangé (i.e. <1% pour les photobioréacteurs du banc, et <1‰ pour le pilote). Ce n'est par contre pas le cas sur le photobioréacteur homogène d'un volume de seulement 150 mL. On ne peut donc procéder à la mesure sur ce dernier, du moins tant qu'une culture est en cours. En revanche, on a vérifié la validité des mesures optiques (décrites ci-après) par comparaison à la mesure de matière en suspension sur des échantillons tests. Enfin, il faut prendre garde à l'interprétation de cette mesure car elle résulte tout de même de l'ensemble de la phase biologique, et non exclusivement de la spiruline (culture non axénique). Ainsi, une efflorescence bactérienne résultera en une augmentation de la valeur obtenue même si la spiruline ne croît pas ou ne croît pas autant que la mesure. Elle n'est donc pas un indice fiable de la croissance, *stricto sensu*, de la spiruline.

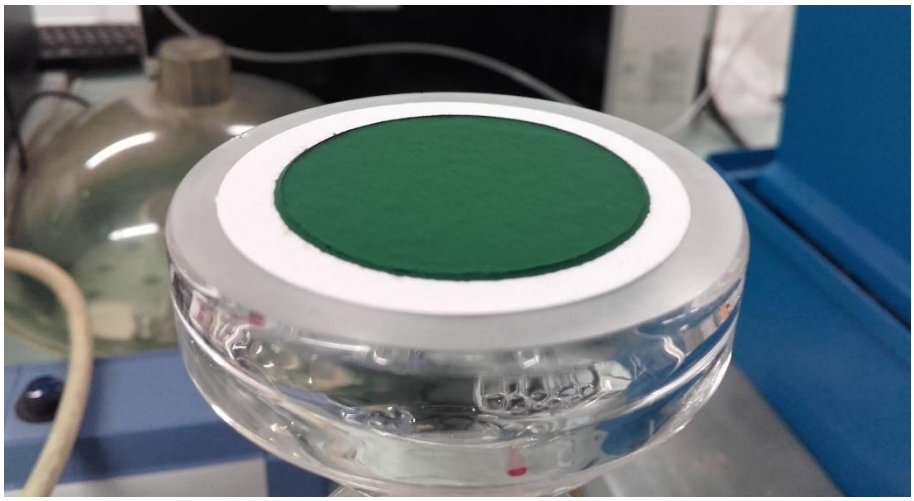


Figure 25 : Photographie macro d'un gâteau de filtration obtenu sur Büchner

c. Mesure de la Densité Optique

Le second suivi de la biomasse réalisé se fait par mesure de la densité optique de la culture [29], [92]. Il s'agit d'une mesure de la variation d'intensité lumineuse d'un faisceau de longueur d'onde choisie au passage d'un échantillon de géométrie connue. La grandeur obtenue est un nombre adimensionnel, calculé selon la formule (11). Cette mesure, si elle est opérée sur une gamme continue de longueurs d'ondes, constitue le spectre d'absorption de la culture. Dans la pratique la mesure se fait sur une longueur d'onde discrète judicieusement choisie, en général elle correspond à un maximum local du spectre, typiquement le pic caractéristique d'un pigment. Pour l'étude il a été choisi, arbitrairement, celui de la chlorophylle-a, situé à 680 nm. On la note DO_{680}. Mais on aurait tout aussi bien pu regarder

les longueurs d'ondes des pics attribués à la chlorophylle-b ou à la phycocyanine, respectivement à 490 et 624 nm, d'ailleurs présentes sur le module spectrophotométrique du pilote. Le spectre est présenté en Figure 26. De plus sauf cas particulier, la présence de chlorophylle dans la culture est exclusivement due à la spiruline, et permet donc de suivre uniquement cette dernière, contrairement à la mesure de matière en suspension.

$$DO_x = log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \tag{11}$$

Avec : DO_x la densité optique à la longueur d'onde x, I_0 l'intensité lumineuse du faisceau de longueur d'onde x perçu par le capteur à la traversée d'un blanc, I l'intensité lumineuse du faisceau de longueur d'onde x perçue par le capteur à la traversé de l'échantillon (ayant la même géométrie que le blanc). Remarque : Dans la pratique le blanc utilisé est une cellule remplie d'eau permutée

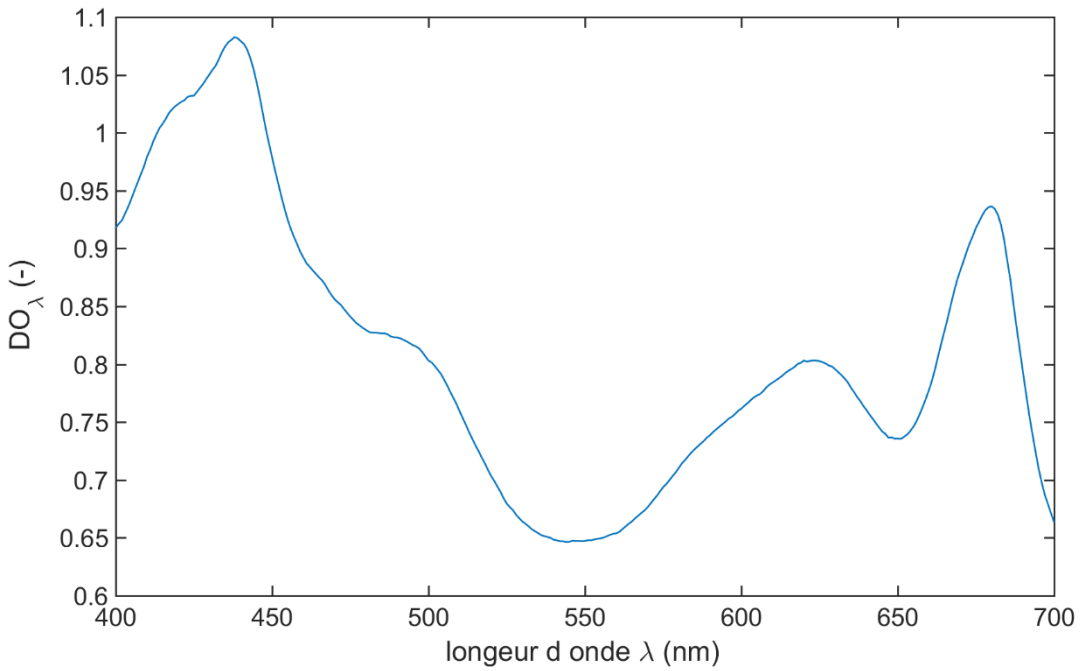


Figure 26 : Spectre sur le PAR d'un échantillon de spiruline immergé 10 min dans un bain à ultra-son (ELMA, s60h) pour atténuer l'effet de diffusion lumineuse (cf. partie III.2.A, Figure 56), on attribue respectivement les trois maxima locaux à la chlorophylle-a, la phycocyanine et à la chlorophylle-a (resp. situés à 440, 620 et 680 nm)

Cette grandeur n'est pas l'absorbance au sens de la loi de Beer-Lambert, car ici notre échantillon ne répond pas aux conditions d'application de cette loi qui veut que l'échantillon soit une phase homogène. Or, les cultures de spiruline sont une suspension de particules

solides (cellules) et sont fortement turbides, c'est-à-dire qu'elles diffusent la lumière. Rigoureusement, ce n'est donc pas l'absorbance qui est mesurée mais l'extinction. Toutefois, on retrouve bien une corrélation affine entre la densité optique mesurée et la concentration massique de la biomasse donnée par la mesure de matière en suspension décrite ci-avant. Un exemple en est donné Figure 27. Cependant cette corrélation n'est valable que pour une culture donnée. Ainsi répétée à plusieurs mois d'intervalle, la valeur de la pente de la corrélation diffère. Cette différence peut, au moins en partie, s'expliquer par l'évolution de la concentration intracellulaire en pigments, la chlorophylle-b en l'occurrence. On fait alors l'hypothèse qu'*a minima* le temps d'une culture, une semaine usuellement, la concentration pigmentaire n'évolue pas de façon significative. De même, l'évolution morphologique des brins de spiruline a sans doute un effet sur la diffusion lumineuse et donc sur l'extinction lumineuse, que l'on décide de négliger ici aussi, au moins à court terme (i.e. le temps d'une culture). Une troisième explication peut être trouvée dans l'évolution de la fraction de biomasse bactérienne en solution et résulte du défaut de la mesure de la quantité de matière en suspension. La mesure de densité optique, comme celle de la matière en suspension, n'est pas un indicateur parfait de la quantité de spiruline en solution.

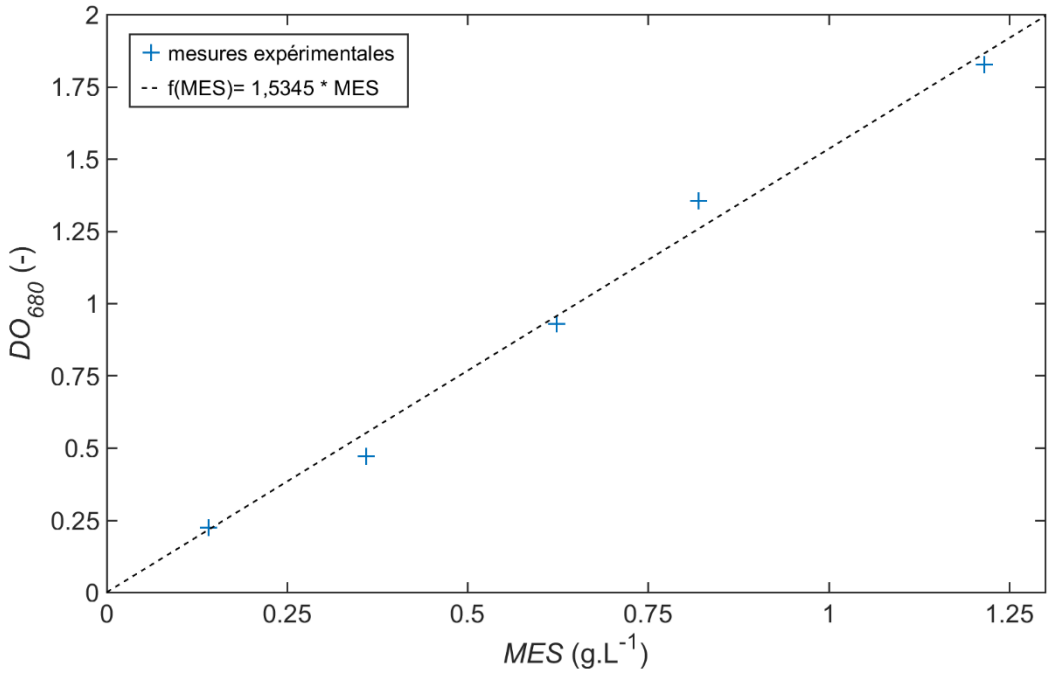


Figure 27 : Corrélation linéaire (R^2=0,988) entre la mesure de MES et la DO_{680} dans le cas de mesures faites sur le spectrophotomètre. Remarque : Les différents points sont obtenus par dilutions successives d'une même culture concentrée

Pour les mesures de densité optique hors-ligne on utilise un spectrophotomètre de paillasse (JASCO, V-630) et des cuvettes en polystyrène cristal, transparentes aux longueurs d'onde de travail, de 10 mm d'épaisseur optique (BIOSIGMA, BSA001) pour contenir les échantillons. Pendant le temps qui sépare le prélèvement et la mesure, on prend garde à ce que la biomasse n'ait pas floculé, ce qui peut arriver parfois en quelques minutes seulement. Le cas échéant, on homogénéise à nouveau la suspension par agitation des cuvettes. Ici, les volumes prélevés sont de quelques millilitres, on négligera encore une fois tout impact sur les cultures de tels prélèvements. Par ailleurs, il se trouve aussi que le bruit de mesure est significatif. Pour compenser cela l'appareil procède à trois points de mesure qu'il moyenne par la suite. On procède aussi parfois à un dupliquât pour confirmer la mesure si cela est jugé nécessaire. On peut sans doute trouver une raison au bruit sur la mesure dans le fait qu'elle n'est, en théorie, applicable qu'à des liquides purement transparents, or on cherche justement à déterminer l'extinction lumineuse due à des particules solides dans une suspension qui est rendue turbide par ces mêmes particules. Bien que la mesure de densité optique soit plus facile à mettre en œuvre, les suivis de croissance qui en résultent ont tendance à être assez peu définis, du moins lorsqu'ils sont réalisés hors-ligne de manière ponctuelle comme ceux réalisés pour les photobioréacteurs du banc d'essai.

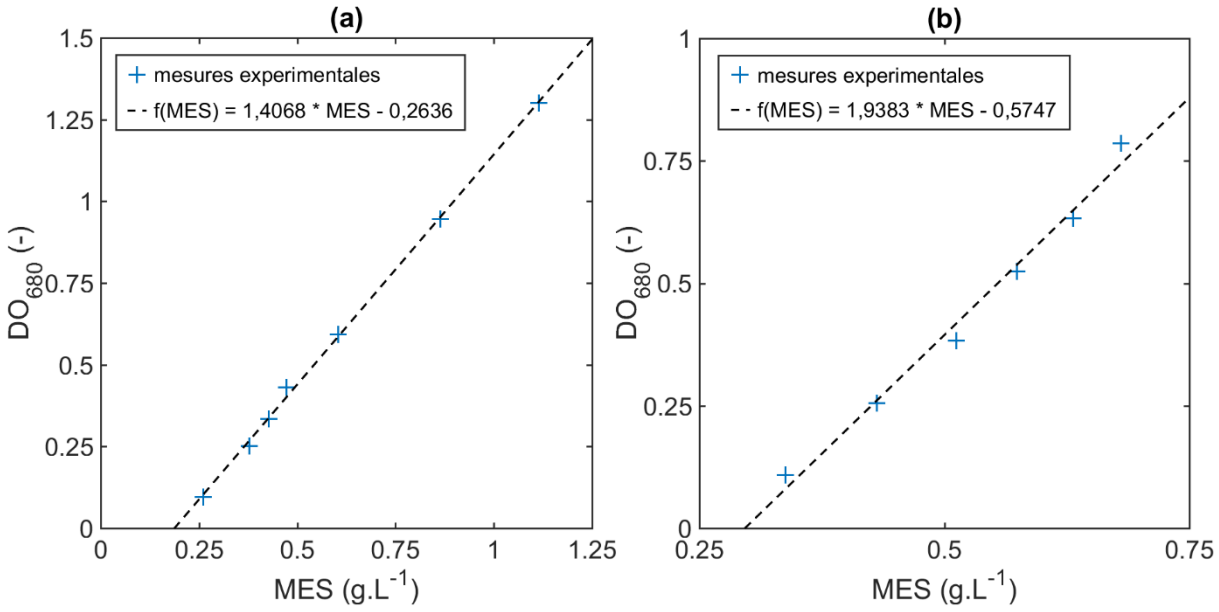


*Figure 28 : **(a)** et **(b)** les corrélations linéaires entre les DO_{680} mesurés en ligne resp. sur le pilote et le photobioréacteur homogène (resp. R^2=0,998 et R^2=0.986)*

En revanche sur le pilote et le photobioréacteur homogène, la mesure de densité optique est faite *in situ* par des dispositifs tout deux conçus à façon. Premièrement, Figure 28, on vérifie que pour les deux dispositifs il existe une corrélation affine entre les mesures de densité optique et la concentration en biomasse en suspension. Cela autorise donc à exploiter ces mesures comme étant représentatives de la concentration en spiruline des cultures. Le fait de réaliser les mesures en ligne, outre le gain de temps, rend possible la multiplication des points. On a alors un point par minute contre un ou deux par jours lorsque la mesure est manuelle. Même si le bruit sur les valeurs est toujours présent, un lissage permet aisément d'amoindrir son impact sur la courbe de croissance globale, l'exploitation des données est alors facilitée et plus fiable, notamment en cas de rupture de pente. Les suivis en ligne et hors-ligne d'une même culture sur le pilote sont proposés en Figure 29 à titre de comparaison.

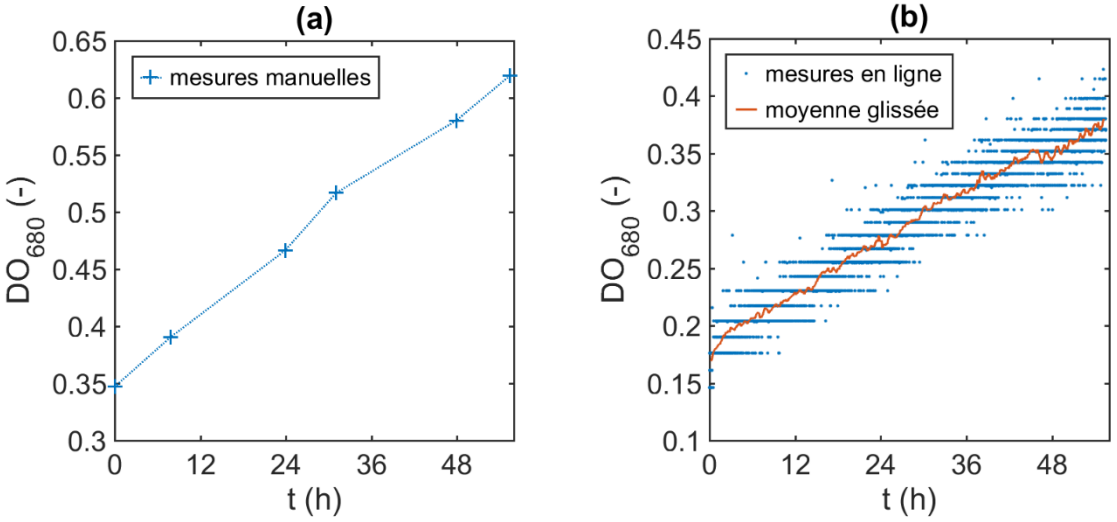


*Figure 29 : comparaison du suivi en DO_{680} d'une même culture réalisé sur le pilote : **(a)** mesures par prélèvements manuels d'échantillons et analysés au spectrophotomètre de paillasse, **(b)** mesures faites en ligne et après filtrage des données sur 30 min. Remarque : Les valeurs absolues mesurées ne sont pas les même car le chemin optique et la largeur spectrale (autour de 680 nm) diffèrent entre les deux outils. Seconde remarque : On trouve dans les données brutes de la sous figure (b) la signature d'un capteur numérique (la photodiode) dont la sortie est en BIT et donc réparties sur des valeurs discrètes*

Sur le pilote, la mesure se fait assez simplement par la mise en regard, grâce à une pièce imprimée en 3D, de sources LED monochromatiques de longueur d'onde connue et d'une photodiode (capteur sensible à l'intensité lumineuse), et ce au travers d'une cellule d'écoulement contenant de la culture en circulation (cf. Figure 20). Le blanc est fait au préalable avant l'introduction de l'inoculum. Un point est fait chaque minute et leurs valeurs sont enregistrées et horodatées dans la base de données du pilote.

d. Cas Particulier du Photobioréacteur Homogène

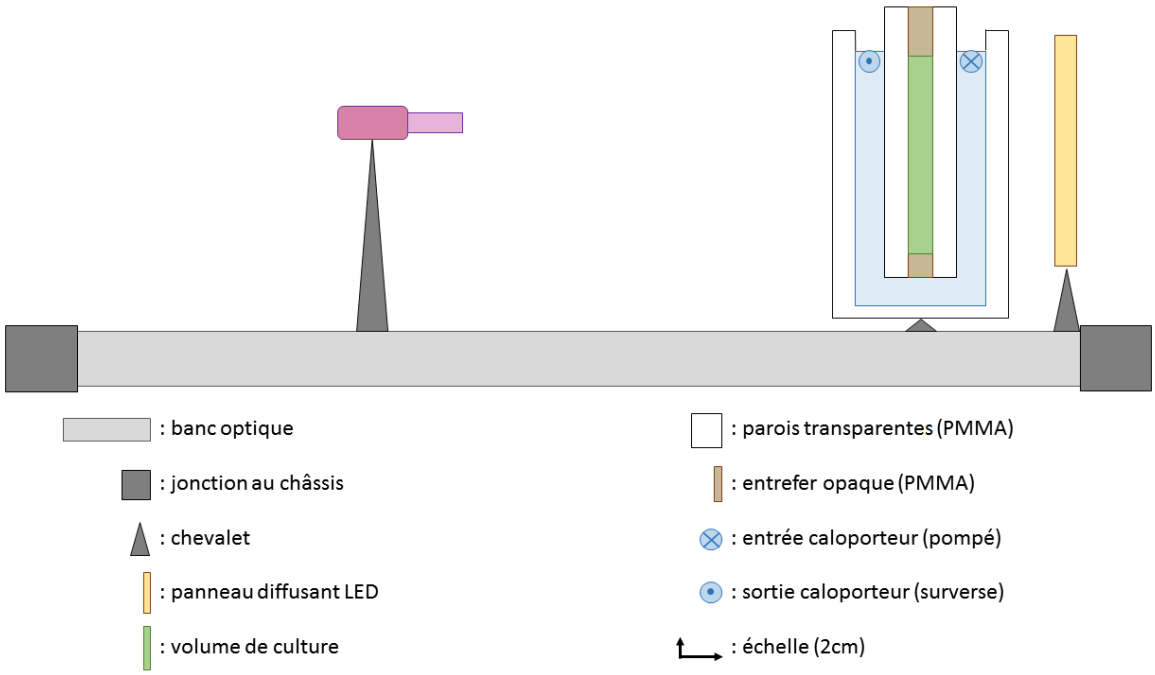


Figure 30 : Schéma en vue de côté du photobioréacteur homogène (à l'échelle)

Quant au photobioréacteur homogène, c'est encore une autre technique qui est employée pour la mesure de densité optique. Etant donné le volume très réduit de culture et sa vocation à dispenser un éclairage homogène à l'ensemble de la biomasse, il a été décidé lors de sa conception de faire en sorte de pouvoir faire le suivi de culture sans prélèvement d'une part et sans introduction de sondes de l'autre, qu'elles soient immergées au sein du volume ou bien déportées sur une recirculation externe comme pour le pilote. C'est alors le réacteur et sa culture eux-mêmes qui font office d'échantillon pour la mesure, la source lumineuse utilisée pour la mesure est celle-là même qui permet la croissance. Comme illustré Figure 30, le réacteur entier fait face à une caméra en noir et blanc (BASLER, ace A1300-200um) dotée d'un filtre passe-bande de longueur d'onde connue (EO, 87792), à 680 nm. L'optique (EO, 33304 + 65800) de la caméra est réglée pour avoir un champ d'observation d'environ 86x68 mm, permettant de visualiser en permanence les deux volumes réactionnels ainsi qu'un troisième volume contenant seulement de l'eau, qui sert de pour la mesure du blanc en continu. La mise au point est réalisée sur le volume de culture, et le temps de pose est de 550 ms. De même, avant chaque culture, cent images sont prises alors que les deux volumes réactionnels ne contiennent que de l'eau, cela sert à la mesure du fond (*flat*) de l'image afin de compenser *a posteriori* le vignetage dû à l'objectif (i.e. l'inhomogénéité des

niveaux de gris, essentiellement sur les bords de l'image) ainsi que l'éventuel encrassement initial des différents dioptres. Les acquisitions faites par la caméra sont synchronisées avec la commande contrôlant l'allumage du panneau LED pour ne pas avoir d'images faites lors des phases obscures et qui seraient donc inexploitables. Une seule image par minute est effectivement enregistrée et fait office de mesure de la densité optique (après son exploitation). Les acquisitions de 1280 par 1024 pixels se font au format ".TIFF" en 10 bit, soit 1024 niveaux de gris, chaque fichier faisant 2,57 MO. Celles-ci sont traitées par la suite via l'exécution d'un script (MATLAB, R2016a), dont le code est fourni en Annexe F, qui aboutit à une matrice qui compte autant de colonnes que d'acquisitions et trois lignes : 1/ le temps écoulé depuis la première acquisition 2/ la densité optique du volume de gauche 3/ la densité optique du volume de droite. Le script opère sur les fichiers images comme des matrices faites d'autant de lignes et de colonnes que de pixels qui composent l'image, qui prennent pour valeur de chaque cellule le niveau de gris des pixels correspondants. Les différentes étapes effectuées par le script sont :

- Création d'une matrice 3D contenant l'ensemble de l'acquisition faite pour la mesure du fond
- Cette matrice est moyennée sur l'ensemble des différentes images
- Cette mesure du fond est normalisée par son maximum
- De manière récursive :
    - Les points de mesures sont ouverts
    - Ils sont divisés par le fond
    - Les valeurs des moyennes des niveaux de gris des trois zones d'intérêt (i.e. cuve de droite, blanc, cuve de gauche) sont extraites vers une deuxième matrice de travail
- Dans une dernière matrice on procède à l'horodatage et au calcul de la densité optique selon la formule (11)
- Cette dernière matrice est enregistrée, affichée et exploitée

Un second script analogue (IDL, 6.1) accomplit le traitement d'image et le traçage du résultat au fur et à mesure, pour un suivi en temps réel des cultures et aide à la prise de décision comme l'abandon ou l'arrêt d'une culture.

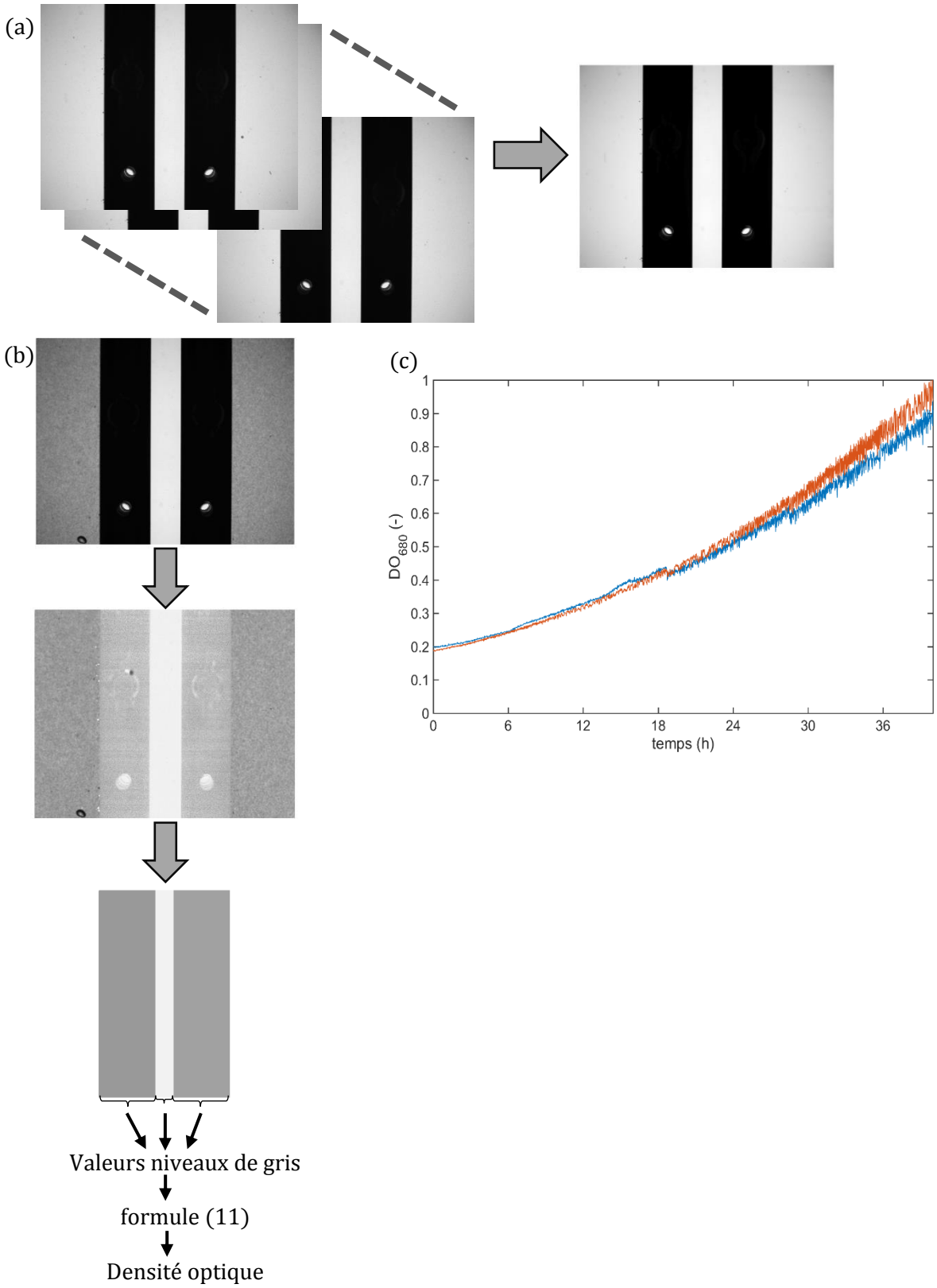


*Figure 31 : **(a)** étape préalable : établir une mesure du vignetage et encrassement par une moyenne sur cent images des cuves en eau seulement, **(b)** différentes étapes de traitement d'une image pour l'obtention de la densité optique sur le photobioréacteur homogène, **(c)** exemple de suivi en DO_{680} des deux cuves du photobioréacteur homogène obtenue après le traitement de l'ensemble des acquisitions réalisées*

C. Réalisation des Cultures

Après avoir exposé en détail les photobioréacteurs utilisés et les moyens métrologiques du suivi des cultures, on traite maintenant de la manière dont les deux sont utilisés conjointement en un protocole de culture pour l'obtention de données expérimentales.

a. Conservation de la Spiruline

Premièrement pour ce qui est de la microalgue elle-même : la même souche a toujours été utilisée, à savoir *Arthrospira platensis* var. *Paracas* exposée dans la partie bibliographique (cf. partie I.2). Cette souche a été initialement fournie en 2011 par l'algoculteur Gilles Planchon spécialisé dans la spiruline. Elle a ensuite, au début du projet PLAISIR, été nettoyée d'une grande partie de sa charge bactérienne par nos partenaires de l'IFREMER, notamment par de multiples repiquages monoclonaux successifs, monoclonaux au sens ici de prélèvement d'un unique trichome. C'est cet inoculum qui par la suite a été en permanence cultivé dans nos photobioréacteurs, et/ou conservé en incubateur (PANASONIC, MLR-352-PE) sous 120 $\mu mol \cdot m^2 \cdot s^{-1}$ sur table orbitale à 120 rpm. On s'affranchit donc de toute variabilité souches-dépendante des cinétiques de croissance, hormis bien sûr celle due à la charge bactérienne qui, elle, n'est pas contrôlée mais que l'on suppose constante (cf. hypothèses du modèle, partie I.3.B).

Plus spécifiquement, on procède à la conservation de la culture sur le long terme par repiquage (i.e. redilution) régulier d'une culture. Un simple stockage pour la conservation de la spiruline n'est viable que pour des intervalles de quelques jours au maximum, sous peine du risque d'un développement excessif de la charge bactérienne pour la conduite de culture suivantes. Néanmoins, même pour le simple stockage il faut *a minima* entretenir une agitation du milieu pour prévenir la floculation de la spiruline en un unique agglomérat qui ne pourrait pas être remis en culture par la suite. Quant à la conservation sur le long terme, on dédie entièrement l'utilisation d'une des sept cuves du banc d'essai à la culture d'un inoculum et l'on fait en sorte que la biomasse qu'elle contient soit toujours en croissance. En ce sens on suit l'évolution de la biomasse par densité optique, et lorsque cette croissance semble ralentir on procède à son repiquage de sorte de se retrouver à la concentration usuelle de début de culture, à savoir entre 0,1 et 0,2 $g \cdot L^{-1}$, soit une dilution par 5 ou 6 avec ajout de milieu nutritif neuf. Pour éviter une croissance trop rapide de l'inoculum et donc des repiquages trop

fréquents, on modère les facteurs favorisant la croissance, ainsi l'irradiance en paroi éclairée est réglée à 230 µmol·m²·s^{-1} (contre 350 µmol·m²·s^{-1} usuellement), de même pour la température qui est imposée ici à 30°C (contre 35°C usuellement). Dans la pratique, le repiquage de l'inoculum est une manipulation hebdomadaire. En parallèle de quoi, on fait aussi un prélèvement d'un volume de 500 mL, que l'on va garder dans un incubateur éclairé en erlenmeyer de 1L doté d'un bouchon respirant et sur table agitante, et ce pour une période de deux semaines. Cela permet de sécuriser la possession d'un inoculum et donc de pouvoir parer les conséquences d'un éventuel incident sur les autres photobioréacteurs, comme une efflorescence bactérienne ou une défaillance matérielle. Par contre, le faible volume ainsi conservé ne permet l'inoculation que d'un seul photobioréacteur du banc. On ne peut pas lancer une expérience à part entière directement sans une étape préalable de montée en volume, qui elle-même peut prendre plus d'une semaine. Mais malheureusement la contingence des événements font que ce protocole de conservation de l'inoculum n'a été rendu possible que très tardivement dans les réalisations des campagnes expérimentales. Le fait étant que tous les résultats exposés par la suite sont effectivement tous issus de la culture d'une unique souche de spiruline mais dont les conditions et la qualité de conservation n'ont en revanche pas été constantes voir capricieuses. Par conséquent, nombre de résultats sont soumis à une variabilité pouvant être imputée au manque de contrôle de la phase biologique, notamment de sa charge bactérienne.

b. Milieu de Culture

Encore une fois, dans l'optique de fournir un socle commun à toutes les expériences et donc d'aider à ce que les résultats soient comparables entre eux, un unique milieu de culture a été utilisé sur l'ensemble des expériences. Exception faite, évidemment, des expériences visant à étudier l'effet de la concentration de certains éléments nutritifs. Sa formulation, nommée P3, a fait l'objet d'un développement spécifique de la part d'Alg&You et PRAYON lors du projet PLAISIR, tous ses composants ne peuvent donc être explicités. Néanmoins, il s'agit d'un milieu inorganique, possédant une source carbonée sous forme de bicarbonate de sodium, d'azote sous forme de nitrate de potassium et de phosphore sous différentes formes de phosphate. Par ailleurs, pour la viabilité de la spiruline qui réclame salinité et condition basique, il contient du chlorure de sodium et de l'hydroxyde de sodium ainsi qu'un mélange d'oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse, bore, magnésium) en infime quantité, de l'ordre de la partie par million (ppm). Ces derniers ne sont pas à proprement parler des espèces nutritives car ils ne sont pas consommés par la biomasse, du moins de façon quantifiable. Le milieu se

présente sous forme de deux solutions concentrées, A et B, déjà préparées auxquelles il suffit d'ajouter sel, soude et bicarbonate, selon les quantités données dans le Tableau 2. Le milieu est formulé de sorte que les éléments nutritifs précédemment cités soient introduits en proportions stœchiométriques relativement à la formule brute de la spiruline (cf. partie II.2.0). De plus, les éléments nutritifs sont introduits en large excès relativement à nos conditions de culture, ainsi le milieu P3 permet en théorie d'obtenir jusqu'à 5 $g \cdot L^{-1}$ alors qu'il n'en est produit qu'entre 1 et 1,5 $g \cdot L^{-1}$ lors des expériences. On s'affranchit donc d'éventuelles carences nutritives au cours des cultures.

Tableau 2 : formulation du milieu de culture P3 tel qu'usuellement utilisé lors des expériences

Espèces	Concentration massique ($g \cdot L^{-1}$)
NaOH	1,4
$NaHCO^3$	19
NaCl	4
Solution A	12,24
Solution B	1,45

c. Protocole de Culture

Quant au protocole de culture, il est lui aussi normalisé et suit les étapes suivantes :

- Préparation du milieu P3 par pesées (FISCHER, PPS2102C) selon le Tableau 2 (de manière in situ pour le pilote)
- Insertion du volume de milieu nécessaire dans la cuve
- Instauration des paramètres opératoires :
  - l'irradiance en paroi, contrôlée via la puissance électrique délivrée aux LED et mesurée grâce à un PAR-mètre (APOGEE, MQ-500) hémisphérique en parois éclairées et en présence d'eau, attention des lunettes de protections teintées peuvent être nécessaire contre l'éblouissement
  - l'agitation par bullage, via les débitmètres gaz (simple robinet pour le

photobioréacteur homogène)

- mise en température du milieu via les thermoplongeurs ou bain-marie, contrairement aux deux autres paramètres son respect n'est pas instantané (inertie thermique), on veille donc à respecter le délai nécessaire avant de passer à l'étape suivante (Remarque pratique : La sonde mesurant la température doit toujours être immergée pour une régulation correcte, attention donc lorsque les cuves ne sont que partiellement remplies)

- Introduction de l'inoculum, en général de sorte à obtenir une culture initialement entre 0,1 et 0,2 $g \cdot L^{-1}$ de concentration (risque d'échec si culture plus diluée)

- Suivi de la culture :
  - densité optique : de façon manuelle pour le banc et automatique pour le pilote et le photobioréacteur homogène
  - matière en suspension (manuelle) : pour le banc et le pilote
  - on évite l'encrassement des métrologies en ligne, et la formation de bulles en paroi des dispositifs d'acquisition optique
  - s'ajoutent aussi des observations au microscope pour juger de l'état des cultures
  - les mesures manuelles sont effectuées une ou deux fois par jour et sont horodatées

- Le volume des cultures est corrigé quotidiennement pour compenser l'évaporation naturelle du milieu (chauffé et bullé)

- On veille au respect des consignes de culture (par exemple de température car la température ambiante de l'environnement de travail connaît de grandes variations)

- Nettoyage des photobioréacteurs en fin de culture :
  - vidange de la culture
  - rinçage à l'eau claire
  - nettoyage physicochimique : éponge et détergeant pour les cuves de paillasse, quelques heures rempli d'une solution à 1 $g \cdot L^{-1}$ d'acide citrique pour le pilote, 20 min rempli d'acide peracétique à 5‰ massique pour le photobioréacteur homogène (redondant avec l'étape suivante)

- nettoyage biologique : javellisation (dichloroisocyanurate de sodium), 1 pastille pour 6 L pour la paillasse et le pilote
- rinçage à l'eau claire
- séchage

On commencera par préciser que, bien que l'on utilise systématiquement ce protocole, la façon dont les cultures sont conduites varie en revanche quasi systématiquement. On le rappelle, la culture de la biomasse n'a ici pas vocation à produire de la spiruline mais bien à permettre l'étude des paramètres expérimentaux sur la croissance. On explicite néanmoins les conditions de cultures qualifiées d'usuelles, autour desquelles on fait varier les paramètres opératoires. Ces conditions usuelles sont, elles-mêmes, le résultat de prérequis issus de la littérature, des résultats expérimentaux eux-mêmes, des possibilités techniques, mais aussi de certains choix arbitraires. Par exemple, pour les deux premiers points déjà décrits, le choix de la souche de spiruline, *Paracas*, provient de sa réputation à être robuste et productive, et la formulation du milieu P3 est, elle, issue d'un long travail expérimental opéré en amont (qui n'est pas l'objet de ce travail). La température de 35°C pour les cultures est, elle, extraite de la littérature comme valeur de l'optimum de croissance. Par contre, concernant l'agitation par bullage, rien ne justifie le choix d'un débit d'air plutôt qu'un autre, si ce n'est de permettre a posteriori la croissance de la biomasse. D'autre part, les cultures sont réalisées et suivies sur des périodes d'une semaine, afin que la croissance soit correctement établie et pour intégrer les phénomènes dynamiques comme une éventuelle latence suite à un changement d'environnement. Mais cela laisse aussi le temps d'avoir assez de données pour la détermination d'une cinétique de croissance. Le photobioréacteur homogène permet, par contre, une acquisition fine et rapide de l'évolution de la biomasse mais sur une gamme de concentration restreinte (due à la méthode de mesure, cf. l'augmentation de l'incertitude de mesure visible sur la Figure 31), ainsi les cultures sur cet appareil ne sont réalisées que sur deux jours. Par ailleurs les actions manuelles, telles que les mesures ou la correction du niveau de culture, n'ont été réalisées les samedis, dimanches et jours fériés.

d. Considérations Pratiques

Finissons par une série de considérations pratiques sur la conduite des cultures :

- Tout d'abord, il a été observé qu'un cisaillement excessif (non-quantifié) mène à une lyse cellulaire, ce qui se traduit par une réduction de la taille moyenne

des brins de spiruline et le relargage de matière biologique en suspension dans la culture, très souvent suivi d'une efflorescence bactérienne et à terme d'un décès de la culture (de la spiruline du moins). Le cas s'est par exemple présenté lors de l'usage de conditions d'agitation intense, ou lors des modifications sur le circuit métrologique du pilote. Ainsi a-t-on voulu remplacer la pompe péristaltique, qui malgré une maintenance régulière engendrait régulièrement des défaillances (fuite par perçage du tube flexible), par une pompe à engrenage (elle aussi de type volumétrique) mais avec une vitesse de rotation plus élevée (300 rpm, contre 50 avant) induisant de trop forts cisaillements pour la spiruline. De même l'usage de flexibles installés avec les deux cellules d'écoulement (pour le spectrophotomètre et la microscopie en ligne) de trop faible section de passage (diamètre : 1 mm) engendre le même type de problèmes.

- Un autre problème fréquent concerne le développement de biofilm en paroi. Ainsi une accumulation de biomasse est régulièrement observée au niveau des surfaces éclairées des photobioréacteurs et ce d'autant plus qu'il s'agit d'une zone de faible agitation comme en fond de cuve et dans les angles (cf. Figure 32.(d)). Bien que sa désolidarisation des parois soit aisée, le bullage seul ne permet par contre pas forcement d'y parvenir, on a alors recours à différentes méthodes : petit jet d'eau depuis une pissette, friction avec un écouvillon inséré par le ciel du réacteur ou grâce à une paire d'aimant dédiée (similaire à ce que l'on peut trouver en aquariophilie). Ceci est problématique car la couche dense d'algues alors formée obstrue le passage de la lumière de la source vers la culture, l'éclairement n'est plus celui qu'il est censé être et les conditions opératoires ne sont donc plus correctement contrôlées. D'autre part, on a dans ce cas une partie de la biomasse qui croît, dans le biofilm, sans pour autant être comptabilisée dans le suivi de culture puisque ne sont prises en compte que les cellules en suspension dans le milieu. La même remarque peut être faite lorsque des agglomérats et flocs de spiruline sont présents. On veille donc, autant que faire se peut, à prévenir leur formation par les quelques moyens cités.

- Lors des expériences sur le banc d'essai, consistant en 6 cultures différentes en parallèle variant par leurs conditions, on tâche de n'utiliser qu'une seule solution de milieu P3 ainsi qu'une seule source d'inoculum, pour améliorer la comparabilité et donc l'exploitation commune des résultats des 6 croissances.

- Remarque sur les photobioréacteurs eux-mêmes cette fois : ils sont faits de PMMA qui est un polymère plastique très transparent et facilement usinable (découpe et assemblage), en revanche c'est un matériau fragile. Non pas comme le verre qui, lui, est cassant, mais il a par contre une faible résistance à l'abrasion et au gradient de température. Ainsi un nettoyage physique trop vigoureux (comprendre à l'éponge grattante) va provoquer de multiples microrayures qui viennent ternir la transparence des parois et fournir par la même occasion des aspérités propices à la formation de biofilm (cf. Figure 32.b). Les gradients de température, quant à eux, s'ils sont trop prononcés engendrent des microfissures du matériau, qui elles-mêmes peuvent limiter la transmission de la lumière par des réflexions par exemple. Par contre aucun cas de ruptures du matériau dû aux microfissures n'a été constaté. Pour éviter leur apparition on se contente d'éviter tout contact entre les parois et les sources de chaleur comme les LED ou les thermoplongeurs (cf. Figure 32.c).

- On évite tous contacts physiques entre les cultures pour éviter une éventuelle propagation d'une contamination bactérienne néfaste. En ce sens, les outils de prélèvements, par exemple, sont spécifiques à chacune des cuves quand ils ne sont pas à usage unique.

- Dernier ennui occasionnel : parfois les cultures moussent en raison de la production ou relargage d'espèces tensio-actives, particulièrement lorsque l'on observe une lyse cellulaire. Bien que ce ne soit pas limitant pour la conduite de la culture en elle-même ou de son suivi, ça l'est en revanche d'un point de vue technique si cette mousse finit par occuper tout le ciel du réacteur et sort du volume réactionnel. Il peut alors y avoir contact et détérioration des composés électroniques, comme les LED, situés autour du réacteur, sans compter la considération d'ordre purement esthétique (cf. Figure 32.a). Heureusement on peut facilement y remédier, tout d'abord par l'aspersion en faible quantité d'alcool à 96% volumique sur la mousse qui s'en trouve immédiatement détruite. Et pour éviter sa reformation quelques gouttes d'huile alimentaire peuvent être ajoutées la culture, toutefois cela peut encrasser le ciel du réacteur en créant des dépôts gras en paroi.

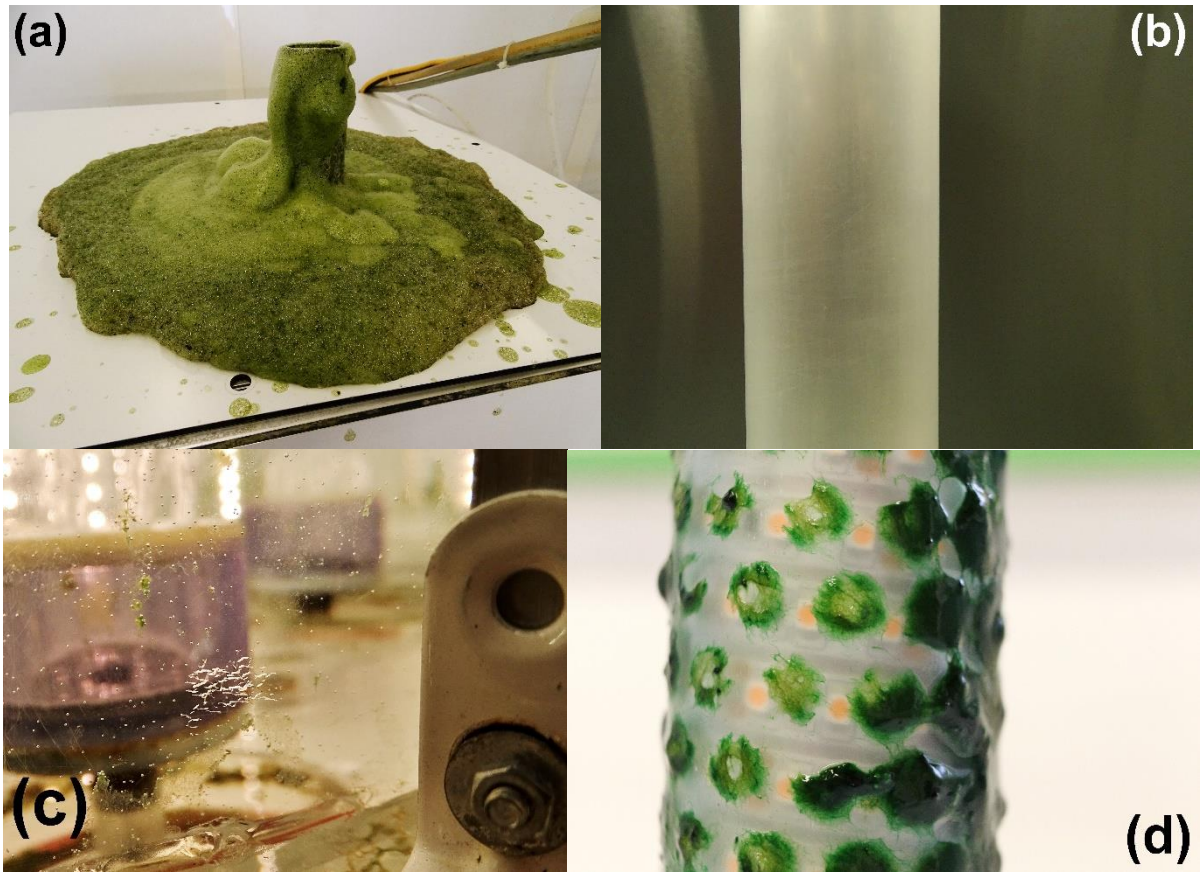


*Figure 32 : Photographies : **(a)** de l'évent du photobioréacteur pilote dans le cas de production abondante de mousse, **(b)** de l'un des tubes immergés des photobioréacteurs de paillasse ternis par de nombreux nettoyages, **(c)** micro-craquelures de la paroi au contact prolongé d'une LED, on observe par ailleurs les restes d'un biofilm s'étant formé à proximité **(d)** biofilms formés au voisinage des LED*

2. Discussion Préliminaire au Travail de Caractérisation et Modélisation

Dans la pratique, il est constaté que les mesures de densité optique présentent une incertitude plus faible sur les résultats que la mesure de matière en suspension (cf. II.1.B). Elles sont plus commodes à pratiquer et permettent un échantillonnage plus resserré. Ainsi, bien que les deux suivis soient généralement réalisés, seule la densité optique est exploitée au titre de la modélisation des cinétiques. Il faut alors garder en tête que les tendances mises en valeur par l'expérience peuvent (en partie) provenir du fait que la mesure ne quantifie pas directement la quantité de spiruline mais résulte de la morphologie de la population de trichomes et de la concentration de composés intracellulaires qui ne sont pas constants (d'où l'idée d'un suivit microscopique en parallèle). De fait, ce que l'on décrit à travers les modèles et que l'on cherche à optimiser par la suite, c'est la production de chlorophylle (via la DO_{680}, plus ou moins la morphologie) et non directement la quantité de spiruline. On suppose que les observations et conclusions faites sont bien les mêmes que si l'on avait effectivement étudié la quantité de biomasse. De plus, comme il est dit dans l'exposé de la méthodologie I.3.A., on n'étudie pas les résultats comme valeurs absolues mais on cherche à mettre en évidence leurs variations. Les séries de points obtenues sont toujours traitées de façon relative, c'est-à-dire qu'elles sont systématiquement normalisées par leur maximum. D'ailleurs, cela facilite d'autant plus la comparaison des résultats issus des différents réplicas avec la littérature. D'autant plus que les conditions réactionnelles sont quasi-systématiquement insuffisamment décrites, notamment relativement à l'éclairement du réacteur (point clef du procédé), dans la littérature et empêche donc toutes réexploitation des cinétiques dans leurs valeurs absolues [60], [61].

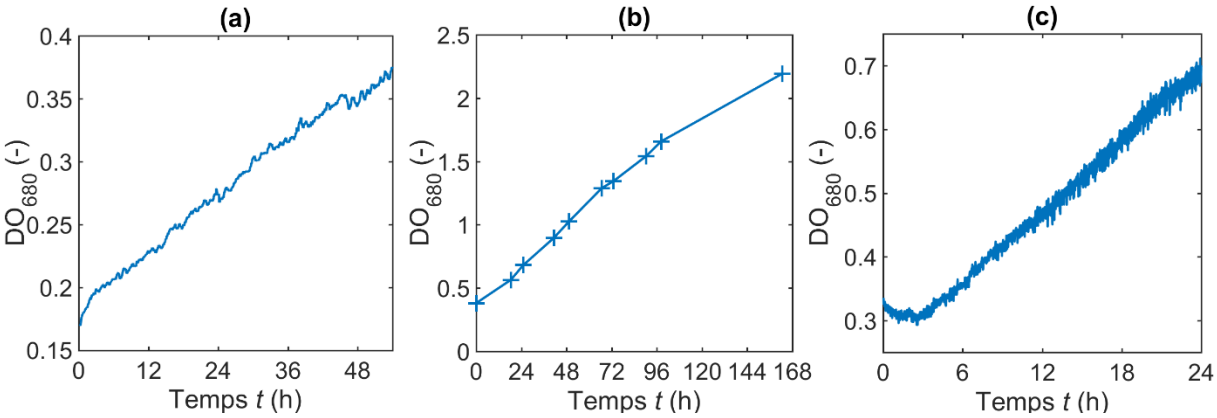


*Figure 33 : Exemple de courbes de croissance typique obtenues sur chaque photobioréacteur, resp. **(a)** photobioréacteur pilote, **(b)** photobioréacteur de paillasse, **(c)** photobioréacteur homogène*

Toujours concernant l'exploitation des données, dans nos conditions de culture les courbes de croissance observées sont linéaires (Figure 33) contrairement à la plupart des cinétiques biologiques où l'exponentielle est plus courante. Certes, la croissance biologique est autocatalytique, c'est-à-dire que la biomasse engendrant la biomasse, il y a par conséquent une accélération de la croissance avec l'augmentation de la quantité de cellules. En revanche, les cultures photosynthétiques ont ceci de particulier qu'elles sont aussi auto-inhibées, car le moteur de la croissance est l'apport de lumière [2]. Or, plus la culture est concentrée moins la lumière pénètre dans le volume (cf. auto-ombrage). La résultante de ces deux phénomènes est une augmentation quasi-linéaire (avec le temps) de la concentration en spiruline, jusqu'à ce que survienne une limitation (ex. carence). Lorsque des valeurs absolues de vitesse de croissance sont ici citées par la suite, elles sont exprimées en j^{-1} (point de $DO_{680}{\cdot}j^{-1}$) mais ne correspondent pas pour autant à une constante de temps d'une courbe exponentielle mais bien à la pente d'une droite affine. Remarque : Si une culture est initialement inoculée à faible concentration, on peut observer le début d'une croissance exponentielle (telle que prévue en l'absence d'autoinhibition), jusqu'à que celle-ci rejoigne son asymptote linéaire. La croissance est linéaire tant que la croissance spécifique de la spiruline relativement à la lumière μ_{lum} demeure constante, or à faible concentration l'auto-ombrage est suffisamment faible pour que l'ensemble du volume ait une irradiance contenue dans le pseudo-plateau de μ_{lum} (cf. Figure 44) et donc un taux de croissance quasi-constant. Empiriquement, on peut approcher l'instant du passage d'une croissance exponentielle à linéaire avec le moment à partir duquel la lumière ne traverse plus intégralement le volume de culture (i.e. on ne discerne plus les sources immergées depuis la paroi externe). Ceci arrive très tôt dans la pratique, étant données les profondeurs optiques de nos dispositifs (exception faite du photobioréacteur homogène). Les

cinétiques de croissances sont mesurées lors de cette phase de croissance linéaire et sont établies sur une durée d'environ une semaine pour les photobioréacteurs pilote et ceux du banc. De même, on prend garde à ne pas traiter les éventuelles périodes de croissance exponentielles ou limitées respectivement en début et fin de culture. Les suivis de culture opérés sur le photobioréacteur homogène présentent, eux aussi, des courbes de concentration en biomasse linéaires avec le temps. Or, le réacteur étant conçu de sorte à délivrer une irradiance identique sur l'ensemble de son volume/épaisseur (en première approximation), l'intervention du phénomène d'auto-ombrage dans les cinétiques mesurées est alors à exclure. On explique la linéarité des croissances observées par le court laps de temps pendant lequel on réalise le suivi : 24 h (contre 168 h pour les autres photobioréacteurs), ainsi on peut approcher l'exponentielle normalement attendue par son développement limité au premier ordre : une droite affine. La pente de cette droite a pour valeur l'inverse de la constante de temps de l'exponentielle attendue, constante de temps dont on vérifie *a posteriori* qu'elle est au moins plus grande que la durée du suivi afin de conforter la validité de l'approximation par le développement limité à l'ordre un. Remarque : Sur l'exemple de la Figure 33.(c) qui est conduit sur une durée plus longue (~40 h), on observe effectivement que la croissance ne peut raisonnablement plus être considérer comme linéaire.

Par ailleurs, avoir réalisé des cultures séquentielles sous-entend que toutes les courbes de croissance acquises le sont dans des conditions de culture qui évoluent avec le temps, puisque le champ de lumière change avec la concentration, de même que les nutriments sont consommés. C'est le propre des réacteurs discontinus. Or, l'analyse des cinétiques consiste en une étude des influences une à une et idéalement de façon indépendante : tout chose étant égales par ailleurs. Mais cela est, en l'état, incompatible avec la nature discontinue de nos cultures, puisque l'on cherche à observer l'effet induit par la variation d'un paramètre opératoire alors même que d'autres évoluent au cours du temps. Premièrement au sujet de la lumière, on ne peut s'affranchir de l'évolution temporelle de son impact puisque *de facto* toutes les croissances observées présentent une croissance linéaire (synonyme de l'augmentation de l'effet de l'auto-ombrage). Par conséquent, il faut à chaque fois que cette évolution temporelle de l'influence de la lumière soit identique pour pouvoir être passée en facteur (cf. équation (4)). Cela demande trois choses. La première étant que les champs de lumières régnant dans le volume soient toujours les mêmes. On le verra partie III.2, les champs de lumière ne dépendent que des propriétés optiques (supposées constantes) et de la concentration en spiruline, or toutes les cultures traversent de manière continue la même gamme de concentration. D'autant plus qu'à l'échelle d'une campagne expérimentale, on prend soin

d'utiliser le même inoculum (et dilution initiale), les cultures démarrent donc à la même concentration. Par contre, puisque les vitesses de croissance sont différentes, cette gamme de concentration n'est pas traversée à la même vitesse. Ainsi, dans un deuxième temps, on suppose qu'il n'y a pas d'effet de la vitesse de variation du champ de lumière sur la cinétique à l'échelle de temps induite par la croissance de la spiruline (de l'ordre du jour). Cela questionne la notion, vue dans la littérature [93], de l'adaptation à moyen terme de la biomasse à son environnement, notamment de son contenu pigmentaire dont on sait qu'il est lié à la photosynthèse, ce que l'on choisit ici d'ignorer. Attention, on s'est bien intéressé à un effet d'une variation temporelle de l'exposition à la lumière, lui aussi identifié dans la littérature, cependant cela touche une échelle de temps bien plus petite (de l'ordre de la seconde), on verra son étude en partie II.4. Et enfin, on émet l'hypothèse que l'influence de la lumière n'est pas intercorrélée avec celle du paramètre étudié (que l'on fait varier), sans quoi elle varierait (avec le paramètre étudié, puisque liée) et serait improprement intégrée dans l'effet du paramètre en question. Il en résulterait un résultat champ-de-lumière-spécifique et donc propre à une géométrie (diminuant sa capacité à permettre une conception d'un nouveau procédé). Il est effectivement apporté dans la littérature un témoignage du lien entre l'éclairement et d'autres paramètres opératoires [94]. Premièrement, il est possible qu'il y ait un lien avec la température, via le phénomène dit de photolimitation et dont on vérifie ici *a posteriori* qu'il n'est pas significatif (cf. II.2.A). Il y a aussi une intercorrélation, cette fois significative, de l'effet de l'éclairement avec l'agitation dans les réacteurs. C'est l'objet de l'étude détaillée en partie II.4.C, et elle use de l'approche multi-échelle (abordé en partie I.3.B). Quoiqu'il en soit, on veille à ce que ces deux paramètres (température et agitation) soient maintenus strictement identiques et constants au sein des différentes campagnes expérimentales pour que l'effet de l'éclairement demeure bien le même entre les cuves et puisse être passé en facteur du terme d'intérêt.

Quant à la composition chimique du milieu de culture, elle est elle aussi susceptible d'évoluer avec le temps, et doit donc être discutée dans le cadre de l'évaluation des cinétiques (en fonctionnement discontinu). Parmi la multitude de composés, tous n'ont pas le même rôle. Ainsi par exemple, le sel et les éléments traces (ex. les métaux) sont là pour fournir un environnement propice à la vie de la spiruline sans pour autant être consommés par cette dernière ou alors de manière négligeable face aux quantités introduites (similaire au rôle du solvant lors d'une réaction chimique). Dès lors on émet l'hypothèse que leur impact sur la croissance est constant dans le temps, à la manière d'une dégénérescence d'ordre en cinétique chimique. Quant au dioxygène dissous, bien qu'il ne soit pas à proprement parler introduit

dans le milieu de culture, il est inévitablement présent de par la photosynthèse et peut, de plus, avoir une influence sur la cinétique de croissance. Cependant, on se permet de l'ignorer dans la modélisation car nos cultures sont agitées par bullage/aération, on suppose donc qu'elles sont toujours très proches de l'équilibre thermodynamique avec l'atmosphère ($P_{O2(L)}$~20%). De fait, seul le photobioréacteur pilote permet un suivi de la concentration en oxygène, et jamais ce suivi n'a montré une accumulation du dioxygène, si ce n'est après un arrêt du bullage (cf. Figure 6). On suppose qu'il en va de même pour les autres photobioréacteurs (les débits gaz et les vitesses de croissance étant dans les mêmes ordres de grandeur). On suppose donc que l'effet du dioxygène sur la biomasse est constant au cours des cultures. En revanche, le milieu de culture contient aussi des espèces chimiques qui vont être consommées par la biomasse pour sa croissance : les nutriments. Leurs concentrations peuvent avoir une influence sur la cinétique, cette dernière évolue potentiellement au cours du temps (avec les concentrations). Néanmoins, on rappelle qu'ils sont introduits en excès (cinq fois). On fait alors l'hypothèse que cet excès est suffisamment grand pour que leurs concentrations ne varient pas de façon significative (en relatif) pendant le temps des mesures, et on en déduit la même conclusion à propos de leur influence sur la cinétique (c'est une dégénérescence d'ordre en cinétique chimique, tout comme pour les éléments traces). En conclusion, l'influence globale du milieu est constante au cours du temps et peut donc être passée en facteur dans la modélisation des différentes croissances spécifiques (hormis celle du milieu lui-même, bien sûr).

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude on ne cherche pas spécifiquement à opérer les cultures dans des conditions de carences nutritives (comme ce peut être le cas ailleurs, cf. I.2.B), au contraire le milieu est justement formulé de sorte à fournir un excès de nutriments relativement à la quantité de biomasse produite (usuellement). Par contre une optimisation possible est d'adapter cette formulation du milieu de culture à un scénario d'usage des photobioréacteurs, typiquement diminuer l'excès de nutriments (qui représentent un coût) sans pour autant rencontrer une situation de carence pendant la période de culture voulue. Dès lors, on se contente d'une description qualitative des cinétiques lors de tels évènements (i.e. carences), car le besoin de modélisation ne se situe alors pas dans la description de la croissance résultante mais dans la détection d'une éventuelle limitation par le milieu. De plus pour simplifier la question, on utilise le fait que le milieu est formulé de façon stœchiométrique. C'est-à-dire que les espèces chimiques dont les concentrations sont amenées à varier, vont varier de façon identique (en relatif). Ainsi, si une carence nutritive survient, elle concernera simultanément l'ensemble des espèces (à la constante cinétique près, ex. demi-saturation dans

une loi de Monod). Cependant cette conclusion n'est vraie que si les concentrations varient uniquement à cause de la croissance de la biomasse. Le bicarbonate utilisé pour fournir le carbone à la microalgue n'est pas chimiquement inerte, il intervient dans des réactions d'équilibres acido-basiques ainsi que dans le transfert de matière avec la phase gaz. En ce sens, on prend alors en compte dans le modèle les deux espèces prépondérantes dans le milieu, à savoir le nitrate (source d'azote, N) pour représenter le reste des espèces (inertes, vérifié en partie III.1) via les proportions stœchiométriques et le bicarbonate (source de carbone, C) parce que l'évolution de sa concentration est découplée de celle des autres espèces. Étant donné que l'on ne considère pas l'ensemble des espèces inertes mais leur seule représentation par le nitrate, une potentielle carence n'est effectivement décrite que de façon qualitative, puisqu'il s'agit normalement de l'effet combiné de la carence en l'ensemble des espèces nutritives inertes (et non du seul nitrate). Une amélioration possible du modèle consisterait alors à étudier l'influence de la concentration globale du milieu de culture, équivalent à la mesure de l'ordre global d'une réaction en cinétique chimique. Cela permettrait, au prix d'une unique expérience, de regrouper sous une seule corrélation l'effet de l'ensemble des espèces inertes. De plus cela ne demanderait sans doute pas de modification importante du modèle final, si ce n'est un ajustement des paramètres cinétiques. Cela pourra être envisagé ultérieurement dans le cas où l'on souhaite justement simuler des scénarios de culture faisant apparaître de possibles carences nutritives, notamment pour continuer à maximiser l'utilisation des nutriments, par exemple en recyclant du milieu de culture (partiellement épuisé) après récolte.

3. Impact de la Température et de la Composition du Milieu

A. Impact de la Température

a. Influence de la Température en Régime Permanent

Les études de l'influence de la température sont réalisées sur le banc de photobioréacteurs de paillasse à partir du même inoculum, avec la même préparation de solution de milieu nutritif et ont été conduites de façon discontinue (*batch*) pendant une semaine. L'agitation et le flux de lumière en parois ont été réglés de manière identique pour chaque cuve, à savoir : 2,0 $L \cdot min^{-1}$ et 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. La température quant à elle est contrôlée au demi-degré près par le dispositif de régulation et le suivi en ligne confirme que les consignes sont bien respectées. Pour les cuves aux températures inférieures à 25°C, est utilisé un système d'aéroréfrigérant décrit en partie II.1.A. L'expérience a été réalisée deux fois, à dix mois d'intervalle, afin de confirmer les tendances observées. L'expérience *#1* est menée en deux fois (sur deux semaines consécutives) afin d'obtenir une plus grande résolution. Elle contient au total douze points de mesures, dont un en commun sur les deux séries. L'expérience *#2*, quant à elle, contient sept points de mesures réalisés simultanément.

Les croissances ont été évaluées par l'intermédiaire d'une régression linéaire sur la concentration en spiruline mesurée par densité optique à 680 nm. Dans le traitement des données de l'expérience *#1*, les deux séries obtenues (première et seconde semaines) sont d'abord normalisées par leur point commun (30°C) avant de l'être par le maximum global. Les données de l'expérience *#2* sont, elles, seulement normalisées par leur maximum. Les résultats sont présentés Figure 34. On constate que, dans les deux cas, le comportement de la biomasse vis-à-vis de la température est semblable. D'autre part, on précise que les valeurs absolues des *maxima* de vitesses de croissance mesurées sont elles aussi comparables entre elles (resp. 0,36 et 0,35 point de DO_{680} par jour).

On observe que sur notre plage opératoire usuelle, comprise entre 25 et 35°C, la croissance n'est que peu impactée par la température. Il n'y a en tout cas pas d'optimum de température marqué. De plus, on a observé que des températures inférieures à 22,5°C et supérieures à 38°C ne peuvent être des conditions opératoires envisageables, car il y a alors de forts risques d'effondrement brusque de la biomasse.

Enfin, étant donné que les données ne présentent pas de forme remarquable (i.e. assimilable à une fonction usuelle), on choisit pour modéliser l'influence relative de la température sur la croissance, μ_T, d'utiliser une fonction affine définie par morceaux. Le modèle est visible sur la Figure 34 et son équation est donnée en formule (12).

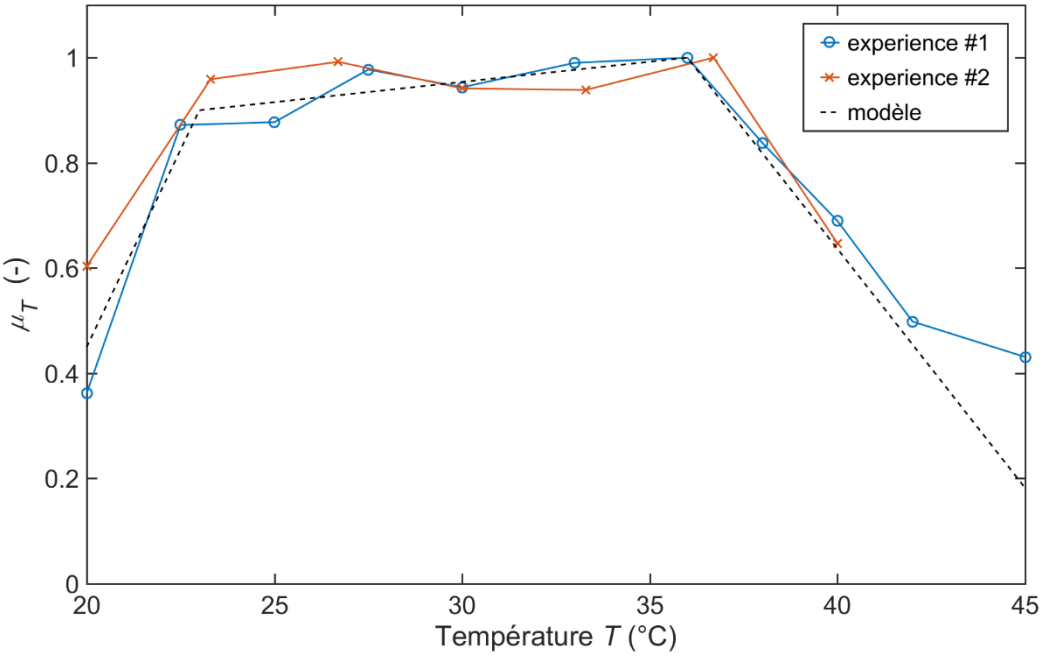


Figure 34 : Influence de la température sur la croissance de la biomasse μ_T, comparaison entre experiences et modèle (formule (12), R^2=0,97)

$$\mu_T(T) = \begin{cases} si\ T < 17\ ou\ T > 47 :\ \mu_T(T) = 0 \\ si\ T \in [17\ ;\ 23] :\ \mu_T(T) = 0,150 \cdot T - 2,55 \\ si\ T \in [23\ ;\ 36] :\ \mu_T(T) = 0,00769 \cdot T + 0,723 \\ si\ T \in [36\ ;\ 47] :\ \mu_T(T) = -0,0909 \cdot T + 4,27 \end{cases} \quad (12)$$

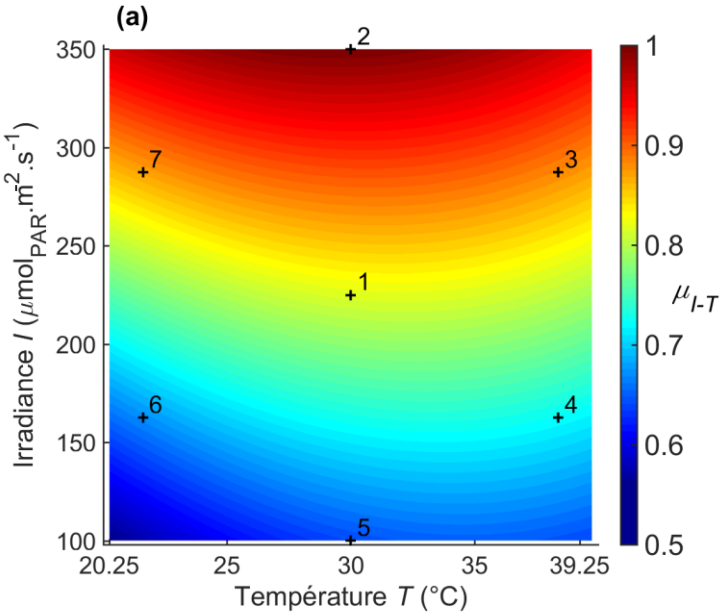
Avec : μ_T l'influence de la température sur la croissance (comprise entre 0 et 1), T la température de culture en degré Celsius. Remarque : La vitesse de décroissance de la biomasse en dehors du domaine de viabilité n'est pas modélisée

b. Intercorrélation Entre Température et Lumière

De plus, il est relevé dans la littérature une possible corrélation des influences de la température et de l'éclairement dans les photobioréacteurs sur les cinétiques de croissance

aussi appelée photolimitation [94], [95]. On a donc cherché à savoir si cela est aussi le cas pour notre souche. Pour cela on a réalisé un plan d'expérience faisant varier les deux paramètres selon un schéma de Doelhert en sept points répartis sur le champ opératoire suivant : 100 à 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ pour l'irradiance en parois et de 20,25 à 39,75°C pour la température de culture. Le bullage est gardé constant à 2,0 $L \cdot min^{-1}$. Les sept cultures sont réalisées simultanément sur le banc de photobioréacteur suivant le même protocole que précédemment, à savoir : une semaine, même inoculum et même milieu, régulation au demi-degré, suivi en densité optique à 680 nm. Les résultats sont illustrés en Figure 35, et l'équation de la corrélation qui en résulte est explicitée en formule (13).

À la lecture des différents coefficients de la corrélation, a_x, on retrouve d'une part le fait que (dans le champ d'observation) la température n'a qu'un impact modéré sur la vitesse de croissance (cf. Figure 34), relativement à celui de l'éclairement en parois. On observe aussi que l'influence de l'irradiance incidente est principalement linéaire. Ainsi, en première approximation il y a proportionnalité entre énergie lumineuse fournie au photobioréacteur et vitesse de croissance (pour un même photobioréacteur). Cela sera discuté plus tard en partie II.4.A. Enfin, concernant la réponse à la question posée, on met en évidence qu'effectivement le terme d'intercorrélation a_{12} entre l'éclairement et la température n'est pas nul. Pour autant, l'influence couplée de ces deux paramètres n'est pas prépondérante dans la détermination de la cinétique de croissance. On néglige donc, par la suite, tout lien entre température de culture et exposition à la lumière dans les modèles.



(b)

Points	I ($\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	T (°C)	μ_{I-T} (-)
+ 1	225,0	30,0	**0,640**
+ 2	350,0	30,0	**1,00**
+ 3	284,5	38,4	**0,733**
+ 4	162,5	38,4	**0,452**
+ 5	100,0	30,0	**0,308**
+ 6	162,5	21,6	**0,380**
+ 7	287,5	21,6	**0,502**

*Figure 35 : Résultat de l'étude de l'intercorrélation entre éclairement et température, avec : **(a)** en échelle de couleur : graphique du modèle obtenu pour μ_{I-T} (formule (13), R^2=0,96), et l'emplacement des points expérimentaux ayant permis de l'obtenir en croix numérotées, **(b)** tableau de valeurs des conditions opératoires et des vitesses de croissances normalisées mesurées pour chacun des sept points (identique à la sous-figure (a))*

$$\mu_{I-T}(T) = a_{22} \cdot T^2 + a_{11} \cdot I^2 + a_{12} \cdot T \cdot I + a_2 \cdot T + a_1 \cdot I + a_0$$

$$avec \begin{cases} a_0 = 0,640 \\ a_1 = 0,298 \\ a_2 = 0,0874 \\ a_{12} = 0,0919 \\ a_{11} = 0,0138 \\ a_{22} = -0,169 \end{cases} \quad (13)$$

Avec : μ_{I-T} l'influence de la température sur la croissance (comprise entre 0 et 1), T la température de culture en degré Celsius, a_x les constante cinétiques, I l'irradiance en parois en $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

c. Réponse à une Variation de Température

On termine l'étude expérimentale de l'influence de la température avec une dernière expérience consistant à regarder son aspect dynamique et non plus à quantifier des régimes permanents (culture d'une semaine). L'objectif est d'observer le changement de vitesse de

croissance lors de changements brutaux de température, afin de savoir si l'influence de la température sur la croissance de la biomasse est un phénomène instantané ou s'il s'établit à plus long terme (comparativement aux durées de culture). Pour cela on a utilisé le photobioréacteur homogène (avec flux incident de lumière réglé à 210 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), car il est le seul à posséder une faible inertie thermique, pour de rapides changements de température, et à permettre un suivi de la biomasse à l'échelle de temps des changements de température. Ont été opérés trois échelons de température, un décroissant et un croissant dans le champ opératoire usuel (35→27°C puis 27→35°C), le dernier est croissant et sort du domaine de viabilité de la spiruline (35→45°C). Dans la pratique entre l'instant du changement de consigne et le respect de la nouvelle valeur, les changements de température ont tous duré approximativement 20 min (suivi manuel par thermomètre digital). Cela correspond au réchauffement/refroidissement des 7 L de liquide caloporteur et à la conduction de chaleur à travers 1 cm de paroi en PMMA des cuves. Pour s'affranchir de l'inertie du caloporteur, celui-ci est remplacé par de l'eau chaude ou par un mélange d'eau et de glace au moment des échelons. L'effet de ce changement est visible sur le relevé de densités optiques, car la mesure se fait à travers le bain-marie (cf. dernier échelon).

Figure 36, on note que pour les deux premiers échelons, les ruptures de pente sont immédiates et ont lieu au moment des changements de température. Les nouvelles vitesses de croissance semblent stables jusqu'à l'échelon suivant. Ce dont on déduit que l'influence de la température est instantanée et que la loi (12) peut être appliquée en l'état dans le modèle de croissance. De plus, les pentes lors de la phase initiale à 35°C et celle après le retour à cette même température sont très similaires (resp. 0,21 et 0,22 points de DO_{680} par jour, régression linéaire sur 6 h de données), ce qui écarte une possible hystérésis du comportement de la biomasse face à la température qui n'aurait pu être mise en évidence par les précédentes expériences. À propos du dernier échelon de température, on retrouve ce qui était déjà noté précédemment, à savoir que la culture n'est pas viable à moyen terme en cas de surchauffe de la culture. En revanche, l'effondrement de la biomasse n'est pas instantanément induit par la surchauffe, contrairement à l'adaptation de la vitesse de croissance ci-avant.

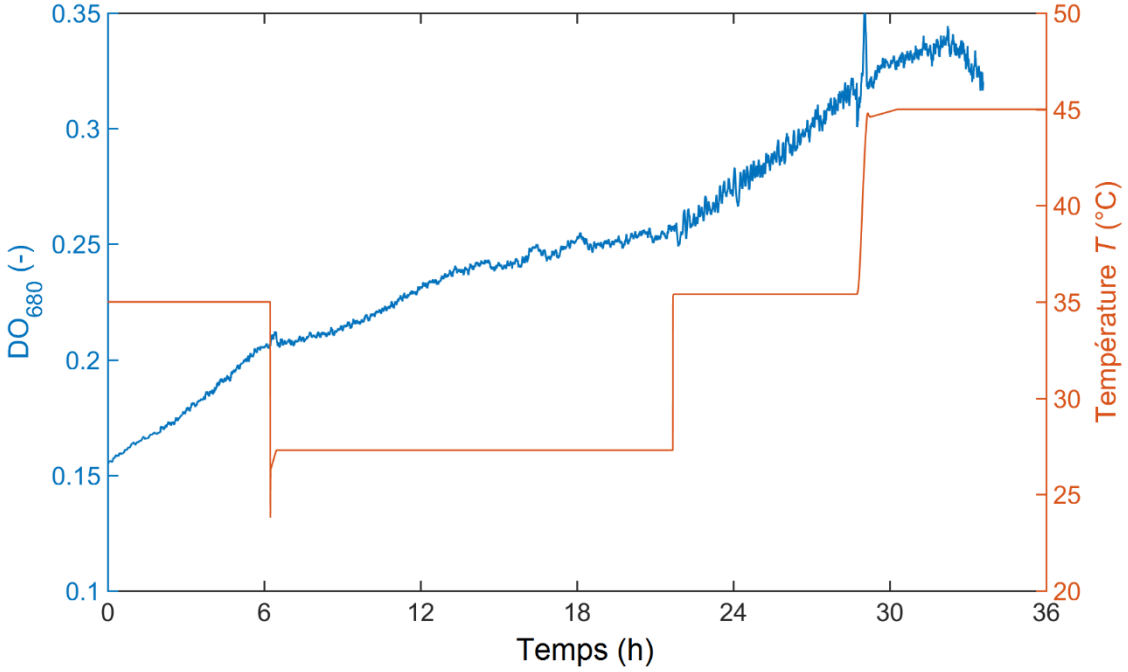


*Figure 36 : Évolution de la concentration en biomasse au cours du temps lors de plusieurs échelons de température, avec : en **bleu** le suivi de concentration en spiruline par mesure de DO_{680} (deux points par minute + moyenne glissante sur 4 min) et en **orange** le suivi de température de la culture.*

B. Impact de la Concentration en Nitrate

Concernant la composition du milieu, on étudie en premier lieu l'influence de la concentration en substrat azoté (nitrate) sur la croissance de la spiruline. On se base pour cela sur des données expérimentales issues de la thèse de C. Zarrouk : "Contribution à l'étude d'une cyanophycée, Influence de divers facteurs physique et chimique sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima Geithler*" de 1966 [17] et dans laquelle est étudié, entre autres, l'effet du nitrate qui nous intéresse ici. Le protocole détaillé est décrit dans ledit document, on précisera toutefois que :

- La microalgue utilisée est *Spirulina Maxima* (et non *A. Platensis Paracas*)
- Le milieu de culture n'a pas la même formulation
- Les vitesses de croissance sont mesurées en masse entre 24 et 48 h de culture
- Le contre-ion du nitrate n'est pas le même entre les expériences de C. Zarrouk et le projet PLAISIR, (resp. sodium et potassium), ce qui nous pousse à formuler l'hypothèse que celui-ci n'a pas d'influence sur la cinétique

Les points, issus de la Figure 11 du document, ont été numérisés puis corrélés par une loi de Monod avec un terme d'inhibition par le substrat et optimisés par une méthode des moindres carrés sur les écarts absolus puis normalisés. Donnant au final le graphique Figure 37 dont on a changé l'axe des abscisses par rapport à la littérature.

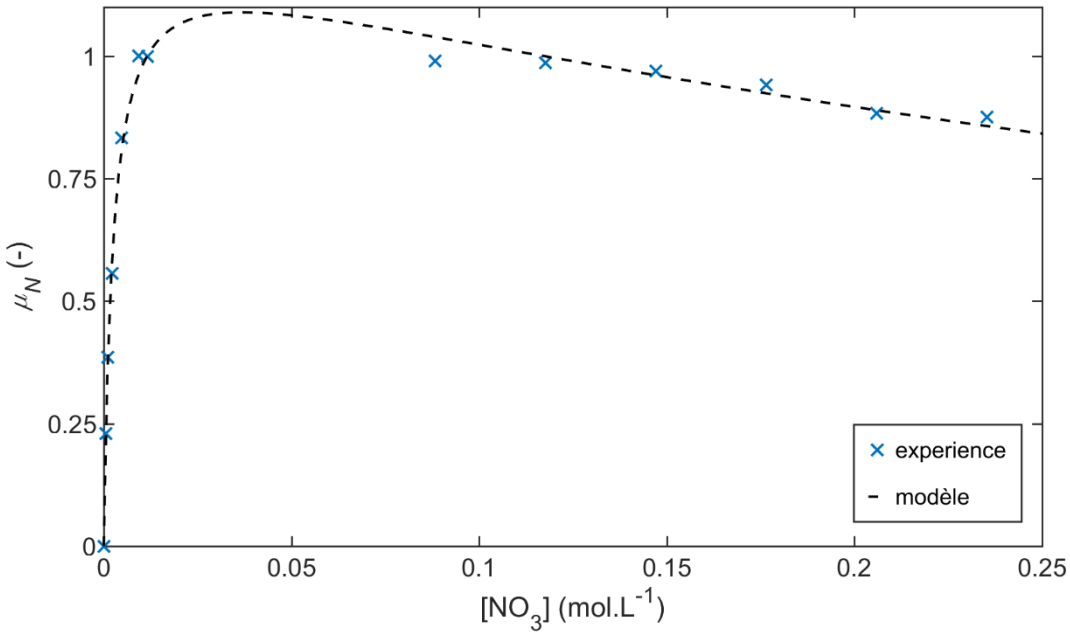


Figure 37 : Adéquation modèle (formule (14), R^2=0,99) et expérience pour l'influence de la concentration en nitrate sur la croissance de la biomasse [17]

Avec l'expression suivante pour le modèle :

$$\boldsymbol{\mu_N = 1,14 \cdot \frac{[NO_3]}{0,00250 + [NO_3] + \left(\frac{[NO_3]}{0,738}\right)^2}} \tag{14}$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_N}$ la cinétique de la biomasse par rapport à la concentration en nitrate (comprise entre 0 et 1), $[\boldsymbol{NO_3}]$ la concentration molaire en nitrate du milieu (mol·L-1)

Dans la pratique dans le milieu P3 (formulé pour le projet PLAISIR), les concentrations en nitrate sont comprises entre 0,046 et 0,024 mol/L, soit une cinétique, μ_N, quasiment égale à 1 relativement à ce substrat sur toute la gamme opératoire.

C. Impact de la Concentration en Bicarbonate

a. Modélisation des Données de le Littérature

Ici, on regarde l'influence sur la croissance de la concentration en carbone inorganique apporté sous forme de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$). Contrairement au substrat azoté, la source de carbone présente dans le milieu de culture n'est pas inerte. La comptabilisation de son influence dans le modèle cinétique n'est alors pas triviale puisque la quantité de matière introduite dans le milieu et la concentration réellement en solution sont différentes. Le bicarbonate de sodium est amphotère, c'est-à-dire qu'il se dissocie en solution aqueuse pour donner trois formes différentes : acide carbonique ($H_2CO_{3(aq)}$), le bicarbonate lui-même (HCO_3^-) et le carbonate (CO_3^{2-}). Celles-ci sont liées entre elles par deux équations d'équilibre acido-basique (26), dont il résulte le diagramme de prédominance en Figure 38 exprimé en fonction du pH et plus largement détaillé en partie III.1. La détermination totale du système nécessite donc au minimum la connaissance de deux paramètres. Dès lors est communément utilisée la quantité de carbone inorganique totale et le pH [9], [17], [96], il en va de même pour les modèles cinétiques pour lesquels sont régulièrement composés de deux termes : l'influence du bicarbonate introduit et l'influence du pH. Le pH évoluant au cours de la culture [8], [9], [97], il est possible d'établir par exemple une loi empirique traduisant sa variation avec celle de la concentration en biomasse.

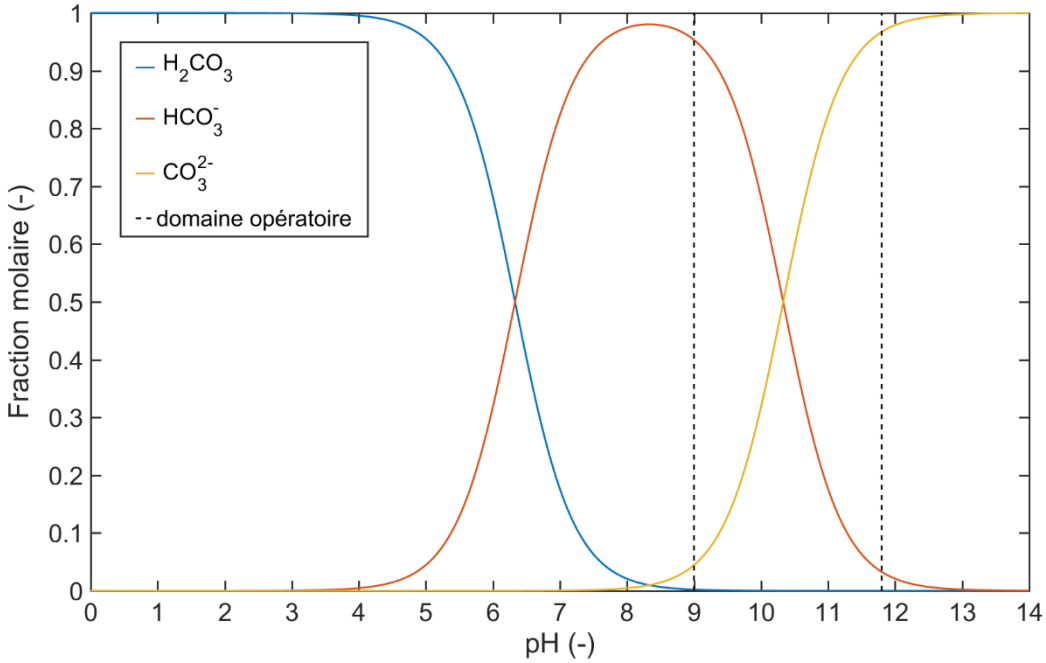


Figure 38 : Diagramme de prédominance des différentes formes du carbone inorganique en solution aqueuse en fonction du pH

C'est une autre approche qui est proposée ici : on souhaite se baser directement sur les concentrations des différentes espèces du carbone au cours du temps [98]. En premier lieu, on cherche le lien entre la concentration en bicarbonate en solution, assimilable par les cellules, et la cinétique. Pour cela on se réfère aux données expérimentales présentes dans la thèse de C. Zarrouk [17] (cf. Figure 39) dans laquelle l'impact du bicarbonate introduit dans le milieu et le pH de la culture sont aussi étudiés. Le pH étant contrôlé par un ajout de soude, ce qui provoque une réaction totale avec une partie du bicarbonate pour former du carbonate. Le protocole est décrit dans le document de référence, et on note deux différences majeures supplémentaires (relativement à l'étude du nitrate) :

- Ce n'est pas la croissance biologique qui est directement mesurée mais son activité photosynthétique à travers la mesure du dégagement de dioxygène
- Les cultures sont réalisées sur des durées de 40min

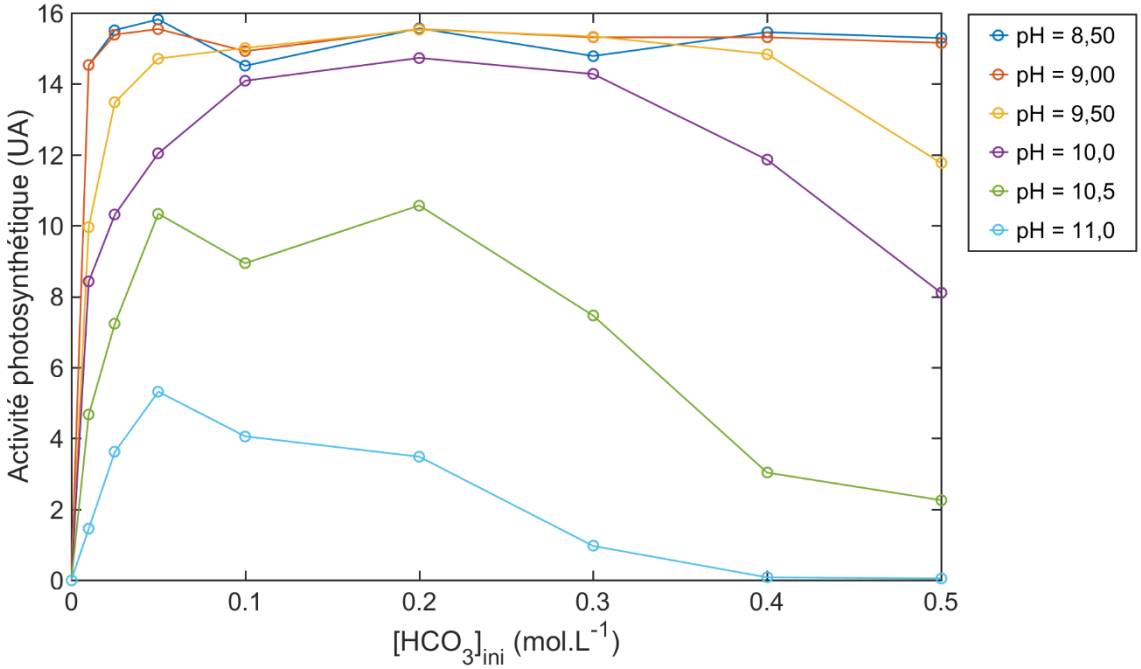


Figure 39 : Influence de la concentration initiale en bicarbonate sur l'activité photosynthétique de la culture de la spiruline en fonction du pH (Numérisation de la figure 20 de C. Zarrouk [17])

On réexploite ces données cinétiques (après normalisation) mais cette fois tracées relativement à la quantité de bicarbonate en solution après la réaction avec la soude et donc réellement disponible pour la biomasse dans le milieu. Sur la Figure 40 qui en résulte on constate alors que les données peuvent être représentées par une loi de Monod dont l'équation est donnée en formule (15). Le coefficient est ajusté par la méthode des moindres carrées écrits sur l'écart absolu entre données et modèle. Cependant treize points parmi les données semblent ne pas obéir à cette tendance, ils n'ont donc pas servi à ajuster la loi (15).

$$\mu_C([HCO_3^-]) = \frac{[HCO_3^-]}{0,00604 + [HCO_3^-]} \quad (15)$$

Avec : μ_C l'influence de la concentration en bicarbonate sur la croissance (comprise entre 0 et 1), $[HCO_3^-]$ la concentration de bicarbonate en solution (en mol·L^{-1})

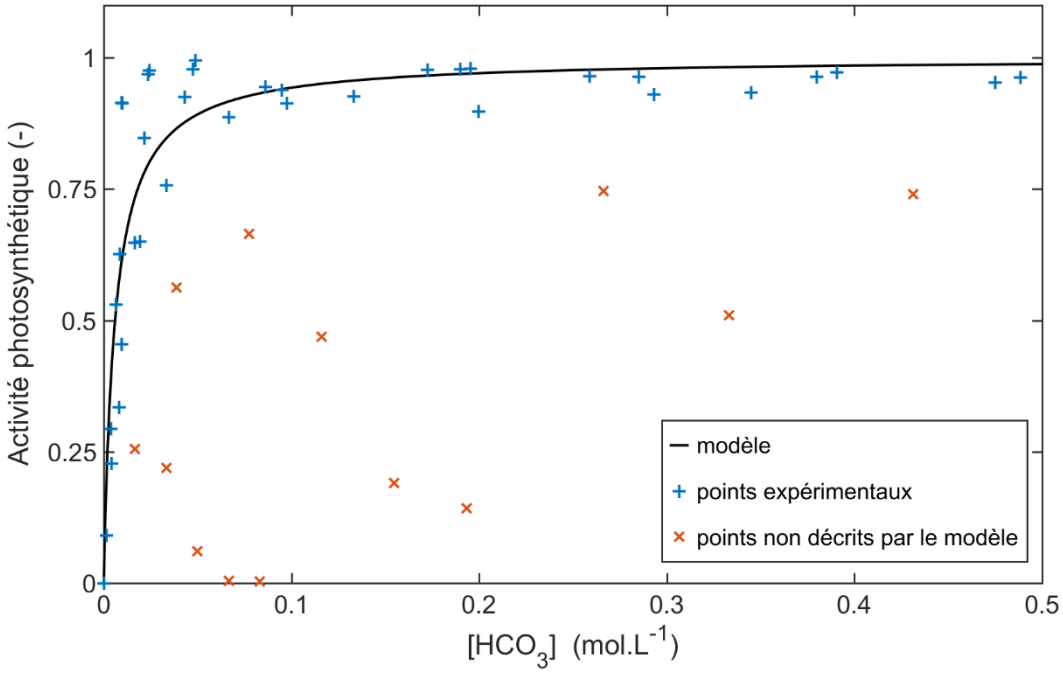


Figure 40 : Adéquation entre une corrélation de type loi de Monod (formule (15), R^2=0,75) et l'expérience concernant l'influence de la concentration en substrat carboné sur la croissance de la biomasse obtenu selon de protocole de C. Zarrouk [17]

En revanche, on remarque que ces points correspondent tous à des milieux de culture dans lesquels ont été introduites les plus grandes quantités de bicarbonate et avec les pH les plus élevés. Dès lors, au regard du diagramme de prédominance, Figure 38, on en déduit que cela correspond aux concentrations en base conjuguée (carbonate) les plus élevées. On postule (de façon empirique) une inhibition de la croissance par la présence de carbonate dans le milieu. Cela est cohérant avec la littérature, où il est mentionné et modélisé un ralentissement de la croissance avec l'augmentation du pH, la prédominance des différentes espèces et solutions y étant directement liée [7]–[9], [14]. Pour vérifier cette hypothèse, on trace l'écart entre le modèle de l'équation (15) et les points expérimentaux en fonction de la concentration en carbonate. Ainsi représenté sur la Figure 41, il semble effectivement que l'écart au modèle et la concentration en carbonate soit corrélés. On introduit alors un terme correctif au modèle afin de prendre en compte cet effet du carbonate sur la cinétique. On décide d'écrire ce terme comme proportionnel à la concentration en carbonate. Cela aboutit, après ajout du nouveau terme et ajustement des paramètres par la méthode des moindres carrés sur l'ensemble des points, à l'équation (16).

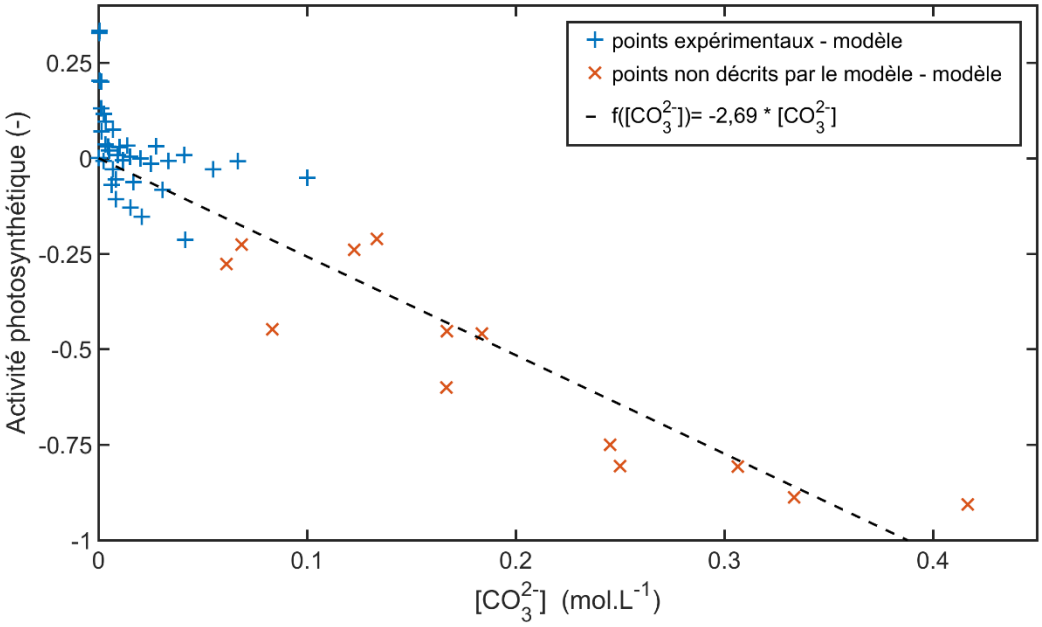


*Figure 41 : Écart absolu entre données et modèle en fonction de la concentration en carbonate en solution, avec en **croix bleues** : l'écart entre l'activité photosynthétique mesurée expérimentalement et calcul par la loi de Monod (formule (15)) et en **tirets noirs** une corrélation linéaire passant par l'origine d'équation (R^2=0,84)*

$$\mu_c = 1,04 \cdot \frac{[HCO_3^-]}{0,00658 + [HCO_3^-]} - 2,69 \cdot [CO_3^{2-}] \tag{16}$$

Avec : μ_c la cinétique de la biomasse par rapport à la concentration de bicarbonate en solution (comprise entre 0 et 1), $[HCO_3^-]$ la concentration molaire de bicarbonate en solution, $[CO_3^{2-}]$ la concentration molaire de carbonate en solution

Sachant que cette correction linéaire du modèle n'est sans doute que l'approximation au premier ordre de la véritable loi décrivant le lien entre la cinétique et le carbonate, pour peu bien sûr que ce soit ce dernier qui ait véritablement une influence sur la cinétique. Les graphiques, Figure 42, montrent une différence résiduelle entre modèle et l'expérience, et ce malgré l'ajout du terme correctif permettant de décrire la partie décroissante des courbes.

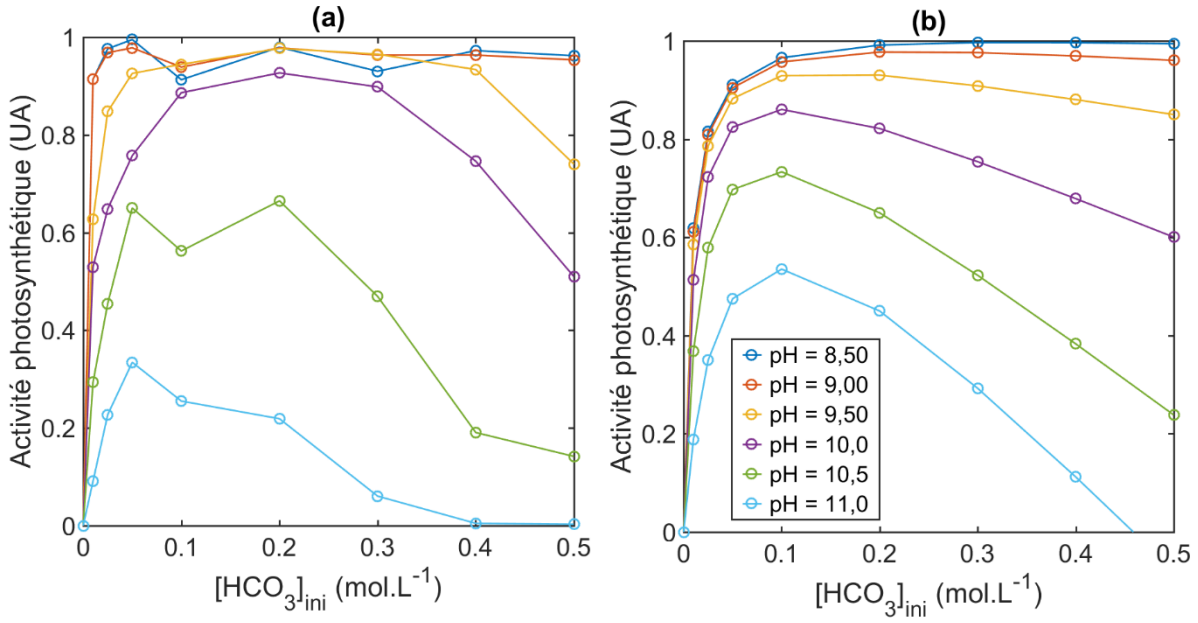


*Figure 42 : **(a)** Données expérimentale (normalisée) issue de [17], **(b)** les mêmes points expérimentaux décrits par le modèle de la loi (16), R^2=0,7*

b. Vérification Expérimentale du Modèle

D'autre part, on a voulu corroborer le comportement décrit par le modèle avec des expériences réalisées sur notre souche de spiruline, et plus particulièrement l'effet de couplé du carbonate par inhibition. On se base pour cela sur l'étude de l'influence d'une gamme de concentration initiale introduite de bicarbonate dans le milieu à pH fixé (choisi arbitrairement à 9,6), tout comme lors de l'expérience décrite ci-avant. Pour cela, on réalise six points en parallèle grâce aux photobioréacteurs de paillasse, toujours sur une durée d'une semaine, issus du même inoculum et réalisés à deux reprises à un mois et demi d'intervalle. L'injection de gaz, l'éclairement en parois et la température sont respectivement réglés à : 2 $L \cdot min^{-1}$, 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ et 35°C. Pour cette expérience, on choisit de ne pas ignorer la consommation du carbone avec la croissance de la spiruline, notamment car, pour les faibles concentrations testées, la carence en carbone survient pendant la durée de la culture. On a exceptionnellement recours à un fonctionnement séquentiel des photobioréacteurs : la concentration en carbone en solution ainsi que le pH sont corrigés biquotidiennement par introduction de bicarbonate de sodium et d'hydroxyde de sodium. Les quantités sont donc déduites de la variation de pH mesuré (TÜV, PH539) via les équations du diagramme de prédominance (cf. Figure 38). On effectue aussi cette opération à l'instant initial. Le pH est donc maintenu approximativement autour de 9,6 (plus ou moins la variation autour de la

consigne, ±0,4). Le modèle est alors établi sur la série de points faite de la moyenne des points des deux expériences préalablement normalisées par leur maximum (Remarque : Les valeurs absolues des deux *maxima* sont cohérentes, resp. 0,36 et 0,34 j^{-1}). L'ajustement du modèle se fait par la méthode des moindres carrés sur l'écart absolu entre valeurs expérimentales et issues du modèle. En revanche, étant donné qu'il n'y a aucun point dans la partie croissante de la courbe, le coefficient de demi-saturation de la loi de Monod ne peut être ajusté. On conserve alors celui issu de l'exploitation des données de la littérature. Néanmoins, on observe que notre souche de spiruline semble effectivement répondre au même phénomène d'inhibition par le carbonate mis en valeurs précédemment. Remarque : Sans l'analyse préalable des données des expériences de C. Zarrouk, les données auraient été interprétées (à tort) comme une inhibition par le bicarbonate lui-même (dans une loi de Monod avec terme d'inhibition par le substrat) car à pH constant la proportion entre la concentration de carbonate et de bicarbonate reste identique. L'effet du carbonate n'aurait pu être relevé par le nombre limité de nos mesures (vs. La littérature). L'ajustement du modèle ne comprenant que l'influence du bicarbonate n'aurait été vrai qu'à l'unique pH de l'expérience, ce qui aurait amputé la capacité du modèle à prédire d'autres cas de figure que celui de l'expérience.

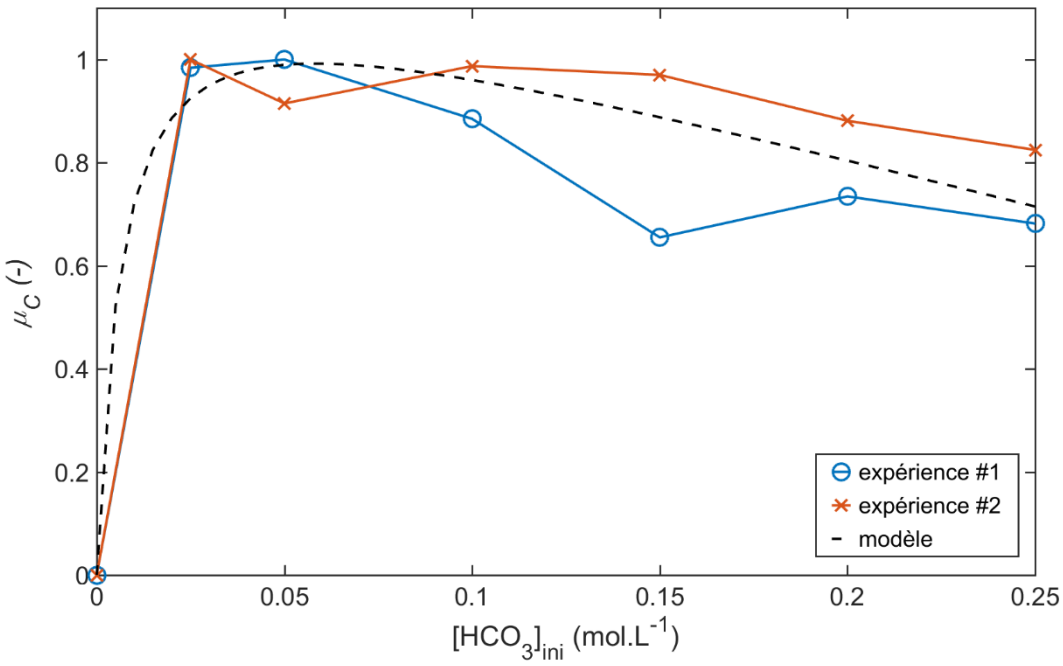


Figure 43 : Influence de la quantité de bicarbonate introduit initialement sur la croissance de la biomasse μ_c lorsque le pH est fixé à 9,6, comparaison entre nos experiences et modèle (formule (17), R^2=0,96)

$$\mu_c = 1,24 \cdot \frac{[HCO_3^-]}{0,00658 + [HCO_3^-]} - 10,6 \cdot [CO_3^{2-}] \quad (17)$$

Avec : μ_c la cinétique de la biomasse par rapport à la concentration de bicarbonate en solution (comprise entre 0 et 1), $[HCO_3^-]$ la concentration molaire de bicarbonate en solution ($mol \cdot L^{-1}$), $[CO_3^{2-}]$ la concentration molaire de carbonate en solution ($mol \cdot L^{-1}$)

Dans la pratique, le milieu de culture possède à l'instant initial une concentration en bicarbonate de 0,19 mol/L et un pH de 9,6, il permet donc une cinétique de croissance idéale. Néanmoins, au cours du temps le bicarbonate est consommé par la biomasse ce qui dégrade naturellement la cinétique comme pour toutes les espèces. De plus, il s'y ajoute que le milieu devient de plus en plus basique, ce qui a pour effet de diminuer d'autant plus la cinétique au cours de la culture.

D. Consommation des Nutriments

Enfin, on prend en compte l'action de la biomasse sur la composition du milieu de culture. Celle-ci, assimile les composés chimiques présents dans son environnement pour croître. Comme on a pu le dire en partie II.1.B, le suivi direct de la composition du milieu au cours de la croissance des microalgues est difficile étant donnée la grande variété d'espèces présentes (tant chimiques que biologiques). Pour répondre à la question de l'évolution de la composition du milieu, on se base alors sur la composition minérale de la biomasse (Tableau 3) avec laquelle on établit une équation stœchiométrique de croissance de la spiruline. Il en découle la loi (18) relativement à l'évolution des deux espèces étudiées (i.e. azote et carbone). De la même manière pourraient être déduits les coefficients stœchiométriques des autres nutriments si leurs natures étaient connues. Il est aussi à remarquer que la stœchiométrie varie d'une algue à l'autre et d'une souche à l'autre [2]. De plus, l'équation (18) se base sur la création de quantité de biomasse et ignore la synthèse de métabolites externes (cf. exo-poly-saccharides) qui relargués dans le milieu ne sont pas comptabilisés en tant que matière biologique quand bien même leur production requiert la consommation d'une fraction des nutriments. Pour la suite de l'étude, on fait l'hypothèse que la production de tels métabolites n'est pas significative et peut être négligée pour évaluer l'évolution de la composition du milieu. De même, on ignore une éventuelle consommation/assimilation ultérieure de ces métabolites externes.

$$\begin{cases} \Delta[\boldsymbol{NO_3}] = -\mathbf{0,0091} \cdot \Delta \boldsymbol{X} \\ \Delta[\boldsymbol{HCO_3^-}] = -\mathbf{0.039} \cdot \Delta \boldsymbol{X} \end{cases} \quad \textbf{Avec :} \begin{cases} \dfrac{y_n^{sp}}{M_{KNO_3}} = \mathbf{0,0091} \\ \dfrac{y_c^{sp}}{M_{NAHCO_3}} = \mathbf{0,039} \end{cases} \tag{18}$$

Avec : $\Delta \boldsymbol{X}$ la variation de concentration massique en spiruline (g·L-1), $\Delta[\boldsymbol{NO_3}]$ la variation de la concentration molaire en nitrate du milieu (mol·L-1), $\Delta[\boldsymbol{HCO_3^-}]$ la variation de la concentration molaire en bicarbonate du milieu (mol·L-1), $\boldsymbol{y_x^{sp}}$ la fraction massique de x dans la spiruline (cf. Tableau 3), $\boldsymbol{M_x}$ la masse molaire de l'espèce x [99]

Tableau 3 : Composition Minérale de la Spiruline [8]

Atome	**%m**
Carbone (C)	47
Azote (N)	12
Phosphore (P)	0,8
Fer (Fe)	0,05
Soufre (S)	2
Potassium (K)	1,5
Calcium (Ca)	0,13
Chlore (Cl)	0,4
Magnésium (Mg)	0,2

4. Impact de l'Éclairement

A. Échelle Macroscopique – Expériences préliminaires

On débute par une première étude expérimentale de l'influence de l'éclairement sur la croissance à l'échelle macroscopique/globale, à savoir s'appuyant uniquement sur la puissance lumineuse dissipée par unité de volume de culture à travers le rapport de forme F (formule (1)). Pour cela, on réalise quatre cultures : deux ont le même F mais selon une géométrie différente (#2 : géométrie présentée en II.1.A vs. #3 : géométrie annulaire), deux ont une valeur de F plus faible et diffèrent entre elles par leur agitation (#1 : bullage identique aux deux premières cultures, comme présenté en II.1.A vs. #4 : bullage "intensifié"). L'expérience est effectuée sur le banc de photobioréacteurs de paillasse. Les cultures ont toutes pour caractéristiques communes : de provenir du même inoculum, d'être régulées à 30°C, d'avoir duré une semaine et l'irradiance en parois éclairées est imposée à 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Les différentes conditions testées et les résultats sont respectivement détaillés dans les Tableau 4.(a) et (b).

On observe ainsi que si F est maintenu identique entre deux différentes géométries alors les croissances qui en résultent sont elles aussi relativement proches. Cela est donc en accord avec l'approche de dimensionnement, citée en I.2.B, consistant à procéder au changement d'échelle en conservant F constant. En revanche, lorsque F varie, la croissance suit effectivement la même tendance sans pour autant y être directement proportionnelle. C'est donc une première limitation de F en tant que variable de dimensionnement. On explique cela par le fait que la superficie de paroi éclairée est une caractérisation insuffisante des conditions réactionnelles puisque, on le sait, il y a un phénomène d'auto-ombrage au sein des milieux de culture rendant le volume réactionnel inhomogène en lumière. Dès lors, comme l'influence de la lumière est non-linéaire (voir paragraphe suivant), une modification de l'inhomogénéité en lumière (via F) induit une variation non-proportionnelle de la cinétique de croissance sur le réacteur. Par là même, cela justifie la nécessité de devoir considérer les effets locaux de la lumière sur la biomasse plutôt qu'à la seule échelle macroscopique.

*Tableau 4 : **(a)** Conditions opératoires des différentes cultures, **(b)** Résultats de l'expérience et exploitation. Remarque : La croissance spécifique correspond à la vitesse de croissance divisée par le facteur de forme F de la culture considérée*

(a)

Culture	Volume (L)	Surface éclairée (cm²)	Temps de mélange (s)
#1	6,5	305 (un tube de LED)	~80 (cane de bullage)
#2	6,0	893 (trois tubes de LED)	~80 (cane de bullage)
#3	5,0	745 (un tube de LED large, diamètre externe 100 mm)	~80 (cane de bullage)
#4	6,5	305 (un tube de LED)	<10 (rideau de bulles en parois extérieurs)

(b)

Culture	F (m^{-1})	Croissance (j^{-1})	Croissance spécifique ($j^{-1} \cdot m^{-1}$)
#1	4,69	0,08	0,017
#2	14,9	0,35	0,024
#3	14,9	0,31	0,021
#4	4,69	0,14	0,030

Remarque : Les temps de mélange, cité en quatrième colonne du Tableau 4.(a), ont été mesurés manuellement par suivi conductimétrique (WTW, LF538) avec injection d'un traceur (solution aqueuse saturée en sel) et moyennés sur dix acquisitions (pour compenser la faible fréquence d'échantillonnage)

Plus encore, on observe également que même à F constant la croissance dépend de manière significative (+75% entre #1 et#4) de l'agitation de la culture (cf. *Flashing Light effect*). Cet aspect doit donc lui aussi être comptabilisé, encore faut-il être capable d'observer cet effet de façon indépendante et de le quantifier. On poursuivra donc ensuite en partie II.4.C avec l'étude de la dynamique de l'influence de la lumière sur la croissance. On le rappelle : l'effet de l'agitation se fait, *a priori*, via les fluctuations temporelles de lumière perçue par les cellules (cf. I.2.B). Les photobioréacteurs sont supposés parfaitement mélangés du point de vue des concentrations, de même on écarte un potentiel effet du transfert de matière par la phase gaz car notre milieu fournit déjà une source excédentaire de carbone.

B. Échelle Locale

a. Modèle de Réponse Irradiance - Croissance

Cette nouvelle étape de l'étude de l'influence de la lumière sur la croissance cherche maintenant à prendre en compte l'effet des différentes intensités locales en lumière dans les photobioréacteurs. L'évaluation des champs de lumière (i.e. répartition dans le volume) fait l'objet de la partie III.2 au prochain chapitre. Il est ici question de caractériser la croissance spécifique de la biomasse relativement à ces différentes valeurs d'irradiances. Cette étude fût réalisée par notre partenaire de l'IFREMER. Les expériences ont été réalisées sur la souche de spiruline du projet PLAISIR, mais diffèrent sur un certain nombre de points par rapport à ce qui est décrit en II.1 :

- Photobioréacteur torique (décrit par ailleurs [36])
- Fonctionnement : Turbidostat (dilution biquotidienne), jusqu'au régime permanent (i.e. quelques jours), biomasse très peu concentrée
- Régulation de la température : 30°C (±2°C). Remarque : On a vérifié que l'intercorrélation lumière/température n'était pas significative pour notre souche (cf. II.3.A)
- Source de lumière : tubes fluorescents. Remarque : Le spectre est donc différent de celui des LED (cf. Figure 8)
- Milieu : Zarrouk

La biomasse est volontairement cultivée en conditions très diluées afin d'assurer un gradient de lumière minimal et ainsi se rapprocher autant que faire se peut du cas d'un photobioréacteur homogène en lumière, et donc mesurer la croissance d'une population de cellules exposées à une même intensité lumineuse. Cependant, ne pouvant assurer une irradiance parfaitement homogène sur le volume, le résultat est exprimé en fonction de la moyenne des irradiances entre les faces d'entrée et de sortie. Les données normalisées sont représentées Figure 44. En raison de la tendance qui suggère une diminution (après un optimum) de la cinétique pour les plus fortes valeurs d'irradiance, on choisit une équation de Haldane pour décrire les données (équivalent à une cinétique

de Monod avec un terme d'inhibition). Les paramètres du modèle sont ajustés par la méthode des moindres carrés sur l'écart absolu entre les points expérimentaux et le modèle, l'équation finale est donnée en (19). Par ailleurs, en lien avec ce qui est décrit dans la littérature [18] un terme seuil (le "-1,05") est ajouté à l'expression (19) pour représenter le point de compensation i.e. l'irradiance minimale pour engendrer une croissance. La seule exploitation des données Figure 44 n'aurait pas permis de conclure à la nécessité de l'introduction de ce terme. D'ailleurs, l'expérience réalisée ne vise pas spécifiquement à la détermination précise du point de compensation, *a fortiori* les données ne permettent pas *a priori* de mettre en valeur son existence. Cela implique une incertitude résiduelle quant à l'ajustement de ce paramètre. Le problème étant que contrairement au photobioréacteur utilisé pour l'expérience, ceux que l'on cherche à modéliser sont fortement hétérogènes en lumière et possèdent même une fraction non-négligeable de leur volume qui n'est pas éclairée. La valeur du point de compensation (qui détermine la décroissance de la biomasse aux faibles irradiances) revêt donc une importance significative dans la prévision des cinétiques dans le cas d'un photobioréacteur possédant une part de volume à l'obscurité. Dès lors, une amélioration ultérieure du modèle passerait, en premier lieu, par une quantification spécifique et fiable de ce paramètre. Dans la littérature des valeurs relevées sont comprises entre 1 et 5 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ [18], [100]–[102], ainsi l'ajustement qui en est fait est donc plausible. Une autre observation est qu'en régime permanent (i.e. exposition continue et constante), 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ est le maximum de viabilité de la spiruline, au-delà de cette valeur nous notons un effondrement systématique (non-quantifié) de la biomasse algale. Seconde remarque : Il existe par ailleurs une autre écriture rependue de μ_{lum} où la notion de point de compensation est substituée par un terme de mortalité (soustraction d'une constante au résultat de μ_{lum} et ce quel que soit l'irradiance) [61], [103]. Les deux écritures sont équivalentes (à l'ajustement des paramètres près), car il s'agit de deux translations (resp. suivant les abscisses et les ordonnées) conservant la forme de la fonction (de Haldane). En revanche l'équivalence n'est pas conservée si le terme de mortalité est appliqué à la croissance globale, son évaluation devient réacteur-spécifique.

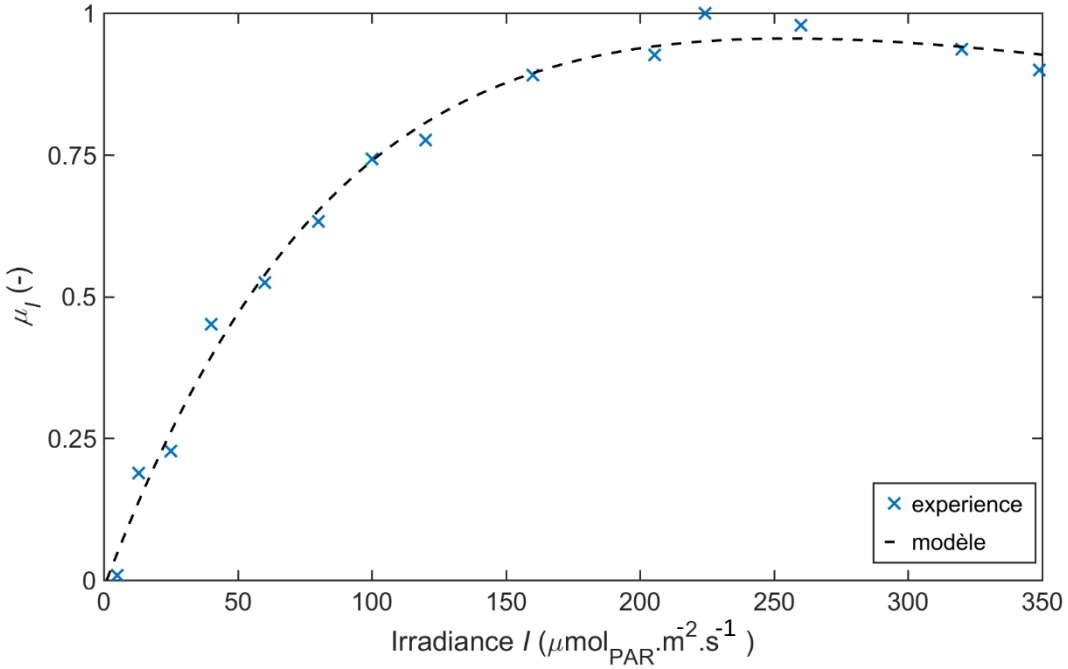


Figure 44 : Comparaison entre expérience et modèle (formule (19), R^2=0,99) pour la description de l'influence de l'irradiance sur la cinétique de croissance de la spiruline

$$\boldsymbol{\mu_{lum} = 2,57 \cdot \frac{(I - 1,05)}{200 + (I - 1,05) + \left(\frac{(I - 1,05)}{18,0}\right)^2}} \tag{19}$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_{lum}}$ la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance (en régime permanent en condition homogène) (comprise entre 0 et 1), $\boldsymbol{I}$ l'irradiance régnant au sein du volume de culture ($\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)

b. Exploitation en Réacteurs Non-Homogènes

Ensuite, se pose la question de l'exploitation d'un tel résultat. Comme on vient de le dire on cherche à faire croître la spiruline dans un environnement fortement hétérogène, où se côtoient les deux *extrema* opératoires, bien loin de la configuration idéale ayant servi à l'expérience décrite ci-avant. Pour prendre en compte la conséquence d'un éclairement inhomogène sur la croissance globale d'un photobioréacteur, il existe deux écritures (cf. I.2.B), suivant que l'on émet l'hypothèse que :

- Équation (20) , notée ia (pour instantaneous adaptation dans la littérature) : à tout instant la biomasse voit sa croissance dirigée par l'irradiance du lieu où elle se trouve, c'est-à-dire les irradiances locales (en chaque point du volume)

- Équation (21), notée fi (pour full intégration dans la littérature) :
  la croissance de la biomasse est fonction de l'irradiance moyenne à laquelle elle est exposée lors de la culture, soit la moyenne volumique du champ d'irradiance. Remarque : Son évaluation ne dispense pas pour autant de la connaissance du champ d'irradiance local

$$\mu_{ia}^{PBR} = \frac{1}{V} \cdot \iint \mu_{lum}(I) \cdot \delta V = \langle \mu_{lum}(I) \rangle \tag{20}$$

Avec : μ_{ia} la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance dans le cas d'une adaptation instantanée de la cinétique à l'irradiance (comprise entre 0 et 1), μ_{lum} la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance (en régime permanent, en condition homogène) (comprise entre 0 et 1), V le volume réactionnel, δV un volume élémentaire du réacteur, I l'irradiance régnant au sein du volume de culture

$$\mu_{fi}^{PBR} = \mu_{lum}\left(\frac{1}{V} \cdot \iint I \cdot \delta V\right) = \mu_{lum}(\langle I \rangle) \tag{21}$$

Avec : μ_{fi} la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance dans le cas d'un comportement intégré de la cinétique face à l'irradiance (comprise entre 0 et 1), μ_{lum} la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance (en régime permanent, en condition homogène) (comprise entre 0 et 1), V le volume réactionnel, δV un volume élémentaire du réacteur, I l'irradiance régnant au sein du volume de culture

Dès lors, l'approche de l'éclairement des photobioréacteurs revêt une nouvelle complexité, puisqu'il s'agit de composer avec la distribution des valeurs d'irradiances dans le volume (via les sources et la géométrie). Par exemple, dans le cas idéal où tous les points d'un photobioréacteur reçoivent la même irradiance, il est inutile de délivrer plus que 250 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ puisqu'il en résulterait une diminution de la vitesse de croissance tout en demandant plus d'énergie (cf. Figure 44). Ce n'est cependant pas le cas lorsque le

volume réactionnel est exposé à un champ de lumière avec un fort gradient, car augmenter le flux de lumière en parois revient à éclairer avec plus d'intensité plus profondément dans le volume, et donc à éclairer suffisamment pour la croissance une fraction de volume qui ne l'aurait pas été sinon. La fraction d la biomasse participant à la croissance s'en trouverait augmentée. C'est d'ailleurs un résultat de l'expérience sur l'intercorrélation entre lumière et température (en II.3.A) pour la laquelle on a observé une augmentation quasi-proportionnelle de la croissance avec le flux lumineux en parois éclairées. Remarque : La proportionnalité s'explique par le fait que, lors de l'expérience, l'irradiance en parois a varié entre 100 et 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, soit une gamme pour laquelle l'influence de la lumière évolue peu (contrairement à la gamme allant de 0 à 100 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mais qui est représentée de manière relativement semblable dans les gradients de lumière de chacun des points expérimentaux). C'est ici un cas particulier, on ne peut dans le cas général tirer de conclusion entre l'énergie lumineuse dissipée dans le système et la croissance qui en résulte, puisque μ_{lum} n'est pas linéaire avec I (cf. I.2.B).

De plus, étant donnée l'expression de la fonction μ_{lum} (équation (19), et dans le cas où l'on se base sur μ_{ia}^{PBR}), il découle certaines conclusions déjà relevées dans l'état de l'art. Premièrement, à puissance lumineuse constante, chercher à optimiser la cinétique globale du réacteur revient à vouloir répartir la lumière de la manière la plus uniforme possible. Cela s'explique par le fait que pour une fonction concave, la moyenne des images d'une collection de points est toujours inférieure à l'image de la moyenne de cette collection. Ainsi vaut-il mieux (à quantité égale) un flux de lumière plus faible mais correctement réparti dans le volume qu'un unique point source de forte puissance et une forte hétérogénéité, cf. la Figure 45. En découle le principe de dilution de la lumière qui consiste à optimiser le rapport surface éclairée sur volume de culture de l'équation (1). Bien que ce résultat mathématique soit évident, il n'est néanmoins pas trivial de le mettre en œuvre dans la pratique, car les gradients de lumière sont imposés par l'absorbance et la diffusivité du milieu due à la présence d'algues. Ainsi, opérer sur des cultures très peu concentrées, comme ici, peut être difficilement compatible avec la notion de production (puisqu'il y a très peu de biomasse). Une autre voie pour une distribution plus homogène de la lumière est de réduire la taille caractéristique du réacteur (sa profondeur optique) comparativement à celui du gradient de lumière (ex. du DicoFLUv [29], Algofilm [64] ou du photobioréacteur homogène) mais là encore cela est difficile à marier avec de très grands volumes de culture.

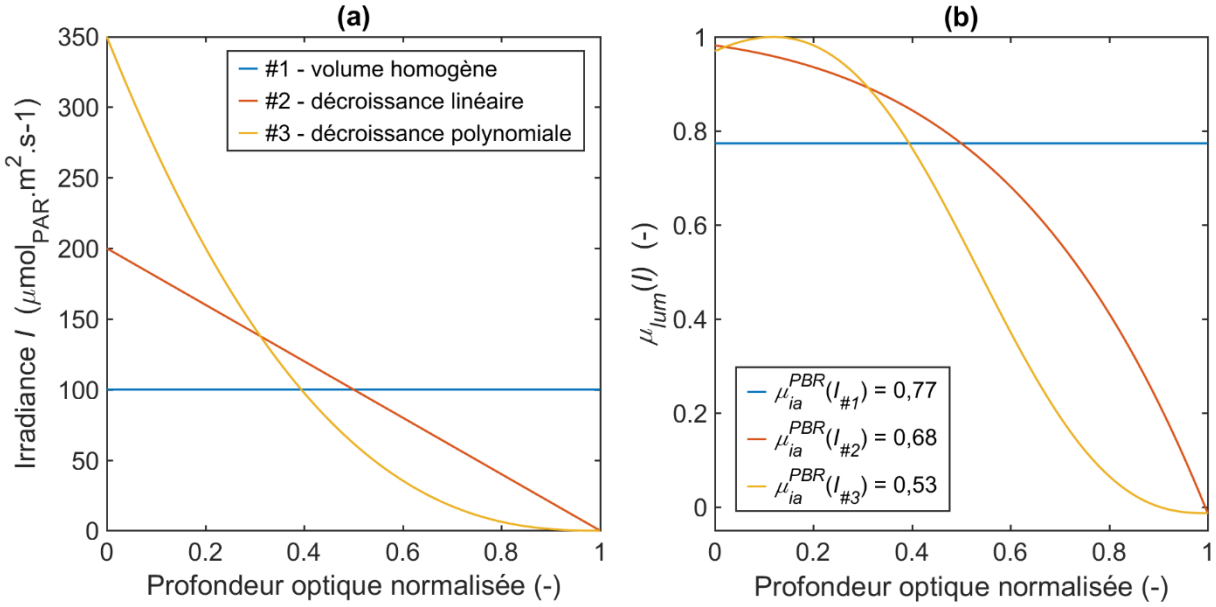


*Figure 45 : Comparaison en **(b)** des cinétiques résultantes dans le cas d'une adaptation instantanée de la cinétique à la lumière en fonction de trois distributions-modèles de lumière **(a)** dans le volume présentant différents degrés de disparité (resp. d'écarts types relatifs : 0 ; 0,56 et 1,02) mais possédant toutes la même irradiance moyenne dans le volume*

Par ailleurs, on remarque que la question du champ spatial d'irradiance ne se pose pas en ces termes lorsque que l'on se base sur l'hypothèse d'un comportement intégré (μ_{fi}^{PBR}, équation (21)) pour le calcul de la cinétique globale du photobioréacteur, puisque l'influence de la lumière s'applique justement sur la moyenne de la distribution (et est donc toujours plus favorable que l'hypothèse d'une adaptation instantanée).

Quant à la question de l'optimisation de la valeur de l'irradiance en parois (cf. I.2.B), la connaissance de μ_{lum} et de l'hétérogénéité en lumière permet aisément l'optimisation de la consigne du flux de lumière en parois pour la maximisation de la conversion de la lumière (i.e. de μ_I^{PBR}/I_0) à chaque instant/concentration ou pour l'ensemble de la gamme opératoire. Néanmoins, elle ne se pose pas ici, car étant donnée la profondeur optique de nos volumes de cultures (excepté pour le photobioréacteur homogène) le gradient de la lumière est toujours total (i.e. allant de la valeur en parois à 0 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, hormis à 0,1 et 0,2 $g \cdot L^{-1}$). Dans notre cas, il n'est donc jamais question de limiter le flux sortant de lumière.

En revanche, se pose la question de comment prendre en compte une surexposition possible (et volontaire) en parois. Par exemple, pour obtenir de vitesse de croissance

satisfaisante dans le photobioréacteur pilote, on a pu imposer une irradiance en parois de 1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, et ce sans que cela ne soit apparemment dommageable pour la culture. Remarque : La surface éclairée du photobioréacteur pilote est trois fois inférieure au photobioréacteur de paillasse relativement à son volume (cf. paramètre F), d'où une irradiance en parois trois fois supérieure. Cela s'explique par le fait que contrairement à l'expérience de caractérisation de μ_{lum}, l'exposition à de telles valeurs n'est alors que brève et occasionnelle et n'est donc pas délétère. Cela indique, encore une fois, qu'il y a une différence entre régime permanent et dynamique pour l'exposition à la lumière et que le comportement ne relève pas strictement d'une adaptation instantanée μ_{ia} à la lumière (sans quoi on assisterait à un décès progressif de la biomasse). Par contre on ne peut pas prédire la croissance dans de tels cas de figure (surexposition), par l'application des formule (20) et (21), étant donné que $\mu_{lum}(I)$ n'est pas définie pour ces valeurs de I (en régime permanent).

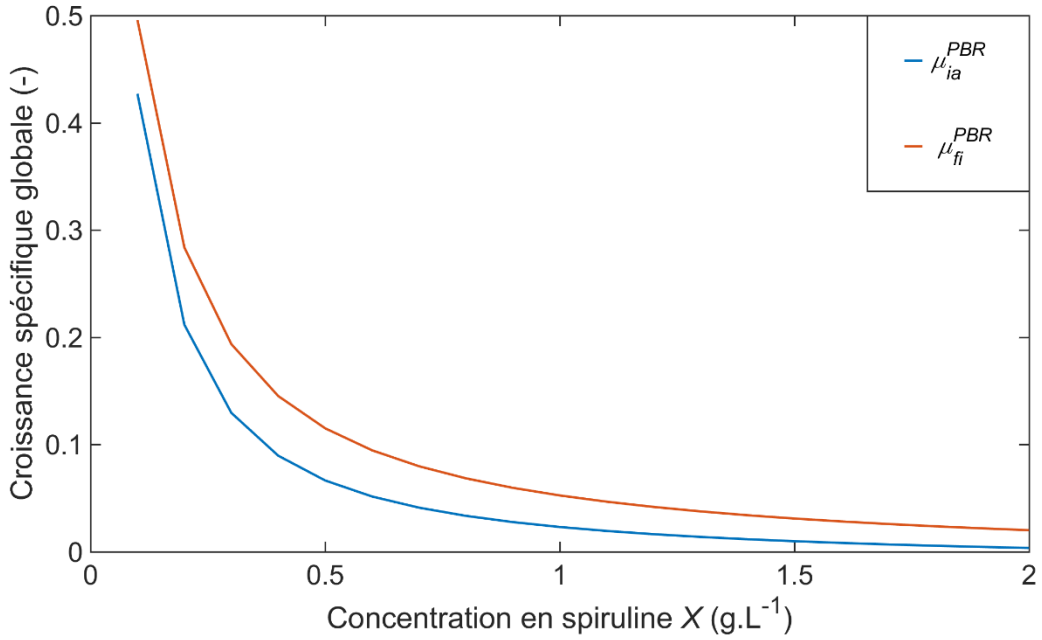


Figure 46 : Comparaison de l'influence de la lumière sur la cinétique de croissance globale du photobioréacteur (cf. III.2) en fonction de la concentration en biomasse pour le pilote éclairées par ses 20 sources LED à 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en paroi éclairée

Par contre, il est question de savoir quand l'une ou l'autre (μ_{ia}^{PBR} vs. μ_{fi}^{PBR}) est applicable. Par exemple, lorsque les équations (20) et (21) sont appliquées aux champs d'irradiance simulés du photobioréacteur pilote (calculés au chapitre suivant, III.2), cela conduit à une différence de prédiction de +100% entre les deux cinétiques globales

(à 1 $g \cdot L^{-1}$ de spiruline), voir Figure 46. Il est alors difficilement envisageable de ne pas répondre à la question du choix de la comptabilisation de l'hétérogénéité dans l'influence de l'éclairement sur la croissance. Il est à noter par ailleurs que le cas réel ne relève sans doute strictement ni de l'une ou de l'autre des deux hypothèses, mais se situe entre les deux. Ceci est l'objet de la partie suivante II.4.C.

C. Comportement Dynamique

a. Observations dans la Littérature

On a vu que dans le cas de nos photobioréacteurs (fortement inhomogènes en lumière) se posait la question de la prise en compte de la présence de toute une gamme d'irradiance au sein d'un unique réacteur. Plus encore, on a mis en évidence qu'il existe aussi un effet dynamique de l'exposition à la lumière, via l'innocuité d'une surexposition en parois, et également de l'effet observé des conditions de mélange sur la cinétique de croissance. Par là même, il est à supposer qu'au-delà du fait de devoir prendre en compte l'effet d'un champ inhomogène de lumière dans les volumes réactionnels, il faille aussi comptabiliser celui de l'aspect temporel de l'exposition à la lumière de la biomasse due au voyage de celle-ci dans le réacteur (et son champ inhomogène de lumière) dû à l'agitation. Ainsi, la fréquence d'occurrence et la durée (entre autres) des événements de passage d'une cellule dans les zones éclairées et obscures du réacteur exercent aussi une influence sur sa croissance. D'ailleurs ceci est sous-entendu dans l'écriture des équations (20) et (21) dans lesquelles la notion d'adaptation instantanée et intégrée posait déjà la question de la comparaison de la réponse biologique aux variations de lumière. Des lors, on cherche désormais à étudier l'effet de la fluctuation temporelle de la lumière perçue par la biomasse. Pour caractériser ce phénomène, il faut contrôler expérimentalement l'exposition de la biomasse à la lumière. Deux solutions techniques sont possibles. La première consiste à utiliser un photobioréacteur contenant deux zones distinctes et connues en éclairement (obscure et éclairée) et à maitriser les temps de séjour/passage du milieu réactionnel dans ces deux zones via l'écoulement [76]. La seconde, adoptée ici, consiste à faire en sorte que l'ensemble de la population algale soit soumise à la même irradiance (réacteur homogène en lumière) et à asservir la quantité de lumière que délivre la source au réacteur via un signal modulé/périodique.

Dans un premier temps, on se base sur une étude de la littérature de Xue *et al.* Parue en 2011 [75] qui étudie, entre autres, expérimentalement l'impact sur la cinétique de différentes fréquences d'exposition à la lumière. Pour cela, les expérimentateurs ont utilisé un photobioréacteur de faible épaisseur optique, 1 cm, assez similaire en géométrie à notre photobioréacteur dit homogène (pour lequel on s'est largement inspiré du dispositif de Xue *et al*). Les cultures sont conduites à faible concentration pour pouvoir supposer que le volume est homogène en éclairement et donc que l'ensemble de la population biologique subit les

mêmes conditions réactionnelles, y compris en lumière. Le protocole détaillé et le photobioréacteur sont décrits dans l'article en question, mais en voici les grandes lignes :

- Microalgue : *Spirulina Platensis*
- Milieu : Zarrouk (pH=9,25)
- Température de culture : 33°C (doubles parois avec caloporteur)
- Suivi : Densité optique mesurée à 560 nm (instant initial DO_{560}=0,39)
- Durée : 24 h
- Volume de culture : 60 mL, 1 cm de profondeur optique, géométrie plane
- Éclairement : panneau LED (spectre fourni), modulation par obturateur rotatif à vitesse contrôlée (signal créneau). Remarque : La courbe d'influence μ_{lum} ainsi que le flux de lumière incident sont donnés en $W \cdot m^{-2}$ et sont donc fonction du spectre d'émission de la source lumineuse.

Les principales conclusions de cette étude sont qu'il existe une variation progressive et significative de la cinétique de croissance en fonction de la fréquence d'exposition à la lumière, que cette variation semble être encadrée par les deux cas limites déjà cités (adaptation instantanée et comportement intégré), que l'amplitude de cette variation est fonction de l'intensité du flux de lumière et du rapport cyclique du signal (i.e. proportion de la phase d'éclairement sur une période, dans le cas d'un signal créneau comme ici). Le passage de μ_{ia} vers μ_{fi} se fait avec l'augmentation de la fréquence du signal, à savoir que plus les variations de lumière perçue sont rapides plus la cinétique a tendance à s'écrire en fonction de la valeur moyenne du signal (et vice versa). Par ailleurs, on relève que des études similaires existent sur d'autres microalgues, comme : *Dunaliella*, *Phaeodactylum*, *Nanochloropsis*, *Chlamydomonas* et *Chlorella* (pour le même ordre de grandeur de fréquences mises en jeux) [39], [76], [93], [104], [105]. Les conclusions de ces études ne sont, quant à elles, pas forcément les mêmes.

On commence donc par redéfinir, par les équations : (22) et (23), les formules des cinétiques μ_{ia} et μ_{fi} pour le nouveau cas de figure, car les différentes valeurs d'irradiances mises en jeux ne sont plus celles d'une hétérogénéité spatiale mais sont celles d'une fluctuations temporelles (ces fluctuations étant celles des sources). Le passage des équations

spatiales (20) et (21) vers les équations temporelles (22) et (23) est détaillé en partie III.3.B,. La discussion concernant μ_{ia} et μ_{fi} développée dans la partie précédente, II.4.B, reste identique. Ainsi, dans le cas d'une adaptation instantanée de la cinétique et pour une même valeur moyenne, un signal continu résultera en une meilleure cinétique qu'un signal offrant de grandes disparités de valeurs (typiquement : tout-où-rien/créneaux comme dans l'expérience) à cause de la concavité de μ_{lum} (en fonction de l'irradiance). Un exemple est traité en Figure 47. Et pour la même raison, la cinétique calculée via μ_{fi} est toujours plus favorable que celle via μ_{ia}.

$$\boldsymbol{\mu_{ia} = \frac{1}{p} \cdot \int_0^p \mu_{lum}(I(t)) \cdot \delta t = \overline{\mu_{lum}(I)}} \tag{22}$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_{ia}}$ la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance dans le cas d'une adaptation instantanée de la cinétique à l'irradiance (comprise entre 0 et 1), $\boldsymbol{\mu_{lum}}$ la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance (en régime permanent, en condition homogène) (comprise entre 0 et 1), $\boldsymbol{p}$ la période du signal, $\boldsymbol{I(t)}$ le signal temporel (périodique) d'irradiance

$$\boldsymbol{\mu_{fi} = \mu_{lum}\left(\frac{1}{p} \cdot \int_0^p I(t) \cdot \delta t\right) = \mu_{lum}(\bar{I})} \tag{23}$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_{fi}}$ la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance dans le cas d'un comportement intégré de la cinétique face à l'irradiance (comprise entre 0 et 1), $\boldsymbol{\mu_{lum}}$ la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance (en régime permanent, en condition homogène) (comprise entre 0 et 1), $\boldsymbol{p}$ la période du signal, $\boldsymbol{I(t)}$ le signal temporel (périodique) d'irradiance

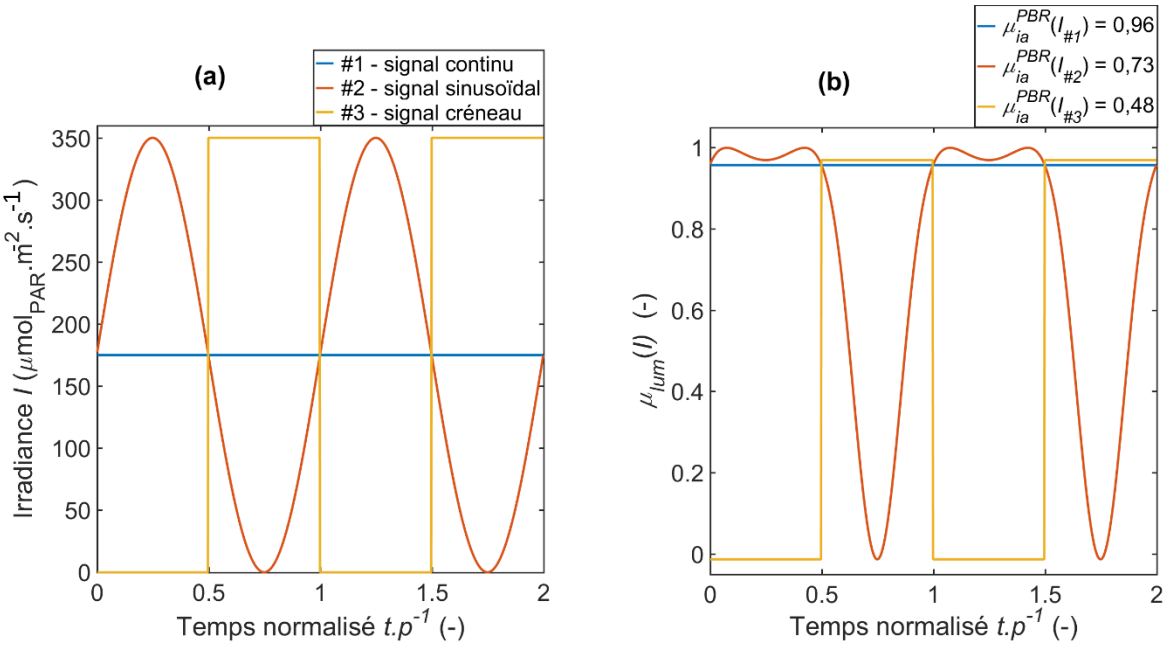


*Figure 47 : Comparaison en **(b)** des cinétiques résultantes dans le cas une adaptation instantanée de la cinétique à la lumière en fonction de trois signaux modèles de lumière, en **(a)**, présentant différents degrés de disparité (resp. d'écarts types relatifs : 0 ; 0,71 et 1,00) mais possédant toutes la même irradiance moyenne dans le temps*

b. Construction d'un Modèle Dynamique

À partir de là, on décide alors d'écrire le modèle directement sur la valeur I de d'irradiance perçue par les cellules au cours du temps. On introduit une variable intermédiaire dans le calcul qui va évoluer dynamiquement avec les variations de I, on la nomme variable interne et la note i. C'est au final sur cette variable i que l'on va procéder au calcul de la cinétique μ_{bio} pour le cas réel, via μ_{lum} et la formule (25). On introduit également un paramètre : τ_{bio} (homogène à un temps), de sorte que i tende vers I avec la constante de temps τ_{bio} selon l'équation (24). i définit en quelque sorte la capacité de croissance de la microalgue relativement à la lumière, on peut par exemple interpréter cette variable comme représentant le produit d'une étape cinétiquement déterminante dans le mécanisme biologique de conversion de la lumière. L'équation (24) n'est autre que l'équation d'un système intégrateur avec fréquence de coupure définissant un filtre passe bas. Ce modèle a la propriété de permettre, suivant les cas, soit de conserver le signal d'origine soit de le moyenner (illustration en Figure 48). On l'a construit ainsi en accord avec la définition des deux cas limites qui consistent à dire que la biomasse adapte instantanément sa cinétique à lumière ou réagit relativement à la moyenne (sur un temps long) de la lumière à laquelle elle est exposée.

Remarque : Contrairement à ce que peut laisser entendre l'énoncé de ces deux cas limites, le comportement de la biomasse est constant (via τ_{bio}) et la variable responsable du changement de la cinétique est le temps caractéristique de variation de la lumière subie par les cellules (relativement à τ_{bio}).

$$\frac{\delta i^{¢}}{\delta t} = \frac{1}{\tau_{bio}} \cdot \left(I^{@¢} - i^{¢} \right) \qquad (24)$$

$$avec : \ \tau_{bio} = 0,3 \ s$$

Avec : $i^{¢}$ la variable interne de la cellule ¢, $I^{@¢}$ l'irradiance subie physiquement par la cellule ¢, τ_{bio} la constante de temps de relaxation de la variable interne i (cf. Figure 49)

$$\mu_{bio}^{¢} = \frac{1}{p} \cdot \int_{0}^{p} \mu_{lum}\left(i^{¢}(t)\right) \cdot \delta t \qquad (25)$$

Avec : $\mu_{bio}^{¢}$ la cinétique spécifique de la biomasse par rapport à l'irradiance dans le cas réel (comprise entre 0 et 1), μ_{lum} la cinétique de la biomasse par rapport à l'irradiance (en régime permanent, en condition homogène) (comprise entre 0 et 1), p la période du signal, $i^{¢}(t)$ le signal temporel de la variable interne formule (24). Remarque : Dans le cas particulier d'un photobioréacteur parfaitement homogène, l'ensemble des éléments de la population algale ¢ possède la même cinétique (via I et i), donc : $\mu_{bio}^{¢} = \mu_{bio}^{PBR}$ (cf. formule (48) en IV.3.B).

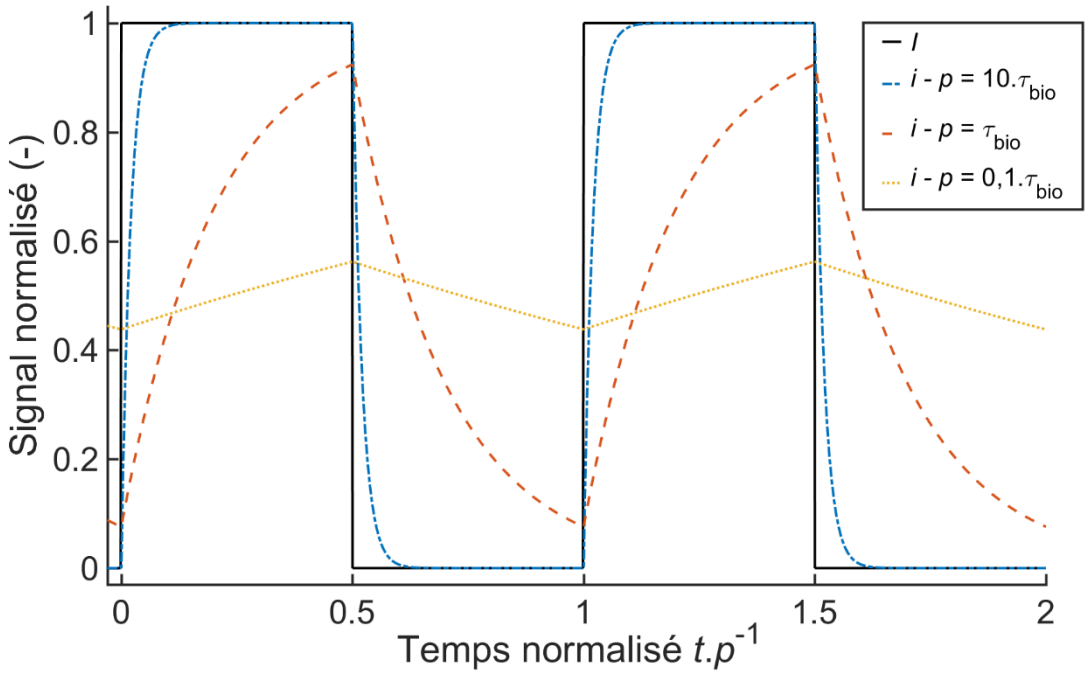


Figure 48 : Comparaison des valeurs de la variable interne i relativement à un signal periodique de I en fonction du rapport entre la période p de ce signal et τ_{bio}. Remarque : Le signal modèle utilisé est une fonction créneau d'amplitude 1 et de rapport cyclique 50%

Ce choix de modélisation vient dans la continuité de précédents travaux de modélisation de la dynamique de phénomènes biologiques au sein de l'équipe de recherche [106]–[108]. De même, on peut relever des pistes de réflexions similaires dans la littérature, notamment avec les travaux de Nikolaou *et al* [109] et Takache *et al* [110]. Ce n'est cependant pas la seule qui existe, on peut citer en exemple l'usage de la notion d'unité photosynthétique (PSU pour *PhotoSynthetic Unit*) introduit par Eilers et Peeters [68], puis repris par Wu et Merchuk [69], Hartmann [70] ou Nikolaou [71]. D'autres modèles dynamiques ont aussi été établis par Bernard et Chachuat [109], [111], [112]. Cependant, tous sont limités dans leur mise en œuvre à cause de leur complexité intrinsèque due au nombre de variables nécessaires au calcul. Ils sont aussi confrontés à la question de l'identification de leurs nombreux paramètres et ne sont, actuellement, qu'assez peu documentés concernant la Spiruline.

c. Ajustement du Modèle Relativement à la Littérature

L'avantage du modèle choisi ici est de ne demander l'ajustement d'un unique paramètre et, comme souhaité, d'être applicable à n'importe quel type d'exposition à la lumière (sous réserve qu'il soit connu). On procède à la caractérisation de τ_{bio} sur les données de Xue *et al*

que l'on a numérisées puis dont on a normalisé l'évolution entre zéro et un. On note que dans le modèle tel qu'il est écrit, la transition d'une cinétique à l'autre (de μ_{ia} vers μ_{fi}), n'est fonction que de la fréquence du signal, ainsi on peut se référer aux seules données normalisées (de μ_{bio}^{PBR}) pour caractériser τ_{bio}. L'amplitude de la transition (sur les valeurs absolues des vitesses de croissance) est, elle, fonction de la distribution des valeurs d'irradiances dans le signal et est dirigée par la concavité de la fonction μ_{lum} (un exemple Figure 47, où l'on compare l'effet de différents signaux modèles sur la dynamique du système).

Sur la Figure 49 sont superposés les données expérimentales normalisées de Xue *et al*. Ainsi que le résultat de la simulation obtenue sur le même signal de lumière modèle, à savoir de type créneau de rapport cyclique 20% et de fréquence variable. On précise que l'on a utilisé pour ces simulation la courbe de μ_{lum} fournie dans l'article en question (en figure 5) et une valeur de crête du signal de lumière à flux de 35 $W \cdot m^{-2}$. Néanmoins, on rappelle que cela n'a pas d'incidence sur la valeur de la fréquence de transition entre les deux cinétiques limites. On obtient alors une valeur de 0,30 s pour τ_{bio}, obtenue par la méthode des moindres carrés appliquée à l'écart absolu entre le modèle et les données. On peut voir dans la Figure 49 quelque chose d'analogue à un diagramme de Bode utilisé en électronique pour représenter des fonctions de transfert, puisqu'il s'agit ici aussi d'obtenir la réponse fréquentielle du système, à ceci près que pour un tel diagramme la solicitation est normalement une pulsation sinusoïdale et non de type créneau. Par ailleurs ici, le choix du signal créneau est ici justifié, premièrement par la simplicité de sa réalisation experimentale, mais aussi car il permet (selon notre modèle) d'observer la plus grande variation possible de la cinétique avec la fréquence (cf. Figure 47).

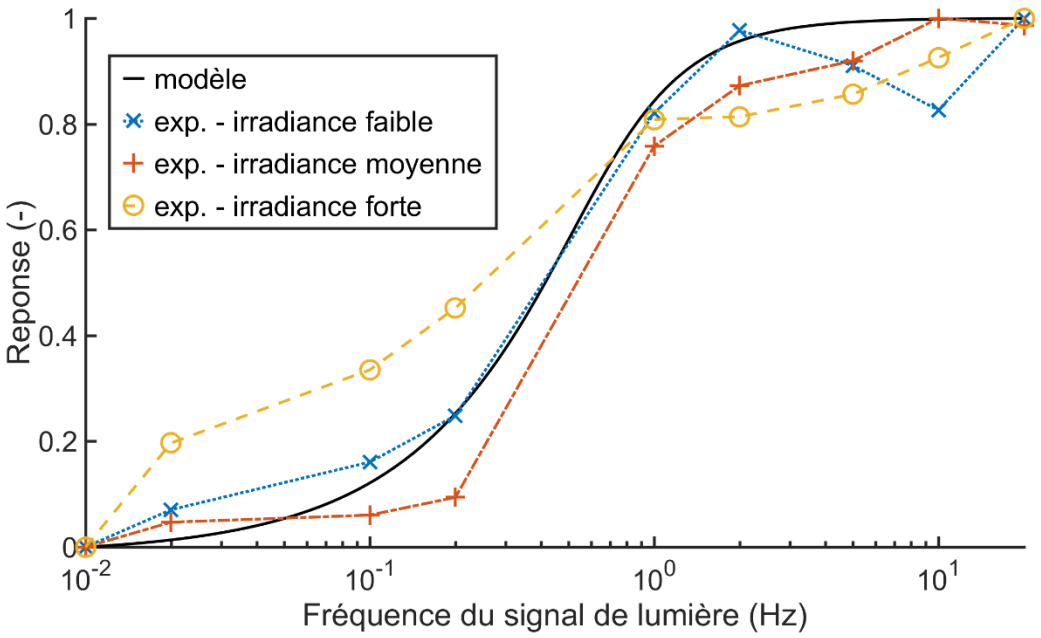


Figure 49 : Ajustement du paramètre τ_{bio} =0,3 s du modèle (formule (26)) sur les données expérimentales de Xue et al [75]. Remarque : Les séries faible, moyenne et forte irradiance correspondent resp. aux graphiques (b), (c) et (d) figure 6 de l'article cité. Le graphique (a) n'a pas été utilisé car l'évolution de la cinétique est jugée de trop faible amplitude.

De plus, avec ce type de modèle, on retrouve qualitativement d'autres résultats comme l'évolution de l'amplitude de cinétiques couverte sur la gamme de fréquence en fonction du flux de lumière délivré en crête du signal (Figure 50) et du rapport cyclique. Malheureusement, les prédictions du modèle ne sont que qualitatives, car il est sensible à la valeur de μ_{lum} aux faibles luminosités (d'autant plus qu'il s'agit ici d'un signal de lumière tout ou rien), ce problème était déjà soulevé en partie II.4.C. Remarque : Le jeu de données pose aussi à nouveau la question du traitement de la surexposition à la lumière en régime dynamique puisqu'un flux de 77,16 mW·cm^{-2} (figure 6.(d), [75]) est bien au-delà de la gamme de viabilité suggérée par la courbe de μ_{lum} donnée figure 5 [75] (d'où les valeurs négatives de la courbe violette Figure 50).

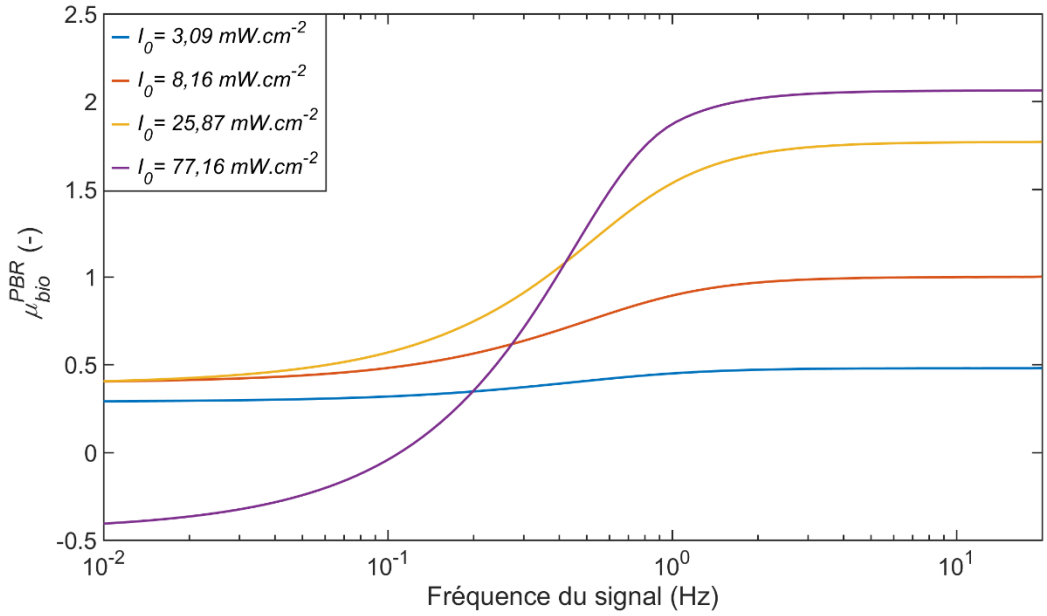


Figure 50 : Croissance spécifique relativement à la lumière en fonction de la fréquence du signal modélisé par les équations (24) et (25), pour les conditions opératoires de l'expérience de Xue et al (resp. (a),(b),(c) et (d) de la figure 6)

d. Conséquences et Propriétés du Modèles

Remarques :

- Ce modèle introduit un retard entre la contrainte physique et la conséquence biologique, ce qui d'un point de vue biologique semble plus raisonnable que de supposer une réaction strictement instantanée. Il en va a priori de même pour tous les autres paramètres opératoires, sauf que leurs dynamiques de variations sont infiniment plus lentes et ne viennent donc pas interférer avec les mécanismes biologiques (excepté éventuellement à l'instant initial de la culture). Du point de vue de ces autres paramètres, on est en régime permanent en tout instant, c'est d'ailleurs la définition de la loi de Monod (utilisée dans les précédentes corrélations).

- Le modèle ne prend pas en compte une éventuelle inhibition par la lumière de la réponse biologique, contrairement à d'autres modèles dynamiques comme celui de Eilers et Peeters [68] par exemple. Un flash bref d'une lumière de forte intensité ne peut impacter négativement la croissance, par contre une exposition prolongée à celle-ci peut détériorer la cinétique via la partie

décroissante de la courbe de μ_{lum} (cf. Figure 44). Par ailleurs, il est envisageable de prolonger la courbe de μ_{lum} vers les hautes valeurs d'irradiance avec une lumière fluctuante sans risquer l'effondrement de la culture comme en régime permanent (cf. la discussion sur la surexposition en parois en partie II.4.B).

- On utilise la même constante de temps pour décrire à la fois la croissance et la décroissance de i, ce qui implique qu'ainsi modélisée la microalgue construit et consomme ce que l'on interprète comme sa capacité à croître (relativement à la lumière) avec la même vitesse. Ce n'est peut-être pas exact, mais cela permet tout de même une description et une compréhension simple d'un mécanisme de réponse dynamique de la phase biologique face des variations de son environnement.

- En régime permanent (i.e. absence de variation de l'éclairement) : $i = I$, ce modèle ne remet donc pas en cause l'exploitation des données ayant servi à établir la fonction μ_{lum} dès lors que les acquisitions se sont déroulées sur un temps suffisamment long (par rapport à τ_{bio}) pour permettre la convergence de i.

- La croissance varie maintenant dans le temps (puisque fonction de $i(t)$ et $I^{@\varepsilon}(t)$), si l'exposition à la lumière est périodique alors on déduit la croissance de la l'intégration de la cinétique sur une période (cf. formules (22) et (23)). En revanche, Partie III.3.B se posera la question de la comptabilisation de la cinétique lorsqu'un signal de lumière arbitraire est appliqué

- De même, si l'ensemble des éléments de la population biologique n'est plus soumis au même signal de lumière (comme dans un photobioréacteur non-homogène en lumière), le calcul de la cinétique devient spécifique à chaque éléments/cellules, se posera alors aussi la question de la comptabilisation de la diversité des cinétiques de croissance au sein de la population biologique

- Le modèle n'est pas un opérateur linéaire quant aux signaux appliqués, à savoir que la cinétique résultante de la combinaison linéaire de deux signaux périodiques de fréquences différentes est différente de la combinaison linéaire des deux cinétiques induites par les signaux pris séparément (constaté par simulation numérique). Cela s'explique par le fait que la linéarité de la

dynamique du système, équation (24), est perdue par la composition par l'opération (25) qui est non-linéaire (via μ_{lum}, loi (19)). Ainsi une approche par analyse spectrale du signal (transformation en série de Fourrier) et fonction de transfert (comme l'aurait pu le laisser croire l'usage d'un pseudo-diagramme de Bode) n'est a priori pas triviale (sauf si les conclusions portent uniquement sur i, et non sur la croissance)

e. Vérification Expérimentale

Par ailleurs, on a cherché à confirmer l'observation faite par Xue *et al.*. À cette fin, on procède à une campagne expérimentale sur le photobioréacteur homogène. Les cultures sont réalisées en duplicas (cuves gauche et droite du photobioréacteur) dans le milieu de culture P3, sont thermostatées à 35°C, sont agitées par un train de bulles (qualitativement identiques) et sont conduites et suivies sur une durée de 24 h. Les fréquences étudiées vont de 50 à $\sim 1 \cdot 10^{-2}$ Hz, signal en créneaux et l'irradiance en parois est réglée à 208 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Il est à noter qu'il s'agit de la seule expérience réalisée avec une autre souche que celle du projet PLAISIR, celle-ci n'ayant pu être conservée jusqu'au moment de l'expérience en question. Pour la remplacer, nous avons utilisé une souche *Arthrospira Maxima* (souche 771 - Algobank, aimablement donnée par le CRITT-bio-industrie). Les résultats sont présentés en Figure 51.(a), où chaque point correspond à la moyenne des vitesses de croissance obtenues sur les deux cuves (systématiquement très proches) et dont on dégage la tendance via la moyenne entre les différents réplicas cohérents entre eux (i.e. les plus proches). Une fois normalisé et comparé aux données de la littérature déjà exploitées, Figure 51.(b), on constate que le comportement observé est assez similaire à une augmentation de la cinétique avec la fréquence d'exposition, du moins jusqu'à environ 1 Hz après quoi une décroissance est observée et qui n'apparaissait pas dans les résultats de Xue et al. Viennent quelques hypothèses pour expliquer cette différence :

- Le protocole de culture se trouve inadapté à cause du changement de la souche de spiruline, les besoins en nutriments, température et lumière sont potentiellement différents entre *Paracas* et *Maxima*.

- L'observation est hors gamme : puisque la partie croissante de notre courbe intervient plus tôt en fréquence (cf. Figure 51.(b)), il est possible que le phénomène (i.e. transition entre μ_{ia} et μ_{fi}) ne soit observé que partiellement,

la décroissance n'est alors qu'une conséquence d'une imprécision sur la mesure exagérée par la normalisation. Un ajustement de τ_{bio} sur ces données mène à une valeur de 1,0 s. Ce résultat semble tout de même qualitativement cohérent avec ce qui été obtenu précédemment, bien que critiquable puisque le modèle en l'état ne décrit que partiellement la tendance observée.

- Il y a effectivement un effet négatif des hautes fréquences sur la croissance pour cette souche, et la modélisation de la dynamique doit être adaptée (ex. passage de l'équation d'un passe-bas à un passe bande). Quand bien même ce serait le cas, étant donnée la faible probabilité d'occurrence d'une variation de la lumière dans la gamme de vitesse concernée au sein de nos photobioréacteur, on décide de conserver le modèle établi jusque-là pour la suite du travail (en supposant donc que ne pas décrire les hautes fréquences ne soit pas un problème dans notre cas de figure). Sachant que, quel que soit le modèle pour lequel on opte, la nécessité de prendre en compte l'aspect dynamique de la cinétique lié à la lumière n'est pas remis en question. Au contraire, cela incite à la poursuite de l'étude de la caractérisation de cette dynamique, car malgré la dispersion des points, il y existe une variation significative de la vitesse de croissance.

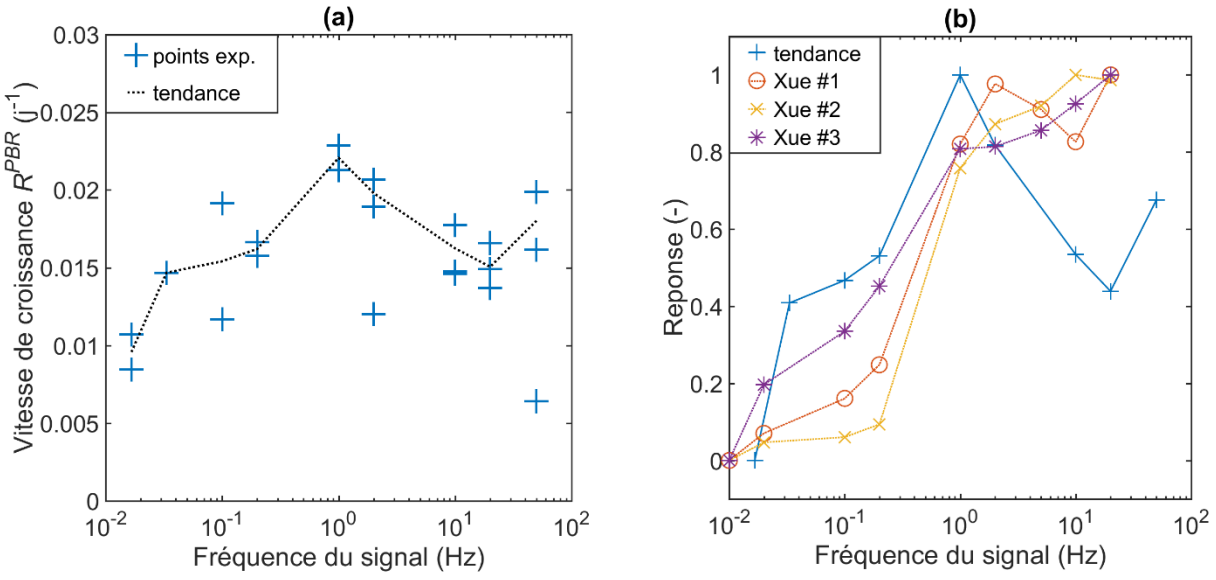


*Figure 51 : **(a)** Valeurs expérimentales des vitesses de croissance mesurées en fonction de la fréquence d'exposition à la lumière dans le photobioréacteur homogène (signal créneau, rapport cyclique 50%, I_0=208 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 35°C), **(b)** comparaison des données normalisée avec les valeurs précédemment extraites de la littérature [75] (resp. (b), (c) et (d) figure 6 pour #1, #2 et #3)*

De même, on relève que la reproductibilité est ici de moins bonne qualité comparativement aux expériences conduites sur les deux autres types de photobioréacteurs. On peut, en partie, expliquer cela par le fait qu'ici les cultures sont suivies sur des temps plus courts que d'ordinaire. Ainsi, lorsqu'usuellement les cinétiques sont lissées sur une semaine, on peut ici sans doute voir la trace d'autres comportements dynamiques comme l'adaptation de la biomasse à un changement brusque de conditions de cultures (vs. étuve), notamment lors des premières heures de culture (cf. Figure 52). Normalement cette dernière n'est pas significative une fois rapportée à l'échelle de la croissance sur une semaine de culture. Cette phase transitoire n'est alors pas exploitée pour la détermination de la vitesse de croissance. En revanche, on peut y voir un éventuel outil d'observation des régimes transitoires (cf. l'expérience sur les échelons de température en II.3.A).

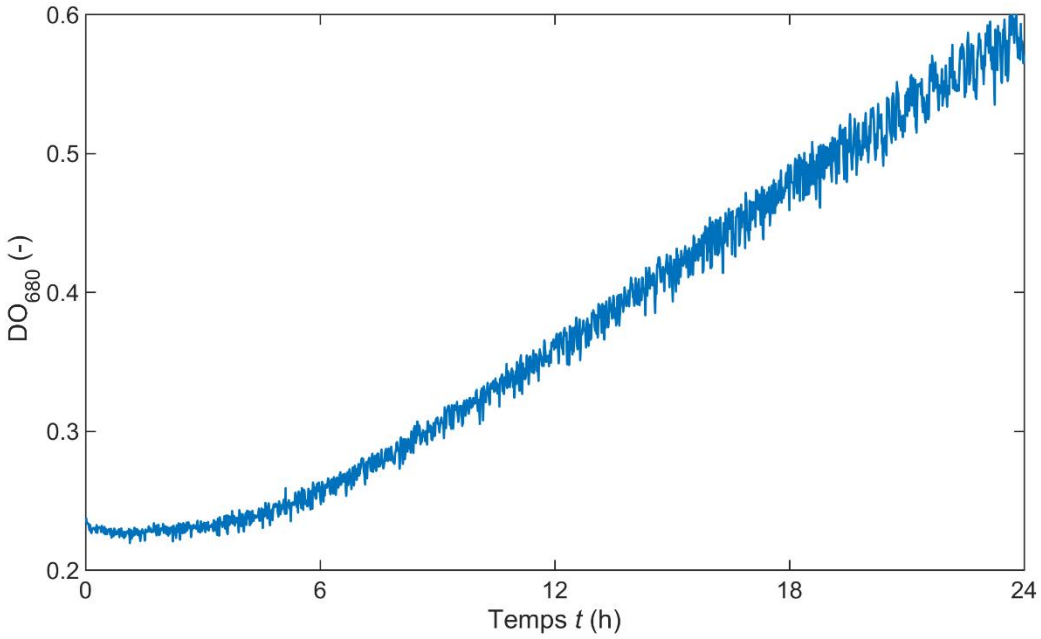


Figure 52 : Exemple typique d'une courbe de croissance enregistrée dans le photobioréacteur homogène (signal créneau, 1 Hz, rapport cyclique 50%, I_0=208 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 35°C)

Le travail de caractérisation de la dynamique biologique pourrait alors se poursuivre à travers d'autres expériences, à commencer par l'étude d'une gamme de fréquence plus étendue afin de vérifier l'éventualité que notre observation soit (pour cette souche en particulier) justement hors-gamme, mais aussi afin de relever d'autres dynamiques possibles (notamment à l'échelle des cycliques nycthéméraux). On peut aussi envisager l'étude de l'impact du rapport cyclique et de l'irradiance de crête afin de de finir de confirmer les autres résultats de Xue *et al.* (auxquels le modèle (24) de *i* est adapté). Également, on peut

poursuivre sur l'étude d'autres signaux qui pourrait répondre à la question de l'identification séparée de constantes de temps de montée et de descente de i (via τ_{bio}), possible si le signal présente une vitesse de montée et de descente différentes (ex. signal en dents de scie). De même on pourrait regarder les intercorrélations possibles avec les autres paramètres opératoires : température et composition du milieu. Et enfin, l'étude du phénomène selon un même protocole sur différentes microalgues pourrait permettre de révéler si le mécanisme mis en jeu est partagé. Si oui, en quelle proportion, ce qui permettrait peut-être d'étendre les conclusions faites ici sur la spiruline à l'ensemble des microalgues (ou le contraire, comme le présuppose notre observation).

III. Modélisation des Conditions de Culture

Dans ce chapitre, il est question de la mise en œuvre des modèles cinétiques établis lors de la caractérisation de la biomasse au chapitre II ci-avant. Mais avant, cela nécessite d'évaluer les paramètres d'entrées nécessaires à leur usage de ces modèles biologiques. Or, on l'a vu la maîtrise et la connaissance des conditions réactionnelles est, elle-même, chose complexe de par la nature du système étudié (cf. partie I.3). Ainsi la caractérisation du photobioréacteur requière elle-même de passer par les étapes de modélisation et simulation. Est donc exposé ci-après une proposition de description numérique d'un photobioréacteur. Cette fois, l'objectif est d'aider à la compréhension de l'impact du procédé, en tant que tel, sur le devenir de la biomasse et donc, si possible, d'améliorer sa conception. Le cas d'étude que l'on cherche ici à représenter est celui du photobioréacteur pilote. Sa conception ne permet pas la caractérisation de la biomasse, mais incarne en revanche bien les problématiques concernant la production industrielle (ex. volume fortement hétérogène en lumière). Par conséquent, les choix qui sont faits ici sont adaptés aux propriétés du pilote. Pour un autre cas de figure, des modifications peuvent alors être nécessaires, comme par exemple la prise en compte du transfert de matière entre le liquide et le gaz ou d'une autre technologie d'agitation. De même, l'effort expérimental étant principalement tourné vers l'étude des cinétiques de croissance, les résultats obtenus ici n'ont que très peu été confrontés avec la réalité expérimentale. Alors, bien que les modèles répondent effectivement à l'objectif de mise en évidence du lien entre procédé et croissance biologique, sans doute sont-ils encore perfectibles pour une description plus fidèle de la réalité (et gagner en quantitativité). En premier lieu, on procède à la description de l'évolution de la composition du milieu réactionnel. Puis, encore une fois on étudie plus en profondeur la question de l'exposition de la biomasse à la lumière à travers l'étude de sa propagation dans le photobioréacteur et du mélange en son sein. Et enfin, on illustre comment en un unique modèle, appelé "photobioréacteur numérique", on utilise l'ensemble des données acquises lors des précédentes étapes (physico-chimie, lumière et mélange) pour solliciter les modèles biologiques et ainsi simuler des croissances biologiques dans le photobioréacteur pilote.

1. Modélisation de la composition

a. Réduction du Système des Espèces Chimiques

Comme on a pu le voir au chapitre précédent (II.3), la croissance de la biomasse est en partie déterminée par la composition de son environnement et la température. On ignore l'effet de la pression car toute l'étude se déroule à pression ambiante/atmosphérique). Ont été établis des liens entre ces paramètres et la croissance (cf. modèles (14), (17) et (18)), et ce dans des conditions spécifiques et contrôlées. On s'intéresse maintenant à l'évaluation de la composition du milieu dans le cas général d'une culture de spiruline (restreint, bien sûr, au cadre technique de l'étude), afin d'alimenter ces modèles et d'être capable de simuler numériquement la croissance de la microalgue dans des conditions données (i.e. photobioréacteur et protocole).

Tout d'abord, étant donné que le procédé de culture que l'on cherche à représenter est thermostaté, il n'est pas besoin d'évaluer ce paramètre puisqu'il s'agit d'une valeur de consigne (connue et constante). Il n'est donc plus discuté de ce facteur par la suite. En revanche, ce n'aurait pas été le cas s'il l'on eût voulu simuler le fonctionnement d'un photobioréacteur lagunaire (en extérieur) soumis à des variations périodiques (quotidiennes et saisonnières) de température et où les calculs de transfert de chaleur (et changement de phase) aurait certainement été un passage obligé pour caractériser correctement les conditions opératoires.

Concernant la composition du milieu, on maitrise dans la pratique les quantités de matières introduites dans le milieu de culture, initialement ou bien même ultérieurement pendant la culture. Au-delà de ces apports, on sait observer en cours de culture des grandeurs macroscopiques mesurables facilement comme le potentiel en hydrogène ou le potentiel d'oxydo-réduction (resp. pH et pE). Mais ces mesures ne sont qu'une conséquence globale des différentes concentrations après que les interactions chimiques aient eu lieu et non leur représentation. On peut citer l'exemple le fait qu'une infinité de couples de concentrations initiales en bicarbonate et soude peuvent donner un pH identique, du moment que la proportion entre leurs deux concentrations demeure constante [98]. Ainsi, une description correcte du milieu ne peut se faire au simple regard de ces grandeurs mais bien par la prise en compte des réactions chimiques et des bilans de quantités de matières correspondantes (cf. en II.3.C, la volonté de décrire la cinétique en fonction des concentrations des espèces en solution et non des grandeurs telles quantités introduites et pH).

Cependant, un grand nombre d'espèces en solution implique aussi un certain nombre d'interactions entre elles : précipitations, coordinations, réactions totales ou d'équilibres. Toutefois, ces interactions peuvent être non-linéaires (dans leur d'équation), comme les complexations ou les précipitations, et surtout elles ne sont pas toutes établies, notamment pour les oligoéléments. Par conséquent, considérer l'intégralité des espèces composant le milieu viendrait non seulement complexifier le modèle dans sa résolution, mais augmente aussi la quantité de connaissances nécessaires à son écriture (i.e. toutes les interactions). Cela conforte la décision, prise en partie II.2, de restreindre la chimie du système à ses deux composés prépondérants pour la modélisation de la cinétique : nitrate et bicarbonate (ainsi que ses différentes formes en solution aqueuse). Pour rappel : on suppose que l'effet des autres espèces est constant dans le temps, soit parce que leur concentration et constante ou parce que leur variation est négligeable à l'échelle de l'étude (et peuvent alors être intégrée dans le modèle biologique à travers une constante μ_{max} dans l'expression du taux de croissance (équation(4)). Mais à travers cette simplification drastique du modèle, un certain nombre d'hypothèses ont été implicitement émises :

- on ignore toutes réactions chimiques (et leurs effets) qui peuvent survenir entre et avec toutes les espèces qui ne sont pas considérées ici
- l'ensemble des espèces sont et restent entièrement en solutions, et remplissent donc leurs rôles car biodisponibles (les concentrations calculées sont celle nécessaires à l'utilisation des modèles cinétiques)
- pour rappel : on émet aussi l'hypothèse dans l'évaluation des concentrations que le mélange est parfait sur l'ensemble du volume réactionnel (validé par la comparaison des temps caractéristiques de mélange, <1 min, et de croissance biologique, >1 j)

b. Mise en Équations de la Chimie du Système

On s'intéresse maintenant plus spécifiquement à la chimie des espèces restantes. Pour commencer le nitrate et les différentes formes du carbone sont toutes des espèces oxydantes (i.e. acceptrices d'électrons) et ne peuvent interagir entre elles dans une réaction d'oxydoréduction (cf. leur potentiel standard, [113]). Par ailleurs, le nitrate ne peut intervenir dans une réaction acidobasique dans nos conditions (cf. pK_{aN} négatif, visible au Tableau 5 en fin de partie). La nitration en milieu aqueux ne peut se faire qu'en présence d'un acide fort ou

en condition de très fortes pressions et température (mécanisme radicalaire). De plus le nitrate est suffisamment soluble dans l'eau (cf. Tableau 5) et non-volatil (dégradation avant ébullition), par conséquent le bilan matière seul suffit à l'estimation de sa concentration (via la loi (18)). On suppose que les solubilités changent suffisamment peu avec la température et l'activité ionique pour ne pas poser problème dans nos conditions.

$$\begin{cases} H_2CO_{3\,(aq)} + H_2O \leftrightarrow HCO_{3\,aq}^- + H_3O^+ \\ K_{a1} = \dfrac{[HCO_3^-]\cdot[H_3O^+]}{[H_2CO_3]} \end{cases}$$

$$\begin{cases} HCO_{3\,aq}^- + H_2O \leftrightarrow CO_{3\,aq}^{2-} + H_3O^+ \\ K_{a2} = \dfrac{[CO_3^{2-}]\cdot[H_3O^+]}{[HCO_3^-]} \end{cases}$$

$$\begin{cases} 2\cdot H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + HO^- \\ K_{ae} = [H_3O^+]\cdot[HO^-] \end{cases} \tag{26}$$

$$[HCO_3^-] + 2\cdot[CO_3^{2-}] + [HO^-] = [H_3O^+]$$

$$[CO_2] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] = [CO_2]_i + [HCO_3^-]_i + [CO_3^{2-}]_i$$

Avec : CO_{2aq} l'acide carbonique, HCO_3^- l'hydrogénocarbonate ou bicarbonate, CO_3^{2-} le carbonate, H_3O^+ l'hydroxyde, HO^- l'oxonium, $[x]$ la concentration en l'espèce x, K_e la constante de réaction d'autoprotolyse de l'eau, Ka_1 et Ka_2 resp. les constantes de première et seconde acidité de du bicarbonate. Et dans l'ordre : la première acidité du bicarbonate, la seconde acidité de bicarbonate, l'autoprotolyse de l'eau, l'électroneutralité du milieu, et la conservation de l'atome de carbone. Remarque : Les différents contre-ions sont des espèces spectatrices

$$\begin{cases} CO_{2\,(aq)} + H_2O \leftrightarrow H_2CO_{3\,(aq)} \\ K_h = \dfrac{[H_2CO_3]}{[CO_2]} \end{cases} \tag{27}$$

$$\begin{cases} \Delta[CO_{2\,aq}] = K_g^{CO_2} \cdot \left(C^* - [CO_{2\,aq}]\right) \\ C^* = H_{CO_2} \cdot P_{CO_2} \\ K_g^{CO_2} = K_g^{O_2} \cdot \sqrt{\dfrac{Diff_{CO_2}}{Diff_{O_2}}} \end{cases}$$

Avec : $[CO_{2(aq)}]$ *la concentration de dioxyde de carbone hydraté,* $[H_2CO_{3(aq)}]$ *la concentration d'acide carbonique,* K_h *le coefficient d'hydratation de dioxyde de carbone en solution,* $K_g^{CO_2}$ *le coefficient de transfert interfacial du dioxyde de carbone,* $K_g^{O_2}$ *le coefficient de transfert interfacial du dioxygène,* C^* *la solubilité de l'acide carbonique en solution aqueuse,* H_{CO_2} *la constante de Henry pour le dioxyde de carbone,* P_{CO_2} *la pression partielle en dioxyde de carbone du gaz (air atmosphérique),* $Diff_{CO_2}$ *coeficient de diffusion du dioxyde de carbone,* $Diff_{CO_2}$ *coefficient de diffusion du dioxygène*

Par contre, le bicarbonate n'est quant à lui pas inerte, comme on l'a introduit en partie II.3.C. C'est un amphotère, il qui intervient dans deux réactions d'équilibres acidobasiques (cf. pKa au Tableau 5 et digramme de prédominance en Figure 38) et il peut donc se trouver simultanément sous trois formes en solution : acide carbonique, bicarbonate (ou hydrogénocarbonate) et carbonate. Ces équilibres acidobasiques font, eux-mêmes, intervenir les formes de l'eau : ions hydroxyde et oxonium. Le système des espèces en solution nécessite donc cinq équations algébriques pour être entièrement déterminé, explicité en (26), respectivement : la première et la seconde acidité du carbone inorganique en milieu aqueux, l'autoprotolyse de l'eau, l'électroneutralité du milieu et enfin la conservation de la masse de carbone. Parmi ces espèces : le bicarbonate et le carbonate sont suffisamment solubles relativement à la formulation du milieu de culture (cf. Tableau 5) et ne sont par ailleurs pas volatils (température d'ébullition non-définie, [113]), seules les lois (18) et (26) sont donc à considérer. De même l'eau est volatile (cf. pression de vapeur saturante, Tableau 5), cependant sa quantité dans le réacteur est une consigne de régulation du procédé (connue et constante, comme pour la température). Ainsi les espèces de l'eau interviennent exclusivement dans les équations (26). Par contre, l'acide carbonique est en équilibre avec le dioxyde de carbone hydraté (en faveur de ce dernier, cf. K_h en Tableau 5), qui lui-même est un gaz volatile et peut donc être transféré entre le milieu et le bullage. Dès lors, il faut prendre en compte de transfert de matière à l'interface entre le liquide et le gaz, ce qu'on fait grâce à l'écriture de l'équation (27). Toutes les grandeurs physico-chimiques relatives aux équations (26),(27) sont énumérées en Tableau 5 ci-après.

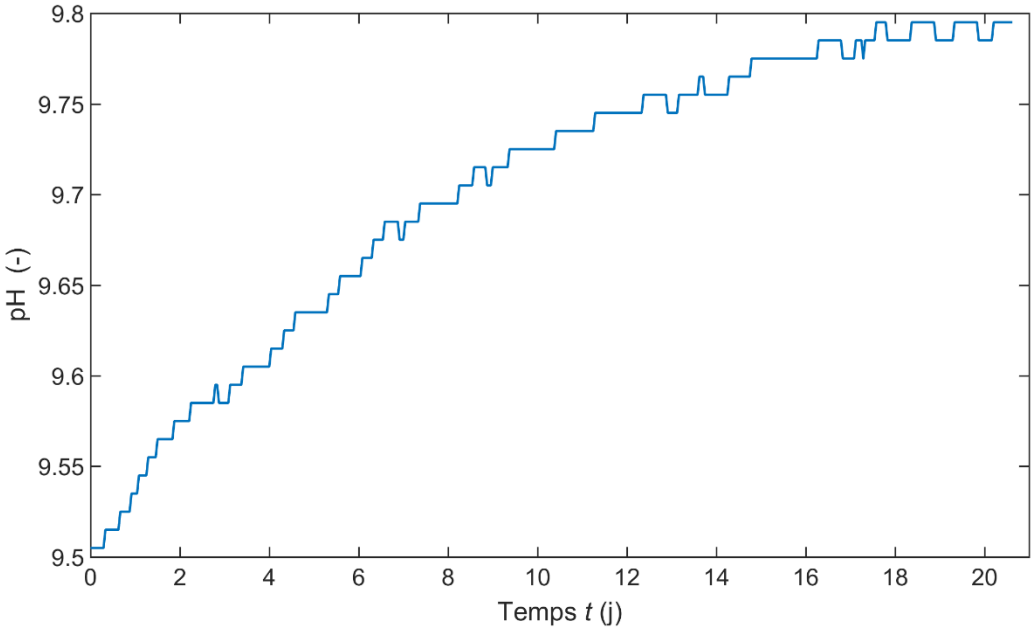


Figure 53 : Évolution du pH dans le pilote en présence du milieu de culture seul avec un bullage de 20L·min^{-1} et régulé à 35°C

En revanche, on constate expérimentalement Figure 53 que contrairement à ce que le pH basique de la solution pourrais laisser croire, celui-ci agit comme une émetteur et non comme un puit de dioxyde de carbone (que l'on déduit de l'augmentation du pH Figure 53 et du diagramme de prédominances Figure 38). Cela s'explique par la faible solubilité du dioxyde de carbone en solution aqueuse, car bien que cette espèce soit largement minoritaire à nos pH, la quantité totale de carbone inorganique en solution impose le sens du transfert (équation (27) : $[CO_{2(aq)}]>C^*$). Un tel résultat n'est pas souhaitable car il signifie qu'une fraction de notre principal intrant chimique est perdue et donc ne participe pas à la croissance biologique, sans compter l'aspect contradictoire d'émettre du dioxyde de carbone alors que le procédé vise une production plus écologique de protéines alimentaires. Heureusement, dans le cas du pilote ce phénomène est assez peu marqué. Ainsi, sur trois semaines et avec le débit de bullage maximum (i.e. 20 L·min^{-1}), seul 0,02 mol de dioxyde de carbone ont été transférés vers le gaz de bullage, soit moins de 10% de la quantité de carbone initialement introduite. Ainsi néglige-t-on par la suite le transfert interfacial (i.e. $K_g = 0\ s^{-1}$, lors des résolutions numériques). Autre remarque concernant la question du transfert de matière : le choix technique d'une agitation des cultures par bullage fait que l'on n'a jamais observé de limitation due une concentration excessive en dioxygène dissout. Mais, si le phénomène venait à devoir être pris en compte (ex. choix agitation mécanique en environnement clos), l'équation à ajouter dans le modèle serait alors similaire à celle sur le transfert du dioxyde de carbone (le coefficient étant d'ailleurs

déjà connu, cf. Tableau 5 et Figure 81) [38], [81]. Il resterait alors déterminer (ou extraire de la littérature) la loi μ_{O_2} décrivant l'influence de la concentration en dioxygène dissout sur la croissance.

Tableau 5 : Liste des grandeurs physiques utilisées pour représenter la physico chimie du milieu.

Grandeurs	Valeurs (unité)	Sources
Solubilité nitrate de potassium (eau, 20°C)	357 g·L^{-1}	Littérature : [114]
Potentiel de dissociation (pK_{aN}) de l'acide nitrique (HNO_3)	-1,37 (-)	Littérature : [113]
Solubilité du bicarbonate de sodium (eau, 20°C)	96 g·L^{-1}	Littérature : [115]
Solubilité de carbonate de sodium (eau, 20°C)	213 g·L^{-1}	Littérature : [116]
Pression de vapeur saturante de l'eau à 35°C	5,6 kPa	Application numérique
K_{a1}(T (K))	$exp\left(-\frac{12092,1}{T} - 36,7816 \cdot \ln(T) + 235,482\right)$	Littérature : [37]
K_{a2}(T (K))	$exp\left(-\frac{12431,7}{T} - 35,4819 \cdot \ln(T) + 220,067\right)$	Littérature : [37]
K_e(T (K))	$exp\left(-\frac{13445,9}{T} - 22,4773 \cdot \ln(T) + 140,932\right)$	Littérature : [37]
K_{a1} (35°C)	4,8501·10^{-7} (-)	Application numérique
K_{a2} (35°C)	5,5863·10^{-11} (-)	Application numérique
K_e (35°C)	2,0664·10^{-14} (-)	Application numérique
K_h (25°C)	1,70·10^{-3} (-)	Littérature : [117]
K_g^{CO2} (35°C, 10 L·min^{-1})	1,61·10^{-3} s^{-1}	Formule : (27)
K_g^{O2} (35°C, 10 L·min^{-1})	1,69·10^{-3} s^{-1}	Mesure expérimentale : Figure 81 (HAMILTON, visiferm do arc 120)
H_{CO2} (35°C)	3,4·10^{-2} mol·L^{-1}·atm^{-1}	Littérature : [118]

y_{CO2}^{air}	408 ppm	Littérature : [119]
P_{CO2}	$4{,}08 \cdot 10^{-4}$ atm	Loi de Raoult (hypothèse de gaz parfait)
$Diff_{CO2}$ (25°C)	$1{,}92 \cdot 10^{-9}$ $m^2 \cdot s^{-1}$	Littérature : [120]
$Diff_{O2}$ (25°C)	$2{,}10 \cdot 10^{-9}$ $m^2 \cdot s^{-1}$	Littérature : [120]

c. Validation

Par ailleurs, ou vérifie l'aptitude du modèle à décrire la composition du milieu de culture. Ainsi, la résolution des équations (26) appliquées aux quantités de matières initiales introduites dans le milieu P3 permet bien de retrouver le pH initial de 9,6 (après solubilisation de toutes les espèces). Par la même, on obtient les concentrations des différentes formes du carbone inorganique en solution nécessaires à l'évaluation de la cinétique μ_C (loi (17)), dans le respect du diagramme de prédominance (en Figure 38). La résolution se fait par une méthode de Newton-Raphson décrite en partie Modélisation des Conditions de Culture III.4. On peut aussi simuler la courbe de dosage du milieu de culture P3 par un acide fort (cf. Figure 54), ce qui prouve sa capacité à résoudre les équilibres et leur évolution face à une sollicitation externe (titrage ou croissance biologique). L'écart croissant entre les données et le modèle s'explique par le fait qu'expérimentalement l'acidification du milieu va de pair avec un dégazage important du dioxyde de carbone (peu soluble, cf. Tableau 5) qui n'est pas comptabilisé dans la simulation (cf. paragraphe précédent et Figure 53) puisque qu'un titrage n'est censé être le reflet que des seuls équilibres.

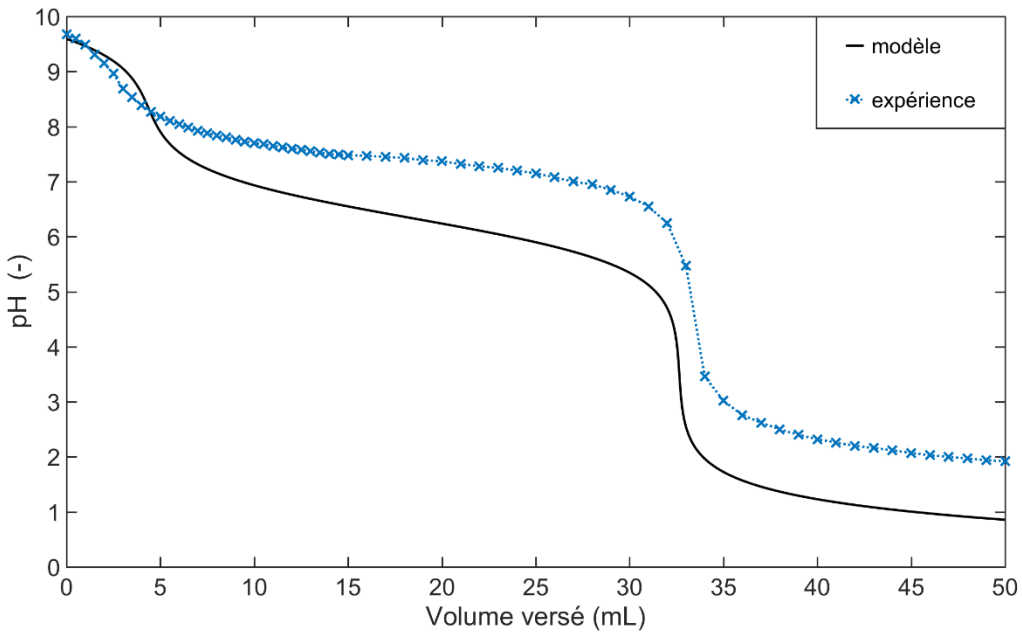


Figure 54 : Comparaison de l'évolution du pH lors du titrage du milieu P3 à 20°C par de l'acide chloridrique (HCl) à 2 mol·L^{-1} obtenu expérimentalement et selon le modèle (formule (26))

De plus, au-delà des simplifications déjà énoncées, on a fait aussi l'hypothèse d'une solution idéale dans le calcul des équilibres. Or, notre milieu est un électrolyte relativement concentré (i.e. >1 mol·L^{-1}), les activités chimiques ne devraient pas, en toute rigueur, être réduites aux simples concentrations molaires. La Figure 55 est un exemple de la limitation d'une telle simplification : lorsque l'on cherche tout de même à simuler le transfert interfacial du dioxyde de carbone, la simulation s'inscrit en faux en décrivant une absorption et non une désorption. Le calcul du transfert est sensible à la valeur de C^* qui certainement est mal évaluée pour nos conditions de concentration et température, notamment car la loi de Henry utilisée en (27) n'est pas adaptée aux cas des solutions concentrées et réactives. Pour y remédier et obtenir des descriptions plus proches de la réalité, des modèles existent et pourraient être implémentés , celui de Pitzer notamment [42].

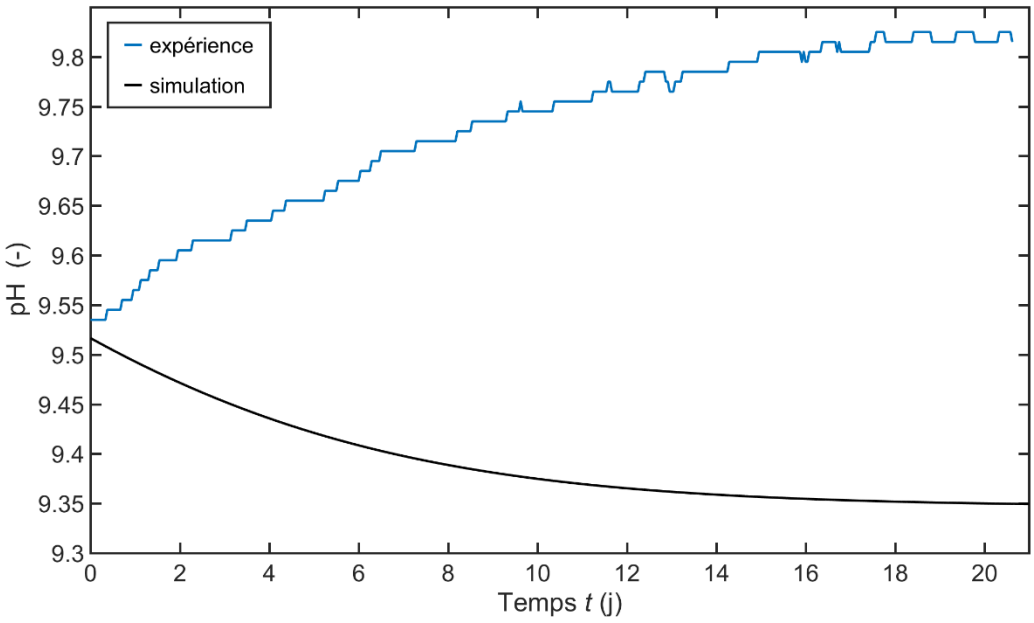


Figure 55 : Comparaison entre l'expérience et le modèle (formule (26)) de l'évolution du pH lors d'un bullage prolongé du milieu de culture P3 seul à 35°C à 20 L·min^{-1} d'injection de gaz. Remarque : Bien que le sens du transfert ne soit pas respecté (cf. paragraphe précédent), la vitesse de celui-ci semble par contre cohérente.

En guise de conclusion, comme croissance biologique et concentrations sont étroitement couplées, via les cinétiques et les consommations, le calcul des concentrations des espèces nutritives doit se faire en parallèle de celui de l'évolution de la concentration en biomasse. Les termes de croissance, consommations (et éventuellement le transfert) constituent un système d'équations différentielles, et celui des équilibres chimiques un système d'équation algébrique. Ce qui implique que pour procéder à la simulation d'une culture de microalgue, il faut résoudre un système algèbro-différentiel, ce qui est détaillé partie III.4. On fait ici l'hypothèse implicite que les équilibres acido-basiques sont instantanés (rapide devant toutes autres variations de concentration de notre système).

2. Modélisation de l'Éclairement

Comme on a pu le voir au chapitre I.3 et quantifié en II.4, notre biomasse étant photosynthétique, l'influence de l'éclairement revêt une importance capitale sur le devenir des cultures. Qui plus est, notre procédé possède la double complexité d'avoir un réacteur hétérogène (en lumière) et une cinétique avec un terme d'histoire (cf. variable interne i, équation (24)). Il est alors nécessaire de prendre en compte l'exposition à l'échelle de la cellule et non plus du réacteur. L'obtention de cette information nécessite deux étapes. En premier lieu, il faut acquérir l'information locale du champ d'irradiance au sein du volume réactionnel, c'est-à-dire déduire des données connues sur le photobioréacteur (intensité lumineuse des sources, géométries, etc…), les hétérogénéités en lumière internes à celui-ci. En second lieu, et toujours à partir des données connues (i.e. géométrie, débit gaz etc..) on procède par mécanique des fluides numérique (CFD) au calcul de l'écoulement au sein du photobioréacteur et à celui de la cinématique des cellules biologiques due à cet écoulement. Cette étape vise à obtenir l'information concernant l'histoire des cellules qui manquait encore. Ces deux informations, locale et temporelle, ainsi obtenues sont ensuite couplées par une approche Lagrangienne ce qui permet de fournir les données nécessaires à l'utilisation de notre modèle à l'échelle cellulaire. La particularité de ces deux étapes est qu'elles forment chacune un calcul numérique important et chronophage, mais ont en revanche l'avantage de ne pas être dépendantes du temps de culture mais des conditions opératoires seules. Il n'est alors pas nécessaire de calculer ces deux informations à chaque pas de temps de la simulation d'une culture biologique. En d'autres termes, leur établissement n'est réalisé qu'une unique fois et leur résultat est un paramètre de simulation globale de la croissance biologique. Par ailleurs, des problématiques similaires existent aussi en bioréacteurs conventionnels (type fermenteur), dans lesquels l'hétérogénéité touche la concentration en substrat (typiquement sucre ou oxygène dissous). Ces concentrations sont aussi dépendantes de la cinétique croissance/consommation elle-même, il n'est alors d'autres choix que de résoudre l'hétérogénéité au cours du temps. Une méthode est alors de réduire le problème grâce à une compartimentalisation du volume [83]. Dans notre cas d'étude du photobioréacteur, ce n'est pas nécessaire puisque l'hétérogénéité n'est pas transportée avec l'écoulement ou directement modifiée par les cinétiques locales de croissance.

A. Méthode Numérique : Monte-Carlo

La distribution de la lumière dans les photobioréacteurs diffère radicalement selon leur conception, même en conservant une source de lumière identique. De ces différences, il en résulte bien entendu des caractéristiques différentes entres les réacteurs : production, rendement et gamme opératoire réalisables pour n'en citer que trois.

Plusieurs facteurs influent sur la distribution des niveaux d'irradiance dans le réacteur :

- La source de lumière :
  - sa géométrie : ponctuelle (LED), linéique (néon), surfacique (panneau diffusant)
  - sa collimation : l'angle solide d'ouverture du faisceau (ex. laser vs. filament incandescent)
  - son spectre : le poids de chaque longueur d'onde dans le rayonnement total (ex. lampe à décharge au sodium vs rayonnement solaire/corps noir, cf. Figure 8)
  - sa puissance : le flux surfacique de photons, appelé irradiance, noté I et exprimé ici en micromoles de photons par mètre carré et par seconde : $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (photons dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 400 et 700 nm, appelé PAR, car seules ces longueurs d'ondes sont considérées utiles à la photosynthèse). Elle est communément estimée au niveau de la paroi interne (et éclairée) de la cuve (cf. II.1.C.)
- Le réacteur :
  - sa position par rapport à la source : distance et incidence du faisceau lumineux sur la paroi
  - propriété optique de la surface d'échange : matière et épaisseur de la paroi que la lumière doit traverser pour atteindre le milieu réactionnel (ex. verre, PMMA, surface libre, etc..)
  - sa géométrie : ex. plane, cylindrique, film de fluide, etc.

- Les propriétés optiques du milieu réactionnel :
    - absorbance
    - turbidité
    - indice de réfraction

Chacun de ces paramètres variant d'un PBR à l'autre, c'est autant d'erreurs que l'on fait lorsque l'on transpose les résultats obtenus lors d'une expérience sur un réacteur donné à un autre cas de figure. C'est pourquoi pour les photobioréacteurs, il est peu probable de réaliser un changement d'échelle (*scale-up*) correct vers une unité de production simplement en extrapolant des résultats obtenus sur paillasse, ce qui rend donc très difficile l'exercice de dimensionnement de ce type de procédé (cf. partie I.2.B). Une voie pour s'affranchir de cela est de prendre dans les calculs non plus les grandeurs macroscopiques comme le volume utile ou l'intensité de la source mais bien de passer par l'évaluation de la distribution de l'irradiance au sein du réacteur. En revanche, cela requiert la connaissance de tous les facteurs cités ci-avant mais aussi d'établir le calcul correspondant.

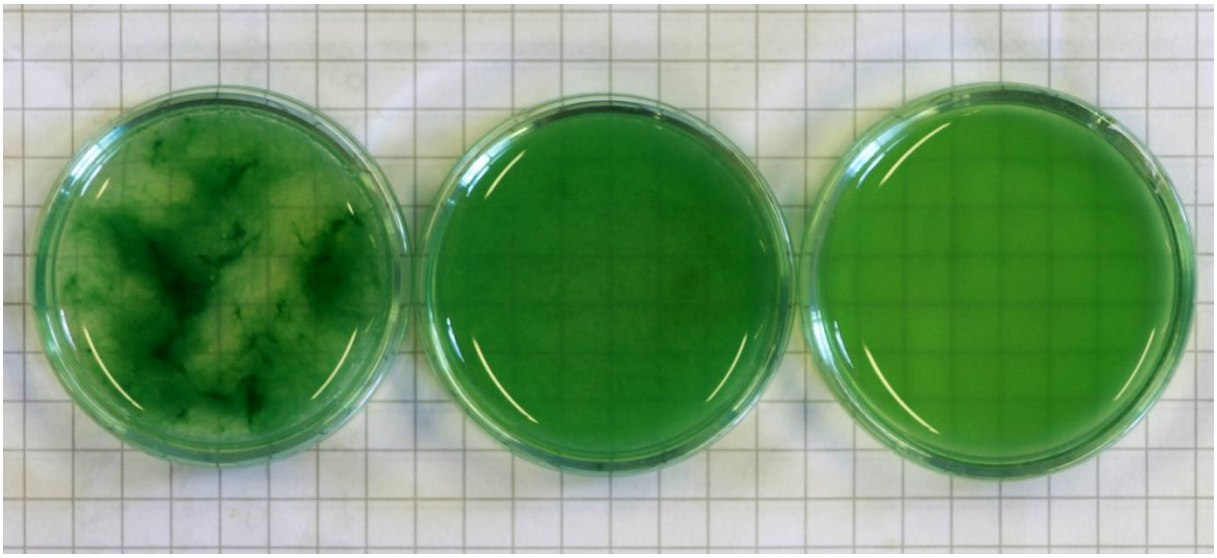


*Figure 56 : Photographie macro, avec : **(a)** un échantillon de spiruline ayant commencé à floculé (absence prolongé d'agitation), les propriétés optiques ne sont manifestement plus homogènes **(b)** un échantillon de spiruline telle qu'usuellement cultivée, il est turbide (diffusant), **(c)** un échantillon de spiruline dont on a partiellement détruit les parois cellulaires par cisaillement (ULTRA-TURAX) (dioptres responsable de la déviation de la lumière), il présente la même teinte que l'autre mais avec une diffusion moins importante de la lumière*

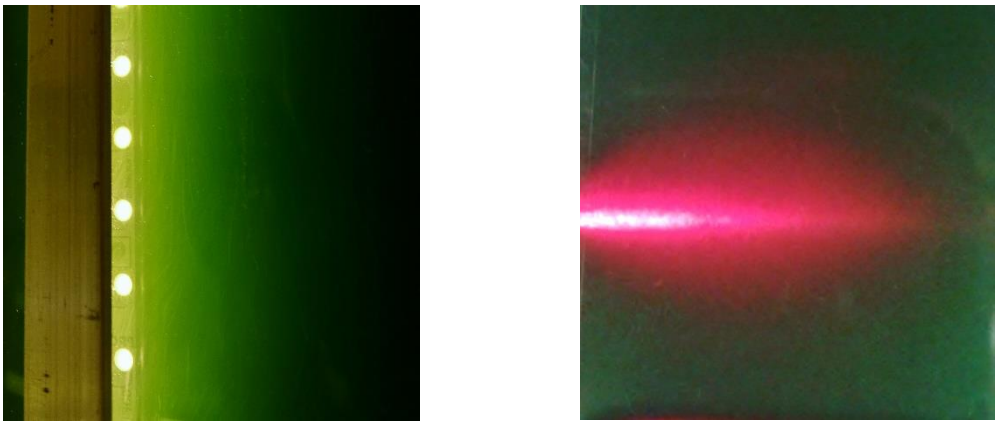


*Figure 57 : Photographies macro illustrant en **(a)** le gradient de lumière depuis une source, en **(b)** le phénomène de diffusion de la lumière avec l'incidence d'un laser (rouge) dans un échantillon de culture de faible épaisseur*

La difficulté est ici que le milieu est non seulement absorbant mais aussi turbide, voir Figure 56 et Figure 57, ce qui fait que la loi de Beer-Lambert ne peut être appliquée, sinon qu'au seul titre de première approximation (cf. discussion en partie II.1.B). Les équations de transfert radiatif (RTE) qui gouvernent la propagation de la lumière sont alors difficilement solvables analytiquement dans notre cas de figure. Cela est dû, justement, à la propagation non-rectiligne de la lumière dans nos cultures, car elles sont constituées d'une suspension solide (biomasse) et sont par conséquent inhomogènes en indices de réfraction. Ainsi au gré de son parcours un photon pourra être dévié de sa trajectoire s'il rencontre une cellule (et qu'il n'est pas absorbé par un pigment). C'est le phénomène de diffusion, il vient s'ajouter à l'absorption qui, elle, traduit la diminution de l'intensité lumineuse à mesure de la propagation dans le milieu, due cette fois au contenu pigmentaire de la biomasse. Néanmoins, il existe des solutions analytiques, mais pour des cas simples uniquement, comme celui d'un point source dans un milieu infini [121]. Dès lors que la géométrie du problème gagne en complexité il faut effectuer des approximations pour que des solutions analytiques existent encore. La simplification la plus répandue étant d'approximer la diffusion à un phénomène unidimensionnel, dit "méthode à deux-flux" [18], [63], consistant à réduire la diffusion au seul changement de sens le long d'une même direction. Cependant, une telle simplification n'est applicable qu'à des géométries possédant encore de fortes symétries, ainsi il est par exemple impossible de cette façon de décrire correctement la diffusion autour d'un faisceau de lumière comme ceux présents dans nos réacteurs. C'est pour cela que l'on s'est tourné vers une tout autre méthode dite de Monte-Carlo qui permet d'approcher la solution analytique de façon satisfaisante [66], [121]–[124]. Elle a pour avantage de pouvoir être applicable à tous les cas de figure possibles. Un parallèle peut être fait avec la différence qu'il y a en mécanique des

fluides entre résoudre analytiquement les équations Navier-Stoker sur des cas simples, comme un écoulement de Poiseuille, et le recours à la mécanique des fluides numérique pour tous les autres cas. Ainsi, quelle que soit la source lumineuse ou la géométrie du photobioréacteur, on peut par cette unique méthode obtenir la distribution de lumière au sein du volume : le champ d'irradiance. Une méthode de Monte-Carlo est une approche stochastique, elle est basée sur le calcul (itératif) d'un grand nombre d'étapes élémentaires qui répondent chacune individuellement aux équations de la physique et dont la résultante converge statistiquement vers la solution recherchée. Le principe en est simple : après avoir implémenté la géométrie des sources et du réacteur ainsi que les propriétés physiques du système, on calcule les trajectoires de photons depuis les sources au travers du volume. Lors de leur parcours, ces photons ou plutôt ces paquets de photons vont subir cinq types d'évènements :

- Initialisation : depuis un point source aléatoire dans une direction aléatoire
- Absorption : l'énergie qu'ils transportent diminue
- Diffusion : leur direction de propagation change aléatoirement
- Réflexion : changement de direction en atteignant une paroi
- Terminaison : son parcours s'arrête si l'énergie qu'ils transportent n'est plus jugée significative

Remarques :

- Les évènements aléatoires respectent bien évidemment les caractéristiques du système, comme la géométrie, les phénomènes physiques sous-jacents et les propriétés optiques
- Fondamentalement, un photon constitue un quantum d'énergie, ainsi nos photons "numériques" sont en réalité des groupes de photons ayant la même trajectoire et dont certains sont absorbés le long de celle-ci

Ce calcul de trajectoire est donc réalisé un grand nombre de fois, idéalement jusqu'à ce que l'ensemble des chemins optiques possibles dans le réacteur ait suffisamment été couvert pour décrire le cas réel par convergence statistique. Le facteur clef étant l'utilisation de termes aléatoires dans la façon dont les trajectoires sont calculées, permettant d'avoir à chaque itération une trajectoire calculée différente et donc de couvrir un peu plus l'ensemble des

chemins possibles. La contrepartie à la simplicité de cette méthode de Monte-Carlo est qu'elle est gourmande en ressources et/ou en temps de calculs de par la quantité d'opérations à effectuer. Néanmoins, l'usage d'outils de calcul récents (/puissants) et de quelques réductions du problème (comme on le verra ci-après) permettent d'obtenir des temps de calculs qui ne sont pas prohibitifs.

Par ailleurs les propriétés optiques utilisées dans nos simulations sont toutes issues de la littérature, et sont énumérées dans le Tableau 6. On suppose que les données de la littérature sont représentatives des propriétés optiques de notre souche de spiruline et du mileu de culture utilisé. Néanmoins, pour garder ces grandeurs invariables dans les simulations, il nous faut faire l'hypothèse que ces propriétés sont homogènes spatialement, ce qui est raisonnable car notre réacteur est parfaitement mélangé (cf. II.2). Mais on suppose aussi la validité cette assertion dans le temps, même si, comme discuté en II.1.B, il n'est pas trivial d'affirmer que la pigmentation et la morphologie de la biomasse (dont dépendent les propriétés optiques) n'évoluent pas dans le temps.

Tableau 6 : Liste des grandeurs physiques utilisées lors de la simulation du champ d'irradiance dans le photobioréacteur pilote

Grandeurs	Valeurs (unité)	Sources
Irradiance en paroi	350 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Arbitraire (condition de culture)
Ouverture du faisceau des sources lumineuses (LED)	120°	Arbitraire : spécification matériel
Largeur de la zone éclairée en paroi	15 mm	Arbitraire : géométrie du réacteur
Coefficient d'absorption	162 $m^2 \cdot kg^{-1}$	Littérature : [101]
Coefficient de diffusion	640 $m^2 \cdot kg^{-1}$	Littérature : [101]
Coefficient d'anisotropie la diffusion	0,97 (dans la fonction de phase de Henyey-Greenstein, équation (35))	Littérature : [125]
Indice de réfraction des parois (PMMA)	1,49	Littérature : [89]
Indice de réfraction du milieu de culture (indépendant de la présence de spiruline)	1,34	Mesure expérimentale : refractomètre (CETI, convex)

B. Implémentation

a. Construction de l'Algorithme

En ce sens, un programme a été développé pour l'occasion afin de mettre en œuvre la méthode de Monte Carlo (MATLAB, R2016a), il est constitué d'un seul et unique script présenté en Annexe E. La construction du script autour des différentes étapes de calcul, déjà citées, peut être résumée par l'organigramme de la Figure 58.

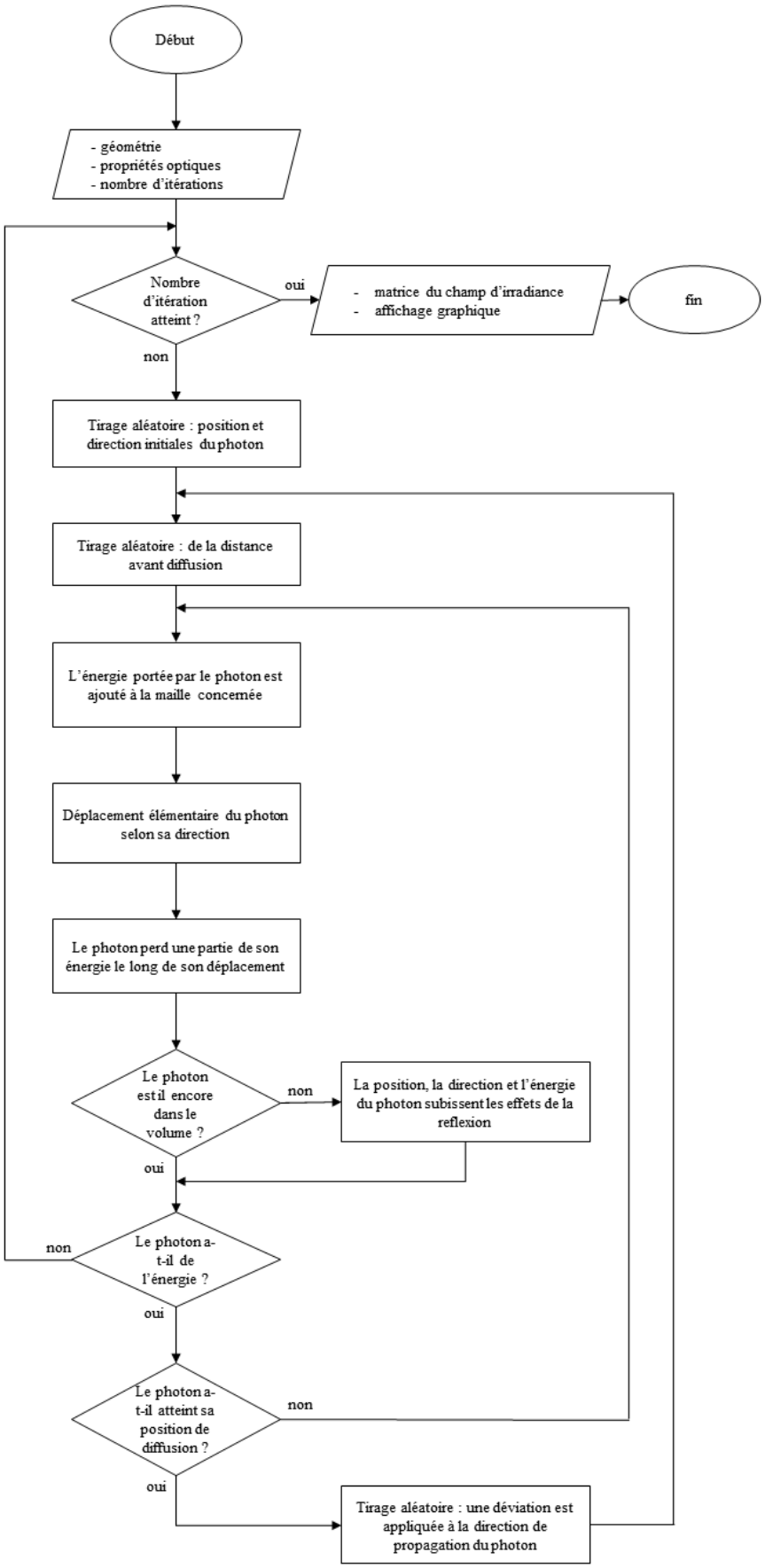


Figure 58 : Algorigramme de la méthode de Monte-Carlo pour le calcul des champs d'irradiance

Au regard du problème déjà cité du temps de calcul de la méthode, un certain nombre de choix ont été faits, *a priori* à l'écriture du code, pour le limiter autant que possible :

- La géométrie considérée dans le calcul est réduite autant que possible grâce aux différentes symétries dans le but de diminuer le nombre de cellules dans le maillage et donc de diminuer le nombre d'itérations nécessaires à la convergence. Concrètement, l'invariance selon l'axe vertical, O_z, du réacteur permet de projeter l'ensemble selon une simple section 2D horizontale. À travers cela, on néglige les effets du fond et du ciel du réacteur ou de la présence d'appendices tels les bulleurs ou les thermoplongeurs sur la distribution des niveaux d'irradiance, ou que les LED sont en réalité ponctuelles le long des rubans. La périodicité angulaire de la géométrie (cuve et sources) permet encore une fois de réduire la section considérée à sa moitié ou à son quart selon les cas.

- Le milieu est considéré homogène en matière de propriétés optiques et de concentration biologique. Cela implique d'ignorer la présence des bulles qui elles aussi entrainent un phénomène de diffusion par réfraction à leur interface [126], on se permet l'approximation ici car le réacteur présente un faible taux de gaz, <1%v (cf. partie suivante), et que les bulles sont principalement localisées dans la région de faible irradiance (bulleurs à mi-distance des deux parois éclairées). De même, cela suppose que la biomasse reste en suspension homogène, qu'il n'y a pas de ségrégation (ex. sédimentation/flottation, floculation, biofilm), mais cela est général à l'ensemble du modèle et à la pratique expérimentale.

- On n'étudie pas l'ensemble du spectre lumineux mais sa représentation moyenne sur la gamme de longueur d'onde d'intérêt : le PAR, de 400 à 700 nm. On utilise ainsi des propriétés optiques moyennées sur cette gamme de longueur d'onde, ce qui permet de ne faire qu'une seule fois le calcul pour l'ensemble du PAR. Il en découle cependant que par la suite tous les photons dans le PAR participent de façon équivalente à la cinétique de croissance, on dit alors que les photons sont "cinétiques" et que le comportement optique est "gris" [29].

- Le code a été écrit afin de permettre la parallélisation du calcul, à savoir que plusieurs trajectoires de photons sont calculées simultanément sur différents processeurs de l'ordinateur plutôt que de façon séquentielle sur un seul d'entre eux.

Une autre voie d'amélioration de la méthode, décrite en [127], a été envisagée sans pour autant être mise en place. Cette derniere consiste, dès lors que toutes les sources sont identiques, à utiliser plus encore le principe de réduction par symétrie en ne calculant la contribution que d'une unique source pour ensuite superposer cette contribution autant de fois que nécéssaire pour les représenter toutes, moyennant les translations/rotations apropriées. Permettant ainsi en un seul calcul de pouvoir accéder à tous les cas de figure d'éclairement possible, pour peu que ceux-ci diffèrent seulement par le nombre/position des sources en présence, comme ici, et non par leur nature ou géométrie.

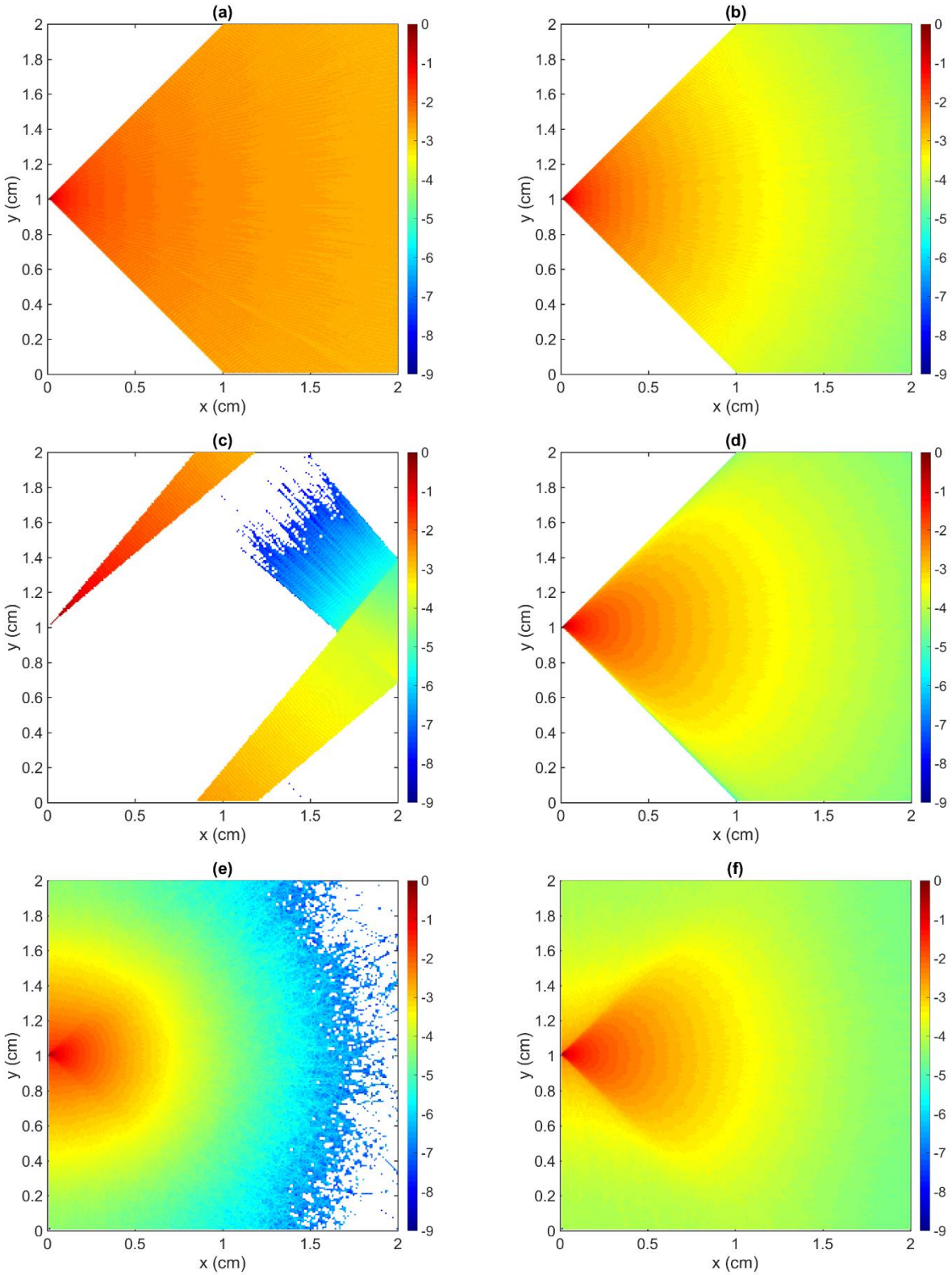
Par ailleurs, l'aspect stochastique de la méthode étant l'élément clef, on précise que les tirages aléatoires sont réalisés grâce aux fonctions $rand$ et $randi$ de la bibliothèque de MATLAB. Elles correspondent respectivement au tirage d'un nombre réel compris sur [0 ; 1] selon une densité de probabilité uniforme, et au tirage aléatoire d'un entier de façon uniforme dans un intervalle donné en argument, et dont on a bien sûr vérifié l'uniformité des distributions. Pour obtenir d'autres densités de probabilité, on procède par composition avec d'autres fonctions (ex. formule (35)). De même, on précise que l'ensemble des fonctions trigonométriques utilisées lors des calculs de trajectoires des photons sont définies en degrés et non en radian.

Avant d'aborder l'algorithme et le détail des équations des différentes étapes, voici en Figure 59 une illustration sur un cas simple des différents phénomènes pris en compte dans le calcul et ce qu'ils impliquent en matière de description des champs d'irradiance. Ainsi peut-on voir en premier lieu une propagation conservative dans un plan, puis successivement l'application : d'une absorbance, des conditions aux limites (symétrie et réflexion), d'une émission selon un cône solide et d'une propagation dans l'espace (projeté sur le plan Oxy), du phénomène de diffusion et enfin d'une anisotropie de la diffusion.

Remarques :

- Les zones blanches présentes dans les champs d'irradiance n'ont été traversées par aucun photon lors des simulations et doivent être vues comme une continuité des zones en bleu marine
- Les propriétés optiques qui ont été utilisées sont celles de nos cultures biologiques
- Les champs sont tous en échelle logarithmique (népérien) selon l'irradiance afin de mieux représenter leur grande variation spatiale

Figure 59 : Illustration de l'implémentation des différents phénomènes sur un cas simple d'une source émettant un faisceau homogène de demie angle 45° dans une géométrie de 20x20 mm, avec en :
-(a) la source émet selon une nappe plane, l'hétérogénéité en lumière provient seulement de la dilution géométrique de la lumière par conservation du flux
-(b) le milieu possède une absorbance, la lumière perd de son énergie le long de la propagation
-(c) on applique des conditions aux limites suivantes : symétrie pour y=0 ou 20 mm et réflexion total en x=20 mm (Remarque : Pour la lisibilité l'ouverture du faisceau est ici réduite à 10°)
-(d) la source émet maintenant selon un cône 3D
-(c) un coefficient de diffusion est appliqué au milieu mais celle-ci est isotrope
-(d) la diffusion obéit à la fonction de phase dite de Henyey-Greenstein avec g=0,9


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
x (cm)
y (cm)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
0.5
1.5
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9

b. Calcul de la trajectoire des Photons

Comme on l'a vu le photobioréacteur est représenté dans le calcul par sa projection sur Oxy (cf. invariance verticale et symétries) et elle-même fractionnée, cette représentation prend la forme d'une matrice, M, à deux dimensions venant mailler la géométrie de manière orthonormée. Chaque cellule de cette matrice représentant un volume élémentaire et dont la valeur n'est autre que le nombre de photons l'ayant traversée. Afin d'avoir un échantillonnage correct du champ d'irradiance, il a été décider de dimensionner M de sorte qu'il y ait au plus 1% de variation du niveau d'irradiance entre deux cellules adjacentes le long de la direction principale de propagation des photons, à savoir dans l'axe des sources en proche paroi. Il en résulte des mailles de 0,05 mm, soit $2{\cdot}10^4$ éléments par mètre.

On peut remarquer que lors des expériences menées précédemment ou dans le reste de la littérature, la grandeur opératoire concernant la lumière est systématiquement un flux surfacique, exprimé en puissance ($W{\cdot}m^2{\cdot}s^{-1}$) ou en quantité de photons ($\mu mol_{PAR}{\cdot}m^2{\cdot}s^{-1}$) et donné usuellement pour la face éclairée du réacteur. On obtient avec notre méthode la distribution volumique de la lumière (cf. discussion en II.4). Le résultat de notre méthode est, on l'a dit, la quantité de photon ayant traversé chaque cellule du maillage. Or, si on divise ce résultat par la superficie des faces de ces mailles (constante, car le maillage est régulier), on retombe sur un flux surfacique de lumière, aux différents points du volume du PBR. La nuance par rapport au cas usuel est qu'ici les photons peuvent provenir de toutes les directions possibles. Pour pouvoir tous les comptabiliser, il faut donc intégrer le flux de photons sur la surface fermée faite de l'ensemble des faces de chacune des mailles (ici les quatre arrêtes du carré représente par les mailles), là où, en revanche, en ne considérant que le flux entrant, supposé unidirectionnel, la seule face traversée par le flux suffit (i.e. la paroi éclairée).

Le principe de l'algorithme consiste à calculer la trajectoire de photons au sein du domaine d'étude depuis son émission par une source. Dans notre cas, les trajectoires sont constituées des positions successives occupées par les photons et obtenues de façon itérative par l'application d'un déplacement élémentaire, de longueur dep. Cette longueur, dep, est imposée comme étant égale à la taille caractéristique des mailles, à savoir la longueur des arrêtes d'une maille (valant : 0,05 mm), de sorte qu'à chaque itération le photon contribue en moyenne plus ou moins à incrémenter le contenu d'une nouvelle maille.

$$\boldsymbol{D} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{dx} & \boldsymbol{dy} \\ \boldsymbol{x} & \boldsymbol{y} \\ \boldsymbol{n} & \boldsymbol{p} \end{bmatrix} \tag{28}$$

Avec : $\boldsymbol{D}$ la matrice caractérisant un photon dans le plan Oxy , $\boldsymbol{x}$ et $\boldsymbol{y}$ les deux premières coordonnés (abscisse et ordonnée) de la position du photon dans le repère $Oxyz$, $\boldsymbol{dx}$ et $\boldsymbol{dy}$ la projection du déplacement élémentaire du photon suivant les axes Ox et Oy, $\boldsymbol{n}$ et $\boldsymbol{p}$ les indices (ligne et colonne) de la cellule du maillage contenant la position du photon.

Pour caractériser un photon se déplaçant dans le photobioréacteur, on utilise plusieurs variables : la première, D (explicitée en formule (28)), est une matrice 3x2 contenant les informations relativement à sa trajectoire dans le plan Oxy. Le deuxième, I, est un scalaire et correspond à la fraction d'énergie restante relativement à son état initial (point source), c'est-à-dire la fraction de photons dans le paquet n'ayant pas été absorbés.

D'autre part bien que pour des considérations de temps de calcul, on ne s'intéresse qu'au résultat sur une section plane, cela n'empêche en rien les photons de se déplacer dans les trois dimensions du volume. C'est bien une trajectoire gauche qui est calculée (i.e. hors du plan). M et D ne sont que des projections sur le plan Oxy. Une première conséquence est que dans la formule (28) : $dep \neq \sqrt{dx^2 + dy^2}$, puisqu'il manque la composante sur Oz. La maille contenant le photon est déduite assez simplement comme décrit en (29) et est calculée à chaque déplacement, avant l'incrémentation de la valeur de la maille concernée. Le maillage ne sert que pour l'enregistrement du résultat, la position exacte du photon est conservée et utilisée pour la suite du calcul.

Quant aux déplacements élémentaires selon Ox et Oy, dx et dy, ils ne sont calculés qu'initialement et à l'occasion d'une déviation/changement de direction. Pour cela, on se place dans le repère attaché au photon, $PHOTONxy$, et l'on caractérise sa direction en coordonnées sphériques $\{\theta\ ;\ \varphi\}$ (longitude, latitude). Les déviations sont quant à elles déterminées dans le repère de Frenet du photon en sphérique, cette fois par le couple $\{dev_1\ ;\ dev_2\}$, représentant respectivement la déviation angulaire du photon par rapport à sa direction et l'orientation de cette déviation autour de sa direction. L'ensemble des considérations géométriques sont illustrées en Figure 60. Les nouveaux déplacements élémentaires $\{dx\ ;\ dy\}$ sont obtenus par projection dans le repère $PHOTONxy$ puis dans Oxy suivant la formule (29). Les coordonnées successives du photon sont obtenues de façon explicite par la formule (31).

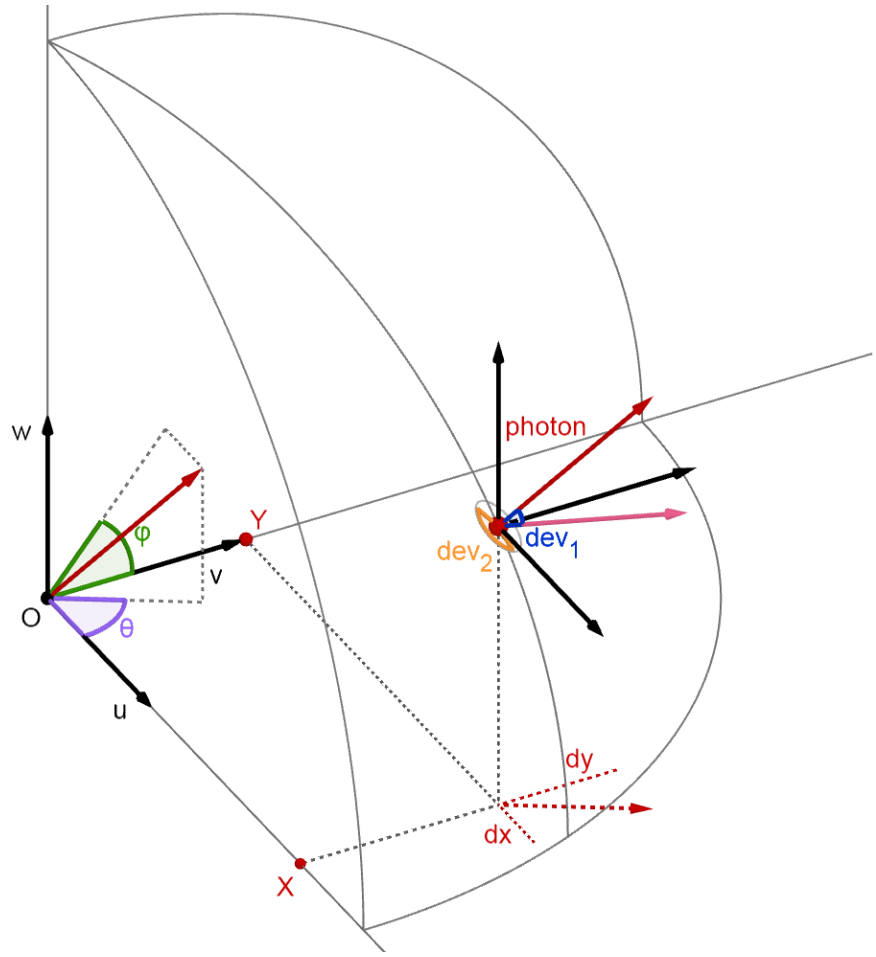


Figure 60 : Schéma dans l'espace du système de coordonnées utilisées dans le calcul de la trajectoire du photon, avec :
*- **en noir** : le repère Oxyz avec u, v et w resp. les vecteurs unitaires associées à Ox, Oy et Oz*
*- **en traits gris** : les traits de construction aidant à la lisibilité*
*- **en traits pointillés** : les différentes projections dans le repère Oxyz*
*- **en rouge :** le photon, son vecteur directeur (et son représentant dans Oxyz), et en **rose** son nouveau vecteur directeur après déviation*
*-**en violet, vert, bleu** et **jaune** : les différents angles, resp. θ, φ, dev_1 et dev_2*

$$\boldsymbol{D} = \begin{bmatrix} \underbrace{\boldsymbol{dep \cdot sin(\varphi) \cdot cos\,(\theta)}}_{\boldsymbol{x}} & \underbrace{\boldsymbol{dep \cdot sin(\varphi) \cdot sin\,(\theta)}}_{\boldsymbol{y}} \\ \boldsymbol{E\left(\frac{x}{dep}\right)} & \boldsymbol{E\left(\frac{y}{dep}\right)} \end{bmatrix} \tag{29}$$

*Avec : **D** la matrice caractérisant le photon dans Oxy, **dep** la longueur du déplacement élémentaire appliqué au photon entre deux itérations, $\{\boldsymbol{\theta}\ ;\ \boldsymbol{\varphi}\}$ l'orientation du vecteur directeur en coordonnées sphérique dans le repère $Oxyz$, $\{\boldsymbol{x}\ ;\ \boldsymbol{y}\}$ les coordonnées du photon dans le repère Oxy, **E** la fonction partie entière. Remarque : On rappelle que $dx = dy = dep$*

$$\begin{cases} \boldsymbol{\theta' = \theta + dev_1 \cdot sin\,(dev_2)} \\ \boldsymbol{\varphi' = \varphi + dev_1 \cdot cos(dev_2)} \end{cases} \tag{30}$$

Avec : $\{\boldsymbol{\theta}\ ;\ \boldsymbol{\varphi}\}$ *l'orientation du vecteur directeur en coordonnées sphériques dans le repère Oxyz,* $\{\boldsymbol{\theta'}\ ;\ \boldsymbol{\varphi'}\}$ *le même couple après déviation,* $\{\boldsymbol{dev_1}\ ;\ \boldsymbol{dev_2}\}$ *latitude et longitude de la déviation subis dans le repère de Frenet*

$$\boldsymbol{D_{n+1}} = \begin{bmatrix} \boldsymbol{dx_n} & \boldsymbol{dy_n} \\ \boldsymbol{x_n + dx_n} & \boldsymbol{y_n + dy_n} \\ \boldsymbol{E\left(\frac{x_n + dx_n}{dep}\right)} & \boldsymbol{E\left(\frac{y_n + dy_n}{dep}\right)} \end{bmatrix} \tag{31}$$

Avec : $\boldsymbol{D_{n+1}}$ *la matrice caractérisant le photon à l'itération n+1,* $\boldsymbol{dx_n}$ *et* $\boldsymbol{dy_n}$ *la projection du déplacement élémentaire du photon suivant les axes* $\boldsymbol{O_x}$ *et* $\boldsymbol{O_y}$ *à l'étape n,* $\boldsymbol{x_n}$ *et* $\boldsymbol{y_n}$ *les coordonnées du photon dans Oxy à l'étape n*

c. Initialisation de la Trajectoire des Photons

À l'initialisation d'un photon : I vaut 1 et P est tiré aléatoirement relativement aux points sources et incidences possibles. Dans notre cas, les différentes sources sont discrètes et délivrent systématiquement la même irradiance ainsi la probabilité de tirage est la même pour tous les points sources, on utilise alors la fonction $randi$. Une fois la source déterminée, on en déduit les coordonnées du photon en fonction de la géométrie des sources. Pour ce qui est de l'incidence, les LED utilisées éclairent sous la forme d'un faisceau, que l'on considère homogène et de demi-angle à la base de 60°, soit un cône d'angle solide de π sr (stéradian). Le tirage de l'incidence du photon est réalisé comme une déviation relativement à l'axe principal de la source, comme expliqué ci-dessus. Le faisceau étant symétrique, par rotation autour de son axe la variable dev_2 est uniformément tiré entre 0 et 360°. En revanche pour que le faisceau soit effectivement homogène en irradiance, dev_1 ne doit pas être uniforme car chaque déviation supplémentaire (par rapport à l'axe du faisceau) correspond à une augmentation toujours plus grande de l'angle solide couvert et donc du flux. Au final, l'incidence initiale répond à la formule (32). En Figure 61, on compare justement les faisceaux dont les incidences sont issues d'un tirage selon une loi uniforme ou selon la loi (32). D'autre part, on ne considère pas les photons provenant de la lumière ambiante à l'intérieur de la carène du réacteur, mesurée à 1 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, que l'on suppose négligeable.

$$\begin{cases} \boldsymbol{dev_1 = C \cdot \sqrt{rand}} \\ \boldsymbol{dev_2 = 360 \cdot rand} \end{cases} \tag{32}$$

*Avec : $\boldsymbol{dev_1}$ et $\boldsymbol{dev_2}$ les deux composantes de l'incidence initiale du photon, **C** le demi-angle d'ouverture du faisceau, **rand** la fonction aléatoire uniforme sur [0 ; 1]*

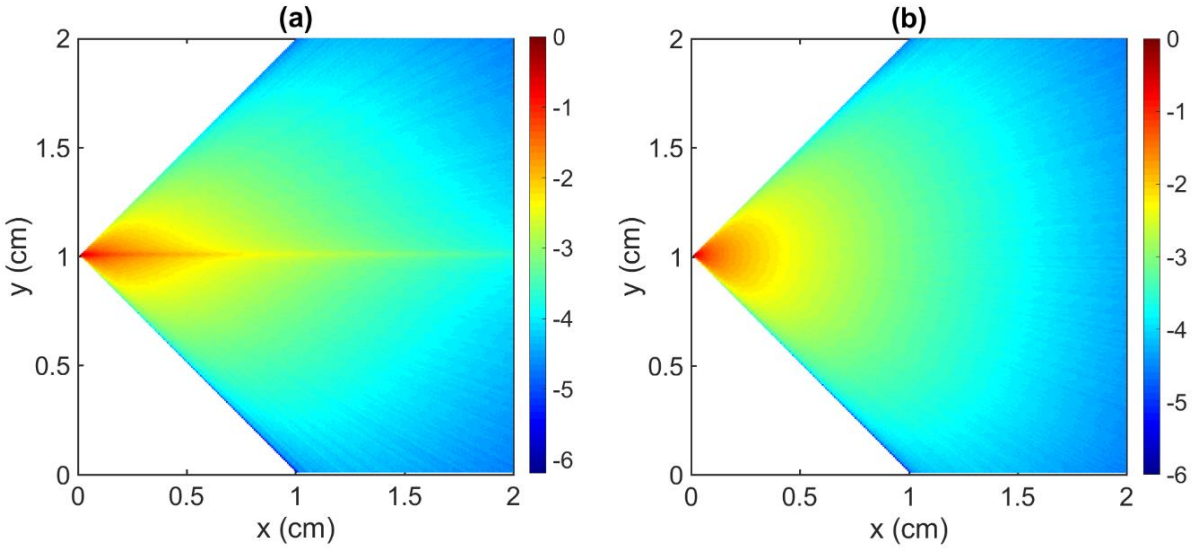


*Figure 61 : Logarithme népérien du champ d'irradiance dont les incidences ont été tirées par une loi uniforme **(a)**, par la loi (32) en **(b)**. Remarque : Les conditions de calcul sont décrites en Figure 59*

d. Conditions aux Limites

Lorsque le photon atteint une des parois du réacteur, on applique une loi de réflexion totale, dite spéculaire, selon la formule (33), par laquelle seul θ est impacté. On remarque par ailleurs qu'appliquer une réflexion de Fresnel serait rigoureusement plus exact, car elle permet d'obtenir les fractions d'énergie réflechie et transmise en fonction des indices de réfraction du milieu et de la paroi transparente. Néanmoins, cela requiert un calcul plus lourd dont on se dispense ici. Cela se justifie car dans le cas du réacteur étudié, l'épaisseur optique est grande (i.e. 175 mm) et les occurences de réflexion sont rares (hormis aux très faibles concentrations) et n'ont pas de poids significatif dans le résultat final (i.e. <2% sur la moyenne spatiale, <5% localement). Le choix d'utiliser la réflexion spéculaire a ici essentielement le rôle de condition limite. Autre condition limite : étant donné que seule une partie du photobioréacteur est

simulée, on applique des conditions de cylicité aux frontières du domaine le nécéssitant. Cela consiste, par exemple, à permuter les coordonnées x et y et ajouter/soutraire 90° à θ dans le cas où n'est simulé que le quart du domaine angulaire. De même, φ n'est pas affecté par ce changement. Cela est, entre autres, illustré Figure 59.

$$\boldsymbol{\theta'} = \mathbf{2} \cdot \boldsymbol{i} - \boldsymbol{\theta} \tag{33}$$

Avec : $\boldsymbol{\theta'}$ et $\boldsymbol{\theta}$ l'angle de la direction du photon projeté dans le plan Oxy resp. après et avant réflexion, $\boldsymbol{i}$ l'incidence du photon avec la paroi.

e. Calcul de l'Absorption de l'Énergie Lumineuse

Par la suite lors de son déplacement, dep, le photon perd toujours la même proportion de l'énergie qu'il transporte, I, par unité de longueur, qui suit donc une loi de décroissance exponentielle, formule (34), paramétré par E_a le coefficient d'absorption et X la concentration en biomasse. Ce qui n'est autre que la loi de Beer-Lambert valable ici car la diffusion n'intervient pas lors des déplacements élémentaires (entre les évènements de diffusion).

On rappelle qu'ici le coéfficient d'absorption E_a utilisé, et E_s ci-après, sont moyennés sur l'ensemble de la gamme de longueur d'onde d'interêt, par cette simplification qui permet de diminuer drastiquement l'ampleur du calcul. On fait l'hypothèse que tous les photons, quelles que soient leurs longueurs d'ondes, sont soumis aux mêmes propriétés optiques, et *a fortiori* contribueront de la même manière de façon équivalente à la croissance biologique. Si cette dernière assertion est fausse, on obtient alors un résultat qui intègre cette hétérogénéité sur le spectre, et par conséquent n'est donc valable que pour un spectre donné. D'ailleurs l'ensemble du travail experimental répond à cette limitation car il est réalisé avec un unique type de source lumineuse (references et description données en II.1.).

$$\boldsymbol{I_{n+1}} = \boldsymbol{I_n} \cdot \boldsymbol{e^{-E_a \cdot X \cdot dep}} \tag{34}$$

*Avec : $\boldsymbol{I_{n+1}}$ l'énergie du photon à l'itération n+1, $\boldsymbol{I_n}$ celle à l'itération n, **Ea** le coefficient d'absorption du milieu, **X** la concentration en spiruline du milieu, **dep** la distance parcourue entre les deux itérations*

f. Calcul de la Diffusion Lumineuse

Ensuite, on prend en compte la diffusion, qui est un événement discret, contrairement à l'absorption qui agit tout au long de la propagation (formule (34)). Sa probabilité d'occurrence suit une loi de densité de type logaritmique paramétrée par E_s le coefficient de diffusion du milieu et X la concentration de biomasse. Ainsi, pour chaque photon est initialement calculée la distance qu'il parcourt avant qu'il soit diffusé (libre parcours). Une fois cette distance atteinte, il est dévié de sa trajectoire, l'importance de cette déviation suit elle-même une loi de probabilité dite de Henyey-Greenstein [128]. Le calcul de la déviation se fait grâce à la réciproque de la fonction de répartition de cette même loi, formule (35). Puis elle est appliquée à la direction de propagation selon la formule (29) déjà vue et explicitée en (36). Après quoi on tire à nouveau une distance avant diffusion et ainsi de suite, comme l'indique l'algorigramme de la Figure 58. La particularité de la diffusion de Henyey-Greenstein est qu'il ne s'agit pas ici d'une diffusion isotrope, son anisotropie est régie par le coefficient g. Ce dernier est proche de 1 dans notre cas, ce qui permet de décrire une diffusion qui se fait, ici, principalement aux petits angles, avec donc très peu de rétro-diffusion, comme illustré en Figure 62. Remarquons que $g = 0$ décrit une diffusion isotrope. De plus, on prend garde à ne pas commettre l'erreur citée par [129], qui consiste à oublier au cours des étapes de calcul, en (35), que la variable utilisée est $cos(dev_1)$ et qu'ainsi la variable aléatoire doit être cosinusoïdale et non une loi uniforme. S'il elle est commise, cette mégarde conduit à une mauvaise description de la fonction de phase de la diffusion et donc à un champ d'irradiance érroné, la comparaison est donnée en Figure 63.

$$\boldsymbol{PROB(dev_1) = \frac{1}{4 \cdot \pi} \cdot \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2 \cdot g \cdot \cos(dev_1)]^{3/2}}}$$

$$\boldsymbol{prob(\omega) = \frac{1 - g^2}{2 \cdot g} \cdot \left\{(1 + g^2 - 2 \cdot g \cdot \omega)^{-1/2} - (1 + g)^{-1}\right\}} \qquad (35)$$

$$\boldsymbol{avec : \ \omega = cos\,(dev_1)}$$

$$\boldsymbol{\omega(P) = \frac{1}{2 \cdot g} \cdot \left\{1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 + g \cdot (2P - 1)}\right)^2\right\}}$$

Avec : $\boldsymbol{PROB(dev_1)}$ *la densité de probabilité de déviation* dev_1 *en fonction de la valeur de celle-ci,* $\boldsymbol{g}$ *le coefficient d'anisotropie dans la loi de Henyey-Greenstein,* $\boldsymbol{\omega}$ *une variable de calcul,* $\boldsymbol{prob(\omega)}$ *la fonction de répartition de la précédente loi (i.e. son intégrale),* $\boldsymbol{\omega(P)}$ *la*

réciproque de la précédente fonction par laquelle on obtient une valeur de déviation à partir d'un tirage aléatoire.

$$\begin{cases} d = \dfrac{-\ln(rand)}{E_s \cdot X} \\ dev_1 = \arccos\left(\dfrac{1 + g^2 - \dfrac{1 - g^2}{\left(1 - g + 2 \cdot g \cdot \cos(180 \cdot rand)\right)^2}}{2 \cdot g}\right) \\ dev_2 = rand \cdot 360 \end{cases} \quad (36)$$

Avec : $\mathbf{d}$ la distance que doit parcourir le photon avant d'être diffusé, $\mathbf{dev_1}$ et $\mathbf{dev_2}$ la déviation subie par le photon, $\mathbf{Es}$ le coefficient de diffusion, $\mathbf{rand}$ la variable aléatoire uniforme sur [0 ; 1], $\mathbf{X}$ la concentration en biomasse, $\mathbf{g}$ le coéfficient de Henyey-Greenstein, $\mathbf{ln}$ le logarithme népérien

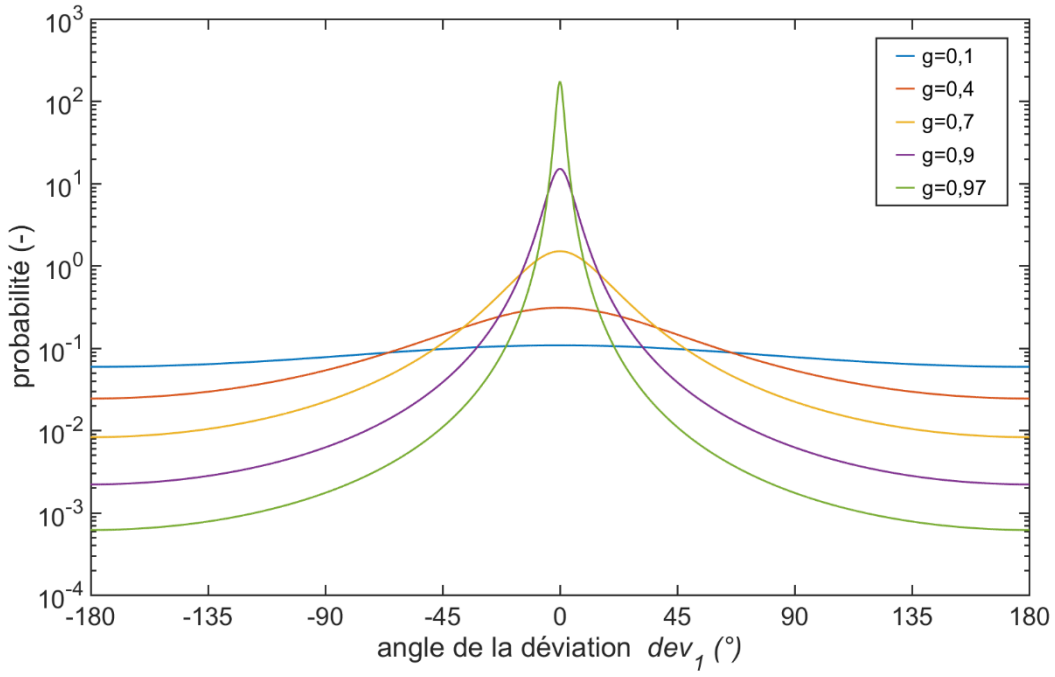


Figure 62 : Densité de probabilité de l'angle de diffusion dev_1 (formule (36)) en fonction du paramètre 'g'

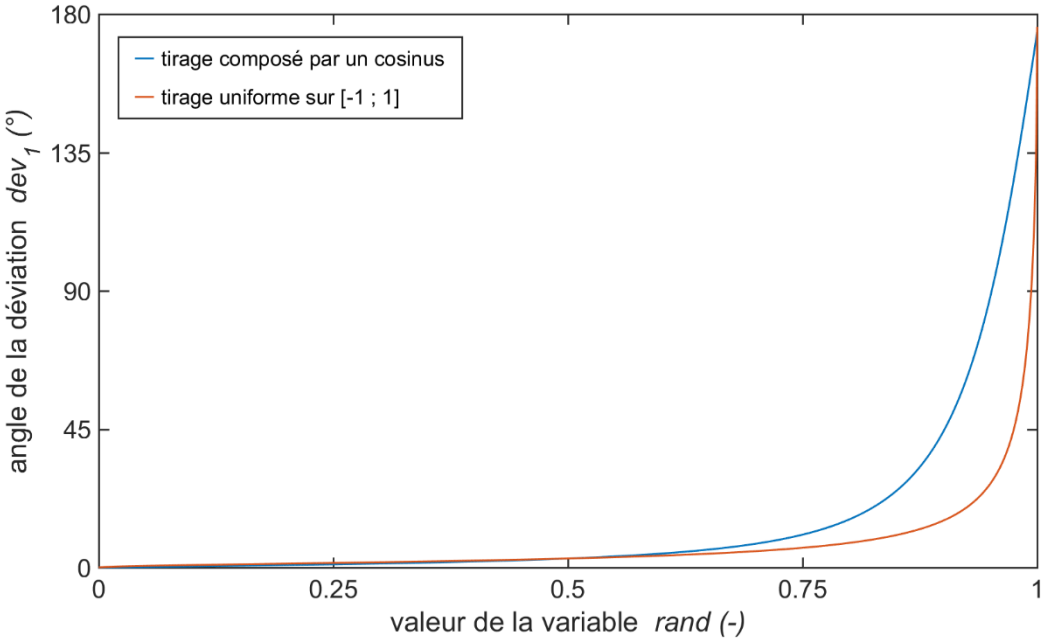


Figure 63 : Comparaison de l'aspect de la fonction déduisant l'angle de déviation dev_1 *:*
- si la variable aléatoire suit une distribution cosinusoïdale (i.e. composé par : $f : x \rightarrow cos\,(x)$*)*
- si la variable aléatoire est uniforme (i.e. composé par $f : x \rightarrow 2 \cdot x - 1$*)*
Remarque : La fonction en question a image sur [-1 ; 1]

g. Terminaison du Calcul de Trajectoire

Pour finir, la loi de décroissance de l'énergie portée par les photons dans la simulation, (34), implique que leurs intensités ne deviennent jamais nulles. En l'état, cela conduit à des boucles infinies de calculs, puisque jamais ils ne s'arrêteront par eux-mêmes. De plus, le calcul de la propagation des photons qui ne portent plus qu'une infime partie de leur énergie initiale ne contribue que très peu à l'éclairement de notre réacteur et donc à la convergence de la méthode. Pour cela, un critère d'arrêt de la propagation des photons est donc obligatoire. Ainsi dès lors que l'énergie portée par ces derniers passe sous un certain seuil, on arrête le calcul de leurs parcours pour passer au photon suivant, formule (37). Le choix de la valeur de ce seuil est fait de sorte d'être capable de décrire le champ jusqu'à des niveaux d'irradiance qui ne sont plus jugés significatifs au regard de la cinétique de croissance. Il est fixé arbitrairement à 10^4 pour nos simulations, et l'effet du choix de la valeur de $seuil$ est illustré en Figure 64.

$$\boldsymbol{SI\ \ I_n < I_0/seuil\ \rightarrow arret\ de\ l'it\acute{e}ration} \tag{37}$$

Avec : $\boldsymbol{I_n}$ *l'intensité porté par le photon au moment du test de terminaison,* $\boldsymbol{I_0}$ *l'intensité initiale du photon,* $\boldsymbol{seuil}$ *une constante*

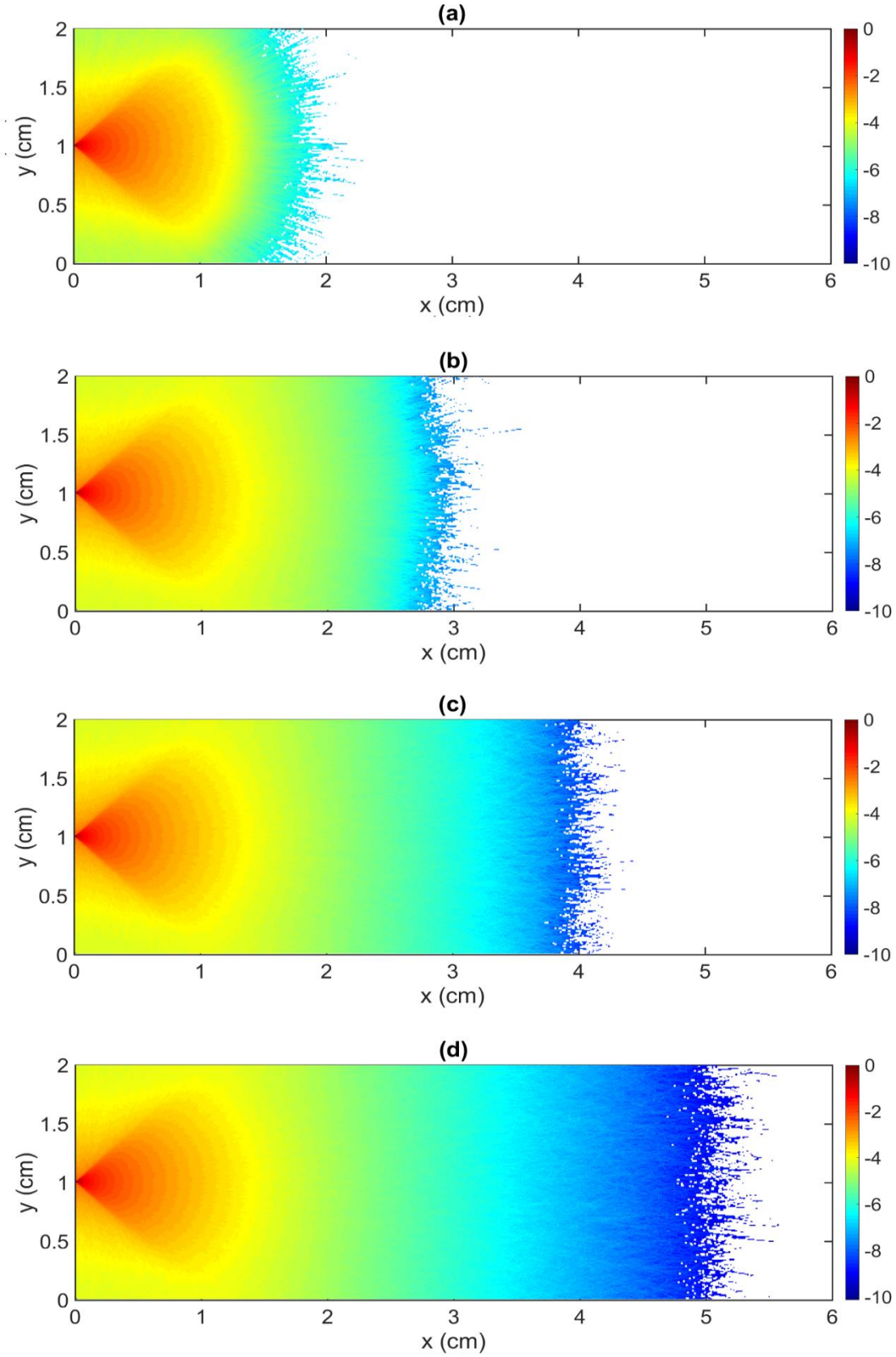


Figure 64 : Logarithme népérien d'un même champ d'irradiance en fonction de la valeur du seuil, à savoir 10, 100, 1000 et 10000 resp. pour ***(a)****,* ***(b)****,* ***(c)*** *et* ***(d)***

h. Convergence de l'Algorithme

De même, le nombre de trajectoires à calculer afin de converger le champ est choisi par comparaison d'un même profil d'irradiance, typiquement celui dans l'axe de la source, jusqu'à ce qu'il soit défini de manière satisfaisante au regard du bruit numérique. L'aspect des champs résultant est montré Figure 65. Ce nombre d'itérations est, par la suite, pondéré suivant les différents cas simulés par le volume de réacteur à décrire relativement aux réductions de domaine par symétrie et donc le nombre de mailles à converger. Dans la pratique quelques dizaines de millions de trajectoires sont nécessaires. Sur le champ d'irradiance final, la valeur obtenue en paroi est proportionnelle : au nombre d'itérations (ie. photons simulés), à la superficie éclairée au sein de la géométrie et à la taille des mailles. Ainsi pour l'ensemble de cas de figure simulés, les champs sont normalisés par leurs valeurs moyennes en paroi éclairée, (qui sont la grandeur que l'on contrôle expérimentalement). Pour être exploités ils sont ensuite multipliés par l'irradiance en paroi souhaitée. Cette manipulation est possible car la forme de la distribution des niveaux d'irradiance est indépendante de la valeur de celle-ci, les propriétés optiques ne sont pas fonction de la valeur de l'irradiance [29].

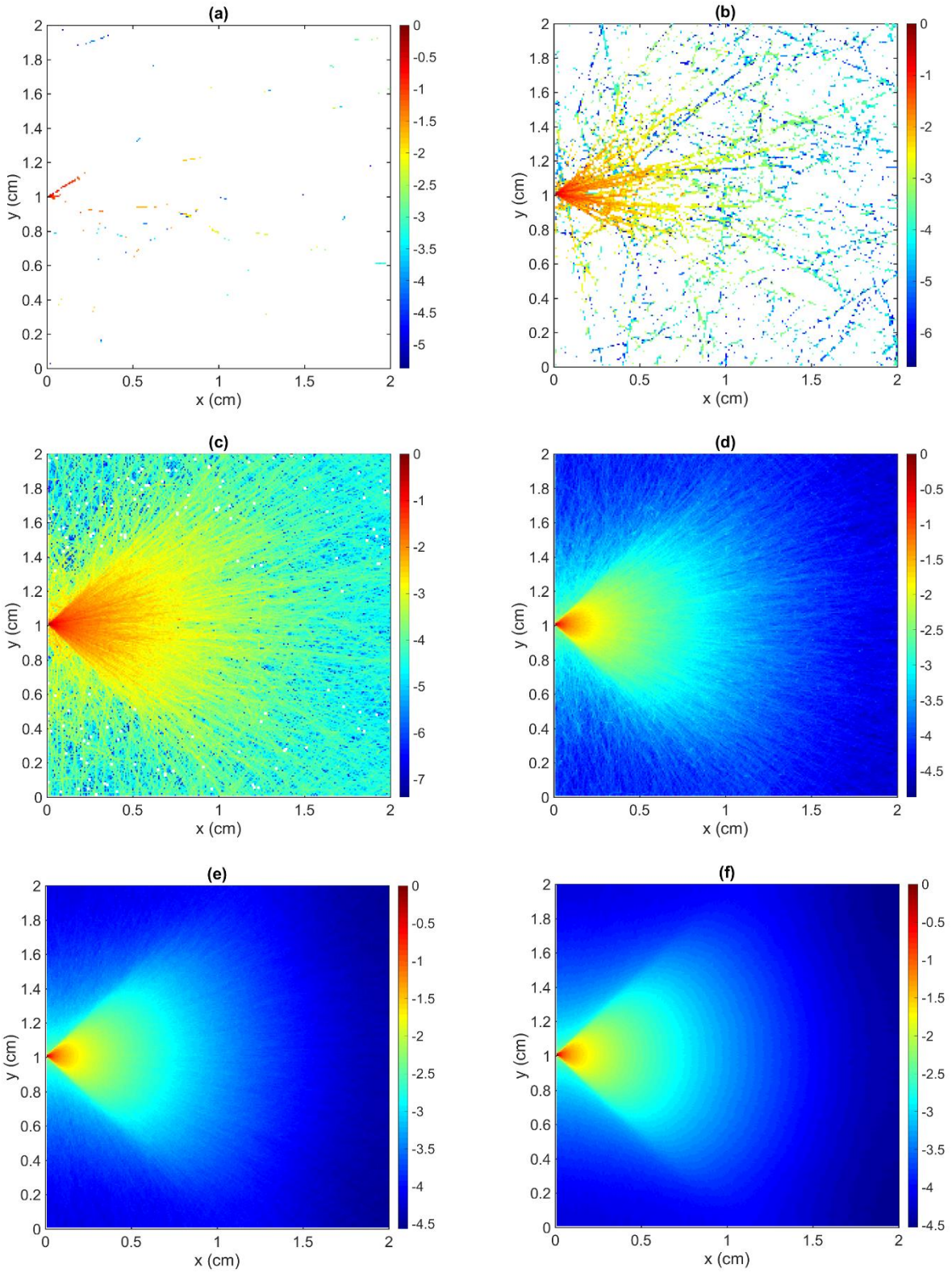


Figure 65 : Logarithme népérien d'un même champ d'irradiance en fonction du nombre de trajectoires de photon calculés : 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 et 10^6 resp. pour **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**, **(e)** *et* **(f)**

i. Validation sur un Cas Analytique

Et enfin, ne possédant pas de sonde de mesure de l'irradiance en un point selon toutes les directions (i.e. un PAR-mètre sphérique), on ne peut donc confronter les simulations à l'expérience. De même, une mesure d'actinométrie, qui évalue l'énergie lumineuse dissipée à l'échelle macroscopique [29], n'a pas été envisagée. On procède alors à la validation de la méthode par comparaison avec un cas de la littérature. Pour cela, on s'est basé sur [130], qui pour une géométrie simple résout analytiquement les équations du transfert radiatif avec la méthode à deux flux pour traiter la diffusion. Le cas en question est celui d'un plan émettant de manière orthogonale une lumière collimatée et homogène, les propriétés optiques utilisées sont celles de nos cultures à 1 g.L^{-1} et le champ d'observation est arbitrairement imposé à 40 mm. La solution est l'équation (38). Bien que ce cas de figure soit plus simple que ceux simulés par la suite, il permet néanmoins de conforter notre méthode numérique, Figure 66, comme étant capable de calculer un champ d'irradiance en tenant compte de l'absorption et d'évènements de diffusion discrets. On a validé par ailleurs l'implémentation des degrés de complexité supplémentaires, à savoir : la prise en compte d'un phénomène de diffusion omnidirectionnel selon une loi de Henyey-Greenstein et la géométrie annulaire de notre photobioréacteur et ses conditions aux limites.

$$\frac{I(z)}{I(z=0)} = 2 \cdot \alpha \cdot \frac{exp\big(-\delta \cdot (z-L)\big) + exp\big(\delta \cdot (z-L)\big)}{(1+\alpha)^2 \cdot exp(\delta \cdot L) - (1-\alpha)^2 \cdot exp(-\delta \cdot L)}$$

$$avec : \begin{cases} \alpha = \sqrt{\dfrac{E_a}{E_a + 2 \cdot (1-g) \cdot E_s}} \\ \delta = \sqrt{E_a \cdot (E_a + 2 \cdot (1-g) \cdot E_s)} \end{cases} \tag{38}$$

Avec : z (m) la distance à la paroi (située en Oxy), $I(z)$ la distribution d'irradiance en foncion de z, $I(z=0)$ l'irradance en paroi, α, δ deux variables de calculs, L la longeur du champ d'observation, E_a, E_s et g resp. les coefficients d'absorption et de diffusion et d'anisotropie de Henyey-Greenstein

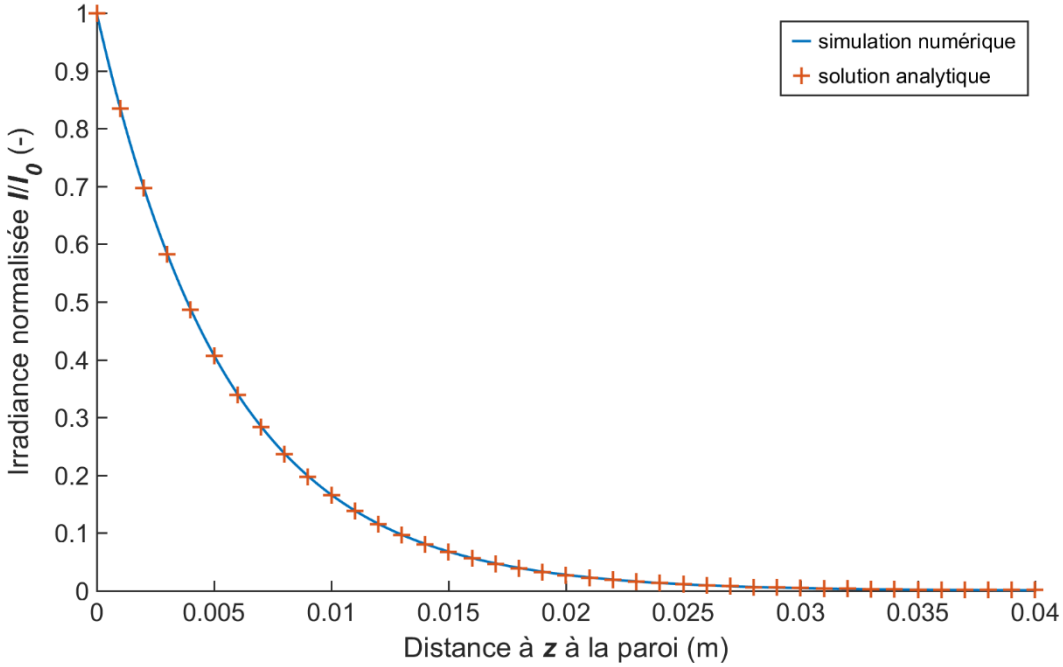


Figure 66 : Comparaison du niveau d'irradiance normalisée issue resp. de notre algorithme de Monte-Carlo et d'une résolution analytique (formule (38), R^2=0,997) sur un cas simple décrit ci-avant.

j. Application au Photobioréacteur Pilote

Cet algorithme a ensuite été utilisé pour simuler plusieurs cas de figures, en accord avec la gamme opératoire expérimentale, ainsi 20 concentrations ont été simulées entre 0,1 et 2,0 g·L^{-1} afin de représenter l'évolution de l'éclairement avec l'augmentation de la biomasse. De même, quatre configurations de sources ont été étudiés. Les illustrations des champs d'irradiance obtenus se trouvent respectivement en Figure 67 et Figure 68. Une première constatation est que la variation spatiale de l'irradiance est telle que les valeurs au cœur du réacteur sont négligeables face à celles qui sont délivrées en parois (hormis aux plus faibles concentrations de spiruline), au point que la fraction volumique contribuant réellement à la croissance photosynthétique s'en trouve minoritaire. Une conséquence est tout simplement que la moyenne volumique en irradiance est très différente de celle qui est imposée en parois et que la population biologique voit, dans son ensemble, une vaste gamme de conditions d'éclairement. Ce qui était présupposé dans l'étude bibliographique et expérimentale est maintenant quantifié.

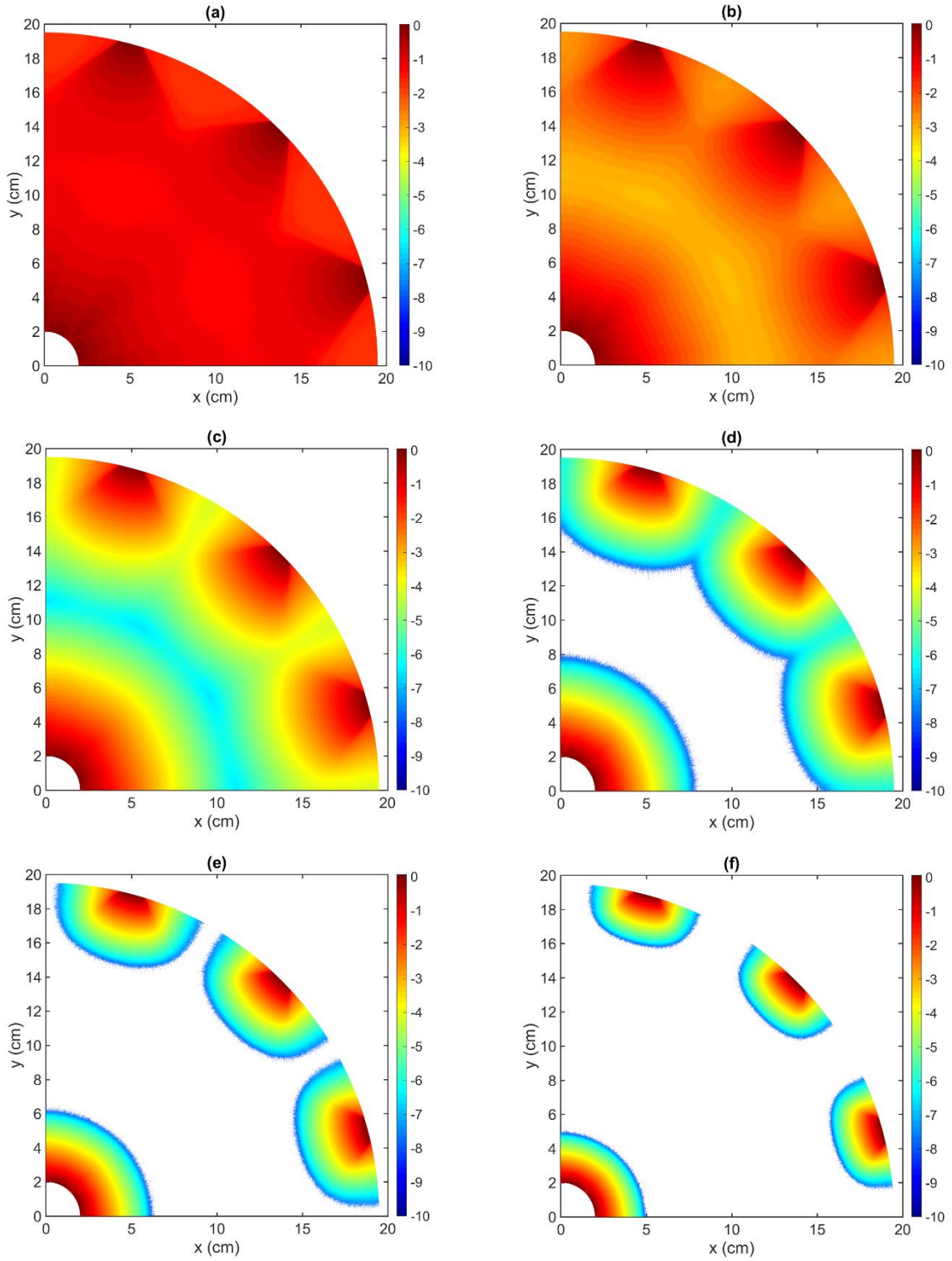


Figure 67 : Logarithme népérien d'un quart du champ d'irradiance selon une section horizontale du photobioréacteur pilote éclairé par les 20 sources en fonction de la concentration en spiruline : 0,1 g·L^{-1}, 0,3 g·L^{-1}, 0,6 g·L^{-1}, 1,0 g·L^{-1}, 1,4 g·L^{-1}, 2,0 g·L^{-1}, resp. pour ***(a)***, ***(b)***, ***(c)***, ***(d)***, ***(e)*** *et* ***(f)***

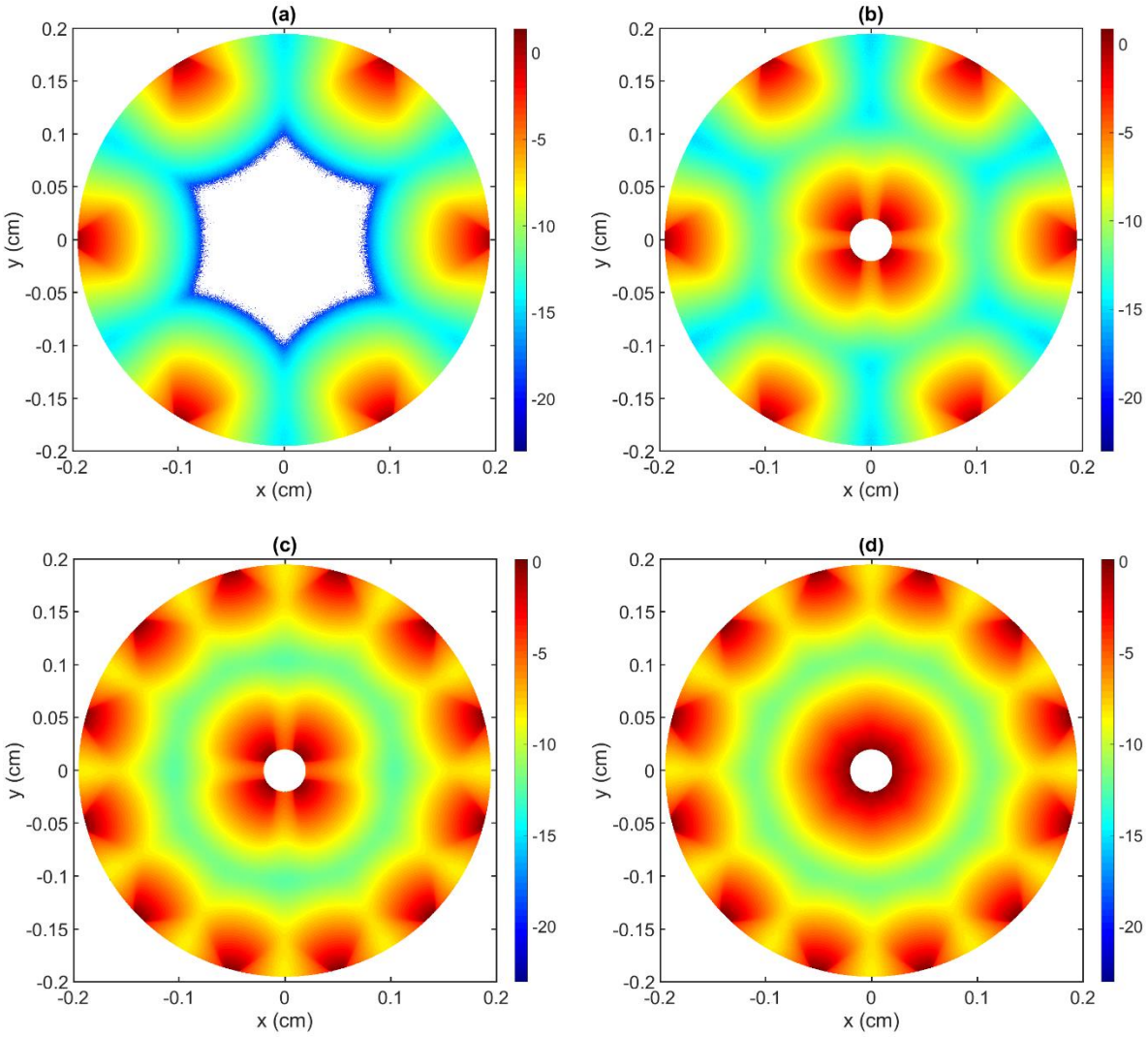


Figure 68 : Logarithme népérien du champ d'irradiance selon une section horizontale du photobioréacteur pilote en présence de 0,5 g·L⁻¹ de spiruline en fonction du nombre de sources LED utilisées : 6, 10, 16 et 20, resp. pour ***(a)****,* ***(b)****,* ***(c)*** *et* ***(d)***

D'autre part, l'objectif ce cette quantification de l'éclairement est bien son exploitation concernant le calcul des cinétiques de croissance, or la base de données ainsi collectée est assez vaste, à savoir un total de 4x20=80 matrices 4000x4000 (soit ~5 Go), n'est pas idéale à un calcul rapide de ces cinétiques tout au long d'une simulation d'une culture de spiruline. Or, pour l'évaluation de μ_{fi} et μ_{ia}, respectivement l'influence de l'irradiance selon les hypothèses intégrée et instantanée, l'agencement spatiale des niveaux d'irradiance n'importe pas (cf. les équations (20) et (21)). Ainsi peut-on, pour le calcul de μ_{fi} et μ_{ia} se contenter de la densité de probabilité volumique d'irradiance soit la distribution de fractions volumiques dans le volume des niveaux d'irradiances (Figure 69), et par la même réduire la quantité d'information nécessaire à l'exploitation de ces deux cinétiques. Remarque : La non-monotonie

des distributions aux faibles concentrations s'explique par le recouvrement spatial des contributions de plusieurs sources et rendue possible par la faible absorbance dans le milieu. Ainsi, plus qu'un seul vecteur est nécessaire à la représentation de chaque cas de figure (i.e. nombre sources et concentration), de plus la taille de ce vecteur n'est plus imposée par des considérations géométriques mais par la qualité de l'intégration de la distribution que l'on cherche à obtenir (cf. équations (53) et (54)). Dans notre cas, une distribution contenant mille classes est jugée suffisante à représenter l'hétérogénéité volumique des valeurs d'irradiances.

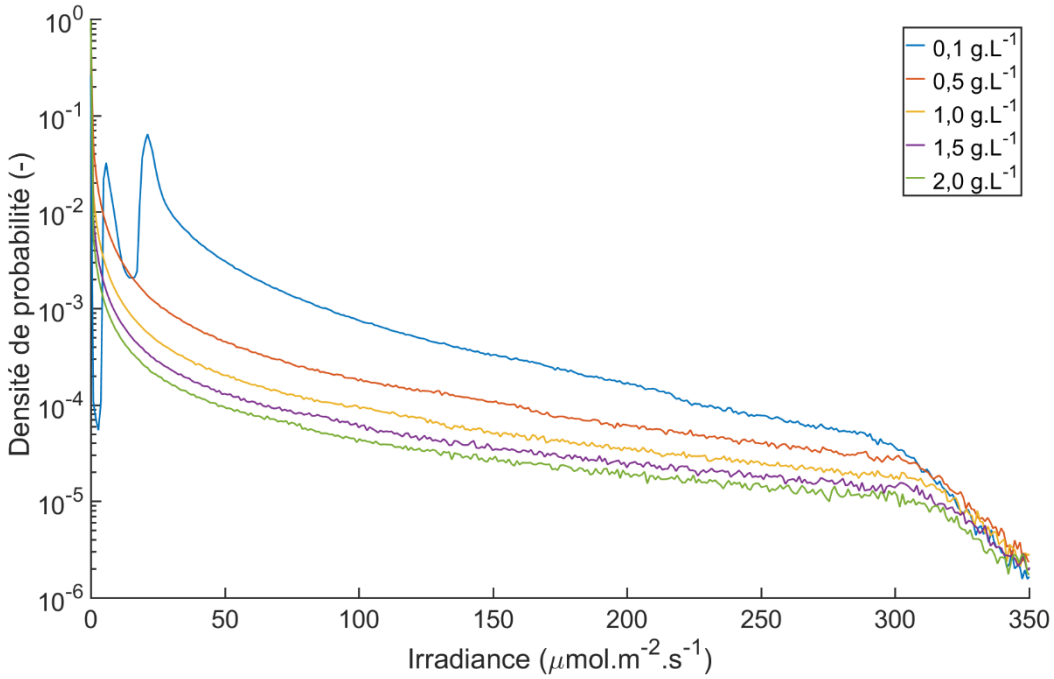


Figure 69 : Densités de probabilité volumique des niveaux d'irradiances au sein du photobioréacteur pilote en présence de plusieurs concentrations de spiruline différentes et éclairé par la totalité des 20 sources LED délivrant 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en parois

Toujours dans le sens d'une simplification de l'exploitation des données, on observe en Figure 70 que la distribution volumique des niveaux d'irradiances non-nuls est directement proportionnelle au nombre de sources de lumières présentes dans le cas de figure simulé. Ainsi, le rapport issu de la division terme à terme des distributions obtenue pour les différentes quantités de sources lumineuses est le même sur toute la gamme d'irradiance et correspond au rapport algébrique des quantités de sources, et ce quelle que soit la concentration microalgale. Ceci est parfaitement cohérent avec [127] (mentionné à l'occasion de l'énumération des méthodes possibles pour réduire la quantité de calcul nécessaire pour la convergence de l'algorithme) où il est dit que seul le calcul de la contribution d'une unique

source est suffisant pour la connaissance de leur contribution combiné (théorème de superposition). On peut alors procéder aux simulations des cinétiques de croissance avec des quantités de sources lumineuses différentes avec le même jeu de données en y appliquant seulement un coefficient de proportionnalité adapté.

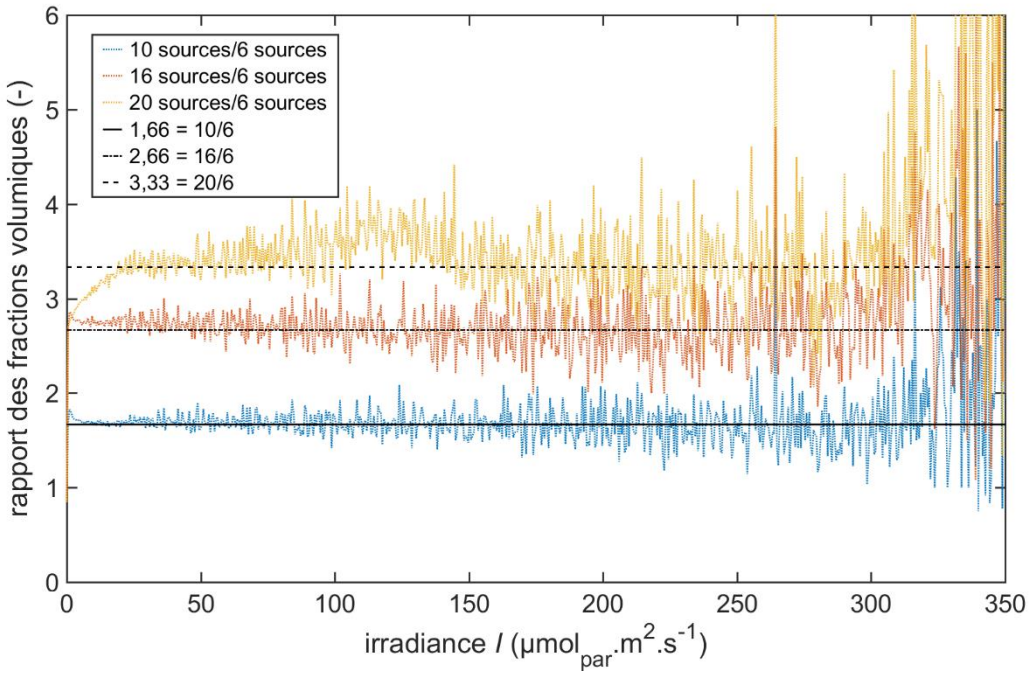


Figure 70 : Différentes distributions du rapport termes à termes des distributions volumiques d'irradiance obtenues dans le photobioréacteur pilote en présence de 0,8 g·L^{-1} de spiruline est 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1} délivrée en parois

En revanche, ces deux résultats ne doivent pas occulter que le calcul des champs spatiaux d'irradiance reste une étape inévitable, car la forme de la distribution volumique d'irradiance qui en résulte est spécifique de la géométrie du réacteur, de ses sources de lumières et c'est seulement la connaissance du champ spatial qui permet de la déterminer. De même, on ne peut s'affranchir de l'étude aux différentes concentrations, car les distributions n'évoluent pas de façon homogène sur la gamme d'irradiance ni même de façon régulière avec la concentration en microalgue. Par ailleurs, l'usage d'une distribution volumique d'irradiance n'est plus possible dès lors que l'on veut estimer μ_{bio} (i.e. avec l'effet de variation temporelle de lumière, cf. II.4.C) puisque c'est justement l'hétérogénéité spatiale en lumière combinée à l'agitation qui déterminent les variations de lumière subies par la population de spiruline et dont le détail est donné plus loin en partie III.3.B.

3. Modélisation de l'Agitation

A. Modélisation de l'Écoulement

a. Mécanique des Fluides Numériques

Les différentes cellules constituant la biomasse sont exposées lors de leur culture à une lumière fluctuante due à l'hétérogénéité volumique en lumière et à leur propre mouvement dans ce même volume, provoqués par l'agitation par bullage du milieu réactionnel. La distribution de la lumière ayant été précédemment calculée, on s'intéresse maintenant au deuxième aspect de la problématique, à savoir le positionnement des cellules dans le champ d'irradiance au cours du temps.

Pour cela on procède en premier lieu à une modélisation de mécanique des fluides numérique (CFD pour *Computational Fluid Dynamics*) sur notre cas d'étude. On utilise alors un logiciel commercial dédié : ANSYS-FLUENT 16.2, et les utilitaires associés DESIGNMODELER ainsi que MESHING. L'ensemble des éléments cités ci-après pour la configuration des simulations font référence à la documentation du logiciel [131]. De plus, sauf précision contraire, les options de configuration par défaut sont conservées. Dans la continuité du chapitre, le cas de figure exploité est celui du photobioréacteur pilote, la géométrie utilisée est donc celle décrite en partie II.1.A, et visible ici en Figure 71. En revanche, on fait le choix d'ignorer la boucle de recirculation métrologique, que ce soit le volume liquide qu'elle contient ou l'écoulement qu'elle induit (i.e. entrée et sortie) et ce afin de simplifier tant la géométrie que le calcul lui-même. Le temps de mélange expérimental sans injection de gaz, visible en Figure 82, c'est-à-dire dû à la seule recirculation de la boucle métrologique, est de 233 s soit plus de cinq fois supérieur au temps de mélange en condition usuelle. On en conclut donc que l'écoulement est bien principalement induit par les gradients de densité (i.e. injection de gaz) et non par la convection forcée issue du pompage. Une fois la géométrie établie (sans la recirculation), elle est maillée selon une méthode CUTCELL qui consiste à générer des mailles principalement parallélépipédiques et dont les arêtes sont orthogonales entre elles, le raffinement se faisant par subdivision des mailles par un facteur deux typique de la méthode. L'avantage de ce type de maillage est qu'il est particulièrement régulier et homogène sur l'ensemble du volume et rapide à mettre en œuvre. Le maillage est réalisé de sorte à obtenir des éléments d'environ 20 mm de taille caractéristique au cœur du volume et affiné au voisinage des parois (bulleurs et thermoplongeurs compris) jusqu'à 0,5 mm, menant au final à approximativement $140 \cdot 10^3$ mailles et représenté en Figure 72.

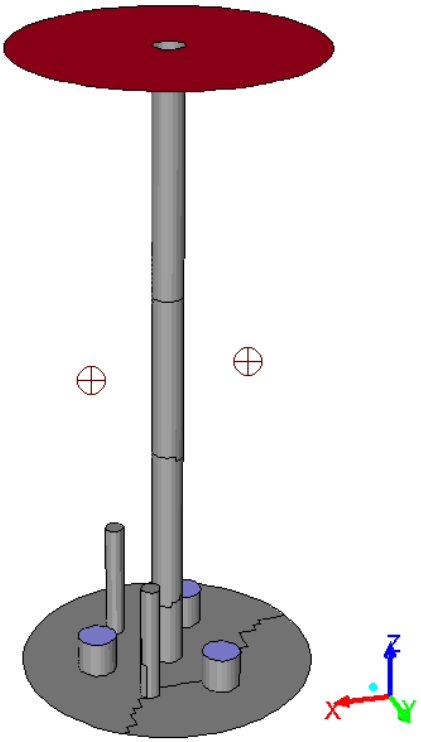


*Figure 71 : Géométrie 3D du photobioréacteur pilote utilisé dans la simulation CFD, avec : en **nuances de gris** les parois (à l'exception du cylindre externe, transparent, pour la lisibilité), en **bleu** les zones d'injection de gaz, en **rouge** surface de dégazage (cf. ci-dessous), les **croix noires** indiquent quant à elles la position des sondes de mesure qui seront utilisés par la suite.*

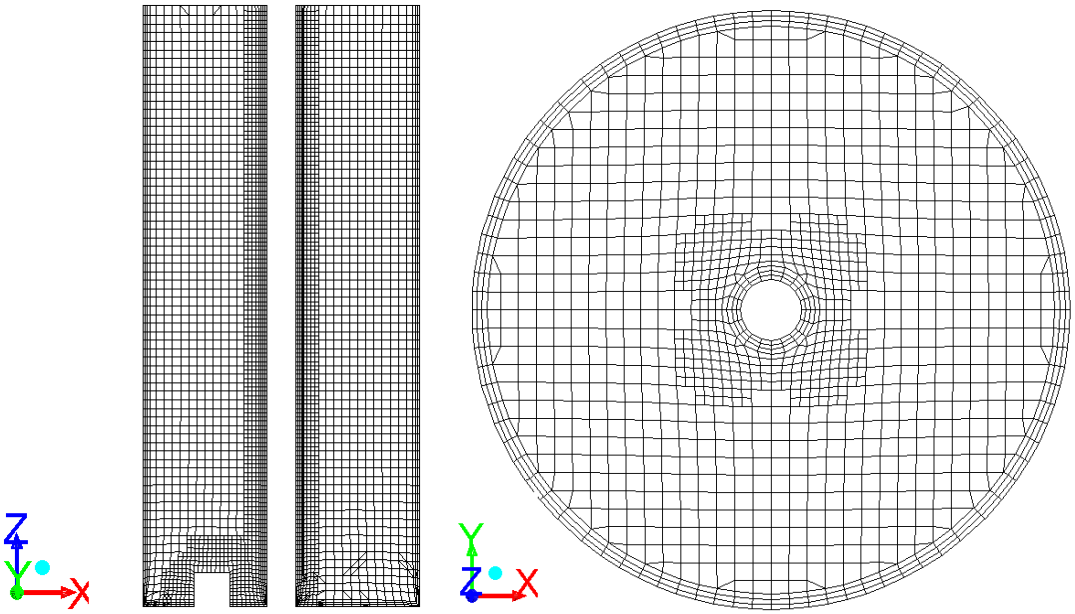


Figure 72 : Détails du maillage utilisé dans les simulations CFD, en (a) selon le plan médian vertical et en (b) selon le plan médian horizontal

Ensuite sont imposées les conditions aux limites du domaine, à savoir :

- Une condition de non-glissement (*no-slip*) en parois, i.e. la vitesse du liquide est alors nulle en paroi (*wall*).
- Débit gaz imposé (*velocity inlet*) aux bulleurs, remarque : Cela ne prend pas en compte qu'en réalité le gaz est délivré par l'intermédiaire d'orifices, ici le débit est homogène sur toute la face supérieure des bulleurs.
- Dégazage (*degassing*) en ciel de réacteur, i.e. la fraction de gaz y est imposée comme nulle, sont donc ignorés dans les simulations tous les effets éventuellement issus de la présence d'une surface libre.

La simulation suit la configuration suivante :

- Le calcul est : 3D, instationnaire, double précision et parallélisé sur quatre processeurs.
- L'écoulement considéré est diphasique, de type Euler-Euler avec le gaz comme phase dispersée et avec un modèle laminaire pour l'écoulement (point qui sera traité plus longuement dans une discussion à part entière). Les bulles de gaz ne sont pas considérées dans leur individualité pour la résolution de l'écoulement mais à travers une fraction volumique locale.
- Les phénomènes pris en compte concernant la physique des bulles sont : un terme de masse ajoutée [132] ($C_{ma}=0,5$), une loi de traînée de type Karamanev [133] adaptée aux bulles ellipsoïdales par l'intermédiaire d'une fonction utilisateur (UDF) contenant l'équation (39) et disponible en Annexe D, ainsi qu'une force de portance de type Legendre-Magnaudet décris en [134].

$$C_t = \begin{cases} \frac{24}{Re}\left(1 + 0.173\, Re^{0.657}\right) + \frac{0.413}{1 + 16.3\, Re^{-1.09}} & si\ Re < 130 \\ 0.95 & si\ Re > 130 \end{cases} \tag{39}$$

$$avec : \ Re = \frac{\rho_l \cdot d_b \cdot |\overrightarrow{v_r}|}{\mu_l}$$

Avec : C_t le coefficient de traînée de la bulle, Re le nombre de Reynolds, ρ_l la masse volumique du liquide, d_b le diamètre des bulles, μ_l la viscosité du liquide, $|\overrightarrow{v_r}|$ la vitesse relative de la bulle dans le liquide

Afin de paramétrer l'usage des différentes équations du modèle hydrodynamique un certain nombre de grandeurs physiques sont utilisées afin de représenter les propriétés de nos cultures de spiruline. Elles peuvent provenir de mesures expérimentales réalisées au cours de la thèse, lorsque cela fut possible, ou alors provenir de la littérature. Elles sont énumérées dans le Tableau 7 ci-après.

Tableau 7 : Liste des grandeurs physiques utilisées lors de la simulation CFD du photobioréacteur pilote.

Nature	Valeurs, le cas échéant à 35°C	Sources
Température	308 K	Arbitraire (condition de culture)
Tension de surface du liquide	$62 \cdot 10^{-3}$ N·m^{-1}	Mesure expérimentale : protocole de l'anneau de du Noüy (KRÜSS, K6 avec RI 011)
Viscosité du liquide	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$ Pa·s^{-1}	Mesure expérimentale : usage d'un rhéomètre (THERMO SCIENTIFIC, MARS III), Figure 74
Densité du liquide	1008,1 kg·m^{-3}	Mesure expérimentale : pesée d'un volume connu (SARTORIUS, ED224S)
Volume de liquide	100 L	Arbitraire : dimensionnement du photobioréacteur pilote
Viscosité du gaz	$1{,}882 \cdot 10^{-5}$ kg·m^{-1}·s^{-1}	Littérature : [119]
Masse volumique du gaz	1,146 kg·m^{-3}	Littérature : [119]
Diamètre équivalent en volume des bulles ($d_{3\text{-}2}$)	$6{,}7 \cdot 10^{-3}$ m	Mesure expérimentale : acquisition d'image et post-traitement [135] (dispositif conçu à façon), illustré en Figure 73
Vitesse terminale d'ascension d'une bulle isolé	0,25 m·s^{-1}	Mesure expérimentale : acquisition d'image et post-traitement [135] (dispositif conçu à façon)
Débit de gaz total	0,60 m^3·h^{-1}	Arbitraire : conditions de culture
Accélération normale de pesanteur (selon axe Oz)	-9,81 m·s^{-2}	Littérature : [136]

Remarques :

- Il est toujours sous-entendu pour "liquide" : la culture de microalgue et pour "gaz" : l'air comprimé issu du réseau disponible au laboratoire.

- La valeur de viscosité du liquide est une moyenne des valeurs obtenues pour le milieu de culture P3 seul et une culture de spiruline à la concentration de 1,5 $g \cdot L^{-1}$ (resp. 0,7 et 1,3 $N \cdot m^{-1}$), à une température de 35°C et pour des cisaillements croissants puis décroissants compris entre 10 et 1000 s^{-1} (représentatif, a posteriori, de l'écoulement simulé). Les données sont représentées en Figure 74. Par ailleurs, il est confirmé dans la littérature [5] qu'en deçà de 4 $g \cdot L^{-1}$ de biomasse, il n'y a pas d'effet de cette dernière sur la viscosité de la culture.

- Les tailles et vitesses de bulles sont obtenues par mesures optiques grâce à l'immersion d'un bulleur ne possédant qu'un seul orifice (mêmes matériaux, même diamètre d'orifice, cf. description en II.1.A) dans une cuve parallélépipédique verticale contenant du milieu de culture seul (pour la visualisation), ce qui suppose que la présence des microalgues n'a pas d'impact sur ces deux grandeurs. L'acquisition est réalisée grâce à une caméra (BASLER, acA2040-90um) par comparaison à une mire (double décimètre commun), puis traitée via un script écrit sous MATLAB R2016a dont le contenu fait par ailleurs l'objet d'une publication de la part de l'équipe de recherche [135]. En Figure 73, quelques images acquises pour l'occasion. On remarque, de plus que les mesures effectuées ne varient pas significativement en présence d'eau ou de milieu de culture, et surtout que la population de bulles formées est relativement mono-disperse autour de sa valeur moyenne ce qui accroît la validité de la simulation CFD.

Figure 73 : Acquisition optique (côte à côte) de bulles issues de nos injecteurs (traitées ici spécifiquement pour la visualisation)

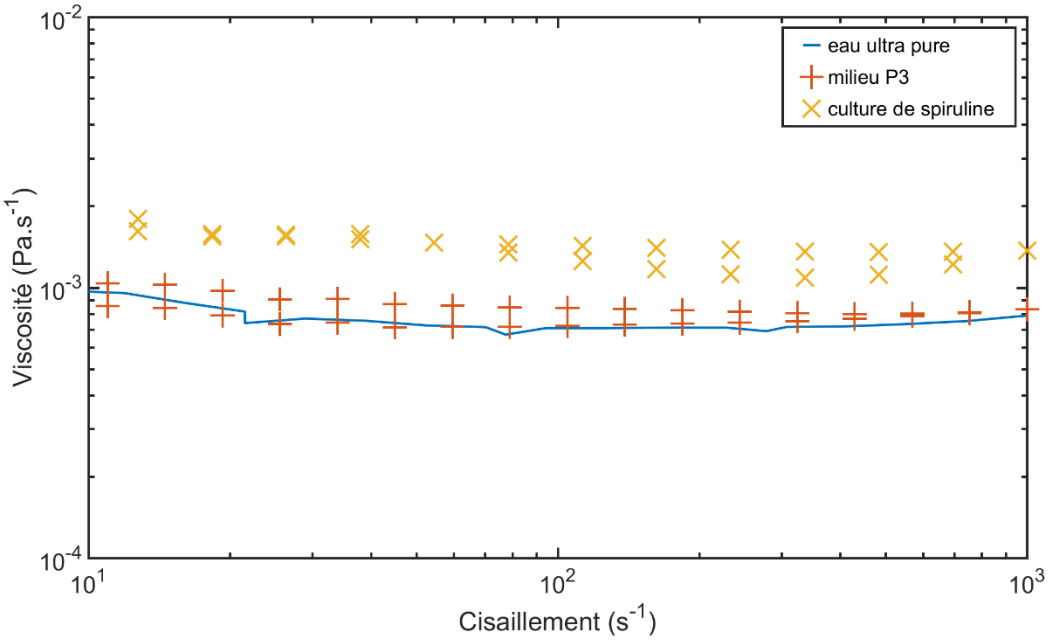


Figure 74 : Graphique en échelle logarithmique des courbes de viscosité à 35°C de l'eau ultrapure (ELGA, purelab ultra) du milieu de culture P3 seul et d'une culture de spiruline à une concentration de 1,5 g·L-1

b. Convergence de la Simulation

Après configuration de la simulation, le calcul est opéré de façon distante sur un ordinateur de calcul dédié (DELL, precision tower 7910), via un fichier journal, avec un pas de temps de $5 \cdot 10^{-3}$ s et un maximum de trente itérations par pas de temps. Afin d'établir l'écoulement dans la colonne il est tout d'abord simulé une durée de 100 s, durée choisie arbitrairement (pour information : elle équivaut à environ deux fois le temps de mélange expérimental). On suit l'établissement de l'écoulement grâce à l'enregistrement d'un certain nombre de grandeurs réalisé à chaque pas de temps, tel le taux de gaz global, le débit massique de gaz sortant en ciel de réacteur et la vitesse ascensionnelle du liquide (i.e. projetée sur Oz) à l'emplacement des sondes (cf. Figure 71). Ces deux sondes sont situées dans le plan Oxz à mi-hauteur du réacteur, à mi-distance des parois interne et externe et placées respectivement à l'aplomb d'un panache de bulles et entre deux panaches pour la seconde. Des exemples de ces relevés sont présents en Figure 75 et Figure 76 dans le cas d'une injection de 10 $L \cdot min^{-1}$ de d'air. Une première observation, issue du second graphique, est que le pilote présente un écoulement typique de type gazosiphon (*air-lift*) avec un mouvement ascendant du liquide en zone aérée due à une densité apparente plus faible de ces régions, et descendante sinon. De plus, on constate que la durée de 100 s permet d'atteindre la

convergence des moyennes temporelles des différentes mesures et donc de l'écoulement dont elles sont issues. Ensuite, on relève une nette instationnarité de l'écoulement, car même si en moyenne l'écoulement est établi, il existe une variation non-négligeable des valeurs autour de leurs moyennes, pour le champ de vitesses notamment.

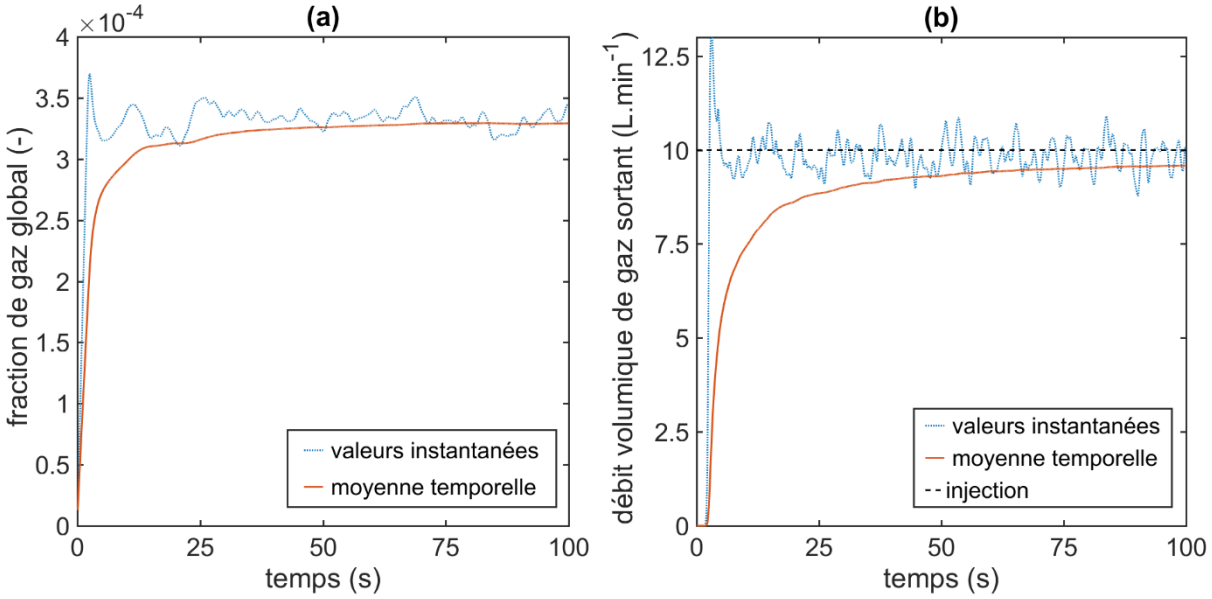


*Figure 75 : Graphiques en fonction du temps de simulé : **(a)** le taux de rétention volumique du gaz dans l'enceinte du réacteur, **(b)** le débit volumique de gaz s'échappant par la condition limite de dégazage (i.e. ciel de réacteur)*

De la même manière cela est conforté par les représentations des valeurs locales, Figure 77 et Figure 78, où l'on remarque qu'au-delà de la présence des panaches et des zones ascendantes et descendantes, il y a aussi des macro-instabilités hydrodynamiques non-ordonnées et qui évoluent dans le temps (comme le montrent les deux graphiques précédents). Cela implique donc que dans l'étape suivante, où l'on procède à la simulation du mouvement des cellules de la biomasse, le calcul doit continuer à être résolu de façon instationnaire. Et ce, afin de pouvoir prendre en compte l'impact de ces structures désordonnées car il est probable qu'elles contribuent aux variations de l'intensité lumineuse perçue dans les microalgues.

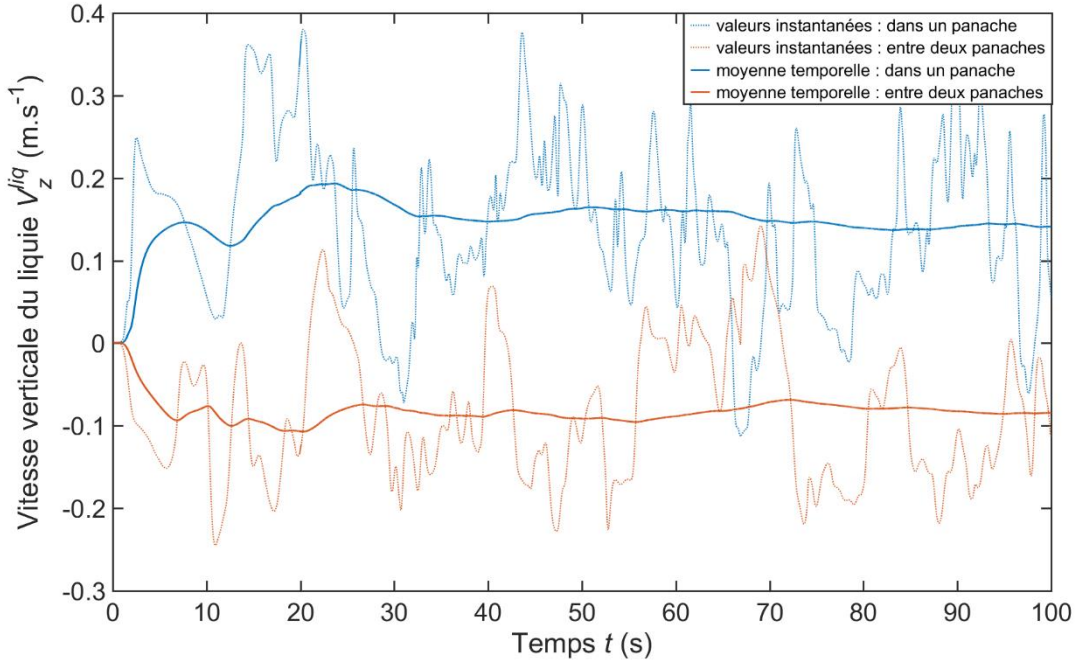


Figure 76 : Graphique en fonction du temps simulé de deux mesures de vitesses ascensionnelles (projeté sur Oz) du liquide à mi-hauteur de réacteur à l'aplomb d'un panache de bulle et entre deux panaches

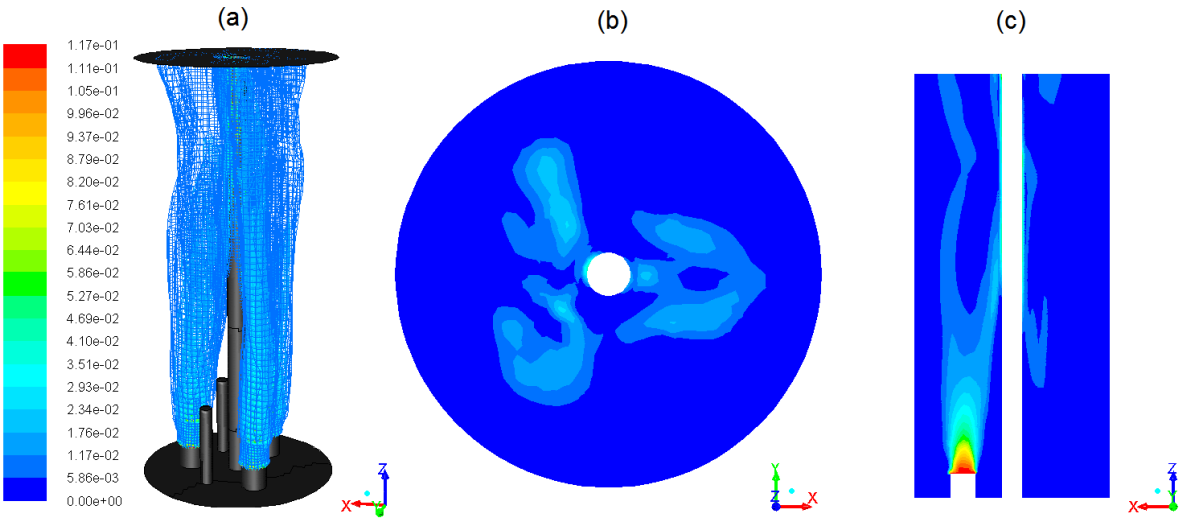


*Figure 77 : Représentations graphiques de la fraction volumique locale du gaz en échelle de couleur (-), **(a)** en 3D, **(b)** selon le plan médian Oxy et **(c)** selon le plan médian Oxz, pour la simulation du photobioréacteur pilote avec une injection de 10 L·min^{-1} d'air après 100 s simulées*

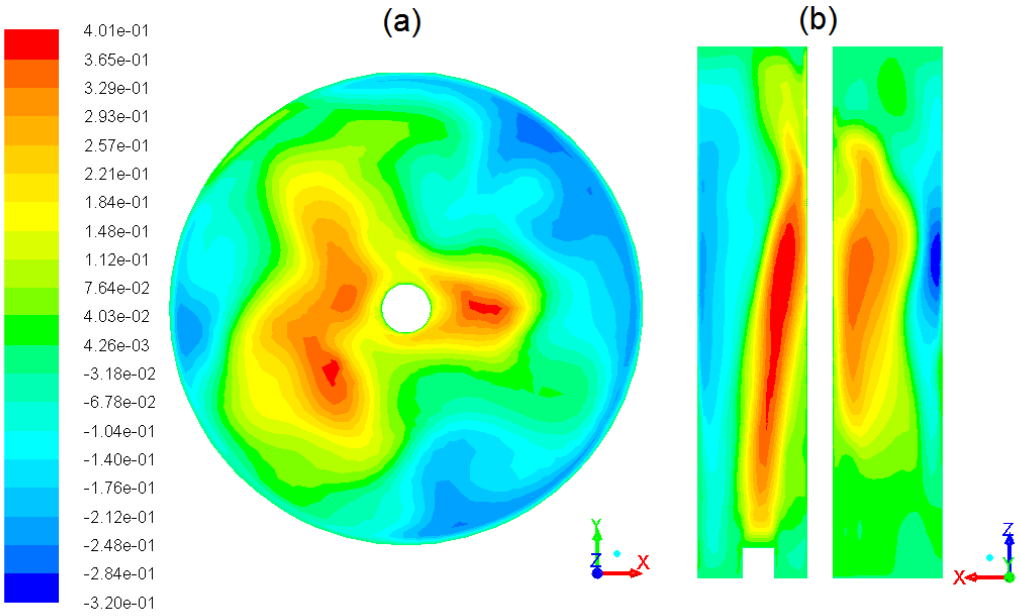


*Figure 78 : Représentations graphiques de la vitesse ascensionnelle (selon Oz) du liquide v_z^{liq} en échelle de couleur (m·s^{-1}), **(a)** selon le plan médian Oxy et **(b)** dans le plan médian Oxz, pour la simulation du photobioréacteur pilote avec une injection de 10 L·min^{-1} d'air après 100 s simulées*

c. Validation

Par ailleurs, il faut au préalable vérifier la validité de l'écoulement ainsi obtenu, la contrainte étant que le photobioréacteur réel n'a pas été conçu pour un contrôle/métrologie optimal de l'écoulement. Ainsi sa géométrie cylindrique me permet pas de faire la visualisation et donc de mesurer des champs de vitesse par imagerie laser par exemple (PIV, pour *Particle Image Velocimetry*). De même, sa conception ne prévoit pas l'introduction de sondes afin de faire des mesures *in situ* comme une bi-sonde optique pour la mesure d'un taux de gaz local. Néanmoins, un essai *in situ* a bien été réalisé avec une sonde de vélocimétrie par effet Doppler dans le domaine des ultra-sons (SIGNAL PROCESSING, dop2000). Mais la difficulté à réaliser des mesures, intrusive, en présence de la phase gaz dispersée (bullage) d'une part et des mesures moyennes sur le long terme (relativement à l'instationnarité de l'écoulement) d'autre part, n'a pas permis d'acquérir de données probantes pour la validation du champ de vitesse. Pour autant, la tendance qui ressort de ces acquisitions (Figure 79) est *a minima* cohérente avec la simulation, à savoir que la zone de descente du liquide se situe entre les panaches de bulles et proche de la paroi externe.

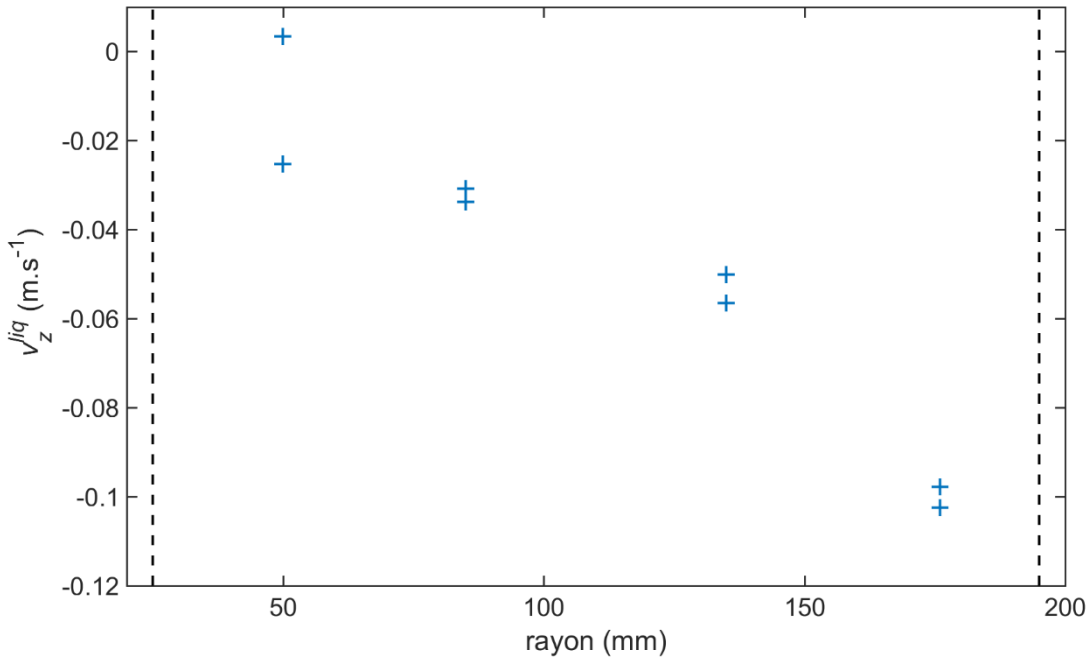


*Figure 79 : Mesures expérimentales du profil radial (**croix bleues**) de vitesse ascensionnelle du liquide v_z^{liq} entre deux panaches de bulles à 220 mm au-dessus du fond et en **pointillés noirs** les limites spatiales du domaine*

Ne pouvant accéder à une mesure précise à l'échelle locale, on se base donc sur des mesures globales comme le taux de gaz ou le temps de mélange. Ce n'est certes pas une vérification absolue, puisque de plusieurs champs de vitesse peut résulter un même temps de mélange, cela n'en est pas moins un bon indicateur. Ainsi la simulation montre, Figure 80, une évolution linéaire de la fraction volumique globale de gaz avec l'évolution du débit d'injection de gaz. Malheureusement ces fractions sont faibles et difficilement mesurables expérimentalement. Par contre, l'évolution du coefficient de transfert interfacial a pu être mesuré pour différent débits d'injection de gaz, il est directement lié à la fraction volumique de gaz, équation (40) (donnée pour une colonne à bulle). Le coefficient de transfert montre lui aussi une variation linéaire (Figure 81). La rétention gazeuse semble donc bien obéir au même comportement.

$$\boldsymbol{k_{LG} = k_{gaz} \cdot S \quad avec} \begin{cases} \boldsymbol{S = a \cdot V} \\ \boldsymbol{a = \dfrac{6 \cdot \varepsilon_g}{d_b}} \end{cases} \tag{40}$$

Avec : $\boldsymbol{k_{LG}}$ le coefficient de transfert liquide/gaz apparent, $\boldsymbol{k_{gaz}}$ un coefficient spécifique au gaz transféré, $\boldsymbol{S}$ l'aire interfaciale d'échange, $\boldsymbol{V}$ le volume du réacteur, $\boldsymbol{a}$ l'aire spécifique d'échange, $\boldsymbol{d_b}$ le diamètre de bulles, $\boldsymbol{\varepsilon_g}$ la fraction volumique globale de gaz

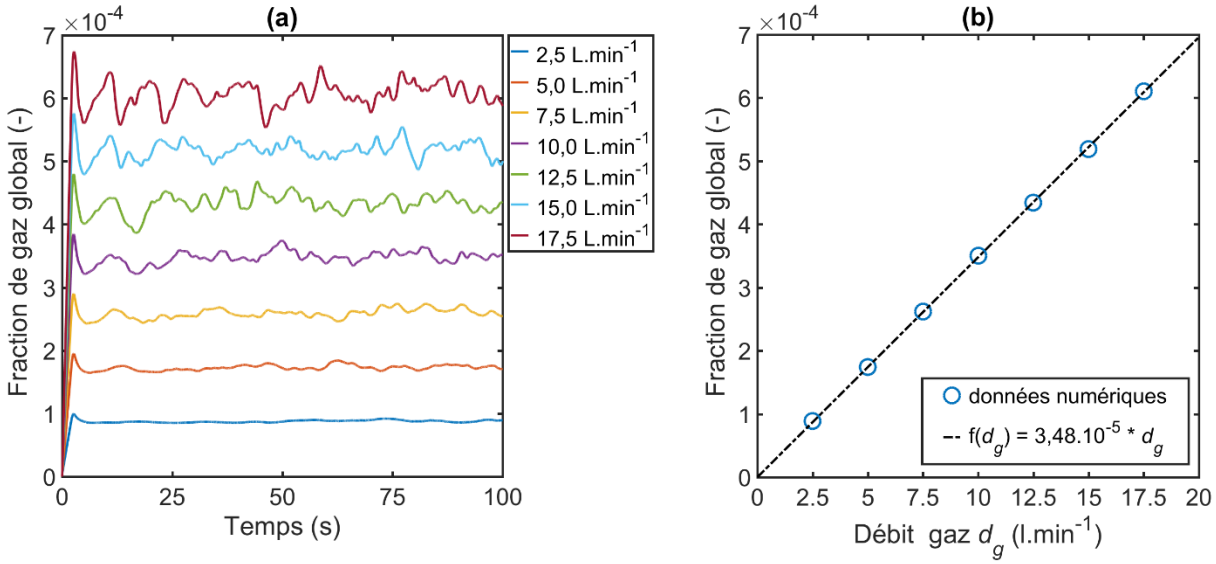


*Figure 80 **(a)** Graphique en fonction du temps de simulation des taux de gaz globaux, ε_G, pour une gamme de débit d'injection de gaz, **(b)** graphique en fonction du débit d'injection de gaz des taux volumiques de gaz globaux moyens (calculés sur les dernières 50 s de simulation) et la corrélation linéaire correspondante (R^2=0,9999)*

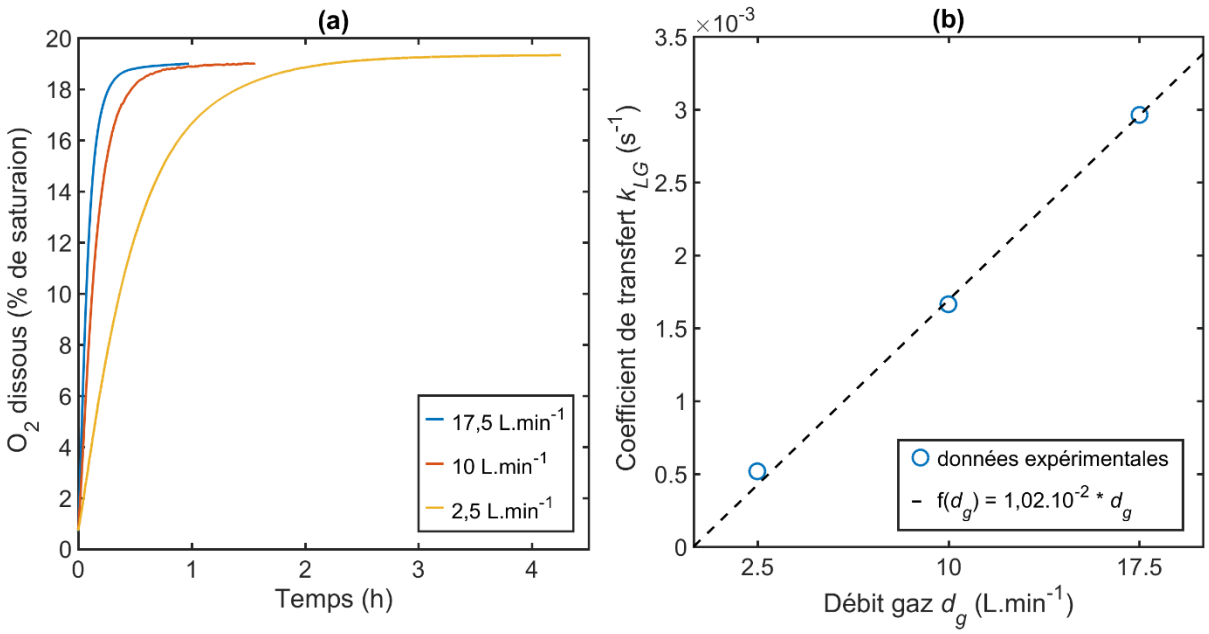


*Figure 81 : **(a)** mesures expérimentales de la concentration en oxygène dissous au cours du temps pour différents débits d'injections de gaz à 35°C (après avoir purgé le liquide par un bullage prolongé de diazote (N_2) pur), **(b)** coefficients de transfert de matière apparent à l'interface liquide/gaz, k_{LG}, mesurés expérimentalement sur le photobioréacteur pilote pour les différents débits d'injection, et la corrélation linéaire correspondante (R^2=0.997)*

Et pour dernière comparaison, on procède à la comparaison de valeur de temps de mélange pour la simulation et le cas réel. Numériquement, on introduit un champ scalaire sur le volume qui vient représenter la concentration d'un traceur et qui est donc transporté avec le champ de vitesse. Il est initialisé nul sur l'ensemble du réacteur sauf sur un cylindre de 1 L de volume situé en surface (similaire à ce qui est fait expérimentalement). Les sondes utilisées pour faire la mesure sont les mêmes que pour le relevé de vitesse ascensionnelle du liquide lors de l'établissement de l'écoulement (cf. Figure 71). Expérimentalement, deux traceurs ont été utilisées : une solution saturée en sel ($[Na^+ + Cl^-]$) et une d'acide chlorhydrique ($[2 \cdot H_3O^+ + SO_4^{2-}]$) concentré. La première ayant le défaut de nécessiter l'injection d'un grand volume de traceur pour être exploitable, 1 L en l'occurrence, ce qui implique une modification du volume total, une perturbation de l'écoulement lui-même lors de l'injection en ciel de réacteur et enfin une modification des panaches de bulles en favorisant la rupture des bulles vers de plus petits diamètres (un effet de l'augmentation de la salinité). L'acide chlorhydrique quant à lui possède le défaut d'être exothermique lors de sa dilution en solution aqueuse, cependant relativement aux quantités introduites cela ne change pas de façon significative la température au sein du réacteur. Les mesures de concentration en traceur sont réalisées par suivi conductimétrique grâce à la sonde située dans la boucle métrologique, via la loi de

Kohlrausch (41). Le prélèvement se fait à 5 cm au-dessus du fond de cuve à mi-distance entre les parois interne et externe. Le temps de parcours du liquide depuis le prélèvement jusqu'au point de mesure est connu (via le volume et le débit de liquide dans la boucle métrologique) et retranché aux résultats finaux. Remarque : La différence entre les deux traceurs réside dans leurs conductivité ionique, λ_{NaCl}=12,63 mS·m²·mol^{-1} et $\lambda_{H_2SO_4}$=85.96 mS·m²·mol^{-1} [113], et dans leurs concentrations en solution aqueuse, resp. 6,25 mol·L^{-1} et 3,06 mol·L^{-1}, l'acide chlorhydrique permettant donc l'introduction d'un plus faible volume pour une même qualité de mesure. Dans tous les cas, l'injection est supposée impulsionnelle (i.e. très courte devant le temps de mélange) et le temps de mélange, τ_m, est défini comme le temps nécessaire pour atteindre de manière définitive la concentration finale en traceur à ±2%. Les mesures expérimentales de temps de mélange ainsi réalisées sont cohérentes quel que soit le traceur utilisé. On observe toutefois que les valeurs de temps de mélange pour le premier traceur (i.e. solution saline) sont inférieures pour les faibles débits de gaz, sans doute parce que les mouvements du liquide induits par l'introduction du traceur ne sont pas négligeables par rapport à l'écoulement global dans ces conditions. D'autre part, on observe que les mesures ne sont pas significativement différentes en présence d'eau ou de milieu de culture. C'était déjà le cas pour la mesure de taille de bulles ou de viscosité. La comparaison des résultats, présentée Figure 82, montre que sur l'ensemble de de la gamme opératoire la simulation numérique sous-estime de façon importante les temps de mélange, en moyenne de 45% (en relatif sur les sept points en commun). Cela montre que la modélisation de l'écoulement diphasique est encore perfectible. Bien que le champ de vitesse ainsi obtenu ne soit pas corroboré par l'expérience, on fait toutefois l'hypothèse qu'il est néanmoins satisfaisant pour représenter qualitativement les conditions d'agitation du photobioréacteur pilote.

$$\boldsymbol{\sigma} = \sum \boldsymbol{\lambda_i} \cdot \boldsymbol{C_i} \tag{41}$$

Avec : $\boldsymbol{\sigma}$ la conductivité électrique du liquide, $\boldsymbol{\lambda_i}$ la conductivité molaire ionique de i, $\boldsymbol{C_i}$ la concentration de l'ion i, $\boldsymbol{\Sigma}$ la somme sur l'ensemble des composés ioniques en solution

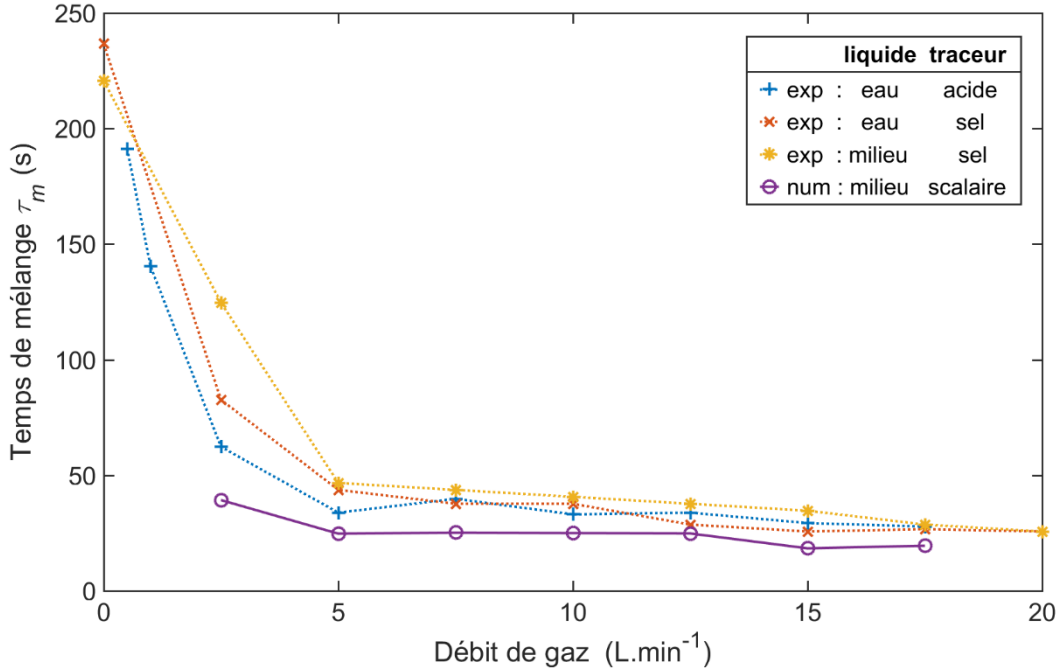


Figure 82 : Comparaison des temps de mélange τ_m obtenus expérimentalement (cuve thermostatée à 35°C) et numériquement (dans le cas d'une simulation laminaire) et fonction du débit d'injection de gaz

d. Limites et Discutions

Figure 83, sont représentés des champs de vitesse ascensionnelle résultants pour les différents débits et sur laquelle on constate une augmentation qualitative (et non représentative) de la présence de macro-instabilités avec l'intensification des conditions d'agitation. De plus, cette augmentation est aussi visible sur la Figure 80.(a) avec l'amplitude croissante des perturbations, autour des valeurs moyennes, des mesures de taux de gaz. Il est donc probable que la qualité de l'agitation du réacteur, à travers le débit d'injection de gaz, ait un impact sur l'exposition de la biomasse à la lumière. En revanche, bien que cela n'ait pas été étudié ici, il est relevé dans la littérature ([137], [138]) que l'échelle (i.e. taille caractéristique) des instabilités décrites par un modèle laminaire d'hydrodynamique numérique peut être dépendante du maillage utilisé. Une étude de sensibilité au maillage constituera donc une première voie d'amélioration possible de nos simulations d'hydrodynamique numérique. De même, opter pour un modèle de simulation des grandes échelles (LES pour *Large Eddy Simulation*) peut sembler opportun, mais ce type de modèle n'existe pas pour l'instant pour simuler par des méthodes eulériennes des écoulements diphasiques

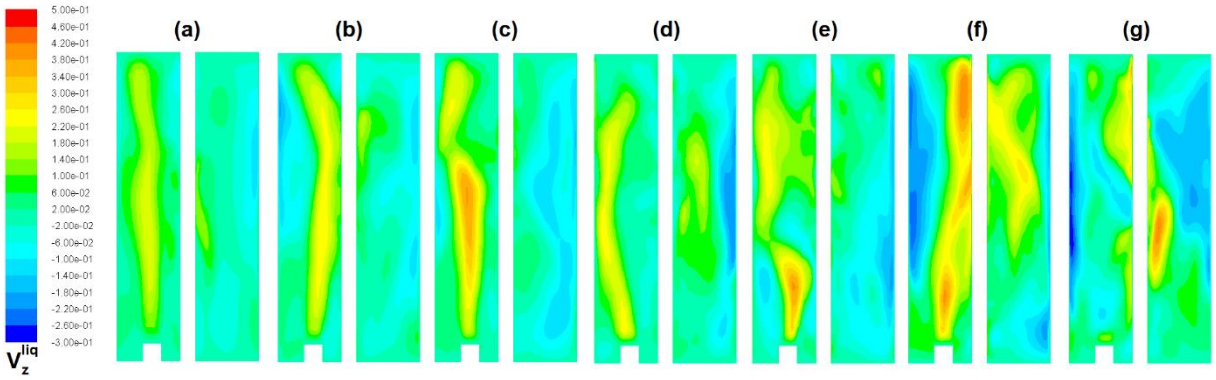


Figure 83 : Représentations graphiques de la vitesse ascensionnelle (selon Oz) du liquide v_z^{liq} en échelle de couleur (m·s^{-1}) *dans le plan médian Oxz, pour la simulation du photobioréacteur après 100 s simulées, resp. pour les différents débits d'injection de gaz : 2,5 ; 5,0 ; 7,5 ; 10,0 ; 12,5 ; 15,0 et 17,5 L·min^{-1} pour* ***(a)***, ***(b)***, ***(c)***, ***(d)***, ***(e)***, ***(f)*** *et* ***(g)***

Par ailleurs, notons qu'une partie des structures hydrodynamiques ne sont pas simulées et ne seront donc pas prises en compte dans l'étape suivante de la détermination des variations de lumière vues par les particules. Premièrement, le choix d'un modèle Euler-Euler pour l'écoulement diphasique fait que le déplacement du liquide induit par les passages des bulles n'est pas considéré. Par une analyse dimensionnelle rudimentaire (équation (42)), on estime le temps caractéristique de ces mouvements à ~1,5·10^{-2} s, ainsi la fréquence caractéristique des variations de lumière qui en résulteraient serait ~75 Hz. Ce sont donc des variations qui seraient lissées par la variable interne i, car par construction sa dynamique est un filtre passe-bas possédant une fréquence de coupure de l'ordre du Hertz (cf. Figure 49). De même, on suppose qu'il en va de même pour les variations de lumière induites par les mouvements tourbillonnaires dans le sillage des bulles, dont la fréquence est liée à celle du passage des bulles, et pour les fluctuations générées par les mouvements des cellules dus aux tourbillons créés par les gradients de vitesses du liquide en proche paroi.

$$\boldsymbol{\tau_{bulles} = \frac{r_b}{v_b}} \tag{42}$$

Avec : $\boldsymbol{\tau_{bulles}}$ *le temps caractéristique du déplacement du liquide dû au passage des bulles,* $\boldsymbol{r_b}$ *le diamètre caractéristique des bulles,* $\boldsymbol{v_b}$ *la vitesse terminale d'ascension des bulles (cf. Tableau 6)*

B. Simulation du Mouvement des Cellules

a. Lâcher de Particules Lagrangien

Une fois la simulation de l'agitation dans le réacteur obtenue, il faut encore lier cette information avec celle de l'éclairement. Rappelons-le en effet, l'objectif est d'obtenir des données concernant l'exposition de la biomasse à la lumière pour nos conditions réactionnelles et sur lesquelles utiliser le modèle cinétique relatif à la lumière, modèle qui a la particularité d'être écrit à l'échelle de la cellule. On procède en ce sens à un lâcher de particules Lagrangien (LPT pour *Lagrangian Particle Tracking*) dans l'écoulement simulé, particules dont la vocation est de venir imiter et enregistrer les mouvements de la biomasse subie due à l'agitation du milieu de culture dans le réacteur. Ainsi, connaissant d'une part les positions successives d'un échantillon de la biomasse et de l'autre l'irradiance régnant en chaque point du volume, on est en mesure de reconstituer le signal d'irradiance vu par l'échantillon en question, comme illustré plus tard en Figure 86 et Figure 87. Cette démarche n'est pas inédite : on peut par exemple la trouver appliquée à un agitateur statique [74], un photobioréacteur de laboratoire [36] ou un bassin à recirculation [70]. Des approches plus pratiques existent aussi : soit par suivi de particules expérimental [105] ou plus simplement par la maîtrise/connaissance des temps de résidences dans les différentes régions du réacteur [139]. Toutefois, jamais à notre connaissance, ce type de résultat (exposition temporelle à la lumière) n'a par la suite été exploité comme entrée d'un modèle dynamique concernant la croissance.

Mais pour que l'exploitation de nos données soit correcte, les trajectoires calculées par cette méthode doivent être représentatives de ce que subit la biomasse. En ce sens, on utilise à nouveau une variable stochastique et une convergence statistique pour assurer la représentativité, comme on a pu le faire dans l'algorithme de Monte-Carlo pour le calcul des champs d'irradiances. Le tirage aléatoire a ici pour objectif d'obtenir une collection de trajectoires toutes distinctes entre elles, via le choix des positions initiales des particules. Le choix de la quantité de particules dans cette collection est fait de sorte à avoir un résultat statistiquement significatif des trajectoires possibles dans le photobioréacteur et ses conditions opératoires données. Par ailleurs, bien qu'il s'agisse d'une population de particules biologiques servant à calculer des cinétiques de croissance à l'échelle cellulaire, ce n'est pour autant pas un bilan de population mais bien une méthode d'échantillonnage du mouvement des cellules dans le réacteur (cf. discussion en I.3.B.).

b. Simulation du Mouvement des Particules/Cellules

Concrètement, étant donné que l'on suppose toujours l'absence de phénomène de ségrégation de la biomasse, le volume est homogène en concentration de biomasse. Le tirage aléatoire des positions initiales des particules est donc configuré comme uniforme sur l'ensemble de volume, via un script MATLAB permettant de créer le fichier ".inj" utilisé dans FLUENT. Pour ce qui est de la quantité d'informations à recueillir, la question revêt deux dimensions à savoir le nombre de particules suivies, ainsi que la durée pendant laquelle elles sont suivies. Pour des questions pratiques concernant le dépouillement des données le nombre de particules, N_p, est choisi à 10^4. La durée, quant à elle, est fixée à 100 s soit environ deux fois le temps de mélange (puisque cette durée a déjà permis d'établir l'écoulement) et avec un pas de temps de 0,01 s, il en résulte 10^4 évènements enregistrés. Ce pas de temps étant jugé suffisamment petit pour permettre une intégration correcte des phénomènes sur le temps de relaxation biologique τ_{bio}=0,3 s. La validité de ce dimensionnement pour une description correcte de l'exposition à la lumière de la biomasse est réalisée *a posteriori* et fait l'objet d'un paragraphe dédié.

D'autre part, dans la simulation FLUENT, les particules sont définies comme particules fluides (*massless*), ce qui implique qu'elles suivent exactement le liquide sans interagir avec lui ou entre elles, les cellules réelles de spiruline étant iso-denses (au moins en première approche, puisqu'elles ne peuvent flotter ou sédimenter qu'en l'absence d'agitation). Le calcul, lui, conserve la même configuration que précédemment, c'est-à-dire avec les mêmes pas de temps, nombre d'itérations par pas de temps et demeure instationnaire. Ce dernier point, bien que coûteux en temps de calcul, est nécessaire pour décrire l'effet des macro-instabilités de l'écoulement (précédemment mis en évidence) sur le mouvement des cellules, au-delà du simple mouvement ascensionnel du gazosiphon. Un exemple de trajectoire ainsi obtenue sur une particule pendant 100 s en présence d'une injection de 10 L·min^{-1} de gaz est montré en Figure 86.

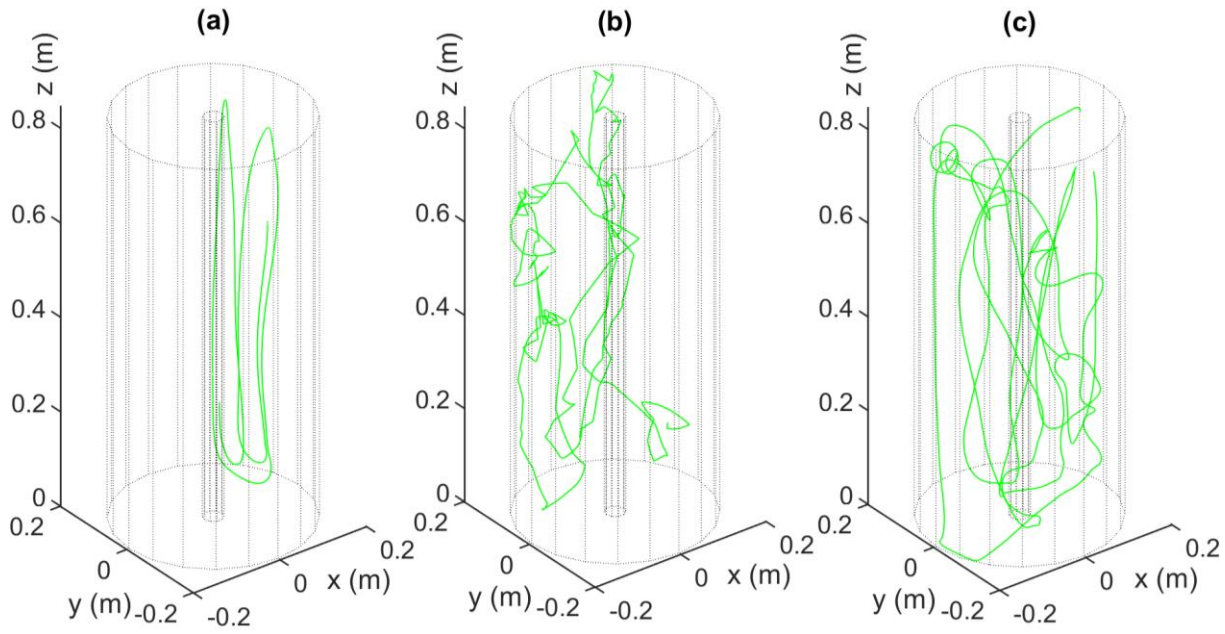


*Figure 84 : Représentation 3D de la trajectoire suivie par une particule, **trait plein vert**, dans le photobioréacteur pilote pendant 100s avec un bullage de 10 L·min^{-1} avec en **pointillés gris** les parois interne et externe de la cuve, avec en **(a)** le cas d'une simulation k-**ε**, **(b)** une simulation k-**ε** avec le modèle de marche aléatoire et en **(c)** une simulation en laminaire*

Tout comme pour la configuration des positions initiales des particules, il faut encore que l'iso-concentration des particules à travers le volume soit conservée tout au long de leur voyage dans le réacteur, qu'elles ne s'accumulent pas préférentiellement dans une région du réacteur. Ainsi, il faut valider cet aspect pour assurer l'exploitation des données, sans quoi cela conduirait à une surreprésentation de cette région en termes d'éclairement et fausserait donc tout bilan entre la lumière dissipée dans le réacteur et perçue par les particules. Empêchant ainsi le calcul de cinétique, comme cela a déjà pu être constaté dans la littérature [36]. C'est d'ailleurs cette contrainte qui a abouti au choix d'une simulation avec un modèle laminaire pour l'écoulement tel qu'exposé ci-avant. Le nombre de Reynolds de l'écoulement est ici de ~1,7·10^4 qui est donc intermédiaire aux régimes pleinement laminaire et turbulent pour une colonne à bulle, en conséquence de quoi la simulation fut dans un premier temps réalisée avec un modèle de type $k\varepsilon$, c'est-à-dire turbulent. Modèle d'écoulement auquel était adjoint un coefficient de dispersion et d'interaction turbulente pour les interactions entre phases, selon les lois données par Simonin [140], [141]. Cependant, le champ de vitesse alors obtenu (avec $k\varepsilon$) n'est alors qu'un champ moyen dans le temps puisque par construction les turbulences ne sont pas simulées mais modélisées. En l'état, les trajectoires des particules issues de cette simulation ne laissent apparaître que la structure principale de l'écoulement à savoir la recirculation ascension/descente due aux panaches de bulles, comme visible sur la Figure

84.(a). Les variations de lumière vues par les cellules dues aux macro-instabilités ne sont alors pas représentées et une grande part de l'information recherchée est alors absente. Pour avoir une représentation plus réaliste de la trajectoire des particules dans l'écoulement turbulent, il existe un modèle dédié dit de marche aléatoire (RWM, pour *Random Walk Model*) consistant à appliquer un changement de direction aléatoire aux mouvements des particules, afin de représenter l'effet des turbulences. Ces redirections sont basées sur le niveau de turbulence local de l'endroit où se trouvent les particules. Sont alors obtenues des trajectoires telles que représenté en Figure 84.(c). On constate alors qu'effectivement les trajectoires sont moins ordonnées, en raison de la présence de ces redirections, et semblent donc plus proches des chemins suivis par les cellules dans le cas réel. De plus, ainsi conduite, la simulation de mène pas à une base de données exploitable. Tout d'abord une grande fraction de la population disparaît lors du calcul (~10%). Bien que cela ne soit pas rédhibitoire pour l'exploitation, cela constitue en revanche une mauvaise augure quant à l'acuité de la résolution numérique. Et effectivement en Figure 85, on constate que la répartition statistique des particules sur le volume révèle une accumulation préférentielle en parois et en fond de cuve. Cela est d'autant plus problématique qu'ici les particules sont calculées comme n'ayant aucune masse, aucune force ne peut donc les ségréger, il s'agit donc d'un biais purement numérique. Trois hypothèses peuvent expliquer cela : un tel problème peut provenir d'une surestimation de la valeur de l'énergie cinétique turbulente dans le modèle $k\varepsilon$, sur lequel se base par la suite le calcul de marche aléatoire. Cette mauvaise estimation pourrait provenir soit de l'utilisation du maillage de type CUTCELL dont ce serait semble-t-il un défaut [131]. Ou bien alors provient du fait que l'écoulement est essentiellement laminaire (bien que pouvant être localement turbulent) ce qui rend le choix des équations en $k\varepsilon$ inadaptées, les macro-instabilités étant transformées en sources de turbulences quand bien même elles constituent une circulation organisée, comme signalé en [142]. En effet, les macro-instabilités de l'écoulement dues aux variations temporelles de gradients de fraction volumique du gaz ne sont pas de la turbulence, et ne peuvent être décrites par un modèle de turbulence. Il se peut aussi que le modèle de marche aléatoire soit inadapté aux écoulements faiblement turbulents.

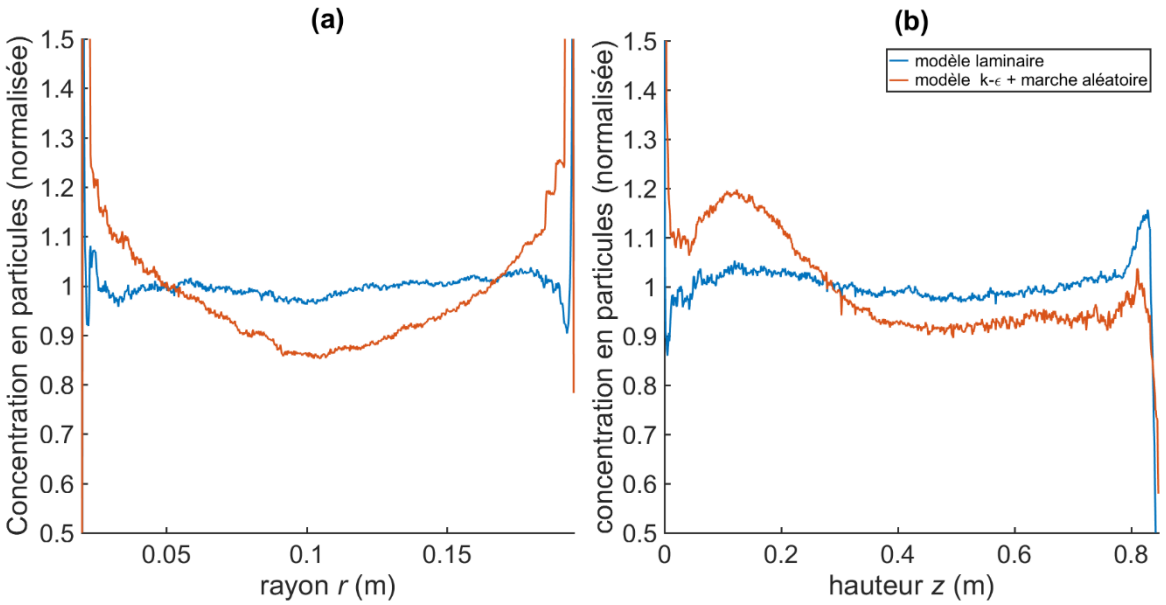


*Figure 85 : Répartitions normalisées des particules resp. pour **(a)** et **(b)** : selon le rayon et selon la hauteur dans le réacteur, en fonction du modèle hydrodynamique utilisé et sur l'ensemble de la base de données (i.e. cumulées sur toutes les particules et tous les pas de temps)*

Par ailleurs, sur ce même graphique est superposée la répartition spatiale des particules dans le cas du modèle laminaire d'écoulement, qui est le choix final. On constate alors globalement une meilleure homogénéité sur le volume, comparativement au cas précédent. On observe toutefois aussi la présence d'un artefact (sans doute numérique) en très proche parois. Ainsi dans l'épaisseur de la première maille (0,5 mm) on constate une aberration sur la concentration volumique de particules. Cette fois, deux hypothèses peuvent être avancées. La première concerne un biais possible sur la prise en compte soit des lois de rebond des particules en paroi, ou alors cette incohérence serait due au facettage du volume réel du rendu 3D (représentation d'un cylindre par un polyèdre). Cela concerne une fraction suffisamment faible de la population, et ne constitue donc pas un obstacle pour la poursuite de la modélisation de la lumière vue par la biomasse. Toujours aux limites géométriques du système, on relève une seconde hétérogénéité en concentration de particules, de moindre ampleur ($\pm$10%) mais plus étendue (quelques centimètres), sans que l'on puisse expliquer son origine. Ce dernier problème peut avoir un impact sur l'intégration du champ de lumière par la population de particules aux fortes concentrations en biomasse, pour lesquelles le champ de lumière (non nul) est essentiellement cantonné aux régions situées en proche paroi.

c. Exploitation des Résultats

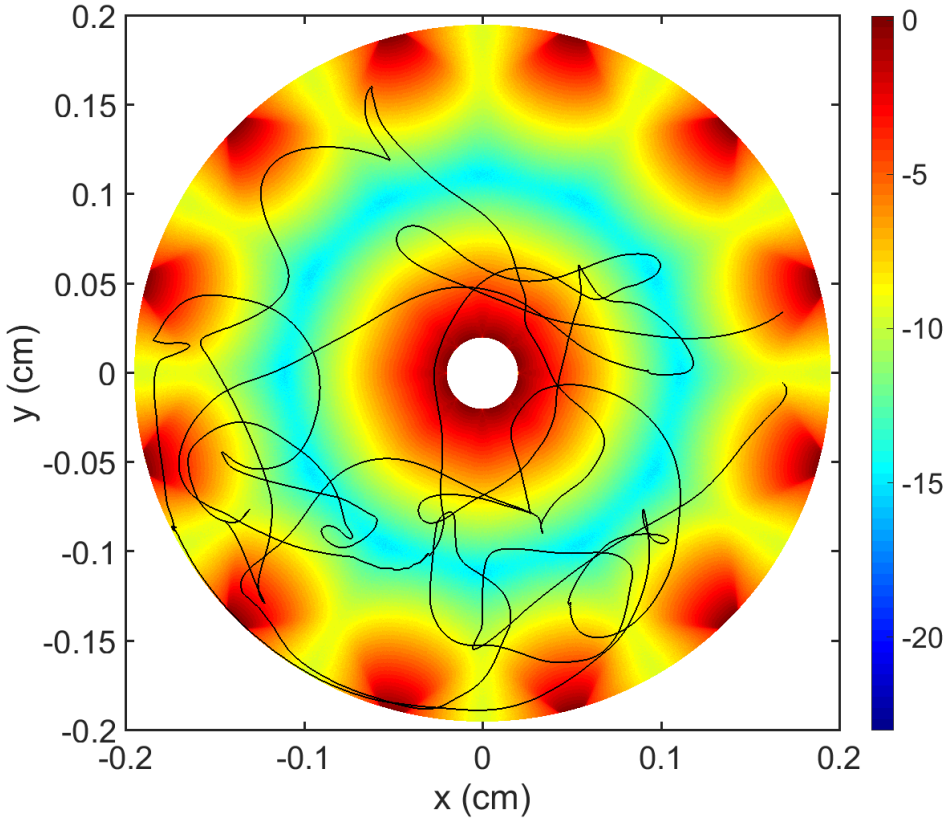


*Figure 86 : Projection sur Oxy de la superposition en **trait plein noir** la trajectoire de la Figure 84.(c) et d'un champ d'irradiance normalisé en échelle logarithmique en **nuances de couleurs** (20 sources LED, 0,6 g·L^{-1} , Figure 67.(c))*

Ainsi on possède désormais une base de données contenant un échantillonnage du mouvement des cellules de la biomasse induit par les conditions d'agitation. Cette base de données est ensuite mise en regard des champs d'irradiance obtenus dans la partie précédente (Figure 86), on est alors capable de reconstituer le signal d'irradiance vue par les particules en question (Figure 87). On procède donc maintenant à la vérification de la validité des valeurs d'irradiances relevées par les particules. On le rappelle encore, le volume réactionnel est homogène en concentration (hypothèse "parfaitement mélangé"). Il en va de même pour les particules. Or, si elles sont effectivement réparties de façon homogène sur l'ensemble du volume et qu'elles sont suffisamment nombreuses, alors mathématiquement l'irradiance vue par l'ensemble de la population est statistiquement représentative du champ spatial d'irradiance dans le photobioréacteur (équation (43)).

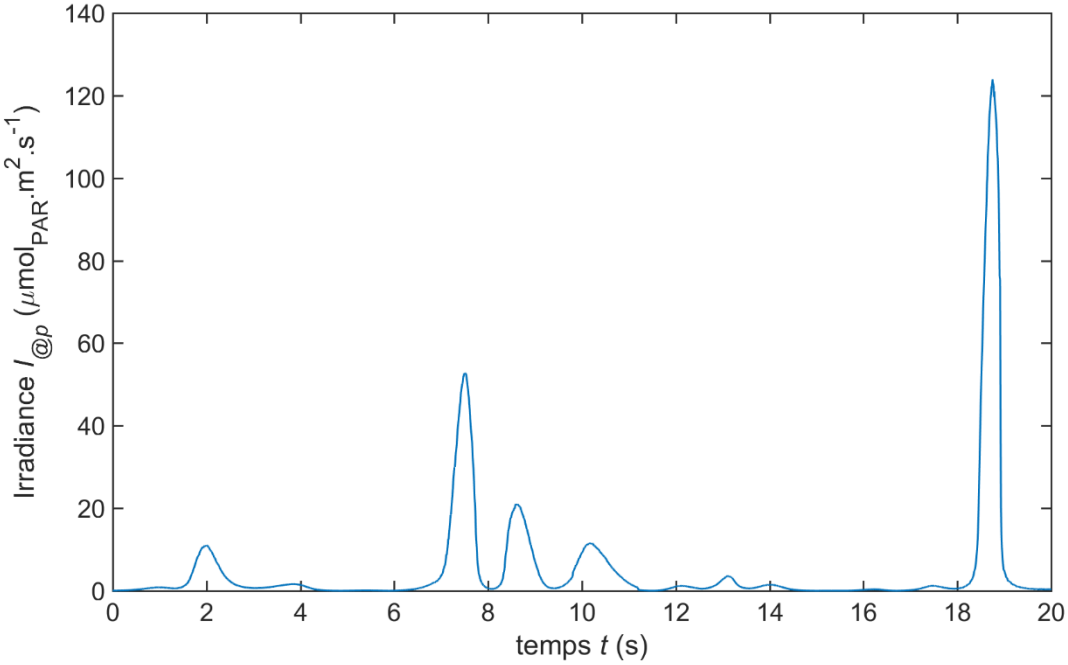


Figure 87 : Extrait du signal temporel de lumière vue par la particule de la Figure 86 pendant 20 s (photobioréacteur pilote, 0,6 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz)

Ce n'est autre qu'une méthode stochastique de l'évaluation d'une intégrale. Et c'est ce que l'on contrôle avec la Figure 88, en comparant les distributions de niveaux d'irradiance obtenus directement depuis le champ spatial d'irradiance et depuis la base de données des particules. De par la concordance des deux distributions, on peut conclure que le lâcher de particules Lagrangien permet effectivement un échantillonnage correct de l'hétérogénéité en lumière dans le réacteur. L'obtention de la convergence statistique de la distribution n'est pas étonnante puisque la base de données des particules contient 10^8 éléments soit six fois plus que n'en contient le maillage du volume dans l'algorithme de Monte-Carlo. Il s'agit en revanche d'une validation de leur iso-répartition dans le volume, cela signifie donc que les artéfacts observés en Figure 85 ne sont, ici, pas limitant pour la convergence numérique de notre méthode.

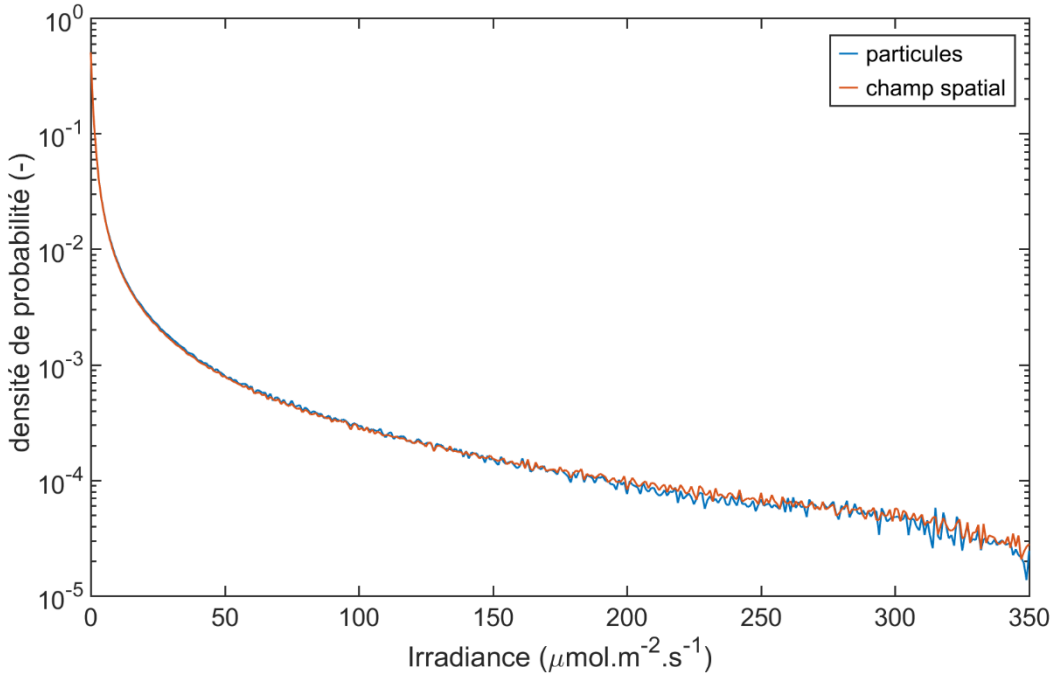


Figure 88 : Comparaison des distributions des niveaux d'irradiance du champ spatial de lumière et celles échantillonnées par la base de données du lâcher de particules (photobioréacteur pilote, 1g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz)

Néanmoins, l'objectif du lâcher de particules Lagrangien n'est pas d'échantillonner à nouveau le champ spatial, puisque l'on possède déjà l'information, mais bien d'évaluer l'effet du terme d'histoire dans la cinétique biologique (variable interne i). Ce qu'il faut donc en réalité valider c'est l'échantillonnage des évènements possibles d'exposition à la lumière. Pour cela, on propose d'étudier les variations temporelles d'irradiance vue par les particules, puisque c'est lors des variations d'irradiance que la variable interne i intervient et modifie la cinétique. Contrairement à la distribution des valeurs d'irradiance, pour les variations d'irradiance on ne possède pas de point de comparaison. On choisit donc d'étudier la convergence de sa moyenne et de son écart type en fonction de la quantité de données accumulées au cours de la simulation Lagrangienne. Par l'examen de la Figure 89 on déduit que le dimensionnement du lâcher de particules permet la convergence statistique de la distribution des variations d'irradiance échantillonnées par cette approche. Par contre, que la convergence soit établie ne valide pas qu'elle le soit autour de la bonne valeur. La justesse est déterminée, non pas par la quantité d'informations, mais par l'exactitude de la simulation hydrodynamique gaz-liquide (discutée à l'échelle macroscopique, cf. partie III.3.A.) et du suivi lagrangien des particules (discutée précédemment).

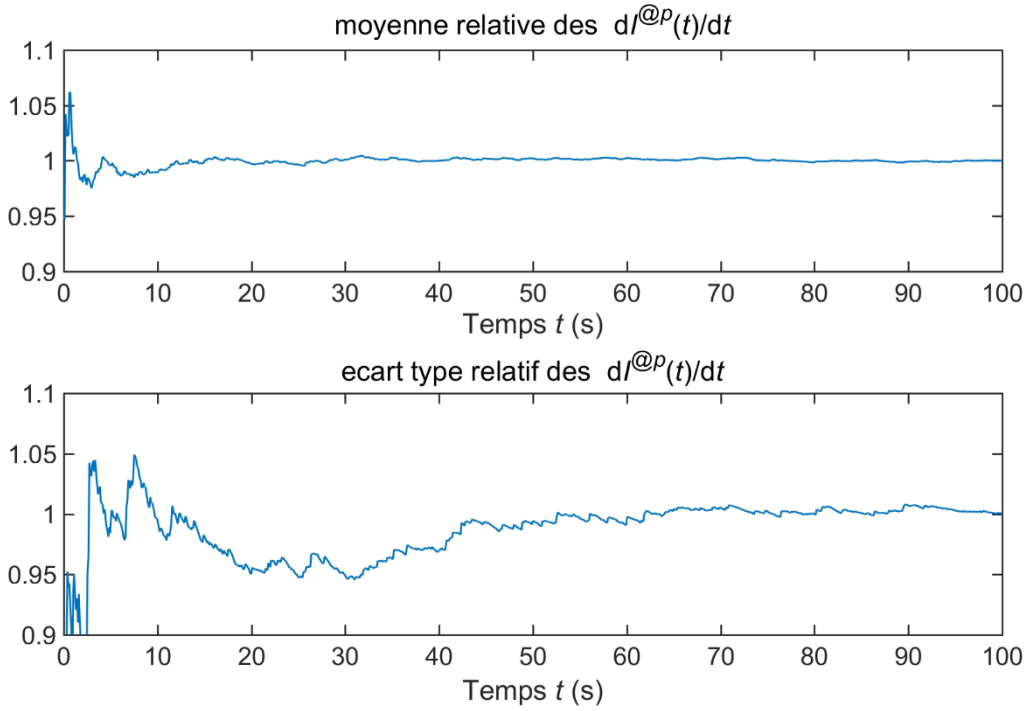


Figure 89 : Convergences de la moyenne et de l'écart type normalisés des variations d'irradiances échantillonnées par les particules au cours des 100 s de simulation (photobioréacteur pilote, 1 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz)

L'échantillonnage de l'exposition de la biomasse à la lumière étant maintenant validé, on s'attèle désormais à son exploitation. Si l'échantillon est représentatif et suffisamment important, alors la moyenne des irradiances vues par les particules est égale à la moyenne volumique du champ d'irradiance (équation (43)), de plus ceci est vrai pour chaque instant. De façon similaire, cette approche statistique peut être abordée autrement (équation (44)) : si des particules voyagent suffisamment longtemps dans le volume, alors les moyennes temporelles vues par chaque particule sont égales entre elles, et prennent donc nécessairement la valeur de la moyenne volumique du champ d'irradiance (par référence à l'équation (43)). Concrètement, le suivi d'une unique particule sur un temps infiniment long et le suivi d'un nombre infini de particules sur une courte durée sont équivalents pour échantillonner l'hétérogénéité en lumière du photobioréacteur. Pour le calcul de la cinétique par contre, un temps d'acquisition minimal est requis : environ cinq fois le temps de relaxation τ_{bio} de la variable interne i afin de s'affranchir de l'influence des conditions initiales et donc obtenir une population représentative des conditions opératoires seules. Dans la réalité de nos simulations, ni le nombre de particules, ni la durée de suivi ne sont infinies. À titre d'exemple (illustré en Figure 90), le lâcher de particules réalisé ici permet effectivement d'avoir une bonne convergence à tout instant t de la moyenne sur la population $\tilde{I}(t)$ ($\pm$7%) vers la moyenne

volumique, ce n'est par contre pas le cas concernant la moyenne temporelle de chaque particule $\overline{I^{@p}}$ ($\pm$60%). On peut en déduire que 10^4 particules suffisent à représenter l'hétérogénéité en lumière, mais que 100 s ne permettent pas à une particule de parcourir le réacteur de façon représentative de ces hétérogénéités.

$$\forall t \lim_{N_p \to \infty} \widetilde{I^{@p}}(t) = \langle I \rangle \ avec \begin{cases} \tilde{I}(t) = \dfrac{1}{N_p} \displaystyle\sum_{p=1}^{N_p} I^{@p}(t) \\ \langle I \rangle = \displaystyle\iiint I \cdot \delta V \end{cases} \tag{43}$$

Avec : t un évènement d'échantillonnage, N_p le nombre de particules dans la population, $\widetilde{I_{@p}}$ la moyenne sur la population des irradiances vues par chacune des particules, $\langle I \rangle$ la moyenne volumique du champ d'irradiance, I le champ d'irradiance locale, δV un volume élémentaire, $I_{@p}$ l'irradiance vue par la particule p

$$\begin{cases} \forall p, & \lim_{T \to \infty} \overline{I^{@p}} = cste \\ \forall t, & \lim_{N_p \to \infty} \widetilde{I^{@p}}(t) = \langle I \rangle \end{cases} \Longrightarrow \forall p, \overline{I^{@p}} = \langle I \rangle \tag{44}$$

$$avec : \ \overline{I^{@p}} = \frac{1}{T} \int_{t=0}^{T} I^{@p}(t) \cdot \delta t$$

Avec : t un évènement d'échantillonnage, N_p le nombre de particules dans la population, $\tilde{I}$ la moyenne sur la population des irradiances vues par chacune des particules, $\langle I \rangle$ la moyenne volumique du champ d'irradiance, δt un pas de temps élémentaire, $I^{@p}$ l'irradiance vue par la particule p, $\overline{I^{@p}}$ la moyenne temporelle d'irradiance vue par la particule p pendant la période d'échantillonnage T, $cste$ une constante arbitraire

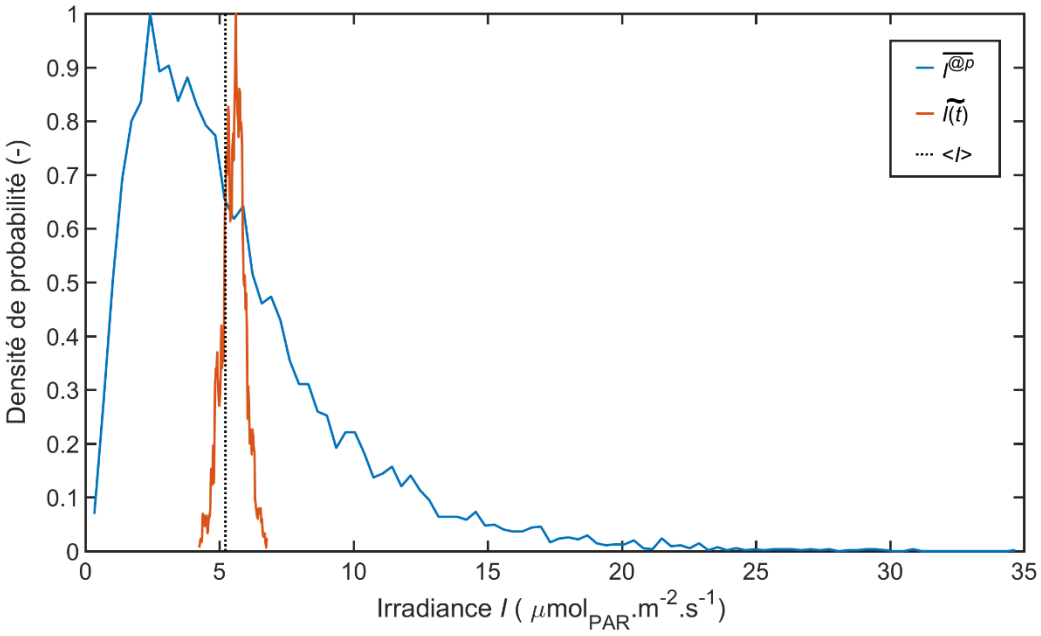


Figure 90 : Densités de probabilité de la moyenne d'irradiance vue par l'ensemble de la population à chaque instant $\widetilde{I^{@p}}$ et de la moyenne temporelle vue par chaque particule $\overline{I^{@p}}$ (photobioréacteur pilote, 1 g·L^{-1} de spiruline, 20 sources LED, 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz)

d. Calcul de la Cinétique de Croissance Résultante

Ces deux raisonnements peuvent alors être reconsidérés au regard des deux cas limites (décrits en partie I.2.B et II.4.C) concernant la variable interne i et la constante de temps τ_{bio} qui la régit. Ainsi, dans le cas d'une adaptation instantanée de la cinétique à la lumière, c'est à dire lorsque τ_{bio} tend à être nul, i_{ia} peut directement être rapprochée de l'irradiance vue par la particule $I^{@p}$. La moyenne sur la population est donc égale à celle sur le volume (comme pour l'équation (43)), y compris après composition par la fonction μ_{lum} (le calcul de la moyenne étant une application linéaire). Par conséquent, cela entraine dans ce premier cas limite que la cinétique globale du réacteur résultant du cas d'une adaptation instantanée de i à l'irradiance puisse être déduite directement du champ spatial d'irradiance (équation (45)), sans recourir aux données des particules.

De la même manière, le cas d'une cinétique intégrée, c'est-à-dire lorsque τ_{bio} tend à être infini, est équivalent à la moyenne temporelle des irradiances vues par une particule sur un temps long $\overline{I^{@p}}$ (équation (47)). Pour rappel : l'équation de i est un filtre passe bas. Pareillement, l'assertion reste vraie après composition par la fonction μ_{lum}. Par conséquent,

ce second cas limite d'un comportement intégré des variations d'irradiances vues par les particules peut être entièrement déterminé par le champ spatial à travers sa moyenne (équation (46)).

Les deux valeurs extrêmes du paramètre τ_{bio} permettent de s'affranchir de l'information temporelle pour la détermination de la cinétique, et cela est vérifié numériquement Figure 91 avec la comparaison des valeurs obtenues par les deux méthodes : particulaire et volumique. En revanche, puisque l'on déduit la croissance globale du réacteur d'après un échantillon représentatif de la population biologique, cela implique une hypothèse forte : les cinétiques des éléments de la population sont indépendantes, il n'y a pas concertation/intercorrélation entre les éléments dans le mécanisme déterminant leur croissance.

$$\forall\{t;p\}\begin{cases} i_{ia}^{p}(t) = \lim\limits_{\tau_{bio}\to 0^{+}} i_{bio}^{p}(t) = I^{@p}(t) \\ \lim\limits_{N_p\to\infty} \mu_{lum}\widetilde{(I^{@p})} = \langle \mu_{lum}(I)\rangle \end{cases} \tag{45}$$

$$\Longrightarrow \mu_{lum}\widetilde{(i_{ia}^{p})} = \langle \mu_{lum}(I)\rangle = \mu_{ia}^{PBR}$$

Avec : t un évènement d'échantillonnage, p un élément de la population de particules, N_p le nombre de particules dans la population, $\tilde{x}$ la moyenne sur la population de particules de la grandeur x, $\langle x\rangle$ la moyenne volumique sur le réacteur de la grandeur x, $I^{@p}$ l'irradiance vue par la particule p, $i^{p}(t)$ la valeur de la variable interne de la particule p à l'instant t, $i_{ia}^{p}(t)$ la valeur de la variable interne de la particule p à l'instant t dans le cas d'une adaptation instantanée, τ_{bio} temps de relaxation de i, μ_{lum} l'influence de la lumière sur la cinétique, μ_{ia}^{PBR} influence de la lumière sur la cinétique globale du photobioréacteur selon l'hypothèse d'une adaptation instantanée

$$\forall\{t;p\}\ i_{p}^{fi}(t) = \lim\limits_{\tau_{bio}\to\infty} i_{p}(t) = \overline{I_{@p}} = \langle I\rangle$$

$$\Longrightarrow \mu_{lum}\widetilde{\left(i_{p}^{fi}\right)} = \mu_{lum}(\langle I\rangle) = \mu_{fi}^{PBR} \tag{46}$$

Avec : p un élément de la population de particules, $\tilde{x}$ la moyenne sur la population de la grandeur x, $\langle x\rangle$ la moyenne volumique sur le réacteur de la grandeur x, $\overline{x}$ la moyenne temporelle de la variable x pendant la période d'échantillonnage, $I^{@p}$ l'irradiance vue par la particule p, $i^{p}(t)$ la valeur de la variable interne de la particule p à l'instant t, $i_{fi}^{p}(t)$ la valeur de la variable interne de la particule p à l'instant t dans le cas d'un comportement intégré, τ_{bio} temps de relaxation de i, μ_{lum} l'influence de la lumière sur la cinétique, μ_{fi}^{PBR} influence de la lumière sur la cinétique globale du photobioréacteur selon l'hypothèse d'un comportement intégré

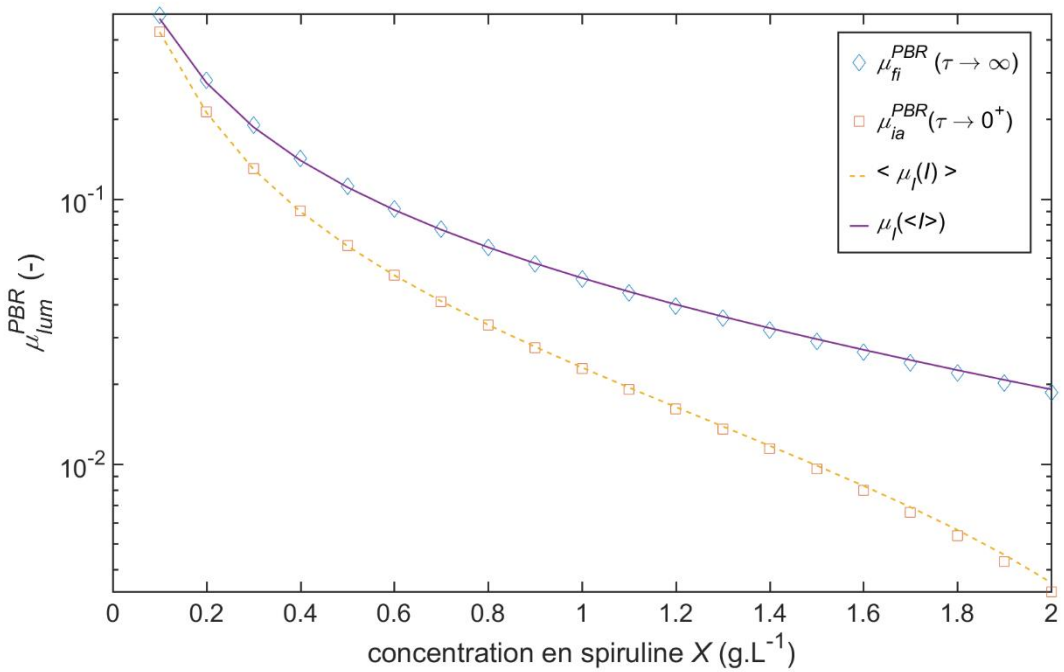


Figure 91 : Comparaison des cinétiques de croissance relatives à la lumière selon les deux hypothèses (réaction instantanée ou intégrée) qu'elles soient calculées à partir du champ spatial de lumière ou de la base de données du lâcher de particules, resp. traits et marques (photobioréacteur pilote, 20 sources LED, 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)

Pour revenir à l'estimation des cinétiques dans le cas réel (i.e. $\tau_{bio} \notin \{0\,;\,\infty\}$) : l'ensemble de la procédure a été réalisée et ce pour toute une gamme de conditions opératoires concernant la concentration en microalgues, le débit d'injection de gaz ou la quantité de sources lumineuses allumées, qui sont autant de cas de figure pour lesquels la croissance biologique pourra être simulée. Mais il se trouve que l'information ainsi acquise est peu commode à exploiter en l'état pour la simulation d'une culture, puisqu'il s'agit d'une matrice de données brutes (signaux d'irradiance vue par 10^4 particules pendant 100 s échantillonnés à 100 Hz). Pour cela, les données sont au préalable interprétées pour au final être utilisées comme paramètres opératoires de la culture. Cela se fait à travers une caractérisation de la façon dont un photobioréacteur expose sa biomasse à la lumière. On introduit alors un module, noté Γ (gamma majuscule), déjà défini par Terry *et al.* [76], qui utilise les deux cas limites déjà exposés (μ_{fi} et μ_{ia} exposés ci-avant) et qui caractérise le taux d'intégration du signal lumineux (équation (47)). C'est-à-dire à quel point le réacteur (et sa conduite) permet à la biomasse d'intégrer les variations de lumière dans sa cinétique de croissance. Γ vient donc situer la cinétique réelle entre les deux cas limites, avec une cinétique

de type intégrée pour des valeurs de Γ proches de 1 et de type instantanée lorsque Γ est proche de 0 (cf. Figure 92).

$$\boldsymbol{\Gamma = \frac{\mu_{ia} - \mu_{bio}}{\mu_{ia} - \mu_{fi}}} \tag{47}$$

Avec : $\boldsymbol{\Gamma}$ le coefficient d'intégration du signal lumineux, $\boldsymbol{\mu_{bio}}$, $\boldsymbol{\mu_{fi}}$ et $\boldsymbol{\mu_{ia}}$ resp. les taux de croissance biologique globaux relativement à la lumière lorsque $\tau_{bio} = 0{,}3\ s$ (cas réel), $\tau_{bio} \to \infty\ s$ (intégration totale du signal) et $\tau_{bio} \to 0^{+} s$ (réaction instantanée à la lumière)

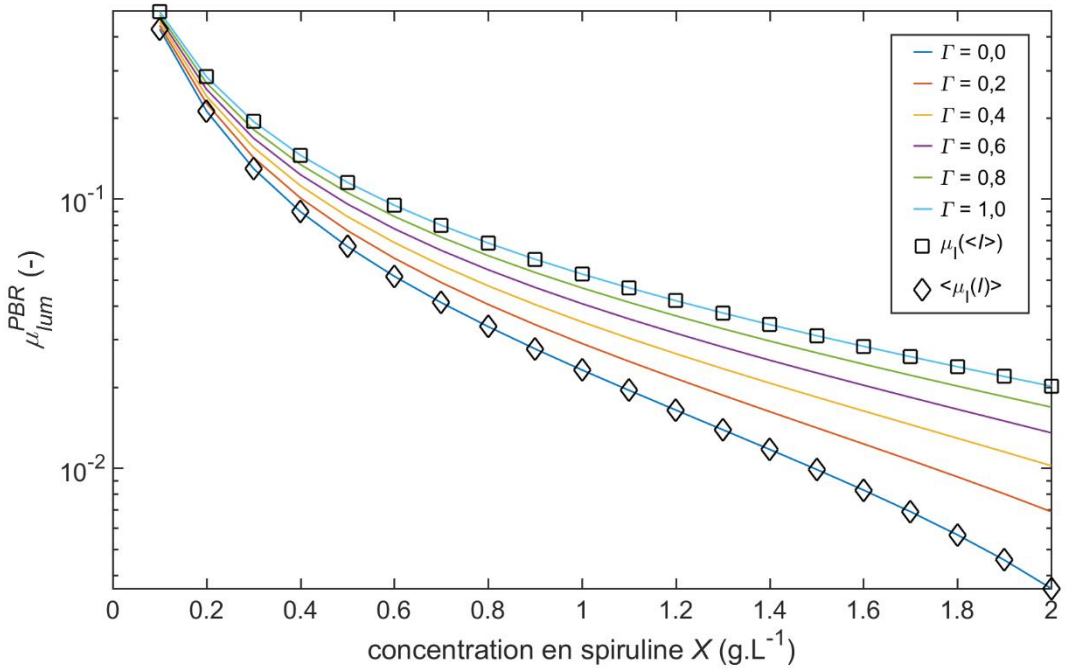


Figure 92 : Représentation de l'influence de la lumière sur la cinétique globale du réacteur en fonction de la valeur du module Γ, relativement aux deux cas limite déjà mis en évidence (Figure 91)

Les μ_{fi} et μ_{ia}étant déjà connus (du champ spatial d'irradiance ou des signaux eux-mêmes, cf. équation (45) et (46)), il reste à estimer μ_{bio} sachant que l'on possède maintenant toutes les données nécessaires. Pour cela, on applique simplement la formule du calcul de la variable interne, i (équation (24), Figure 93.(a)), aux signaux de lumière avant d'opérer les calculs de taux de croissance global du photobioréacteur (formule (48), Figure 93.(b)).

$$\boldsymbol{\mu_{bio}^{PBR} = \widetilde{\mu_{bio}^{\mathcal{C}}}} \tag{48}$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_{bio}^{PBR}}$ *le taux de croissance biologique relativement à la lumière lorsque* $\tau_{bio} = 0{,}3\ s$ *intégré sur l'ensemble de photobioréacteur,* $\boldsymbol{\mu_{bio}^{\mathcal{C}}}$ *le taux de croissance de la cellule* $\mathcal{C}$ *lorsque* $\tau_{bio} = 0{,}3\ s$, $\sim$ *la moyenne sur l'ensemble la population*

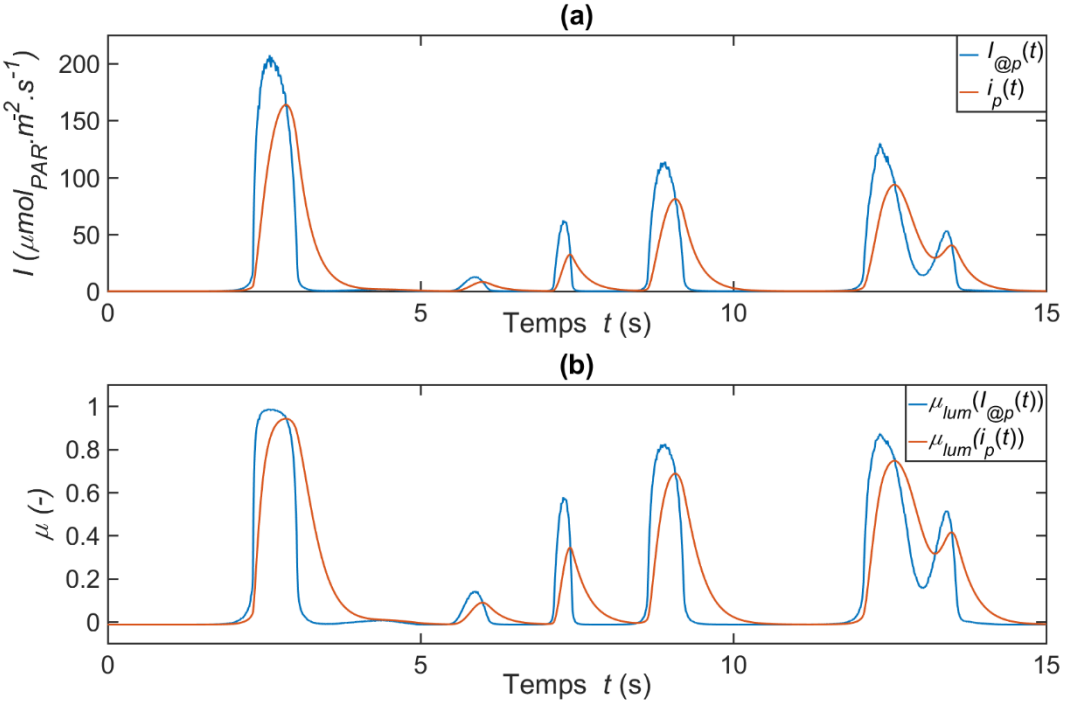


Figure 93 : Pour une particule pendant 15 s (photobioréacteur pilote, 0,5 g·L⁻¹ de spiruline, 20 sources LED, 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1} et 10 L·min^{-1} de gaz), ***(a)*** *comparaison entre l'irradiance* $I_{@p}$ *vue par une particule arbitraire et la valeur correspondante de sa variable interne* i, ***(b)*** *les croissances spécifiques correspondantes.*
Remarque : $\tau_{bio} = 0 \implies \mu_{lum}(i_p) = \mu_{lum}(I_{@p})$

e. Discussion

Les deux cas limites, on l'a vu, sont entièrement définis par le champ spatial de lumière et ses hétérogénéités qui sont fonction de la concentration de biomasse, ce qui explique l'évolution de μ^{PBR} avec la concentration. En revanche le positionnement de μ_{bio}^{PBR} entre les cas limites est fonction de la variable interne et donc n'est régi que par la capacité de i à suivre le signal subi par les cellules relativement à la constante τ_{bio}, et ce quelle que soit l'amplitude des variations dans le signal (fonction du champ de lumière et donc de la concentration), cf. équation (24). La vitesse de variation du signal, pour un champ de lumière donné, est due aux déplacements des cellules dans celui-ci et est donc imposée par l'écoulement hydrodynamique dans le réacteur. Lorsque le taux d'intégration biologique du signal, Γ, est tracé en fonction de la concentration en biomasse, visible Figure 94, on constate qu'il est constant, hormis aux faibles concentrations. Ainsi, quelle que soit la concentration en biomasse et le champ résultant, le positionnement Γ de la cinétique réelle μ_{bio}^{PBR} est une constante qui est seulement fonction des conditions d'agitation du photobioréacteur (pour un τ_{bio} fixé). La variation des valeurs de Γ visible aux faibles concentrations, on présume, peut s'expliquer par le recouvrement spatial des contributions de plusieurs sources, qui avait été constaté Figure 69, offrant donc des variations de lumière vue supplémentaires et donc une potentielle meilleure intégration des hétérogénéités en lumière.

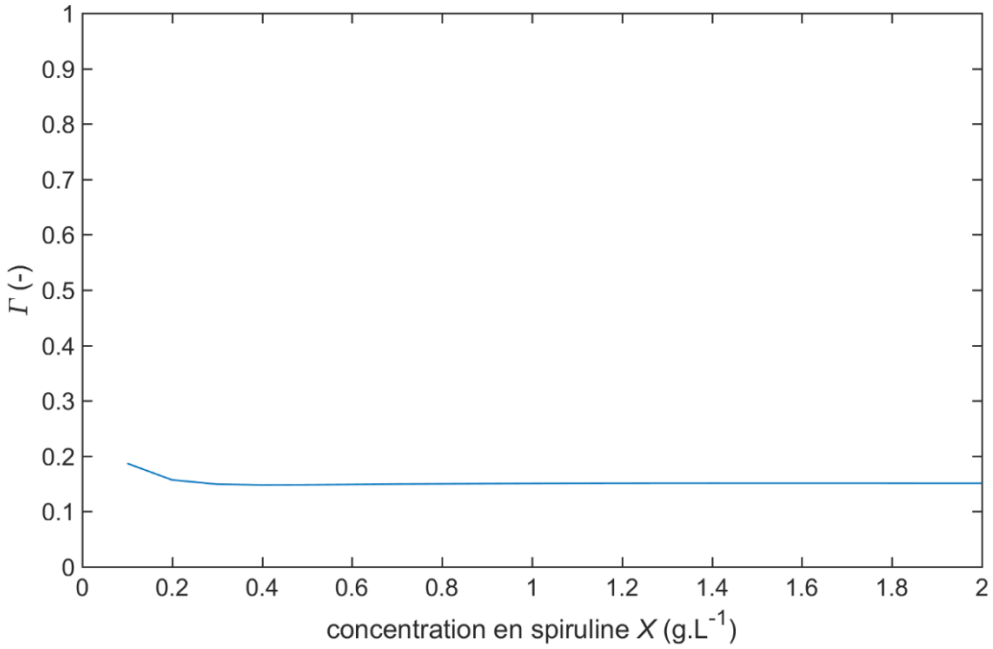


Figure 94 : Le module Γ en fonction de la concentration en spiruline X (photobioréacteur pilote, 20 sources LED, 10 L·min^{-1}, 350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1})

Par ailleurs, l'erreur commise en conservant une valeur constante de Γ pour simuler les basses concentrations est minime puisqu'alors la différence entre les deux cas limites tend vers zéro (cf. Figure 92). En conséquence, la connaissance de la grandeur Γ permet de décrire la cinétique de croissance réelle (en incluant l'inertie due à la variable interne i) en fonction uniquement des deux cas limites, respectivement de réaction instantanée ou intégrée, qui tous deux peuvent s'écrire avec l'unique connaissance de la distribution volumique des irradiances dans le volume (cf. paragraphe précédent). L'influence de l'agitation sur la croissance dans un photobioréacteur, bien que complexe à quantifier numériquement (cf. III.2 et 3), peut se réduire à un unique paramètre. De plus, elle n'évolue pas au cours de la culture (i.e. avec l'augmentation de la concentration en biomasse), sauf si les conditions opératoires varient (ex. modification de l'agitation), Figure 95, comme le laissait penser la Figure 83 en conclusion de la partie précédente sur la mécanique des fluides numériques. Ainsi, on observe effectivement une augmentation du module Γ et donc de cinétique de croissance avec le débit gaz. Cependant, on constate aussi que, quelles que soient les conditions simulées, le photobioréacteur pilote reste globalement assez proche d'un comportement instantané de la cinétique μ_{ia}^{PBR} (défavorable). Il est étonnant de constater que la corrélation linéaire sur la courbe de Γ laisse à croire que celui-ci puisse être non-nul en l'absence d'agitation, cependant il reste peu probable que le lien entre le débit de gaz et Γ soit effectivement linéaire sur une gamme plus étendue de débit.

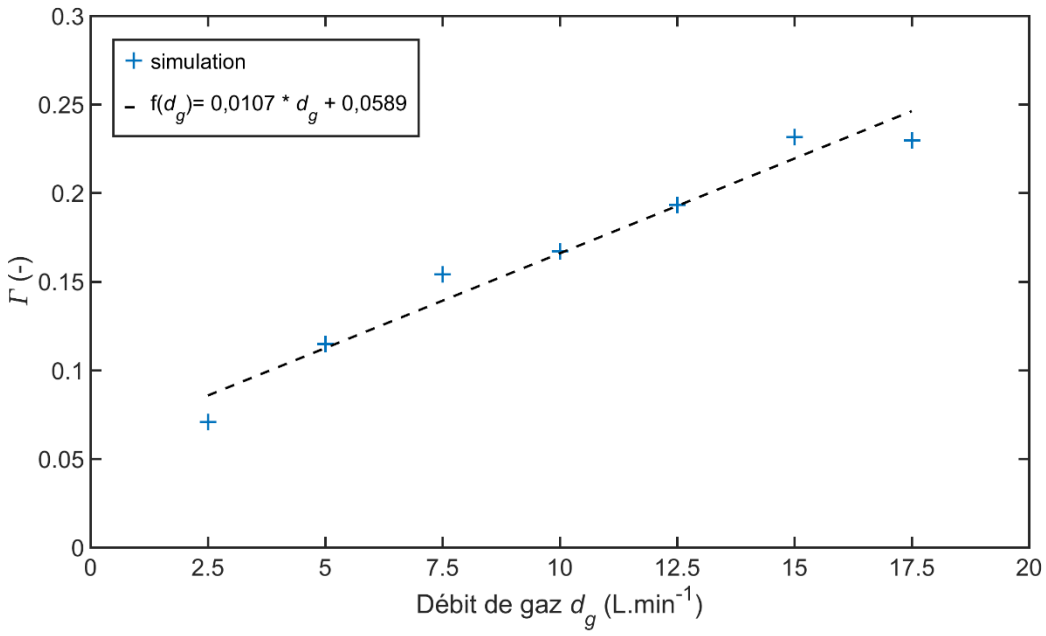


*Figure 95 : Graphique représentant en **croix bleues** l'évolution de Γ (issus des simulations) en fonction du débit d'injection de gaz (i.e. condition d'agitation) et en **pointiller noirs** la corrélation linéaire correspondante (R^2=0,96), elle est utilisé dans la partie suivante III.4.A dans la formule (55)*

Ici, l'essentiel de la démarche consiste à comparer le temps caractéristique du mélange à celui de la réaction. Dès lors, si le mélange est parfait (i.e. infiniment plus rapide que τ_{bio}) alors on se retrouve dans le cas d'une cinétique totalement intégrée, celle-ci ne s'écrit donc plus que sur une valeur moyenne à l'échelle du réacteur, de la même manière que pour le réacteur parfaitement mélangé. D'autre part, si le mélange est négligeable (i.e. infiniment plus grand que τ_{bio}) alors la cinétique dite instantanée conduit à considérer l'hétérogénéité dans le réacteur, tout comme pour un réacteur piston. Le photobioréacteur réel, régi par μ_{bio}^{PBR}, pouvant s'écrire comme une combinaison Γ des deux cas limites μ_{fi}^{PBR} et μ_{ia}^{PBR}, qui eux peuvent être considérés comme idéaux du point de vue de l'ingénierie. Une nuance est toute fois à apporter, ici ce n'est pas tant le temps de mélange *stricto sensu* qui importe mais les variations de lumière induite par les conditions de mélange (relativement à un champ d'éclairement donné).

$$\boldsymbol{Da} = \frac{\boldsymbol{\tau_{bio}}}{\boldsymbol{\tau_{lum}}} \tag{49}$$

Avec : $\boldsymbol{Da}$ le nombre de Damköhler, $\boldsymbol{\tau_{bio}}$ le temps caractéristique de la cinétique biologique, $\boldsymbol{\tau_{lum}}$ le temps caractéristique de variation d'intensité lumineuse subie dans le réacteur par la biomasse.

Plus encore, on peut introduire un second nombre adimensionnel : le nombre de Damköhler, noté Da et explicité dans l'équation (52), connu du génie chimique et dont l'application aux bioprocédés et aux photobioprocédés à déjà pu être relevée dans la littérature [82], [87], [110]. Celui-ci consiste à comparer les temps caractéristiques de la cinétique, à savoir τ_{bio}, et le temps caractéristique de variation de l'argument de cette cinétique (i.e. $I^{@\varepsilon}$) que l'on note : τ_{lum}. Comme Γ, son rôle est de représenter la propension d'un procédé (i.e. photobioréacteur + conditions opératoires) à permettre à la biomasse qu'il contient d'intégrer ou non les variations de lumière. La différence entre Da et Γ consiste en ce qu'il s'écrit non plus par rapport aux cinétiques mais relativement à la conception du procédé. Ce n'est plus une grandeur cinétique, *alias* Γ, mais une grandeur d'ingénierie/dimensionnement (bien que Γ le soit aussi mais de façon moins explicite). Il décrit, lui aussi, l'orientation de la cinétique à tendre vers un comportement intégré ou instantané, respectivement μ_{fi}^{PBR} et μ_{ia}^{PBR} lorsque Da est très grand ou très petit devant 1. Dans la détermination de Da, τ_{bio} est fonction de la biomasse et peut être quantifié expérimentalement (cf. partie II.4.C). En revanche, τ_{lum} est issu du couplage entre l'écoulement et l'éclairement. Il peut alors parfois être aisément déterminé dans des cas simples. Par exemple, lorsque le photobioréacteur délivre un champ homogène de lumière, alors τ_{lum} peut être imposé par la source de lumière elle-même si elle est modulée, comme lors de l'expérience dans le photobioréacteur homogène. Mais si le réacteur présente une hétérogénéité en lumière, alors les fluctuations de lumière sont induites par les trajectoires des particules. Dans le cas où le réacteur présente une recirculation contrôlée spécifiquement entre une zone éclairée et une zone sombre, [69], [82], alors τ_{lum} est apparenté au temps de circulation/séjour dans ces zones. Par contre, dans une configuration usuelle, le signal d'exposition à la lumière des cellules présente une grande gamme de fréquences (et donc de temps caractéristiques) et rend donc le calcul du Damköhler plus délicat. Néanmoins, en première approche, on peut identifier τ_{lum} comme étant du même ordre de grandeur que le temps caractéristique des structures hydrodynamiques induisant la plus grande part des variations de lumière vue (ex. temps caractéristique de parcours des

cellules suivant la direction principale du gradient d'irradiance). Par exemple, si l'on applique cette approche à un bassin à recirculation (*raceway*) [70], [71] et à un réacteur à film tombant [143], tous deux éclairés par leur surface libre (i.e. le gradient est suivant leur épaisseur), on trouve respectivement τ_{lum} de l'ordre de 10^2 et 1 s. Le premier photobioréacteur peut alors être clairement classé comme ayant une cinétique de type instantanée. Le réacteur à film tombant a quant à lui sans doute un comportement intermédiaire, et il est en définitive difficile de conclure à propos de sa cinétique sans une étude complète telle que menée ici.

Remarque : Cette discussion et ces exemples font écho à la discussion (partie III.3.A.) à propos de l'échelle des structures hydrodynamiques que l'on cherche à simuler dans notre cas d'étude. Les grandes recirculations, seules, ne suffisent pas à la description de l'exposition à la lumière, les turbulences peuvent être négligées (car lissées par la variable interne i), mais les structures intermédiaires doivent être prises en compte. De la même manière, lors de la partie expérimentale on a fait l'hypothèse que la régulation des sources LED (sur les photobioréacteurs pilote et de paillasse) par modulation de largueur d'impulsion (pwm) à 1 kHz était entièrement lissé par i.

4. Le Photobioréacteur Numérique

Le but de cette dernière partie de modélisation numérique est de retranscrire en un unique programme tous les aspects qui ont précédé, à savoir la modélisation des cinétiques biologiques, de la composition du milieu, de l'hétérogénéité spatiale en lumière et de l'agitation. Cela consiste en via une résolution des différentes équations au cours du temps via l'écriture d'un algorithme sur MATLAB R2016a. L'objectif est de simuler le fonctionnement du système dans sa globalité en prenant en compte l'action couplée de tous les paramètres opératoires étudiés. C'est ainsi une synthèse de toutes les connaissances sur le système, c'est l'outil qui permet au final de procéder à la compréhension et l'optimisation potentiel du photobioprocédé (cf. partie IV). Mais avant de tirer de telles conclusions, les simulations sont confrontées à plusieurs résultats d'expériences, afin de mettre à l'épreuve sa capacité à rendre compte de l'aspect multiphyisque du système.

A. Implémentation

a. L'Algorithme

Le programme traite l'évolution temporelle du système en résolvant simultanément les lois concernant la composition du milieu et la biologie tout en utilisant les données issues des simulations hydrodynamiques et de l'éclairement. Pour rappel, ces deux derniers aspects sont préalablement établis (et non calculés à chaque itération), car ils sont indépendants du temps de la culture et particulièrement gourmands en ressources de calcul. Quant à la composition du système, elle est décrite, on l'a vu partie III.1, par un système d'équations algèbro-différentielles, et doit être résolue au cours du temps, car la solution de ces équations varie avec la composition du milieu, qui est lui-même impacté par la biomasse et donc évolue avec le temps. L'aspect biologique est constitué exclusivement d'équations différentielles par rapport au temps. Le système global est traité non pas de façon analytique mais par un algorithme itératif où le temps est discrétisé afin de permettre la résolution des équations algébriques entre deux variations élémentaires des grandeurs du système d'équations différentielles. Au final, la solution au cours du temps est obtenue grâce à l'alternance de deux méthodes numériques utilisées de façon itérative : Euler et Newton-Raphson, respectivement pour les systèmes différentiel et algébrique. Pour cela, un programme a été écrit avec MATLAB, et se compose d'un script principal et de plusieurs sous-fonctions dont la structure est résumée à travers l'algorigramme de la Figure 96 (le code est donné en Annexe G).

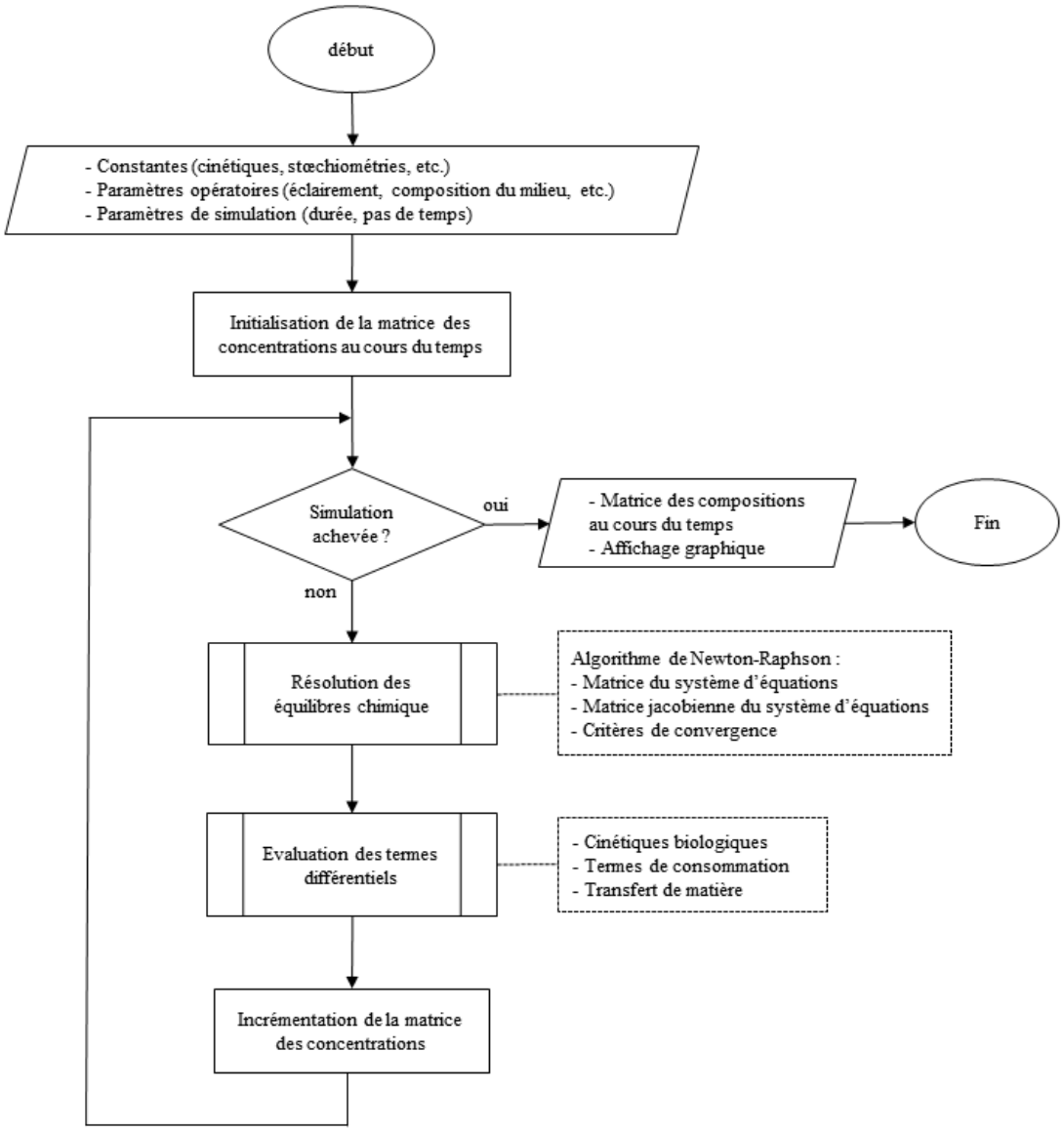


Figure 96 : Algorigramme du programme de simulation de la croissance biologique

Le script principal, représenté ci-dessus, s'appelle *SIMULATION* et décrit un fonctionnement séquentiel du photobioréacteur (*batch*), potentiellement avec apport ou soutirage ponctuels (*fedbatch*) et possiblement conditionnels (ex. récolte lorsqu'une concentration donnée de biomasse est atteinte). Il comporte les trois parties suivantes :

- L'entrée de tous les paramètres utilisés dans les modèles.
- Itération temporelle du système et enregistrement de son évolution dans une matrice résultat, cette étape fait appel à plusieurs sous-fonctions.
- Affichage graphique de l'évolution du système et sa sauvegarde le cas échéant

Ainsi la première opération est la création des variables et constantes utilisées par le programme, celles-ci peuvent être regroupées dans les trois catégories que voici : les conditions réactionnelles (température, irradiance, transfert liquide-gaz, concentration initiale en biomasse, composition initiale du milieu nutritif), l'horizon de la simulation (durée, pas de temps), et enfin toutes les constantes (stœchiométriques, thermodynamiques, cinétiques, etc.).

La seconde opération est de faire évoluer itérativement le système depuis les conditions initiales, pour cela on représente tout d'abord le système à un instant donné par un vecteur colonne y dont chaque ligne représente un des constituants de la culture (en accord avec les parties II.2 et III.1), avec dans l'ordre : acide carbonique, bicarbonate, carbonate, oxonium, hydroxyde, nitrate, biomasse. Puis on décrit son évolution dans le temps par le vecteur ligne constitué des y successifs. Il en résulte Y une matrice de sept lignes et n-pas-de-temps colonnes, et qui comporte les compositions de milieu à chaque instant ayant été calculé. L'évolution du système s'opère de façon itérative depuis la première colonne y_0, la matrice des concentrations initiales du système, donnée dans la première partie : *initialisation*. Ces itérations se décomposent, elles-mêmes, en deux étapes dont la première est la mise à l'équilibre des réactions acido-basiques du système via la fonction *eq_alg_newton* qui résout le système d'équations algébriques de la chimie par une méthode de Newton-Raphson. La seconde calcule l'évolution du milieu due à la présence de la biomasse et du transfert liquide-gaz via la subroutine *eq_diff*. L'incrémentation de variations se fait par une simple méthode d'Euler explicite. D'autre part, il existe plusieurs cinétiques quant à l'influence de l'irradiance dans le PBR, on calcule donc l'évolution du système pour chacune d'entre elles :

- *cas1* : cinétique en équilibre instantané avec l'irradiance : μ_{ia}^{PBR} (45), dans *Y1*
- *cas2* : cinétique relative à l'irradiance moyenne : μ_{fi}^{PBR}(46), dans *Y2*
- *cas3* : cinétique réelle avec inertie de la variable interne i : μ_{bio}^{PBR} (48), dans *Y3*

Et après cela, l'affichage graphique des résultats : L'objectif étant de représenter l'évolution du milieu au cours du temps, ainsi que de pouvoir comparer les différentes hypothèses concernant le modèle relatif à la lumière. Il est aussi possible de superposer la simulation à des résultats expérimentaux dont on a rentré au préalable les valeurs des abscisses et ordonnées dans les matrices *points_x* et *points_y*. Sans compter la sauvegarde des résultats dans un fichier ".mat" ou ".xls", pour un post-traitement ultérieur.

b. Les Sous-Fonctions

La fonction *eq_alg_newton* permet quant à elle de mettre à l'équilibre les réactions acido-basiques des espèces du carbone et de l'eau, dans la matrice Y représentant la composition du milieu, à savoir ses cinq premières lignes. On procède pour cela à une résolution du système algébrique des équations d'équilibres, données dans *eq_alg_systeme*, par une méthode de Newton-Raphson, grâce à l'utilisation du jacobien de ce même système d'équations, donné cette fois dans *eq_alg_jacobien*. L'algorithme de Newton-Raphson est régie par 3 critères d'arrêts : *Nmax* le nombre maximum d'itérations, *bilan* le respect des équations par la solution trouvée et *convergence* l'évolution relative entre deux solutions successives. Chaque solution est trouvée par la formule ci-après, puis sert à l'itération suivante ou de résultat définitif si un critère d'arrêt est atteint (resp. 20, 10^{-4} et 10^{-4}).

$$\boldsymbol{C_{sol} = C - eq\_alg\_jacobien(C) \backslash eq\_alg\_systeme(C, C_t)} \quad (50)$$

Avec : $\boldsymbol{C}$ le vecteur colonne de la composition chimique (vecteur y tronqué à ses cinq premiers éléments), $\boldsymbol{C_{sol}}$ la nouvelle composition chimique, $\boldsymbol{C_t}$ la quantité de carbone inorganique sous toutes ses formes dans le milieu (i.e. y(1)+y(2)+y(3))

eq_alg_systeme, la matrice des équilibres acido-basiques du carbone et de l'eau, décrits en (26), avec en colonnes : acide carbonique, bicarbonate, carbonate, oxonium et hydroxyde ; et en ligne : l'électroneutralité, la conservation des atomes de carbones, la première acidité du carbone, la seconde acidité du carbone, et enfin le produit ionique de l'eau. Afin d'avoir une meilleure homogénéité des ordres de grandeurs sur le système, les trois dernières équations sont pondérées respectivement par K_{a1}, K_{a2} et K_e.

eq_alg_jacobien, la matrice jacobienne du système d'équations précédent, en conservant l'organisation ligne/colonne.

eq_diff est l'écriture du système d'équations différentielles décrivant l'évolution de chaque composante du système due à la biomasse qui croît et consomme une part du substrat et le transfert de matière entre le gaz de bullage et le médium (resp. (18) et (27)). Cela se traduit numériquement par le passage d'une matrice colonne y à la suivante dans Y, à cette fin on passe par une variable $dX = Y(7) * mu\_tcn * mu\_I$ qui calcule l'incrément de

biomasse à l'instant de l'itération par l'intermédiaire des fonctions *mu_tcn* et *mu_I* qui sont respectivement les influences sur la cinétique des trois paramètres : température, azote et carbone sur la croissance (resp. les équations (12), (14) et (17)), puis séparément l'influence de la lumière. La consommation du milieu étant déduite via les coefficients stœchiométriques K_{C0} et K_{N0} donnés dans les entrées de *simulation* (établie en (18)). Reste alors la concentration en acide carbonique qui, elle, peut être impactée par l'équation de transfert liquide-gaz, via les constantes C_{eq} et K_g (cf. (27)). On notera que le système n'est écrit qu'une seule fois, mais que la variable dX dépend de l'hypothèse faite sur la façon dont est prise en compte l'irradiance dans la photosynthèse, grâce à trois fonctions distinctes *mu_ia*, *mu_fi* et *mu_bio*, respectivement pour *cas1*, *cas2* et *cas3* dans *simulation*.

La fonction *mu_tcn* décrit l'influence des paramètres : température, substrats carboné et azoté sur la vitesse de croissance biologique, selon l'équation (50) :

$$\boldsymbol{\mu_{tcn} = \mu_{max} \cdot (K_{t1} \cdot T + K_{t2}) \cdot \left(\frac{K_{c1} \cdot y(2)}{K_{c2} + y(2)} + K_{c3} \cdot y(3)\right) \cdot \left(\frac{K_{n1} \cdot y(6)}{K_{n1} + y(6)}\right)} \quad (51)$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_{max}}$ la vitesse de croissance spécifique maximale de la spiruline (correspondant à l'absence de facteurs limitants), $\boldsymbol{K_x}$ les différentes constantes cinétiques appropriées (établies au chapitre II.), $\boldsymbol{y(1)}$, $\boldsymbol{y(2)}$ et $\boldsymbol{y(3)}$ resp. les concentrations en bicarbonate, carbonate et nitrate du milieu réactionnel. Remarque : Les coefficients relatifs à la température sont fonction de la température (cf. (12))

mu_I[...] : représente l'influence de la lumière sur la croissance biologique sous les différentes hypothèses représentées par la variable *cas* dans *simulation* et *équation*. D'autre part c'est ici que sont exploités les résultats concernant l'hétérogénéité de l'irradiance lumineuse au sein du photobioréacteur (cf. III.2.), et ce à travers la lecture d'une matrice *Irradiance* contenant la distribution des niveaux d'irradiance dans le cas de figure étudié (cf. discussion ci-avant en III.3.B), pour une gamme de 20 concentrations allant de 0,1 à 2,0 g·L^{-1}. Remarque : L'évolution des distributions d'irradiance avec la concentration étant monotone et continue, on se permet de procéder par interpolation entre les différentes concentrations (discrètes) contenues dans la matrice *Irradiance* (cf. équation (52)). Cela permet de s'affranchir du calcul du champ d'irradiance pour chaque concentration, ce qui serait rédhibitoire concernant le temps de calcul nécessaire.

$$\boldsymbol{\mu_I^{PBR}(X) = \frac{X - X_n}{X_{n+1} - X_n} \cdot \mu_I^{PBR}(X_n) + \frac{X_{n+1} - X}{X_{n+1} - X_n} \cdot \mu_I^{PBR}(X_{n+1})} \tag{52}$$

Avec : $\boldsymbol{\mu_I^{PBR}}$ l'influence de la lumière sur la cinétique globale de photobioréacteur (quel que soit le cas), $\boldsymbol{X}$ la concentration en spiruline dans le réacteur, $\boldsymbol{X_n}$ et $\boldsymbol{X_{n+1}}$ resp. les concentrations immédiatement inférieure et supérieure de spiruline contenue dans la matrice I des distributions d'irradiance en fonction de la biomasse

Ensuite il existe trois fonctions, suivant l'équation voulue pour le calcul de de la croissance spécifique globale relative à la lumière : μ_I^{PBR}. Lorsque $cas = 1$, on utilise le cas limite d'une adaptation instantanée de la cinétique à l'irradiance : μ_{ia}^{PBR}. Ce qui équivaut, on l'a vu, au fait que tout volume élémentaire du photobioréacteur voit sa croissance biologique fonction de l'irradiance qui règne en son sein. Il en résulte à l'échelle du réacteur la loi (53).

$$\boldsymbol{\mu_{ia}^{PBR} = \int_{I_{min}}^{I_{max}} \frac{K_{l0} \cdot (I - K_{l1})}{K_{l2} + (I - K_{l1}) + \frac{(I - K_{l1})^2}{K_{l3}}} \cdot PROB(I) \cdot \delta I} \tag{53}$$

Avec : $\boldsymbol{K_x}$ les différentes constantes cinétiques appropriées (établies au chapitre II), $\boldsymbol{I}, \boldsymbol{I_{max}}$ et $\boldsymbol{I_{min}}$ resp. l'irradiance, ses valeurs maximale et minimale dans le photobioréacteur, $\boldsymbol{PROB(I)}$ la densité de probabilité volumique d'irradiance I dans le réacteur, $\boldsymbol{\delta I}$ une variation élémentaire d'irradiance. Remarque : PROB(I) est fonction de la concentration en biomasse

La deuxième fonction : μ_{fi}^{PBR}, utilisée lorsque $cas = 2$, représente le cas limite d'un comportement intégré de la cinétique face aux variations de lumière, et qui peut s'écrire en fonction de la moyenne volumique de l'irradiance dans le photobioréacteur (équation (54)).

$$\begin{cases} \langle I \rangle = \int_{I_{min}}^{I_{max}} I \cdot PROB(I) \cdot \delta I \\ \mu_{fi}^{PBR} = \dfrac{K_{l0} \cdot (\langle I \rangle - K_{l1})}{K_{l2} + (\langle I \rangle - K_{l1}) + \dfrac{(\langle I \rangle - K_{l1})^2}{K_{l3}}} \end{cases} \tag{54}$$

Avec : K_x les différentes constantes cinétiques appropriées, I, I_{max} et I_{min} resp. l'irradiance, ses les valeurs maximale et minimale dans le photobioréacteur, $PROB(I)$ la densité de probabilité volumique d'irradiance I dans le réacteur, δI une variation élémentaire d'irradiance, $\langle I \rangle$ la moyenne volumique du champ des irradiances.
Remarque : PROB(I) est fonction de la concentration en biomasse

Et enfin lorsque *cas=3*, on utilise μ_{bio}^{PBR}, qui correspond à $\tau_{bio} = 0{,}3\ s$ et que l'on exprime en fonction des deux cinétiques précédemment calculées via le module Γ (équation (55)). Γ étant lui-même fonction du débit de bullage via une régression linéaire issue de la Figure 95.

$$\mu_{bio}^{PBR} = \Gamma \cdot \left(\mu_{fi}^{PBR} - \mu_{ia}^{PBR}\right) + \mu_{ia}^{PBR}$$

$$avec : \ \Gamma = 0{,}0107 \cdot d_g + 0{,}0589 \tag{55}$$

Avec : μ_{bio}^{PBR}, μ_{fi}^{PBR} et μ_{ia}^{PBR} resp. les influences sur la croissance spécifique globale relativement à la lumière lorsque $\tau_{bio} = 0{,}25\ s$ (cas réel), $\tau_{bio} \to \infty\ s$ (intégration totale du signal) et $\tau_{bio} \to 0^+ s$ (réaction instantanée à la lumière), Γ le module adimensionnel défini en (47) et évalué dans le cas du photobioréacteur pilote, d_g le débit volumique du gaz de bullage (compris entre 2,5 et 17,5 L·min^{-1}, R^2=0,96)

B. Résultats

Maintenant, grâce au photobioréacteur numérique, nous possédons un outil capable de simuler une culture de spiruline en fonction de conditions opératoires souhaitées et en tenant compte de l'ensemble des modèles établis ci-avant. De façon similaire à ce qui a été fait pour la méthode de Monte Carlo précédemment (cf. Figure 59 en III.2.B), nous allons ici étudier les résultats de simulation de manière progressive par l'ajout successif des différents degrés de complexité afin d'illustrer au mieux les mécanismes en jeu.

Premièrement, on impose la croissance biologique à une valeur de 1 j^{-1}, Figure 97.(a). On retrouve bien une courbe exponentielle attendue et caractéristique des croissances biologiques en l'absence de limitation. Le pas de temps choisi pour la résolution est de 2,88 min (soit 500 itérations par jour simulé) et comparativement à la solution analytique l'écart est de 2‰. Ceci valide la capacité de la méthode d'Euler utilisée ici pour résoudre de système d'équation différentielle relative à l'augmentation de la quantité de biomasse. Maintenant Figure 97.(b), on ajoute la loi décrivant l'influence de la température et l'on simule un réacteur avec une rampe croissante de température. Sans surprise le programme est capable de simuler une culture dont la croissance est fonction d'un paramètre opératoire, et qui de plus évolue dans le temps comme ce sera le cas avec la concentration en nutriments (cf. ci-après).

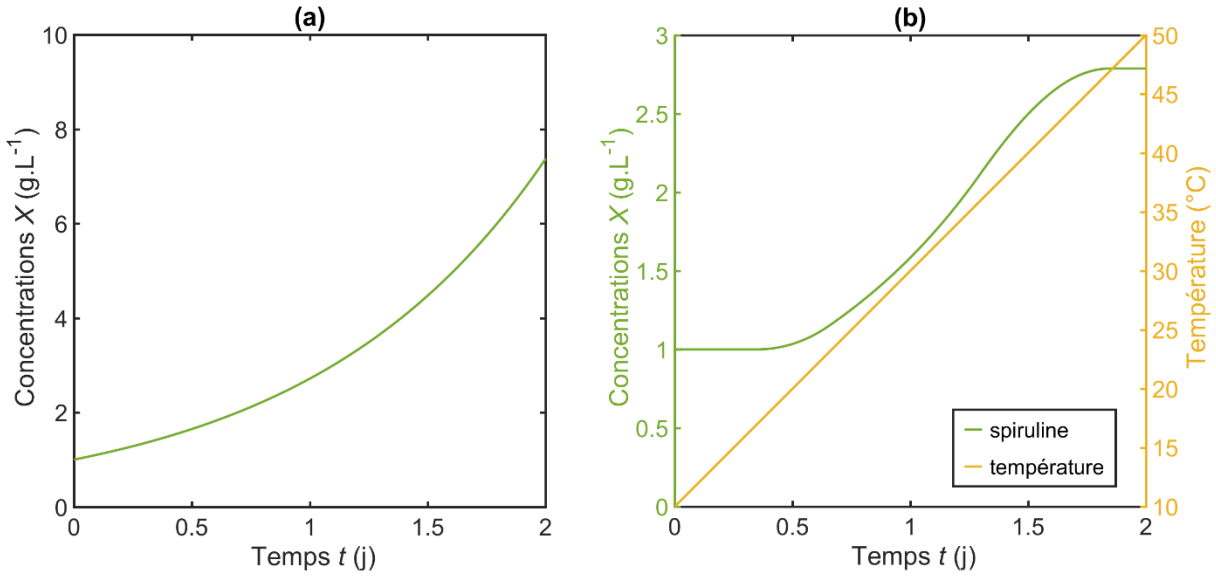


*Figure 97 : Graphiques des courbes de croissance simulées lorsque : **(a)** le taux de croissance est imposé à 1 j^{-1} avec une concentration initiale de biomasse X_0=1 g·L^{-1}, **(b)** le taux de croissance tiens compte de l'influence de la température selon la loi (12) et que l'on impose une augmentation linéaire de la température de culture entre 10 et 50°C sur deux jours et X_0=1 g·L^{-1}*

Ensuite, on ajoute la croissance spécifique relative au nitrate dans le milieu. Un exemple Figure 98, la concentration en nitrate à bien une action sur la vitesse de croissance de la biomasse et l'augmentation de la quantité de biomasse une action sur la concentration en nitrate. Ainsi, L'algorithme décris bien un éventuel cas de carence nutritive. De plus, le bilan de matière boucle et la stœchiométrie est bien respecté, à savoir que la croissance s'arrête après production de 5 g·L^{-1} de spiruline (cohérent avec la formulation du milieu P3)

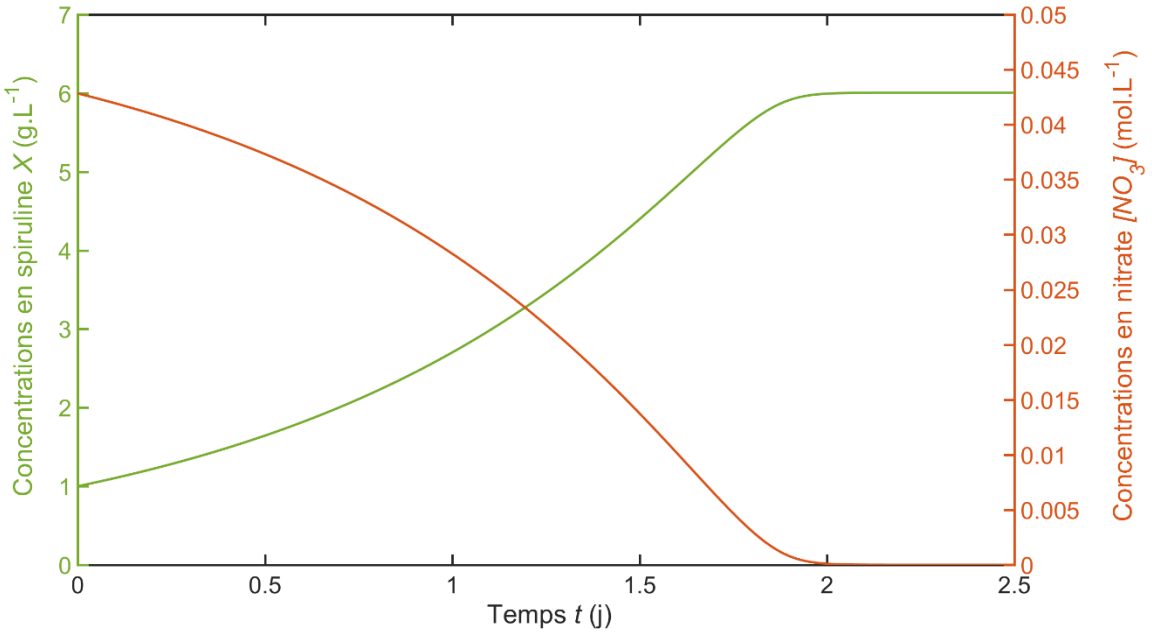


Figure 98 : Courbes de croissance et de substrat simulées lorsque le taux de croissance est aussi fonction de la concentration en nitrate selon la loi (14) (avec : X_0=1 g·L^{-1}, T=35°C, milieu P3)

Dans la continuité, on adjoint le modèle de croissance spécifique relatif aux concentrations des formes du carbone inorganique en solution (pour rappel : bicarbonate et carbonate). Toujours pour la formulation du milieu P3, on présente Figure 99 la simulation correspondante. On observe que tout comme lors les expériences le pH augmente au cours du temps, ainsi le programme résout bien le système d'équations algébriques des équilibres chimiques tout au long de la simulation (en alternance avec les équations différentielles). Remarque : La validité de la méthode Newton-Raphson à résoudre le système algébrique des équilibres était déjà acquise partie III.1 (cf. Figure 54).

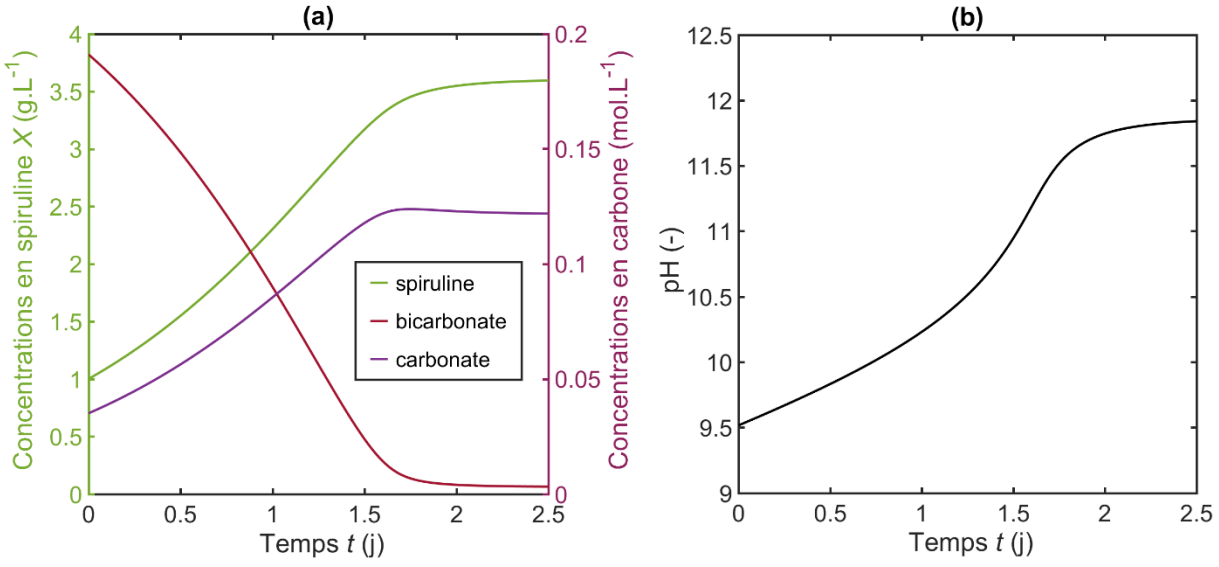


*Figure 99 : Courbes de croissance, de substrat et de pH simulées (resp. en **(a)** et **(b)**) lorsque le taux de croissance est aussi fonction des concentrations des formes du carbone inorganique en solution selon la loi (16) (avec : X_0=1 g·L^{-1}, T=35°C, milieu P3). Remarque : Les trois influences regroupées (i.e. température, nitrate et forme du carbone) donne l'expression (51) décrite en III.4.A ci-avant.*

Mieux encore, se retrouve ici à travers la simulation deux résultats expérimentaux peu évident à anticiper :

- Expérience IFREMER : le pH maximal atteignable au cours d'une culture avant arrêt de celle-ci est de 11,7 *versus* 11,8 dans la simulation
- Expérience Alg&You : la production maximale de spiruline atteinte est de 2,5 g·L^{-1} (contrairement à la formulation du milieu P3 qui voudrait que ce soit 5 g·L^{-1} par stœchiométrie) *versus* 2,59 g·L^{-1} dans la simulation. Remarque : Les 19 g·L^{-1} de bicarbonate dans la formulation du milieu P3 prenne en compte à la fois la production de 5 g·L^{-1} de spiruline et la réaction avec les 1,4 g·L^{-1} de soude ajoutée initialement (pour obtenir un pH basique).

Le mécanisme derrière ces résultats n'est autre qu'une double consommation du bicarbonate, qui est par ailleurs aussi relevé dans la littérature [12], [97]. Ainsi, la résolution des équilibres acido-basique au cours du temps permet de prendre en compte que pour conserver l'électroneutralité de la solution/milieu, la consommation d'une molécule de

bicarbonate par la spiruline entraine la réaction d'une seconde molécule pour produire une molécule de carbonate. Ceci explique l'arrêt de la croissance de la spiruline bien avant ce que le carbone en solution ne soit entièrement consommé, car ce dernier se trouve alors sous forme de carbonate. Remarque : Cette simulation est obtenue en utilisant la loi (16) issue de l'exploitation des données de la littérature et non de la loi (17) issue des données de nos propres expériences. Etonnement, avec cette dernière, l'inhibition provoquée par l'apparition progressive du carbonate vient arrêter la croissance avant que le manque de bicarbonate ne le fasse, le pH maximal atteint est alors de 10,6 et seul 1,8 $g \cdot L^{-1}$ de spiruline ont été produit. Quoiqu'il en soit il n'en reste pas moins qu'à cause de ce phénomène, la moitié du composé prépondérant du milieu ne peut servir à la production de biomasse, ce qui représente un manque à gagner certain dans le cas d'une production industrielle. Par conséquent, on en conclu que le choix de ne pas opérer à une régulation du pH des cultures n'est pas judicieux car cela permettrait de reconvertir le carbonate en bicarbonate à mesure qu'il est formé. On l'a vue dans l'état de l'art (partie I.2.B), une telle régulation peut être obtenue de deux façons :

- Soit grâce au transfert de $CO_{2(g)}$ via le bullage, que l'on a pourtant décidé d'ignorer jusque-là (cf. III.1) avec le double avantage de faire réagir le carbonate et que l'intrant de la régulation lui-même puisse être consommé par la suite ($CO_2+CO_3^{2-}+H_2O \Longrightarrow 2 \cdot HCO_3^-$). En revanche, la régulation est alors tributaire des équilibres thermodynamiques, en l'état elle est donc impossible car on le rappelle le transfert de matière se fait (dans notre cas) dans le sens opposé de celui qui serait voulu ici (cf. dégazage du CO_2, Figure 53). Pour y parvenir, on peut envisager une reformulation du milieu de culture avec une concentration de carbone en solution revu à la baisse pour inverser le transfert (via C^* équation (27)). Ou bien alors, on peut augmenter artificiellement la part de CO_2 dans gaz de bullage (pour augmenter C^*, via la loi de Henry). Il faut alors sans doute revoir la conception du bullage afin de favoriser le transfert de matière (typiquement chercher une plus grande aire interfaciale, souvent grâce à de plus petites tailles de bulles, pour rappel ici : d_{3-2}=6,7 mm Tableau 7), car le CO_2 devient un intrant qu'il serait dommageable de perdre à l'évent pour cause d'un mauvais transfert (tout comme il l'est déjà de ne pas réguler le pH). Mais aussi et surtout, il faut revoir les valeurs des constantes thermodynamiques (cf. Tableau 5) et le calcul des activités chimiques afin de pouvoir le simuler le transfert.

- Soit on procède à la régulation, par introduction d'un acide, faible *a priori* (ex. acide acétique). S'impose alors la condition de l'innocuité de l'acide en question sur la spiruline. Par ailleurs, il n'a pas été question jusqu'ici de l'effet de variations brusques de pH sur les cellules, qui on le sait peut-être néfaste [5], [9]. Si ce choix est adopté, il peut survenir le besoin d'étudier la dynamique de la biomasse face à de tels évènements, comme on a pu le faire par exemple pour la température (cf. Figure 36). On présente l'exemple d'une telle régulation en Figure 100, on l'on vérifie qu'effectivement cela permet un bien meilleur rendement de conversion quant au carbone.

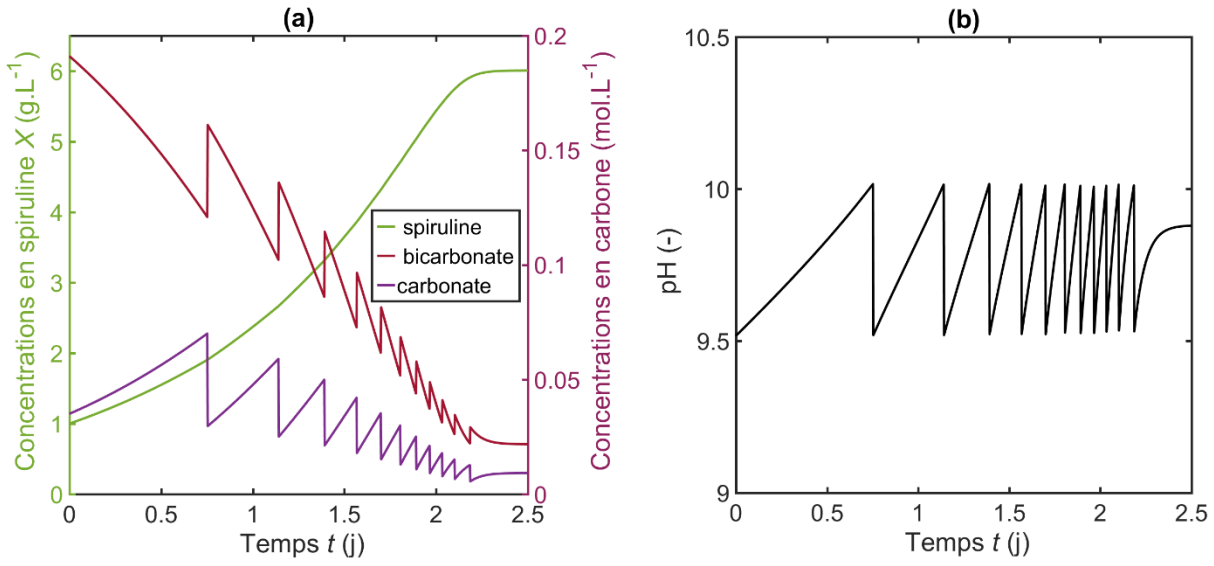


*Figure 100 : Courbes de croissance, de substrat et de pH simulées (resp. En **(a)** et **(b)**) lorsque le taux de croissance obéit à la loi (51) et que l'on impose d'une régulation en pH entre pH_0 et pH_0+0,5 par ajout ponctuel d'un acide faible (avec : X_0=1 g·L^{-1}, T=35°C, milieu P3). Remarque : Il reste du carbone à l'instant final car la croissance est d'abord stoppée par un défaut de nitrate (après production de 5 g·L^{-1} de spiruline, cf. Figure 98)*

Maintenant, on prend en compte l'influence de l'irradiance ainsi que l'hétérogénéité en éclairement du photobioréacteur via les formules (52), (53) et (54). Là encore, la simulation permet de retrouver plusieurs observations qualitatives faites lors des expériences. La première étant que les courbes de croissances mesurées sont linéaires, voir la Figure 101.(a), ou peuvent être approchées ainsi (cf. discussion du paragraphe II.2). Exception faite des faibles concentrations pour lesquelles les taux de croissance vont en augmentant avant

d'atteindre finalement une valeur constante (ou quasi-constante) et que la courbe de croissance puisse être assimilé à une asymptote affine (cf. Figure 101.(b)).

De même, les pentes des courbes sont indéniablement plus faibles que sur les graphiques précédents (cf. Figure 101 vs. Figure 99 et Figure 98). Cette observation vient confirmer le fait que dans nos conditions (géométries de réacteurs) l'éclairement est effectivement le paramètre limitant de la croissance biologique. Ceci, viens étayer *a posteriori* la nécessité de mettre un accent particulier sur l'étude de l'impact de l'éclairement, relativement à celle de l'impact de la composition du milieu. Cela n'aurait pu être mis en évidence sans l'écriture conjointe de ces deux aspects en un unique outil de simulation ainsi que grâce à la description de l'éclairement à l'échelle locale.

Et enfin, on constate bien un écart significatif sur les prédictions de production de spiruline selon que l'on considère l'un ou l'autre des deux cas limites concernant l'influence de la lumière (cf. μ_{ia}^{PBR} et μ_{fi}^{PBR}, Figure 101.(a) et (b)). On explique cette différence par la forte hétérogénéité en lumière de nos réacteurs convoluée par la concavité de la fonction μ_{lum}, comme cela était anticipé en partie II.4.B.

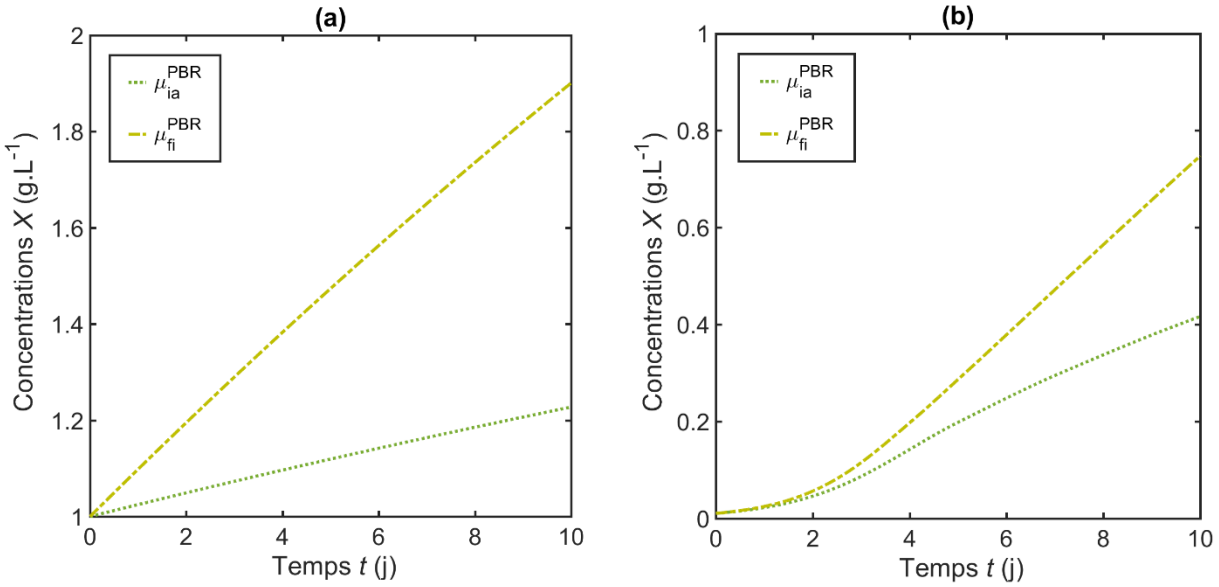


*Figure 101 : Courbes de croissance simulées lorsque le taux de croissance prend en compte l'influence de la lumière selon les formules (52), (53) et (54) (avec : X_0=1 et 0,01 g·L^{-1} resp. en **(a)** et **(b)**, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1}, géométrie photobioréacteur pilote 20 sources)*

En revanche, toutes les simulations réalisées ci-dessus s'appuient sur les modèles décrivant l'influence des différents paramètres qui on le rappelle sont tous écrits en relatif (i.e. compris entre 0 et 1), ainsi aucune d'entre elles ne décris pour l'instant la valeur absolue de la vitesse de croissance, car aucune ne prend encore en compte μ_{max} (la vitesse maximale de croissance de la spiruline) placé en facteur de l'équation du calcul du taux de croissance (équation (4)). C'est pour cela que jusque-là, seuls ont été dégagés et discutés les tendances et résultats ne nécessitant la vitesse absolue pour être interprétées. De même, aucune confrontation des simulations avec des données expérimentales n'est possible sans la connaissance de μ_{max}. N'ayant pas spécifiquement cherché à caractériser expérimentalement ce paramètre, on procède à son évaluation *a posteriori* par ajustement de la simulation sur une série de points expérimentaux. On choisit pour cela l'expérience #3 décrite en partie II.4.A. On le rappelle, cette expérience consiste en une culture dans une cuve de paillasse en présence d'un unique tube de LED immergé de 10 cm de diamètre et faiblement agitée. On a simulé le champ d'irradiance de ce réacteur par le même algorithme de Monte Carlo que pour le pilote (cf. partie III.2.B), car cette géométrie est elle aussi axisymétrique et ne nécessite que des changements mineurs du programme pour être simulée. Mais contrairement au photobioréacteur pilote, nous n'avons pas simulé l'écoulement au sein des cuves de paillasse, nous n'avons pas la valeur de Γ correspondante et qui aurait permis de situer la courbe de croissance entre les deux cas limites (cf. Figure 101). Néanmoins au regard du mélange lors de cette expérience (volontairement très faible) et par comparaison avec ce qui a été simuler pour le pilote (cf. partie III.3.B, Figure 82 et Figure 95), on suppose ici Γ nul ou très proche de zéro. Ainsi Figure 102.(a), on a ajusté la courbe de croissance simulé avec μ_{ia}^{PBR} (dans les mêmes conditions que l'expérience) avec les données sources selon la méthode des moindres carrés. On obtient : μ_{max} =0,84 j^{-1}. Remarque : Cette série de points a été choisie pour l'ajustement μ_{max} car elle présente un fort taux de croissance (contrairement à la série #1) et donc sa quantification est moins soumise à l'incertitude de la mesure (en relatif), de plus le champ irradiance est facilement accessible (contrairement à la série #3, cf. discussion au paragraphe suivant).

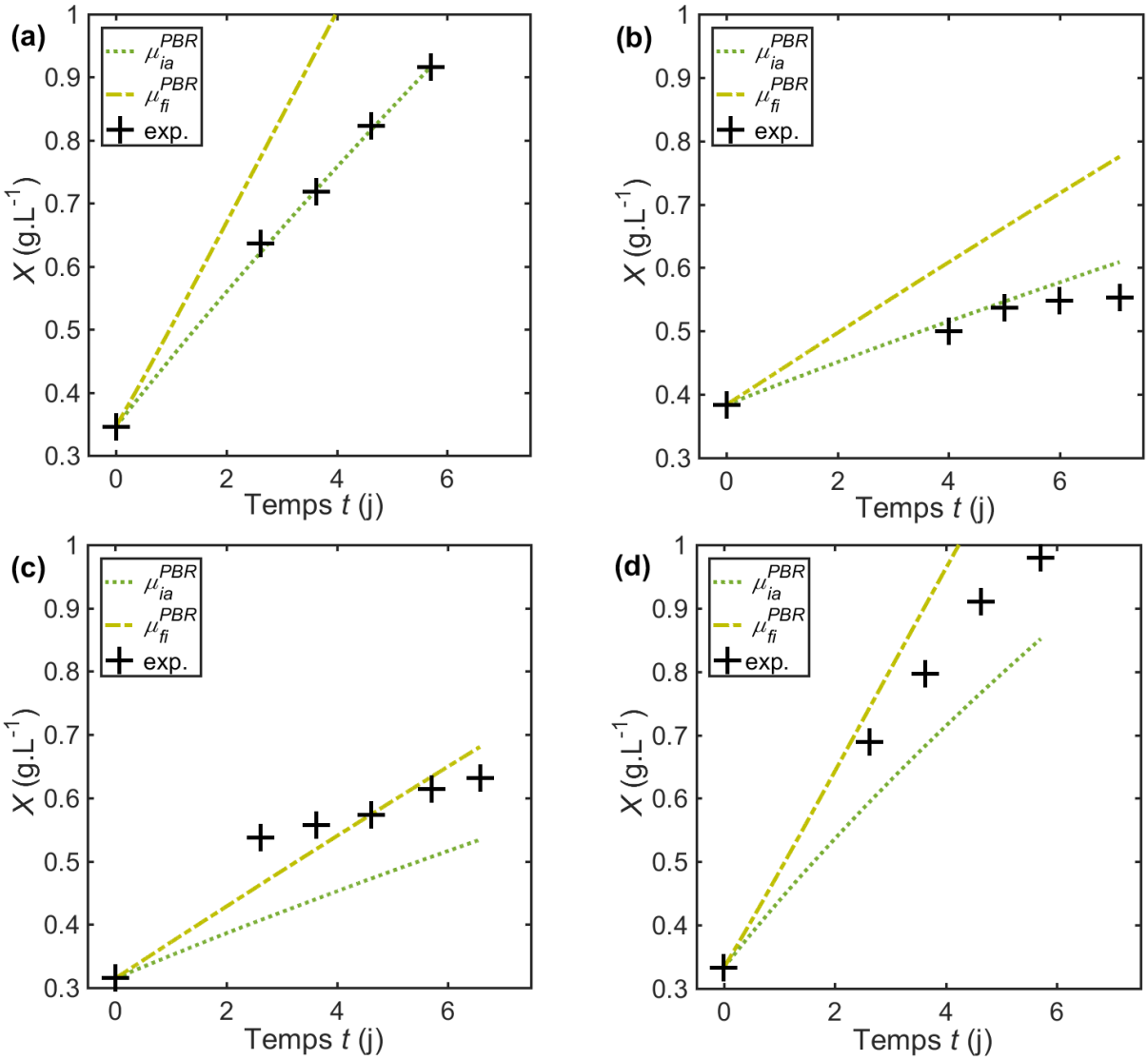


*Figure 102 : Courbes de croissance simulées dans le cas des expériences #1, #4, #2 et #3 sur les cuves de paillasse décrites en II.4.A (resp. **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**), en **croix noires** les mesures expérimentales correspondantes. Avec en :*
*-**(a)**, X_0=0,384 g·L^{-1}, T=30°C, milieu P3, I_0=350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1}, PBR. paillasse tube large*
*-**(b)**, X_0=0,315 g·L^{-1}, T=30°C, milieu P3, I_0=350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1}, PBR. paillasse tube unique*
*-**(c)**, X_0=0,333 g·L^{-1}, T=30°C, milieu P3, I_0=350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1}, PBR. paillasse trois tube*
*-**(d)**, X_0=0,346 g·L^{-1}, T=30°C, milieu P3, I_0=350 µmol$_{PAR}$·m^{-2}·s^{-1}, PBR. paillasse tube unique*

Dès lors on peut comparer les résultats de la simulation pour les trois autres cultures de ce même plan d'expérience (i.e. #1, #2 et #4). Pour l'expérience #1 pour laquelle avait été utilisé un unique tube de LED de taille classique (i.e. 4 cm de diamètre). On a à nouveau procédé à la simulation du champ d'irradiance grâce à l'algorithme de Monte Carlo et de même, on suppose à nouveau que le module Γ est proche de zéro. Sur la Figure 102.(b) on compare la prédiction issue du photobioréacteur numérique et les points expérimentaux. La courbe

calculée grâce μ_{ia}^{PBR} paraît en bonne adéquation avec les données et ce malgré la division par trois du facteur de forme F.

Dans le cas de l'expérience #4, le réacteur contient également un seul tube de LED, par contre l'agitation fut intensifiée jusqu'à atteindre des temps de mélange inférieur à 10 s. Par conséquent, on suppose cette fois que Γ soit relativement proche de 1. On s'intéresse donc cette fois à la prédiction issue de μ_{fi}^{PBR}. La superposition de la simulation et des données est présentée en Figure 102.(C), on y constate la croissance est correctement estimée alors que le régime cinétique est différent. L'amplitude de prédictions issue de μ_{ia}^{PBR} et μ_{fi}^{PBR} (qui incarne une grande problématique du dimensionnement des photobioréacteurs) est ici effectivement observé expérimentalement et peut donc désormais être anticipée et quantifiée.

L'expérience #2, quant à elle, eut lieu avec la configuration usuelle des réacteurs de paillasse, à savoir avec trois tubes de LED immergés (tel que décris en II.1.A) et de nouveau avec une faible agitation. En revanche cette géométrie ne peut être décrite par l'algorithme tel qu'il est écrit, puisqu'ici la cuve n'est pas axisymétrique. On décide donc pour décrire son champ d'irradiance d'utiliser le résultat de la Figure 70. Ainsi, n'ayant accès directement au champ de lumière, on décide de décrire la distribution volumique d'irradiances (qui est la donnée utilisée dans le photobioréacteur numérique) comme la somme des contributions des sources prises séparément, sachant que la contribution d'un tube de LED unique a justement été calculée pour l'étude du cas précédent. Encore une fois on émet l'hypothèse que Γ est quasi nul car l'agitation est considérée comme faible. La simulation ainsi exécutée est montrée et comparée aux données sur la Figure 102.(d). On y observe une augmentation de la production de spiruline prédite par un facteur trois relativement à ce qui est simulé en Figure 102.(d) pour l'expérience #1, ainsi la tendance attendue est bien respectée. En revanche, ce n'est pas le cas de l'expérience et notre estimation de la croissance (via μ_{ia}^{PBR}) vient grandement sous évaluer la croissance réelle. Cela illustre une limitation de l'approche faite ici concernant la description de l'éclairement du réacteur. Contrairement au photobioréacteur pilote, les champs de lumière issue des trois sources/tubes se superposent en grande partie (moins de 4 cm entre les sources) par conséquent la forme de la distribution volumique des irradiances en est changée (cf. discussion de la Figure 69). Les cinétiques sont donc elles aussi changées, à la hausse en l'occurrence. La conclusion est que lorsque l'éclairement des différentes sources se recouvrent, on ne peut extrapoler à partir de la contribution d'une unique source, le calcul du champ est obligatoire. Remarque : Il est vérifié que cette même

approche donne par contre bien des résultats similaires avec ce qui est attendue lorsqu'elle est appliquée au photobioréacteur pilote (où le problème ne se pose pas).

Tableau 8 : Conditions opératoires des différentes cultures des expériences réalisées sur le photobioréacteur pilote

Culture	Nombre de sources de LED (-)	Débit gaz de bullage ($L \cdot min^{-1}$)	Γ (-)	F (-)
#1	6	10	0,17	1,23
#2	10	10	0,17	2,12
#3	16	10	0,17	3,38
#4	16	5	0,11	3,38
#5	16	17,5	0,25	3,38

Conformément au discours en partie I.3.A, l'objectif est de valider (ou non) la capacité du photobioréacteur numérique à prédire les cas de figure n'ayant pas eux-mêmes servis à construire les modèles. C'est d'ores et déjà fait avec les Figure 102.(b) et (c), où l'on a validé le fait que l'approche multi-échelle permet de décrire des effets de couplage entre les phénomènes qui n'auraient pu être pris en compte par une approche simplement macroscopique, ce qui montrent que cet objectif est atteint.

Une autre plus-value de la méthodologie adoptée ici est théoriquement de pouvoir émettre des prédictions correctes indépendamment de l'échelle du réacteur étudié, c'est-à-dire sans réajustement des paramètres (μ_{max} notemment). C'est dans ce contexte que l'on présente un dernier jeu d'expériences cette fois-ci réalisé sur le photobioréacteur pilote, qui est près de 17 fois plus grand que les réacteurs utilisés précédemment. L'hydrodynamique étant connue pour le pilote (par la modélisation, cf. III.3) on peut, via Γ, utiliser la courbe de croissance calculée selon μ_{bio}^{PBR} comme support de comparaison avec les données de l'expérience, et ainsi tenir compte de l'effet de l'agitation sur la croissance. Dès lors, comme pour les expériences exploitées ci-avant, l'idée est d'étudier à nouveaux les effets du champ de lumière, mais aussi de celui de l'agitation sur les cinétiques biologiques. Pour cela, cinq cultures ont été menées avec trois géométries d'éclairement et trois débits de bullage différents, explicités dans le Tableau 8. Il s'agit de cultures discontinues réalisées dans le milieu

P3, régulées à 35°C et toutes séparées dans le temps de quelques semaines. Néanmoins, lorsque l'on regarde la colonne des facteurs F dans le Tableau 8 (à comparer au Tableau 4 pour les cuves de paillasse), on constate que même dans la configuration présentant le plus de sources LED allumées cela reste un dimensionnement inferieur au cas de la cuve de paillasse équipé d'un unique tube de LED (resp. F=3,38 et 4,69). Pour éviter de traiter avec de faibles vitesses de croissance et donc difficilement quantifiables (sans compter le risque accru d'efflorescence bactérienne), on a imposé un flux lumineux en parois de 1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, soit le triple de ce qui est imposé pour les réacteurs de paillasse. Par ailleurs, cela a permis de valider la possibilité d'une surexposition locale/ponctuelle à la lumière, ce qui était impossible avec le régiment permanent imposé lors de l'expérience caractérisant μ_{lum} (cf. Figure 44).

On présente sur la Figure 103 la comparaison des résultats de la simulation avec les données expérimentales. On constate que les cultures #1 et #2 (resp. sous-Figure 103.(a) et (b), pour 6 et 10 sources LED) sont relativement bien décrites par le photobioréacteur numérique, quoique la série #2 puisse paraitre sous-évalué (comparativement à μ_{bio}^{PBR}) mais reste cependant encadrée par les deux cas limites. En revanche la simulation de la série #3 (sous-Figure 103.(d), pour 16 sources LED) n'est par contre pas du tout en adéquation avec l'expérience. Figure 104.(a) on observe néanmoins que la tendance d'une augmentation tu taux de croissance avec l'augmentation de la quantité de sources lumineuses est bien respectée, le défaut se situe donc dans l'amplitude que l'évolution doit avoir.

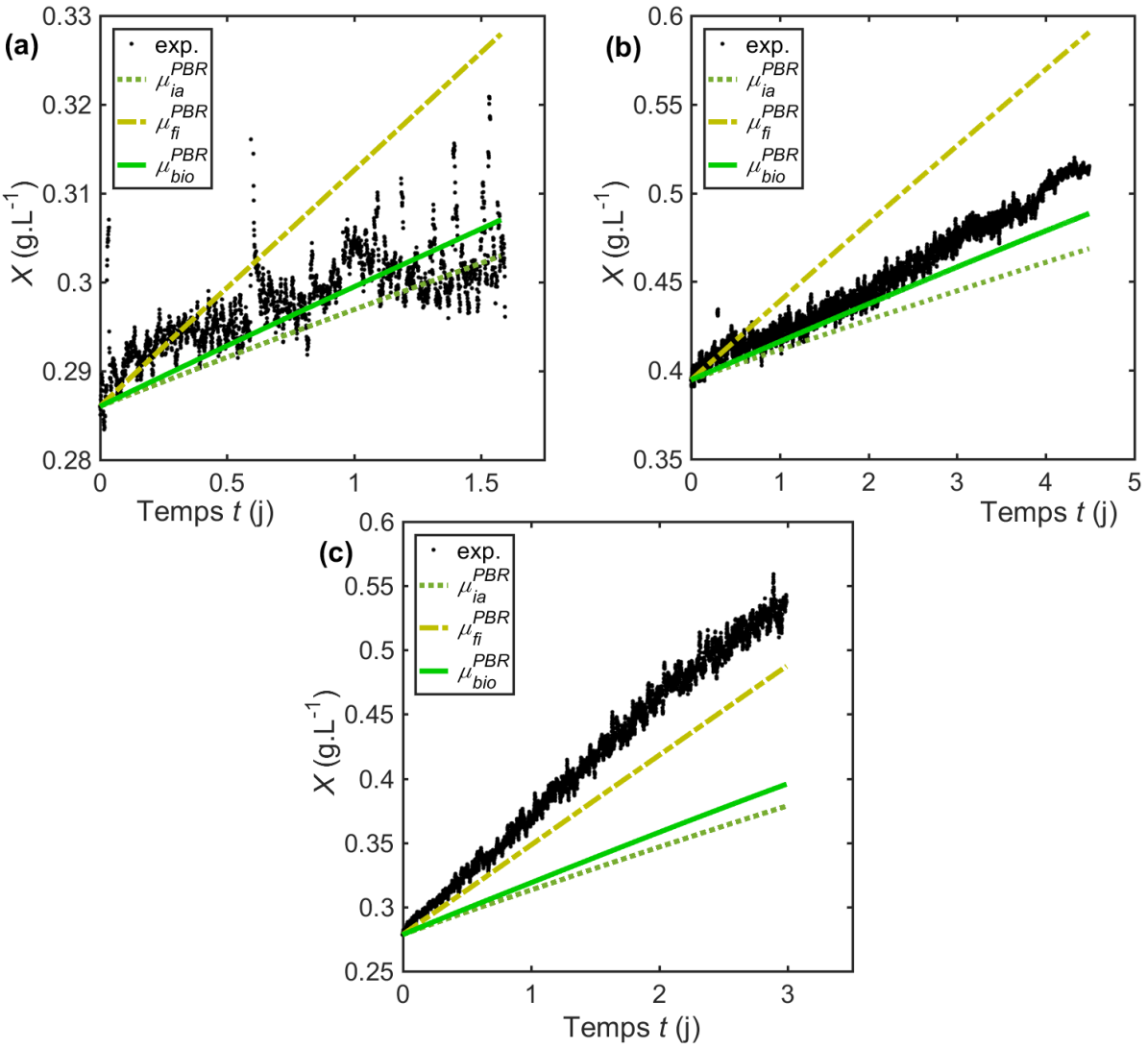


*Figure 103 : Courbes de croissance simulées dans le cas des expériences #1, #2, #3 et #3bissur le pilote (resp. pour les sous-figures **(a)**, **(b)**, **(c) et (d)**), en **croix noires** les mesures expérimentales correspondantes. Avec en :*
*-**(a)**, X_0=0,286 g·L-1, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, PBR. pilote 6 sources*
*-**(b)**, X_0=0,395 g·L-1, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, PBR. pilote 10 sources*
*-**(c)**, X_0=0,278 g·L-1, T=35°C, milieu P3, I_0=1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, PBR. pilote 16 sources*

Le photobioréacteur numérique est donc mis en échec pour décrire quantitativement un photobioprocédés quel que soit son échelle. Cependant, cela n'est pas contradictoire avec le discours porté en partie I.3 : on ne peut reproduire avec certitude ce qui n'a été quantifié par ailleurs et les extrapolations sont de ce fait critiquables. Ainsi, on l'a vu, le pilote possède fraction importante de son volume qui n'est pas éclairée ou très peu (comparativement au photobioréacteur de paillasse ci-avant) mais contient aussi des éléments de volume soumis à de fortes valeurs d'irradiances (i.e. au-delà de ce que l'on peut trouver dans les autres photobioréacteurs). Cependant, dans le calcul de la vitesse de croissance on utilise la loi μ_{lum}

sur un domaine où elle n'est simplement pas définie, à savoir entre 350 et 1000 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (car non-évaluée expérimentalement) et sur un autre domaine, celui des très faibles valeurs (cf. Figure 69), où l'on sait que le modèle est sans doute incertain car la croissance n'as pas non plus été mesurée en deçà de 5 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (cf. Figure 44) et que les faibles valeurs de vitesses correspondantes rendent leur mesure peu précise. Par conséquent bien que le modèle soit effectivement multi-échelle, celui-ci est sollicité en dehors de son domaine de validité lorsqu'il est appliqué au cas du pilote et il était donc probable que sa mise en œuvre aboutisse à un résultat inexact. On ne sait donc pour l'instant pas prédire la production de spiruline dans des réacteurs dont la fraction volume à l'obscurité prédomine, y parvenir demande de compléter notre connaissance de μ_{lum}. Remarque : Grâce à la Figure 105, on vérifie effectivement que ce même calcul appliqué aux cas des photobioréacteurs de paillasse sollicite l'ensemble de la gamme d'irradiance allant de 0 à 350 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (caractérisé expérimentalement) est donc moins sensible aux défauts possibles de la corrélation proposé pour décrire μ_{lum}. À l'inverse, on trouve que pour le pilote, la majeure partie de la croissance est dirigée par les faibles valeurs d'irradiances (i.e. <10 $\mu mol_{PAR} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

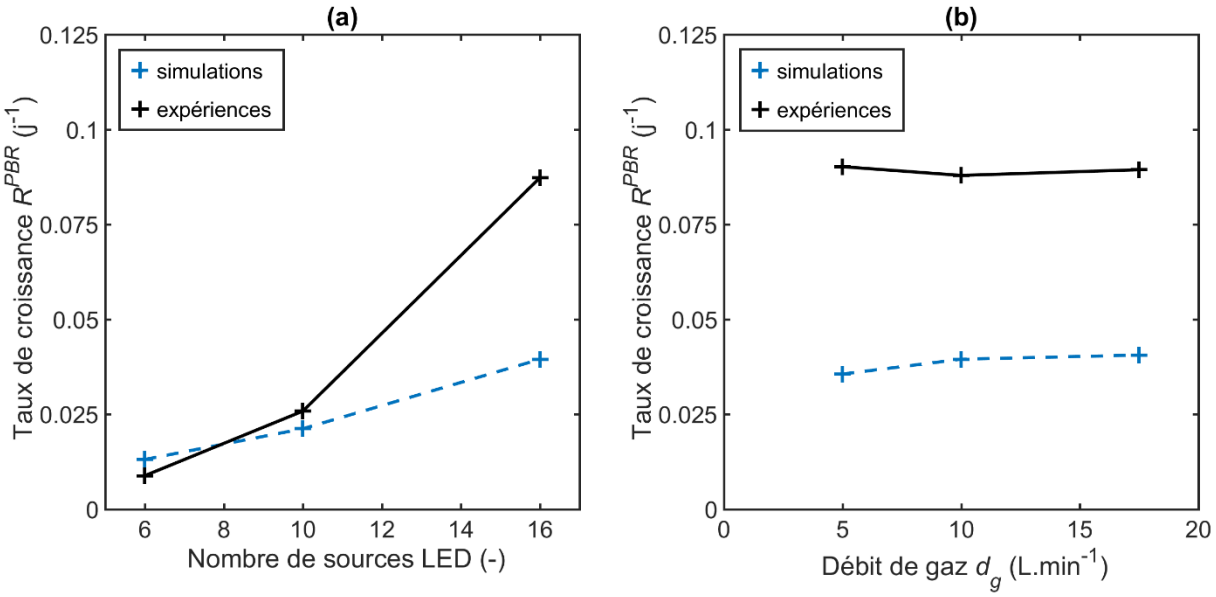


*Figure 104 : Comparaison des taux de croissance expérimentaux et simulé avec μ_{bio}^{PBR}, resp. pour les séries #1, #2 et#3 en **(a)** et #4, #2 et #5 en **(b)***

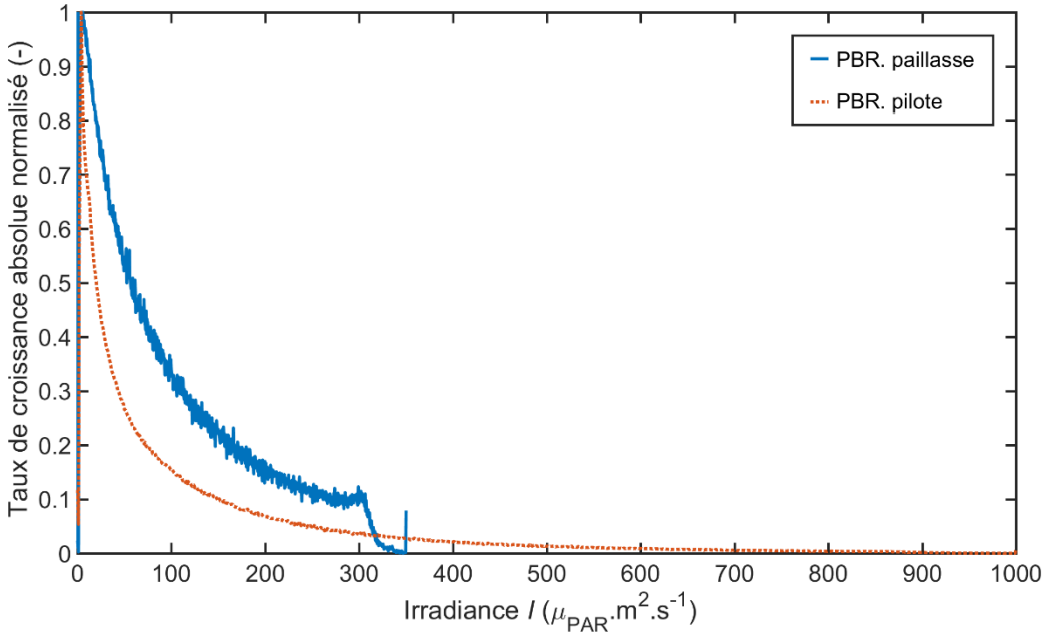


Figure 105 : Comparaison pour les photobioréacteurs pilote et de paillasse de leur distribution normalisée de taux de croissance en fonction de l'irradiance (i.e. $|\mu_{lum}(I) \cdot PROB(I)|/max\ (|\mu_{lum}(I) \cdot PROB(I)|)$*)*

Néanmoins, on s'attend tout de même à ce que la courbe réelle de μ_{lum} soit proche de ce que l'on décrit jusque-là avec équation (19), cela ne remet donc *a priori* pas en cause les tendances qualitatives issues de l'exploitation des résultats du photobioréacteur numérique (bien qu'erronées en valeurs absolue). C'est sur ce postulat que, Figure 104.(b), on procède à la comparaison des taux de croissances expérimentaux et simulées pour les séries #3, #4 et #5 pour lesquelles on a fait varier les conditions d'agitation par bullage de la culture via plusieurs débits d'injections de gaz. Sans surprise, les croissances simulées sont à nouveau sous-estimées, comme en Figure 103.(c). Par contre, la simulation décrit bien l'absence de variation significative du taux de croissance avec de le débit de gaz sur l'ensemble de la gamme opératoire, alors même que Γ varie, lui, de plus d'un facteur deux (cf. Tableau 8). Ainsi, on aurait pu prévoir que pour le pilote on ne peut pas, en l'état, envisager d'améliorer la production de spiruline par une modification de l'agitation (ce qui était pourtant possible et prédit pour les réacteurs de paillasse).

Dans la continuité, et afin d'illustrer le potentiel exploratoire du modèle, il est aussi réalisé une expérience purement numérique. Il y est exposé une nouvelle approche possible de la conception d'un photobioréacteur, et qui est la conséquence des propriétés du modèle. Ainsi, on a voulu voir si la disposition des sources de lumières pouvait à elle seule jouer sur le taux de croissance. Le constat de départ est que la principale composante du mouvement des

cellules se trouve être verticale (dans le pilote, cf. Figure 84.(c)) et que de la cinétique est significativement impactée par les variations de lumière perçue par les cellules (favorablement). Alors, afin d'améliorer cette cinétique on a l'idée de chercher à intensifier la vitesse de variations de la lumière perçue (via Γ). Pour cela, on a simulé un photobioréacteur pilote hypothétique pour lequel les rubans de LED seraient disposés orthogonalement aux trajectoires des cellules et non plus longitudinalement comme dans la réalité. Par ailleurs, pour être capable de faire une comparaison on a, pour ce cas hypothétique, conservé la même hydrodynamique et la même quantité de LED et donc le même coût énergétique opératoire. Ainsi a-t-on simulé le champ d'irradiance du pilote (i.e. même géométrie du volume réactionnel) dans le cas où les rubans de LED seraient disposés de façon horizontale le long des parois et régulièrement espacé sur la hauteur de la colonne de liquide. L'ensemble de la démarche et des résultats est pleinement détaillé en [144] disponible en Annexe H et n'est pas redonné ici. Il sort de cette simulation qu'une telle configuration permet d'augmenter de 8% (à 1 $g \cdot L^{-1}$) le taux de croissance et ce sans avoir modifié la quantité d'énergie nécessaire au fonctionnement du réacteur. Par comparaison, l'augmentation du taux de croissance entre les expériences #4 et #5 (où l'injection de gaz est plus que triplé) n'est que de 4%. Cela illustre un exemple d'amélioration du procédé (qui plus est à moindre frais) qui n'est rendu possible que par le fait de considérer les conditions réactionnelles à l'échelle des cellules et non plus macroscopiques. L'exposition temporelle de la biomasse à la lumière est donc aussi un facteur de dimensionnement envisageable pour aborder la conception d'un photobioprocédé.

IV. Conclusion

1. Démarche

L'objectif de cette étude est de rendre compte d'un photobioprocédé dans sa globalité, afin d'aider à la conception des nouveaux outils de culture de spiruline. Pour cela, on a entrepris de considérer l'ensemble des facteurs pouvant avoir un impact sur la croissance de la biomasse (le Σ du chapitre I.3) au regard de la littérature et de nos observations ; la problématique étant que tous ces facteurs ont certes un impact sur la biomasse, mais sont eux-mêmes aussi fonction de celle-ci (les facteurs eux-mêmes ou leurs effets). Ils sont donc tous couplés entre eux via la biomasse. Ainsi, les étudier de façon indépendante apporte certes des informations, mais cela est insuffisant pour la conception d'un procédé où tous sont sollicités conjointement. C'est afin de pouvoir être le plus représentatif possible du photobioprocédé réel dans l'exploitation des résultats et des conclusions que l'on tire de l'influence séparée de chacun des paramètres, que l'on a construit en partie III.4 un outil de simulation mariant (directement ou indirectement) tous les modèles : biologique, chimique, radiatif et hydrodynamique.

Cependant, ce qui est observable du système (l'augmentation de la quantité de spiruline dans les réacteurs) est déjà la conséquence intégrée de tous ces aspects mêlés entre eux. Cela rend les impacts de chacun indiscernables des autres. Afin d'appréhender et rendre compte de l'effet du couplage de ces différents phénomènes de ce système fortement multi-physique, on a procédé à l'étude des conditions réactionnelles à différentes échelles, en particulier à l'échelle de la cellule/trichome. Cela permet de faire intervenir les mécanismes dans lesquels sont impliqués les différents phénomènes et donc d'en rendre compte avant d'en tirer un résultat sur le réacteur global. Une telle approche nécessite par contre une démarche expérimentale adaptée, car il faut garantir dans la pratique la connaissance de ce à quoi les cellules sont exposées lors des mesures, sachant que nos actionneurs (thermoplongeur, LED, etc.) sont, eux-mêmes, contrôlés uniquement à l'échelle macroscopique. La modélisation du système, nécessite, quant à elle, des étapes supplémentaires comparativement à une approche classique. Il s'agit de déduire de la connaissance des actionneurs macroscopiques et des propriétés du système leur conséquences locales dans le réacteur, voir même temporelle pour ce qui est de l'effet de la lumière. Qui plus est, il est intéressant de remarquer que bien que les actionneurs soient constants dans le temps et que l'on procède aux mesures lorsque le régime pseudo-permanent est atteint (i.e. croissance linéaire établie), la cinétique de croissance est en partie régie par des variations temporelles à l'échelle de la cellule.

A partir de ce constat et sur les bases des connaissance issues de la littérature, on a cherché, à travers l'expérience, à définir le système biologique de façon aussi exhaustive que possible. Plusieurs outils de culture ont été utilisés, chacun étant adapté à un besoin. De par leur nombre, les photobioréacteurs de paillasse ont permis de cribler l'impact des paramètres de culture à l'échelle globale. Les photobioréacteurs étant parfaitement mélangés (ie. mélange très rapide devant la vitesse de croissance), ils sont homogènes du point de vue de la température et des concentrations. L'étude de leur impact macroscopique est donc suffisante à leur modélisation. On a pu constater, pour notre souche, la faible variation de la cinétique de croissance en fonction de la température (entre 25 et 35°C), ainsi que l'absence d'intercorrélation avec l'irradiance délivrée en parois. De même, on a mis en évidence le lien entre carbone inorganique, l'évolution du pH et la croissance. Le photobioréacteur homogène a permis, quant à lui, de maitriser les conditions d'exposition de la spiruline à la lumière. Ce n'est pas le cas à la paillasse ou sur pilote étant donnée la profondeur optique de ces deux géométries. L'étude de la croissance en exposition modulée à différentes fréquences a permis de modéliser l'effet des variations de lumière subies par les cellules et qui sont normalement induites par l'agitation. Enfin, les essais réalisés sur le réacteur pilote ont illustré les conséquences d'un volume fortement hétérogène sur le procédé et la nécessité de considérer le couplage entre les différents phénomènes.

Ensuite, on a cherché à améliorer la description des conditions de culture offertes par un photobioréacteur afin d'utiliser au mieux les modèles de croissance biologique. En ce sens, nous avons comptabilisé les équilibres acido-basiques afin de connaitre la quantité de carbone inorganique en solution réellement biodisponible. On a implémenté une simulation de la propagation de la lumière en milieu absorbant et diffusant et ainsi quantifié localement la cinétique relative à la lumière (moteur de la croissance), car la connaissance seule de l'irradiance délivrée en parois n'est pas représentative du procédé. Nous avons aussi simulé l'écoulement diphasique dans le réacteur afin de faire le lien entre croissance et qualité du mélange, et ce en superposant les lignes de courants et le champ de lumière dans le réacteur. Finalement, cela abouti à un modèle de photobioréacteur capable de prédire rapidement une courbe de croissance en fonction des déférentes consignes du procédé : température, composition du milieu, débit de gaz, irradiance en parois, concentration de l'inoculum et durée de culture.

2. Restrictions

Cependant, comme on l'a vu (chapitre I, II et III) la complexité du problème (notamment à travers son caractère multiphysique) fait qu'il a fallu en réduire l'envergure pour le rendre soluble (raisonnablement). Dès lors, de nombreuses hypothèses ont dues être émises au fil des différentes parties. Toutes constituent une restriction du champ de validité du modèle complet ainsi que des conclusions qui en proviennent. Dès lors, en dépit de la polyvalence que l'on a voulu conférer au modèle, l'interprétation de résultats de son application à des cas de figures ne respectant pas ces hypothèses doit se faire avec la plus grande précaution. Cela comprend l'extrapolation (risquée) des conclusions aux photobioprocédés en général, au-delà du présent cas d'étude (d'une microalgue particulière dans un contexte technique particulier). En revanche, cet ensemble d'hypothèses n'a rien de définitif, il peut tout à fait être modifié ultérieurement au regard de nouvelles données (expérimentales ou bibliographiques) ou de l'écriture d'autres modèles ne les nécessitant pas. Ce qui est mis en évidence, ci-après, n'est pas tant une liste des limites du modèle que des voies d'améliorations ultérieures du travail entrepris ici. Quoiqu'il en soit, voici un rappel des hypothèses les plus conséquentes :

- Tout d'abord, on présume valide l'application de données issues de la littérature pour décrire notre cas de figure (cf. Figure 37, Figure 39, Figure 49, Tableau 3 et Tableau 6). Ainsi, on exploite des résultats pour lesquels la souche de spiruline, le milieu de culture, les conditions opératoires, le protocole et le réacteur ont pu différer de notre cas d'étude, quand bien même sait-on que tous ces aspects contribuent au résultat (cf. le paragraphe précédent)

- Étant donné que l'on traite de la modélisation de cultures biologiques non axéniques, on suppose qu'il n'y pas d'effet (ou un effet constant et identique) de la charge bactérienne au sein des cultures quelles qu'elles soient. On a pour contre-exemple, l'observation d'un inoculum dans lequel une autre cyanobactérie (probablement *Phormidium*, *Planktronix* ou *Lyngbya*) s'est développée jusqu'à y devenir l'espèce prépondérante (cf. le changement de souche lors de l'expérience de la partie II.4.C), changeant donc irrémédiablement le système.

- Comme on a pu le voir, les propriétés optiques de la suspension de spiruline revêtent une importance toute particulière, car elles interviennent à la fois dans

l'éclairement du réacteur (éclairement qui est un point critique de la conception du procédé) mais aussi dans la métrologie avec le choix d'un suivi des cultures par densité optique. On postule alors que ces propriétés sont constantes dans le temps, ou a minima sur la durée d'une culture (ie. quelques jours). Contre-exemple : une culture peut jaunir peu de temps avant son effondrement, de même on observe parfois la formation de biofilms ou d'agglomérats entrainant une inhomogénéité des propriétés optiques.

- On suppose qu'il n'y a qu'une seule cinétique possible, cela sous-entend l'unicité du mécanisme intracellulaire impliqué dans sa croissance avec nos conditions opératoires (ex. pas de dissociation d'un comportement diurne et nocturne, i.e. respiration et photosynthèse).

- On suppose que la cinétique qui est la conséquence de ce mécanisme peut s'écrire comme le strict produit de plusieurs termes rendant chacun compte de l'influence de certains paramètres (cf. loi (4), pas de somme ou de fonctions conditionnelles).

- Dans l'écriture de cette cinétique, on a cherché à prendre en compte le plus de facteurs d'influence possible. On suppose donc que pour nos conditions opératoires, il n'y a pas d'autres paramètres ayant une influence sur la croissance ou d'intercorrélation entre les influences autres que celles considérées ici. Par exemple, dans notre approche pour intégrer l'effet de l'exposition à la lumière à l'échelle du réacteur global, on postule que les cinétiques des différents éléments de la population biologique (distribués) sont indépendantes.

- Des modèles ont aussi été utilisés pour représenter notre réacteur (cf. chapitre III) et tous sont perfectibles. On présume alors que les simplifications opérées ne sont pas dommageables pour le résultat final (ex. réduction du système chimique aux seules espèces prépondérantes).

- Tout au long de l'étude, on s'est attelé à modéliser la croissance de la spiruline. On suppose que cela est suffisant à la conception d'un photobioprocédé, et on ignore alors tous les autres aspects (ex. coût, contenu intracellulaire, etc.). Par exemple : certaines conditions de culture favorisent la production d'EPS par la spiruline qui nuisent à la récolte par filtration [45] et donc à sa valorisation. De

même, on a soulevé le fait que l'agitation pouvait être bénéfique pour la croissance, en ignorant d'un autre côté que des contraintes mécaniques induites par l'augmentation du cisaillement hydrodynamique peuvent au contraire être néfastes à la biomasse via un excès de lyse cellulaire.

3. Heuristiques

Fort heureusement, bien que les hypothèses citées ci-dessus soient formellement limitantes pour la quantitativité de notre outil de simulation, rien n'empêche d'extraire de cette étude les grandes lignes pour une conception optimale d'un photobioréacteur appliqué au cas de la spiruline, ce qui était l'objectif premier. Ainsi, de chaque étape, à savoir : bibliographique, expérimentales, modélisation et simulation, peuvent être déduits quelques enseignements concernant les différents aspects du procédé, à savoir tant la conception du matériel (i.e. briques technologiques, géométrie, etc.) que son utilisation (i.e. paramètres opératoires, pilotage, etc.). Bien évidemment, nombre d'entre elles ne sont pas inédites [1].

Pour commencer, on l'a vu dans l'état de l'art, la conception des photobioréacteurs peut souvent se caractériser autour de la mise en mouvement du milieu réactionnel (ex. lagune, colonne à bulles, recirculation). La vocation première de cette mise en mouvement est classique au génie des réacteurs, à savoir la conservation de l'homogénéité au sein du volume. Cela consiste ici à éviter l'apparition de carences nutritives locales et de façon plus critique prévenir la ségrégation de la biomasse (sauf cas particulier de réacteurs séparatifs [145]) en biofilms ou flocs qui tous deux seraient délétères pour la productivité. Sur le premier point, les inhomogénéités de concentrations en nutriment sont aisément évitées car le mélange est souvent rapide devant la croissance (hormis en milieu naturel). Concernant la ségrégation de la biomasse, il s'agit essentiellement de prévenir la formation de volumes morts, par exemple en évitant les géométries anguleuses ou l'absence de circulation au niveau des parois éclairées, lorsqu'elles sont immergées bien sûr. Par ailleurs, il ne faut pas que les écoulements engendrés soient néfastes à l'intégrité de la biomasse, notamment à travers des cisaillements hydrodynamiques excessifs qui entraineraient une lyse mécanique des cellules. De même, cela comprend aussi les étapes d'adductions entre les différents volumes de stockage et opérations unitaires (ex. transfert entre le réacteur et l'unité de séparation) ou bien même comme dans le cas du photobioréacteur pilote dans les boucles de recirculation (ici à vocation métrologique).

Classiquement, une agitation par bullage est souvent préconisée, car elle possède la double capacité de permettre une mise en mouvement sans fortes contraintes hydrodynamiques, et d'éviter une inhibition par accumulation du dioxygène produit de la photosynthèse, et ce, grâce au transfert entre phases. Si cette solution n'est pas retenue, il

faut soit prévoir une surface libre importante ou une étape dédiée de transfert afin de ne pas être limité par le dioxygène. De plus, le bullage peut aussi servir à la régulation en pH du milieu via l'injection de dioxyde de carbone, toujours grâce au transfert entre phases. De même, la régulation du pH permet de ralentir l'appauvrissement du milieu en nutriment bicarbonate dû à la formation de carbonate au cours de la culture, et donc retarder l'arrêt de la croissance par carence.

Néanmoins l'aspect le plus limitant dans la conception de photobioréacteurs ne concerne pas les conditions de mélange du volume mais son éclairement. Ainsi l'a-t-on vu, la loi cinétique relative à la lumière n'est pas linéaire et les gradients lumières sont très importants à l'intérieur du volume. Se distinguent alors deux cas limites. Le premier, celui d'un réacteur parfaitement homogène en lumière, typiquement lorsque la taille caractéristique du gradient de lumière est petite devant la profondeur optique offerte par la géométrie du réacteur. Ce cas particulier permet d'exposer idéalement les microalgues à des niveaux d'irradiances où la cinétique est la plus avantageuse, c'est à dire soit au maximum de la courbe ou dans la gamme de proportionnalité irradiance/croissance suivant que l'on cherche productivité ou rendement. Dans le cas réel d'un photobioréacteur possédant tout de même une hétérogénéité en lumière, il est par exemple recommandé de rechercher à ce que l'irradiance la plus faible du volume soit égale au point de compensation (cf. II.4.B). Cela implique une intensification des réacteurs via une augmentation du facteur de forme F. La contrainte étant que cela implique de faibles épaisseurs de liquide, qu'il faut donc concilier avec des grands volumes de culture (dans le cadre d'une unité de production). Il existe par ailleurs un abaque faisant le lien entre productivité et F [1], [28]. De ce point de vu, des photobioréacteurs de type film tombant, comme le *Thin Layer Cascade* [65] ou AlgoFilm [64], sont dans la droite ligne de ce type d'intensification.

Autre cas limite, si la géométrie de réacteur implique qu'il y ait, à l'intérieur de celle-ci, des régions non-éclairées, alors le mélange doit aussi répondre à la contrainte du renouvellement de la fraction de la biomasse présente dans les régions du volume exposées à la lumière. Plus encore, on l'a vu, il est possible d'envisager des cas où l'écoulement dans le réacteur permet d'atteindre un régime cinétique dit intégré qui est équivalent en productivité à un réacteur homogène en lumière et dont l'irradiance serait égale à la moyenne volumique dans le réacteur. Dès lors, l'intensification consiste à construire un couple structures hydrodynamiques/gradients de lumière permettant à la biomasse de passer de l'ombre à la lumière avec des fréquences élevées (i.e. à partir de 0,1 Hz). Pour cela, on peut notamment

utiliser le nombre de Damköhler, Da, comme grandeur de dimensionnement. La contrainte étant de ne pas engendrer des vitesses d'écoulement qui seraient dommageables à la spiruline, ce qui limite la taille des gradients de lumière à traverser et donc encore une fois les épaisseurs optiques des potentiels photobioréacteurs ainsi intensifiés. Dans cette logique, on peut citer le photobioréacteur étudié par E. Olivio dans sa thèse, maintenant commercialisé sous le nom de LUCY, qui combine à la fois une épaisseur optique modérée et une hydrodynamique spécifiquement étudiée pour un passage régulier de la biomasse à la lumière [146]. Autre conséquence de la présence d'hétérogénéités en lumière, le mouvement de la biomasse dans le volume permet d'exposer la spiruline à des niveaux d'irradiance locaux bien supérieurs à ce qu'ilserait possible avec une exposition homogène et permanente, la condition à cela étant que ces événements soient brefs devant le temps τ_{bio}. Dans ce cas, il est alors possible de dissiper plus de puissance lumineuse dans les photobioréacteurs et donc potentiellement d'augmenter la production de biomasse.

Dernier point et bien que cela n'ait été traité ici, l'établissement d'un outil de simulation peut aussi, s'il prend en compte les notions de coûts, aider à déterminer l'optimum économique du procédé. Celui-ci n'est pas forcement identique au maximum de production. Par exemple, dans un cas d'étude de notre partenaire Alg&You, le scénario d'usage impliquait des cultures de spiruline de strictement une semaine, il est alors montré, *in silico*, qu'une réduction de 30% de la concentration des nutriments n'impacte pas significativement la production au terme des sept jours, tout en diminuant les coûts de fonctionnements.

Notre modèle et sa méthodologie de construction ont permis de mettre en évidence plusieurs tendances ouvrant des voies d'améliorations du procédé de culture de spiruline grâce à la description des mécanismes de couplage des différents phénomènes. Néanmoins, les différents modèles qui le composent souffrent d'une perfectibilité. Les simulations produites par le photobioréacteur numérique peuvent alors sans nul doute gagner en quantitativité, robustesse et tendre plus encore vers un réel outil de dimensionnement (cf. discussion en partie III.4.B). Voici l'énumération des améliorations pouvant être jugées prioritaires, notamment pour ce qu'elles sont critiques dans la détermination du résultat final :

- Explorer et quantifier la courbe de croissance spécifique liée à la lumière en ses deux bornes (cf.II.4.B, Figure 44), à savoir situer précisément la point de compensation et la croissance/décroissance aux faibles valeurs et en l'absence totale de lumière et *a contrario* évaluer l'inhibition (ou son absence) sur la

croissance d'une surexposition à la lumière (surexposition au sens de non-viabilité en régime permanent).

- Continuer d'investiguer l'effet dynamique de l'exposition à la lumière et perfectionner la mesure des temps caractéristiques mis en jeu. Eventuellement, étendre la gamme d'étude jusqu'aux périodes de 24 h (cf. II.4.C, Figure 51) si l'on souhaite étendre les applications aux photobioréacteurs en lumière naturelle.

- Affiner la modélisation numérique de l'écoulement, notamment la description des macrostructures de mélange pouvant interférer avec τ_{bio} (cf. III.4.A, Figure 83) pour affiner l'évaluation de Γ. On peut envisager de migrer vers des méthodes LES (*Large Eddy Simulation*) lorsque cela sera réalisable en polyphasique.

- Améliorer la qualité du lâché de particule Lagrangien, notamment du traitement des particules en région proche parois où les gradients de lumière sont les plus forts (cf. III.3.B, Figure 85)

- Pour le calcul du champ d'irradiance dans le réacteur, effectuer la mesure des propriétés optiques, E_a, E_s et g (cf. III.2.A, Tableau 6) pour notre souche de spiruline, et confronter les résultats des simulations de Monte Carlo à la mesure expérimentale

- Dans la méthode de Monte-Carlo pour la simulation du champ d'irradiance, implémenter une condition aux limites de type loi de réflexion de Fresnel (réalité physique) et prendre en compte la diffusion lumineuse liée à la présence de bulles dans certaines zones (cf. III.2.B, lois (33) et (36))

- Ajouter un modèle d'activité aux calculs des équilibres chimiques (cf. III.1, Tableau 5), ajuster toutes les constantes thermodynamiques aux températures opératoires. Notamment si l'on veut simuler l'effet du transfert de matière. Si l'on opte pour un protocole de culture avec recyclage du milieu (i.e. retour filtrat), il faudra déterminer la croissance spécifique relative à celui-ci (cf. II.2) car potentiellement appauvrie à des degrés tels qu'on ne puisse plus en ignorer l'effet.

Bibliographie

[1] J. Pruvost et J. F. Cornet, « Production industrielle de microalgues et de cyanobacteries », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. CHV4030 V1. T.I., 10-févr-2017.

[2] A. Richmond et Q. Hu, Éd., *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Second. Oxford, OX, UK ; Ames, Iowa, USA: Blackwell Science, 2004.

[3] E. Marechal, « Carburants à base d'algues oléagineuses - Principes, filière, verrous », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. IN186. T.I., 10-févr-2015.

[4] C. FOUCAUD-SCHEUNEMANN et S. HELINCK, « Les micro-organismes au coeur des biotechnologies », Techniques de l'Ingenieur, vol. BIO550. T.I., 10-mai-2009.

[5] C. Sili, G. Torzillo, et A. Vonshak, « Arthrospira (Spirulina) », in *Ecology of Cyanobacteria II*, B. A. Whitton, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, p. 677-705.

[6] M. Ras, J.-P. Steyer, et O. Bernard, « Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production », *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 12, n° 2, p. 153-164, juin 2013.

[7] A. Vonshak et A. Richmond, « Mass production of the blue-green alga Spirulina: An overview », *Biomass*, vol. 15, n° 4, p. 233-247, janv. 1988.

[8] R. D. Fox, *La spiruline, technique, pratique et promesse*. Aix-en-Provence: Edisud, 1999.

[9] J.-P. Jourdan, « Manuel de culture artisanale de Spiruline »., www.spirulinefrance.free.fr, 2-fev-2018.

[10] M. R. Badger, « CO2 concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution », *J. Exp. Bot.*, vol. 54, n° 383, p. 609-622, févr. 2003.

[11] E. M. Radmann, C. O. Reinehr, et J. A. V. Costa, « Optimization of the repeated batch cultivation of microalga Spirulina platensis in open raceway ponds », *Aquaculture*, vol. 265, n° 1-4, p. 118-126, mai 2007.

[12] R. Burnap, M. Hagemann, et A. Kaplan, « Regulation of CO2 Concentrating Mechanism in Cyanobacteria », *Life*, vol. 5, n° 1, p. 348-371, janv. 2015.

[13] P. Le Cloirec, « CO2 (dioxyde de carbonne) », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. G1815. T.I., 10-janv-2008.

[14] A. Vonshak, Éd., *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology, and biotechnology*. London ; Bristol, PA: Taylor & Francis, 1997.

[15] M. Kumar, J. Kulshreshtha, et G. P. Singh, « Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium Spirulina platensis at different light intensities and temperature », *Braz. J. Microbiol.*, vol. 42, n° 3, p. 1128–1135, 2011.

[16] J.-F. cornet, « Etude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur. Etablissement d'un modèle structuré. application à un ecosystème clos artificiel. », thèse, Univeristé de Paris - Sud, Orsay, 2016.

[17] C. Zarrouk, « contribution à l'étude d'une cyanophycée: Influence de divers facteur physique et chimique sur la croissance et la photosynthèse de Spiruline maxima (Setch et Gardner) Geitler », thèse, Univeristé de Paris, 1966.

[18] J.-F. Cornet, C. G. Dussap, et J.-B. Gros, « Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors », in *Bioprocess and algae reactor technology, apoptosis*, Springer, 1998, p. 153–224.

[19] Fermentalg. www.fermentalg.com.

[20] J. Jenck, O. Lépine, J. Legrand, P. Dreno, D. Grizeau, et C. Dupré, « Valorisation industrielle des microalgues photosynthétiques », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. IN201. T.I., 10-nov-2011.

[21] K. Chojnacka et A. Noworyta, « Evaluation of Spirulina sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 34, n° 5, p. 461-465, avr. 2004.

[22] Centre d'étude et de valorisation des algues, « Réglementation algues alimentaires : Synthèse CEVA au 10/02/2014 ». www.ceva-algues.com/document/synthese-reglementaire-algues-alimentaires.com, 10-févr-2014.

[23] Agence francaise de sécurité sanitaire des aliments, « AFSSA - Saisine n°2003-SA-0002 ». 15-2003.

[24] O.N.U., « Intergovernmental Institution for the Use of Micro-Algae Spirulina against Malnutrition ». www.IIMSAM.org, 2003.

[25] M. N. Ahounou, « La spiruline: un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation », thèse, Université de Rouen, 2-fev-2018 .

[26] S. SGUERA, « Spirulina Platensis et ses consituants interets nutritionnels et activités thérapeutiques », thèse, Universitée Henri Poincaré - Nancy 1, 2008.

[27] T. Pottier, « Modélisation de l'éffet de l'hydrodynamique sur l'acces à la lumière: application à la croissance photosynthetique dans un réacteur de géometrie torique », thèse, Université de Nantes, 2005.

[28] A. Soulies, « Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique », thèse, Université de Nantes, Nantes, 2014.

[29] V. Rochatte, « Développement et modélisation d'un photobioréacteur solaire à dilution interne du rayonnement », thèse, Université de Clermont-Ferrand 2, 2016.

[30] F. Tian, « Study and optimization of lighting systems for plant growth in a controlled environment », thèse, Université de Toulouse, 2017.

[31] N. U. F. Niangoran, « Optimisation de la culture de la spiruline en milieu contrôlé: éclairage et estimation de la biomasse », thèse, Université de Toulouse.

[32] K. Richardson, J. Beardall, et J. A. Raven, « Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies », *New Phytol.*, vol. 93, n° 2, p. 157–191, 1983.

[33] E. Olivo, « Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en écloseries aquacoles », thèse, Université de Nantes, 2007.

[34] M. Roustan, J.-C. Pharamond, et A. Line, « Agitation. Mélange - Concepts théoriques de base », Techniques de l'Ingénieur. vol.J380. T.I., 10-juin-1999.

[35] C. Zhu *et al.*, « Large-scale cultivation of Spirulina in a floating horizontal photobioreactor without aeration or an agitation device », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, n° 20, p. 8979-8987, oct. 2018.

[36] J. Pruvost, J.-F. Cornet, et J. Legrand, « Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 63, n° 14, p. 3679-3694, juill. 2008.

[37] J. Pruvost, B. Legouic, J. F. Cornet, et C. lombard, « Biofixation du CO2 par microalgues », *technique de l'ingénieur*, vol. CH7005 V1. T.I., 10-nov-2017.

[38] M. Ndiaye, « Transfert de Co2 et stratégies d'apport du carbonne inorganique en photobioréacteur », thèse, Université de Nantes, 2016.

[39] E. A. Laws, K. L. Terry, J. Wickman, et M. S. Chalup, « A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 25, n° 10, p. 2319–2335, 1983.

[40] G. Hebrard, « Etude de l'influence du distributeur de gaz sur l'hydrodynamique et le transfert de matière gaz-liquide des colonnes à bulles », thèse, Université de Toulouse, INSA, 1995.

[41] G. Torzillo, B. Pushparaj, F. Bocci, W. Balloni, R. Materassi, et G. Florenzano, « Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors », *Biomass*, vol. 11, n° 1, p. 61–74, 1986.

[42] A. Besson, « Etude multi-échelle de la récolte de Dunaliella salina-Développement d'un procédé d'autofloculation-flottation de microalgues », thèse, Université de Toulouse, INSA, 2015.

[43] J.-F. Cornet, « Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 65, n° 2, p. 985-998, janv. 2010.

[44] A. ARTU, « Etude et optimisation de la culture de microalgues en photobioréacteurs solaires », thèse, Université de Nantes, 2016.

[45] J. B. Vergnes, V. Gernigon, P. Guiraud, et C. Formosa-Dague, « Bicarbonate Concentration Induces Production of Exopolysaccharides by *Arthrospira platensis* That Mediate Bioflocculation and Enhance Flotation Harvesting Efficiency », *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 7, n° 16, p. 13796-13804, août 2019.

[46] D. Leclerc et G. Baluais, « Filtration - Aspects généraux », Techniques de l'Ingénieur, vol.J3499. T.I., 10-dec-1997.

[47] *Polymer Data Handbook*. Oxford University Press, 1999.

[48] A.-M. Riquet, J.-M. Herry, F. Poncin-Epaillard, G. Legeay, et M.-N. Bellon-Fontaine, « Développement de matériaux plastiques à surfaces modifiées et maîtrise de la biocontamination », p. 14, 2008.

[49] C. Thobie, « Caractérisation de l'hydrodynamique et des transferts gaz-liquide dans un photobioréacteur intensifié : étude de l'effet du bullage sur le développement de biofilm micro-algal », thesis, Nantes, 2018.

[50] A. Kozlowski, « Contact alimentaire Principaux matériaux autorisés », Tehcniques de l'Ingénieur, vol. F1305. T.I., 10-juin-2005.

[51] F. D. Champs, « Réglementation des plastiques au contact de l'eau et des aliments », Techniques de l'ingénieur, vol. F1300. T.I., 10-juin-2004.

[52] *Directive Européenne n°93-43 du 14 juin 1993 N° 9343 RELATIVE A L'HYGIENE DES DENREES ALIMENTAIRES*. .

[53] M. Chambolle, « Sécurité sanitaire des aliments », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. F1110. T.I., 10-sept-2003.

[54] J.-Y. Leveau, J.-P. Larpent, et M. Bouix, « Sécurité microbiologique des procédés alimentaires », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. F1120. T.I., 10-mar-2001.

[55] C. Vernozy-Rozand, « Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire », *Technique de l'Ingénieur*, vol. F1130. T.I., 10-sept-99.

[56] G. Planchon et C. Fuentes, *La Spiruline pour Tous. Culture Familiale*. La Chapelle-sous-Uchon (Corcelle, 71190): Passerelle Éco, 2014.

[57] O. Jorquera, A. Kiperstok, E. A. Sales, M. Embiruçu, et M. L. Ghirardi, « Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 4, p. 1406-1413, févr. 2010.

[58] Fédération des Spiruliniers de France, www.spiruliniersdefrance.fr.

[59] J. Boudrant, J. Guezennec, et P. Monsan, « Bioprocédés - Avant Propos », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. BIO10. T.I., 10-nov-2007.

[60] P. Darvehei, P. A. Bahri, et N. R. Moheimani, « Model development for the growth of microalgae: A review », *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 97, p. 233-258, déc. 2018.

[61] S. Aiba, « Growth kinetics of photosynthetic microorganisms », in *Microbial reactions*, Springer, 1982, p. 85–156.

[62] J. Dauchet, « Analyse radiative des photobioréacteurs », thèse, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, 2013.

[63] J.-F. Cornet, C. G. Dussap, J.-B. Gros, C. Binois, et C. Lasseur, « A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 50, n° 9, p. 1489-1500, mai 1995.

[64] J. Pruvost, F. Le Borgne, A. Artu, et J. Legrand, « Development of a thin-film solar photobioreactor with high biomass volumetric productivity (AlgoFilm©) based on process intensification principles », *Algal Res.*, vol. 21, p. 120-137, janv. 2017.

[65] A. C. Apel *et al.*, « Open thin-layer cascade reactors for saline microalgae production evaluated in a physically simulated Mediterranean summer climate », *Algal Res.*, vol. 25, p. 381-390, juill. 2017.

[66] J.-F. Cornet et C.-G. Dussap, « A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors », *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, n° 2, p. 424–435, 2009.

[67] J. S. Burlew et B. Kok, « Experiment on photosynthesis by chlorella in flashnig light », in *Algal culture, from laboratory to pilot plant.*, Washington: Carnegie Institution, 1976, p. 63-75.

[68] P. H. C. Eilers et J. C. H. Peeters, « A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton », *Ecol. Model.*, vol. 42, n° 3-4, p. 199–215, 1988.

[69] X. Wu et J. C. Merchuk, « A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 56, n° 11, p. 3527–3538, 2001.

[70] P. Hartmann *et al.*, « Growth rate estimation of algae in raceway ponds: A novel approach », *IFAC Proc. Vol.*, vol. 47, n° 3, p. 6216–6221, 2014.

[71] A. Nikolaou, P. Booth, F. Gordon, J. Yang, O. Matar, et B. Chachuat, « Multi-physics modeling of light-limited microalgae growth in raceway ponds », *IFAC-Pap.*, vol. 49, n° 26, p. 324–329, 2016.

[72] C. Baroukh, J. P. Steyer, O. Bernard, et B. Chachuat, « Dynamic Flux Balance Analysis of the Metabolism of Microalgae under a Diurnal Light Cycle », *IFAC-Pap.*, vol. 49, nº 7, p. 791-796, janv. 2016.

[73] C. Baroukh, R. Muñoz-Tamayo, O. Bernard, et J.-P. Steyer, « Mathematical modeling of unicellular microalgae and cyanobacteria metabolism for biofuel production », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 33, p. 198-205, juin 2015.

[74] I. Perner-Nochta et C. Posten, « Simulations of light intensity variation in photobioreactors », *J. Biotechnol.*, vol. 131, nº 3, p. 276-285, sept. 2007.

[75] S. Xue, Z. Su, et W. Cong, « Growth of Spirulina platensis enhanced under intermittent illumination », *J. Biotechnol.*, vol. 151, nº 3, p. 271-277, févr. 2011.

[76] K. L. Terry, « Photosynthesis in modulated light: Quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 28, nº 7, p. 988-995, juill. 1986.

[77] J. Huang *et al.*, « Improving performance of flat-plate photobioreactors by installation of novel internal mixers optimized with computational fluid dynamics », *Bioresour. Technol.*, vol. 182, p. 151-159, avr. 2015.

[78] M. Li, D. Hu, et H. Liu, « Photobioreactor with ideal light–dark cycle designed and built from mathematical modeling and CFD simulation », *Ecol. Eng.*, vol. 73, p. 162-167, déc. 2014.

[79] X. M. Truong-Meyer, « Modélisation en génie des procédés », *Techniques de l'Ingénieur*, vol. J1021. T.I., 10-juin-2009.

[80] D. Colombet, « Modélisation de réacteurs Gaz-Liquide de type colonne à bulles en conditions industrielles », thèse, Université de Toulouse, INSA, 2012.

[81] A. Lucchetti, « Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues », thèse, Mines ParisTech, 2014.

[82] A. Kazbar, « Etude de l'impact de la concentration en oxygène dissous et la présence d'une fraction sombre sur la performance des photobioréacteurs », thèse, Université de Nantes, 2018.

[83] M. Pigou, « Modélisation du comportement cinétique, des phénomènes de mélange et de transfert locaux, et des effets d'hétérogénéité de population dans les fermenteurs industriels », thèse, Université de Toulouse, INSA, 2018.

[84] C. SAFI, « Microalgae biorefinery : proposition of a fractionation process », thèse, Université de Toulouse, ENSIACET, 2013.

[85] R. Takors, « Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions », *J. Biotechnol.*, vol. 160, nº 1-2, p. 3-9, juill. 2012.

[86] C. Chatfield, *The Analysis of Time Series: An Introduction, Sixth Edition*, 6 edition. Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC, 2003.

[87] J. Morchain, *Modélisation des bioréacteurs*, Iste. ISTE Editions, 2018.

[88] E. Lee, M. Jalalizadeh, et Q. Zhang, « Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review », *Algal Res.*, vol. 12, p. 497-512, nov. 2015.

[89] M. J. Weber, *Handbook of optical materials*. Boca Raton: CRC Press, 2003.

[90] H. Lin, D. E. Day, et J. O. Stoffer, « Optical and mechanical properties of optically transparent poly(methyl methacrylate) composites », *Polym. Eng. Sci.*, vol. 32, nº 5, p. 344-350, août 2004.

[91] C. Formosa-Dague, V. Gernigon, M. Castelain, F. Daboussi, et P. Guiraud, « Towards a better understanding of the flocculation/flotation mechanism of the marine microalgae Phaeodactylum tricornutum under increased pH using atomic force microscopy », *Algal Res.*, vol. 33, p. 369-378, juill. 2018.

[92] M. Coca, V. M. Barrocal, S. Lucas, G. González-Benito, et M. T. García-Cubero, « Protein production in Spirulina platensis biomass using beet vinasse-supplemented culture media », *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, p. 306-312, avr. 2015.

[93] C. Combe, P. Hartmann, S. Rabouille, A. Talec, O. Bernard, et A. Sciandra, « Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote Dunaliella salina », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, nº 6, p. 1111–1121, 2015.

[94] G. Torzillo et A. Vonshak, « Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium Spirulina platensis », *Biomass Bioenergy*, vol. 6, nº 5, p. 399-403, janv. 1994.

[95] L. Trabelsi, H. Ben Ouada, H. Bacha, et M. Ghoul, « Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium Arthrospira platensis », *J. Appl. Phycol.*, vol. 21, nº 4, p. 405-412, août 2009.

[96] C. Jimenez, « Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of Spirulina: a predictive model of algal yield », *Aquaculture*, vol. 221, nº 1-4, p. 331-345, mai 2003.

[97] M. S. Rodrigues, L. S. Ferreira, A. Converti, S. Sato, et J. C. M. de Carvalho, « Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation and biomass composition with and without pH control », *Bioresour. Technol.*, vol. 102, nº 11, p. 6587-6592, juin 2011.

[98] Z. Ma et K. Gao, « Carbon limitation enhances CO2 concentrating mechanism but reduces trichome size in Arthrospira platensis (cyanobacterium) », *J. Phycol.*, vol. 26, nov. 2013.

[99] « Periodic Table of Elements », *IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry*. [En ligne]. Disponible sur: https://iupac.org/what-we-do/periodic-table-of-elements/. [Consulté le: 30-janv-2019].

[100] G. Cogne, J.-B. Gros, et C.-G. Dussap, « Identification of a metabolic network structure representative ofarthrospira (spirulina) platensis metabolism », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 84, nº 6, p. 667-676, déc. 2003.

[101] J. Pruvost, J. F. Cornet, V. Goetz, et J. Legrand, « Theoretical investigation of biomass productivities achievable in solar rectangular photobioreactors for the cyanobacterium Arthrospira platensis », *Biotechnol. Prog.*, vol. 28, nº 3, p. 699-714, mai 2012.

[102] L. Potier, « Modélisation de l'effet de l'hydrodynamique sur l'accès à la lumière : application à la croissance photosynthétique dans un réacteur de géométrie torique », thèse, Université de Nantes, 2005.

[103] A. Bertucco, E. Sforza, V. Fiorenzato, et M. Strumendo, « Population balance modeling of a microalgal culture in photobioreactors: Comparison between experiments and simulations », *AIChE J.*, vol. 61, nº 9, p. 2702-2710, sept. 2015.

[104] E. Sforza, D. Simionato, G. M. Giacometti, A. Bertucco, et T. Morosinotto, « Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors », *PLoS ONE*, vol. 7, nº 6, p. e38975, juin 2012.

[105] H.-P. Luo et M. H. Al-Dahhan, « Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 85, nº 4, p. 382-393, févr. 2004.

[106] J. Morchain, « Etude et modélisation des couplages entre cinétiques physiques et biologiques dans les réacteurs de grand volume », thèse, Université de Toulouse, INSA, 200apr. J.-C.

[107] J. Morchain, J.-C. Gabelle, et A. Cockx, « Coupling of biokinetic and population balance models to account for biological heterogeneity in bioreactors », *AIChE J.*, vol. 59, nº 2, p. 369-379, févr. 2013.

[108] J. Morchain et C. Fonade, « A structured model for the simulation of bioreactors under transient conditions », *AIChE J.*, vol. 55, nº 11, p. 2973-2984, nov. 2009.

[109] A. Nikolaou, P. Hartmann, A. Sciandra, B. Chachuat, et O. Bernard, « Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth », *J. Theor. Biol.*, vol. 390, p. 61-72, févr. 2016.

[110] H. Takache, J. Pruvost, et H. Marec, « Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of Chlamydomonas reinhardtii in conditions representative of photobioreactor cultivation », *Algal Res.*, vol. 8, p. 192-204, mars 2015.

[111] A. Bernardi, A. Nikolaou, A. Meneghesso, T. Morosinotto, B. Chachuat, et F. Bezzo, « High-Fidelity Modelling Methodology of Light-Limited Photosynthetic Production in Microalgae », *PLOS ONE*, vol. 11, nº 4, p. e0152387, avr. 2016.

[112] A. Bernardi, G. Perin, E. Sforza, F. Galvanin, T. Morosinotto, et F. Bezzo, « An Identifiable State Model To Describe Light Intensity Influence on Microalgae Growth », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, nº 16, p. 6738-6749, avr. 2014.

[113] D. R. Lide, G. Baysinger, S. Chemistry, L. I. Berger, R. N. Goldberg, et H. V. Kehiaian, « CRC Handbook of Chemistry and Physics », p. 2661.

[114] Fiche de données de sécurité : Nitrate, CAS 7757-79-1.

[115] Fiche de données de sécurité : Bicarbonate, CAS 144-55-8.

[116] Fiches de données de sécurités : carbonate, CAS 497-19-8.

[117] C. E. Housecroft, *Inorganic chemistry: solutions manual*. Harlow: Pearson, Prentice Hall, 2005.

[118] R. Sander, « Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent », *Atmospheric Chem. Phys.*, vol. 15, nº 8, p. 4399-4981, avr. 2015.

[119] International Civil Aviation Organization, *Manual of the ICAO standard atmosphere extended to 80 kilometres (262 500 feet) = Manuel de l'atmosphère type OACI: élargie jusqu'à 80 kilomètres (262 500 pieds) = Manual de la átmosfera tipo de la OACI : ampliada hasta 80 kilómetros (262 500 pies)*. Montreal: ICAO, 2002.

[120] E. L. Cussler, *Diffusion: mass transfer in fluid systems*, 3rd ed. Cambridge ; New York: Cambridge University Press, 2009.

[121] A. Liemert et A. Kienle, « Analytical solution of the radiative transfer equation for infinite-space fluence », *Phys. Rev. A*, vol. 83, nº 1, janv. 2011.

[122] J. Dauchet, S. Blanco, J.-F. Cornet, M. El Hafi, V. Eymet, et R. Fournier, « The practice of recent radiative transfer Monte Carlo advances and its contribution to the field of microorganisms cultivation in photobioreactors », *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, vol. 128, p. 52-59, oct. 2013.

[123] J. M. Heinrich, I. Niizawa, F. A. Botta, A. R. Trombert, et H. A. Irazoqui, « Analysis and Design of Photobioreactors for Microalgae Production I: Method and Parameters for Radiation Field Simulation: Photochemistry and Photobiology », *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, nº 4, p. 938-951, juill. 2012.

[124] J. M. Heinrich, I. Niizawa, F. A. Botta, A. R. Trombert, et H. A. Irazoqui, « Analysis and Design of Photobioreactors for Microalgae Production II: Experimental Validation of a Radiation Field Simulator Based on a Monte Carlo Algorithm », *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, nº 4, p. 952-960, juill. 2012.

[125] J. Dauchet, S. Blanco, J.-F. Cornet, et R. Fournier, « Calculation of the radiative properties of photosynthetic microorganisms », *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, vol. 161, p. 60-84, août 2015.

[126] H. Berberoglu, J. Yin, et L. Pilon, « Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H2 production and CO2 mitigation », *Int. J. Hydrog. Energy*, vol. 32, nº 13, p. 2273-2285, sept. 2007.

[127] I. S. Suh et S. B. Lee, « A light distribution model for an internally radiating photobioreactor », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, nº 2, p. 180-189, avr. 2003.

[128] L. G. Henyey et J. L. Greenstein, « Diffuse radiation in the galaxy », *Am. Astron. Soc.*, vol. 70H, nº 1941ApJ, p. 70-83, 1993.

[129] T. Binzoni, T. S. Leung, A. H. Gandjbakhche, D. Rüfenacht, et D. T. Delpy, « The use of the Henyey–Greenstein phase function in Monte Carlo simulations in biomedical optics », *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, nº 17, p. N313-N322, sept. 2006.

[130] J.-F. Cornet, C. G. Dussap, J.-B. Gros, C. Binois, et C. Lasseur, « A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 50, nº 9, p. 1489-1500, mai 1995.

[131] T. Ahmad, S. L. Plee, et J. P. Myers, « Fluent Theory Guide », ANSYS INC., nov-2013 .

[132] J. Magnaudet, M. Rivero, et J. Fabre, « Accelerated flows past a rigid sphere or a spherical bubble. Part 1. Steady straining flow », *J. Fluid Mech.*, vol. 284, nº 1, p. 97, févr. 1995.

[133] D. G. Karamanev et L. N. Nikolov, « Free rising spheres do not obey Newton's law for free settling », *AIChE J.*, vol. 38, nº 11, p. 1843–1846, 1992.

[134] D. Legendre et J. Magnaudet, « The lift force on a spherical bubble in a viscous linear shear flow », *J. Fluid Mech.*, vol. 368, p. 81-126, août 1998.

[135] D. Laupsien, « Hydrodynamics, Mass Transfer and Mixing induced by Bubble Plumes in Viscous Fluids », thèse, INSA de Toulouse, 2017.

[136] Bouquet de la Grye, « Comptes rendes des éances de la troisième conférence générales des poids et mesures ». Gauthier-Villars, 15-oct-1901.

[137] O. Borchers, C. Busch, A. Sokolichin, et G. Eigenberger, « Applicability of the standard k–ε turbulence model to the dynamic simulation of bubble columns. Part II:: Comparison of detailed experiments and flow simulations », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 54, nº 24, p. 5927–5935, 1999.

[138] A. Sokolichin et G. Eigenberger, « Applicability of the standard k–ε turbulence model to the dynamic simulation of bubble columns: Part I. Detailed numerical simulations », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 54, nº 13-14, p. 2273–2284, 1999.

[139] M. Janssen, J. Tramper, L. R. Mur, et R. H. Wijffels, « Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 81, nº 2, p. 193-210, janv. 2003.

[140] O. SImonin et P. L. Viollet, « Modeling of Turbulent Two-Phase Jets Loaded with Discrete Particles », *Phenom. Multiph. Flows*, p. 256-269, 1990.

[141] O. SImonin et P. L. Viollet, « Predictions of an Oxygen Droplet Pulverization in a Compressible Subsonic Coflowing Hydrogen Flow », *Numer. Methods Multiph. Flows*, vol. FED91, p. 65-82, 1990.

[142] A. Delafosse, J. Morchain, P. Guiraud, et A. Liné, « Trailing vortices generated by a Rushton turbine: Assessment of URANS and large Eddy simulations », *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 87, nº 4, p. 401-411, avr. 2009.

[143] T. S. Severin, A. C. Apel, T. Brück, et D. Weuster-Botz, « Investigation of vertical mixing in thin-layer cascade reactors using computational fluid dynamics », *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 132, p. 436-444, avr. 2018.

[144] V. Gernigon, M. A. Chekroun, A. Cockx, P. Guiraud, et J. Morchain, « How Mixing and Light Heterogeneity Impact the Overall Growth Rate in Photobioreactors », *Chem. Eng. Technol.*, p. ceat.201900102, mai 2019.

[145] A. Ríos *et al.*, « KEYS FOR NEW BIOETHANOL PRODUCTION PROCESSES BY FERMENTATION AND IONIC LIQUID EXTRACTION », *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 5, juin 2017.

[146] T. Beignon et X. Gaudefroy, « End Junction Between Two Tubes for Circulation of Fluid and a Reactor Equipped with Such a Junction », WO2018211208 (A1), 22-nov-2018.

Annexes

Annexe A : Liste des références matérielles utilisées

Usage	MARQUES - références
Filtre à air (PBR homogène)	3M - lifeassure 70357 pfs020
Ventilation mécanique forcé (PBR paillasse)	ADDA - ad1212h3-a70gl
PBR paillasse	ALG&YOU
Logiciel de mécanique des fluides numériques	ANSYS - fluent r16.2
PAR-mètre (mesures d'irradiance en parois)	APOGEE - mq-500
Température (PBR pilote, PBR paillasse)	ARDUINO - ds18b20
Contrôle (PBR pilote, PBR paillasse)	ARDUINO - mega
Caméra (PBR pilote, caractérisation des bulles)	BASLER - ac2040-90um
Caméra (PBR homogène)	BASLER - aca1300-200um
Eclairage rubans de LED (PBR pilote, PBR paillasse)	BDL - vs-f600ww-12v-3528-10mm-2700k
Cuve de spectrophotométrie (mesures ponctuelles, PBR paillasse)	BIOSIGMA - macro bs001
Niveau à bulle numérique (PBR pilote)	BOSCH - dnm 60l
Débitmètre (PBR pilote)	BROOKS - 1250ad6092alavb
Débitmètre (PBR paillasse)	BROOKS INSTRUMENT - Flowmeter 2520a4a41bvbn
Refractomètre (mesures d'indices de réfraction liquide)	CETI - convex
Interrupteur contrôlé (PBR homogène)	DATA REPEATER - rp310
Ordinateur dédié au calcul numérique	DELL, precision tower 7910
Alimentation en tension avec variateur (PBR homogène)	ELC - alf902m

Eau ultra-filtrée (mesures de viscosité)	ELGA - purelab ultra
Bain à ultrasons	ELMA - s60h
Objectif (PBR homogène)	EO - 33304, 65800
Filtre chromatique (PBR homogène)	EO - 87797
Objectif (PBR pilote)	EO - microplan x5
Balance (formulation du milieu de culture)	FISCHER - pps2102c
Analyseur de Gaz (PBR pilote)	FRESENIUX UMWELTTECHNIK - biobasic
Conductivité (PBR pilote)	HAMILTON - conducell 4ufs arc pg-120
Potentiel hydrogène (PBR pilote)	HAMILTON - polilyte plus h arc 120
Potentiel d'oxydo-réduction (PBR pilote)	HAMILTON - polilyte plus orp arc 120
Dioxygène dissout (PBR pilote)	HAMILTON - visiferm do arc 120
Thermomètre digital à sonde déportée (en vérification pour tous les PBR)	HANNA - checktemp1
Thermomètre (PBR homogène)	H-B - enviro safe s20110
Cellule d'écoulement (PBR pilote)	HELLMA - 130-10-40
Densité optique (PBR paillasse, mesures ponctuelles)	JASCO - v-630
Anneau de du Noüy (mesures de tension superficielle)	KRÜSS - k6, ri011
Bain thermostaté (PBR homogène)	LAUDA - thermostat K2
Microscope (observations ponctuelles)	LEICA - dm1000
PBR homogène	LISBP
Morphogranulomètre (mesures de morphologie de population biologique)	MALVERN - morphologie g3
Pompe péristaltique (PBR pilote)	MASTERFLEX - ls et tygon 17
Logiciel de programmation/calculs numériques	MATHWORKS, matlab r2016a
Etuve chauffée (mesures de MES)	MEMMERT ULM500
Logiciel de bureautique	MICROSOFT, office 2013

Spectroradiomètre (sources lumineuses)	OCEAN OPTICS - usb2000
Etuve éclairé (inoculum)	PANASONIC - mlr-352-pe
Eclairage panneau LED (PBR homogène)	PHLOX - ledw-bl-400x200-sllub-q-ir-24
Programmation (pilote, paillasse)	RASPBERRY - pi3 - b v1.2
Générateur base fréquence (PBR homogène)	RS - afg-21225
Balance (mesures de MES)	SARTORIUS ED2242
Thermoplongeurs (PBR pilote)	SCIENTAX - sur mesure, spécifications : 0.76W/cm^2, 12V 4.17A, 100W L_{chauf} 150mm, L_{tot} 200mm, diamètre 25mm, inox
Thermoplongeurs (PBR paillasse)	SCIENTAX - sur mesure, spécifications : 0.76W/cm^2, 12V 4.17A, 50W Lchauf 150mm, Ltot 300mm, diamètre 14mm, inox
Sonde de vélocimétrie par effet Doppler (PBR pilote)	SIGNAL PROCESSING, dop2000
Appareil photographique (illustrations)	SONY - hx400v
Ventilation mécanique forcée (PBR homogène)	SUNON - eec0381b1-000U-a99
PBR pilote	SYNOXIS - Cuve et châssis ALG&YOU - métrologie et contrôle
Rhéomètre (mesures de viscosité)	THERMO SCIENTIFIC - mars III
Potentiel hydrogène (mesures ponctuelles, PBR paillasse)	TÜV - ph539
Pompe de dépressurisation (mesures de MES)	VACUUBRAND - me1
Filtres (mesures de MES)	WATTMAN - gf6
Conductivité (PBR paillasse)	WTW - lf538

Annexe B : Composition nutritionnelle de la Spiruline

Spirulina

Fiche Nutritionnelle

CEVA

Teneurs pour 100 g d'algue déshydratée (produit brut) *Version du 14/03/2015*

Paramètres	Unité	Teneur Moyenne	Min	Max	Nb données
Energie	kJ	1 553			
Energie	kcal	372			
Eau	g	5,9	1,6	11,0	19
Minéraux	g	7,6	4,4	13,2	12
Protéines (Nx6.25)	g	60,8	43,3	79,3	49
Glucides (par différence)	g	17,5			
Fibres Alimentaires	g	2,2	0,1	7,4	8
Lipides	g	6,0	1,9	9,8	38
AG saturés	g	2,49	2,49	2,49	1
AG monoinsaturés	g	0,64	0,64	0,64	1
AG polyinsaturés	g	1,96	1,96	1,96	1
Phycocyanine	g	11,2	7,5	18,4	5
Sodium	mg	618	28	1 448	10
Magnésium	mg	560	185	1 789	12
Phosphore	mg	1 041	111	3 671	13
Potassium	mg	1 360	932	1 789	9
Calcium	mg	487	61	1 850	14
Manganèse	mg	4,3	1,7	10,8	9
Fer	mg	79,7	26,8	169,4	15
Cuivre	mg	1,3	0,3	2,7	6
Zinc	mg	5,3	1,2	31,1	11
Iode	mg	0,0	0,0	0,0	5
Sélénium	µg	nd			
Chrome	µg	273,0	60,0	580,0	6
Molybdène	µg	nd			
Vitamine A (eq rétinol)	mg	29,4	2,8	79,1	3
Beta-carotène	mg	127,1	21,7	178,9	4
Vitamine D	µg	0,0	0,0	0,0	1
Vitamine E (eq tocophérols)	mg	10	4	18	5
Vitamine K ou phytoménadione	µg	760	24	1 497	2
Vitamine C	mg	11,1	7,5	18,8	4
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	3,4	2,2	5,2	6
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	3,6	3,1	4,3	6
Vitamine B3 ou PP ou Niacine	mg	14,4	11,1	22,1	4
Vitamine B5 ou acide panthothénique	mg	0,90	0,43	1,22	3
Vitamine B6 ou Pyridoxine	mg	0,4	0,1	0,8	6
Vitamine B8 ou H ou Biotine	µg	19,0	4,3	37,7	4
Vitamine B9 ou Folates	µg	59,3	37,7	88,5	5
Vitamine B12 ou Cobalamines	µg	236,1	13,7	659,0	10

Elaboré par le CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues), Pleubian, France - www.ceva.fr

Annexe C : Poster présenté lors du WORLD CONGRESS OF CHEMICAL ENGEENIRING (WCCE) du 1 au 5 octobre 2017 à Barcelone-Espagne

LISBP
Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

CFD modelling of hydrodynamics of an artificially illuminated cylindrical photo-bioreactor

D. Thibault, M. A. Chekroun, V. Gernigon, J. Morchain, A. Cockx, P. Guiraud

Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France

Objectives

To develop a multiphysic model as a tool to improve photobioreactors [PBR] design for spirulina cultures

- 100L cylindrical tank (ϕ 390mm, H 846mm)
- 3 gas spargers, 10L/min, mean bubble ϕ6.7mm
- 12 external & 8 internal LED stripes

  wall irradience delivered: $350\mu mol_v/m^2/s$

Photography of the pilote-scale photobioreactor

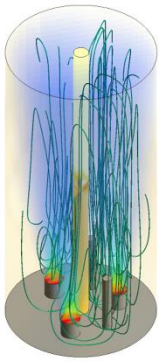
1.CFD: two phase flow

The hydrodynamic is simulated (FLUENT®) with an Eulerian-Eulerian approach: gas as the dispersed phase, 3D, transient, k-ε turbulence equation and the following phases interactions:

- Drag: Karamanev *(AIChE J.38, 1992)*
- Lift: Legendre-Magnaudet *(JFM 368, 1998)*
- Virtual mass: 0.5 *(Magnaudet et al; JFM 284, 1995)*
- Turbulent dispersion & interaction: Simonin

  (phenomena in multiphase flow 259-269, 1990)(numerical methods for multiphase flow FED91, 1990)

For comparison: the experimental mixing time of 45 s is correctly predicted by the CFD (47s)

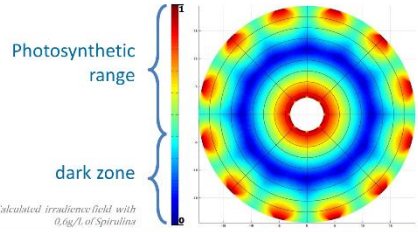


CFD : gas fraction in color scale, pathlines in ribbons

2.Irradience field

2D light distribution in the PBR is solved by a Monte-Carlo algorithm (MATLAB®):

- Absorption: Beer-Lambert E_a=162 m²/kg
- Diffusion: Henyey-Greenstein $\begin{cases} E_s=640\ m^2/kg \\ g=0.97 \end{cases}$
- And: Fresnel reflexion, Descartes refraction



Calculated irradience field with 0.6g/L of Spirulina

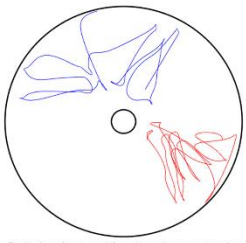
Conclusion

This multiphysic model quantifies the light exposition received by the spirulina :

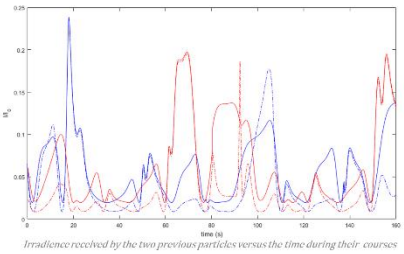
- Enable to investigate more accurately the photosynthesis kinetic, especially in strongly heterogeneous medium
- Help to understand the experimentally observed effects of the mixing on the culture growth rate depending on the PBR's technologies or with a scale-up

3.Algae cell tracking in the light field

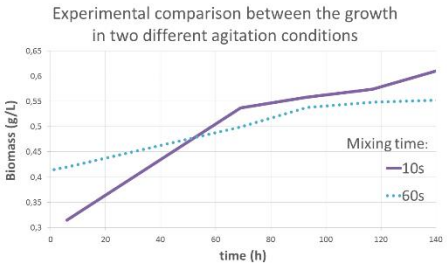
- Lagrangian tracking of 40k iso-dense numerical particles standing for the algae
- Recording the coordinates and the timestamp along their path in the PBR
- Coupling the trajectories with the irradience field simulation gives the temporal light signal seen by the cells during the culture



Projection of two particle trajectories on a reactor's section



Irradience received by the two previous particles versus the time during their courses



LISBP • Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

Annexe D : UDF pour prendre en compte une loi de trainé de type Karananev pour les bulles sous FLUENT

```
/*Drag coeficient of schiller and naumann*/
#include <udf.h>
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <sg_mphase.h>
#include <mem.h>
#include <metric.h>
/*revoir les thread these sam*/
DEFINE_EXCHANGE_PROPERTY(Karamanev_UDF,cell,m_t,s_col,f_col)
{
/*s_col=second column in interaction panel=liquide*/
/*f_col=first column in interaction panel=gaz*/
Thread *thread_g, *thread_l;
real drag_coeff, Kpq, Rey, urel, NV_VEC(UR), dbub;

thread_g=THREAD_SUB_THREAD(m_t,f_col);
thread_l=THREAD_SUB_THREAD(m_t,s_col);

/*bubble diameter*/
dbub = C_PHASE_DIAMETER(cell,thread_g);
/*calcul of relative velocity magnitude*/
NV_DD(UR,=,C_U(cell,thread_g),C_V(cell,thread_g),C_W(cell,thread_g),-
,C_U(cell,thread_l),C_V(cell,thread_l),C_W(cell,thread_l));
urel=NV_MAG(UR);

/*calcul of bubble Reynolds*/
/*Rey=RE_NUMBER(C_R(cell,thread_l),urel,dbub,C_MU_L(cell,thread_l));*/
/*printf("Re= %f",Rey);*/
Rey=C_R(cell,thread_l)*urel*dbub/C_MU_L(cell,thread_l);
/*expression of the drag coefficient C_Dseul=C_D(single bubble)%alpha_G
for a single bubble corelation CDseul=C_D
for a multiple bubble corelation CDseul=C_D(alpha_G)%alpha_G */

/*In ordrer to have a Reynolds number different from zeros at the first itteration*/
/*We force the value of Re to unity in ordre to evoid a zeros division*/
if (Rey<1)
       {
       Rey=1;
       }
else
       {
              drag_coeff =0.9;
       }
/*drag force calcul*/
Kpq = 0.75 *
drag_coeff*C_R(cell,thread_l)*C_VOF(cell,thread_l)*C_VOF(cell,thread_g)*urel/dbub;
return Kpq;
}
```

Annexe E : Script calculant le champ d'irradiance pour le photobioréacteur pilote

```
disp('demarre');clearvars;parpool(6);%active le calcul parallele
%Parametres de la simulation
    %longueur du calcul:
I=10000000; %nombre d'iteration (-)
seuil=1/10000; % critere de fin d'une iteration (-)
    %geometrie + maillage:
C=40; %collimation des faicsceau sources (°)
ri=0.02;%rayon interieur de la cuve (m)
re=0.195;%rayon exterieur de la cuve(m)
lx=re+0.005; %largeur du champ (m)
ly=re+0.005; %epaisseur du champ(m)
ledi=0.0114; %distance des led int a la parois (m) (surface eclairee 1,5cm)
lede=0.0119;%distance des led ext a la parois (m) (surface eclairee 1,5cm)
Nbx=2000*2; %nombre de discretisation sur la largeur (-)
Nby=2000*2; %nombre de discretisation sur l'epaisseur (-)
    %grandeurs physiques:
n1=1.34; %indice de refraction du milieu (-)
n2=1.51; %indice de refraction des parois (-)
D=640; %coefficient de diffusion (m2/kg)
A=162; %coefficient d absorbance (m2/kg)
G=0.98; %coefficient d anisotropie de HG
    %variable locale
dx=lx/Nbx; %largeur elementaire
dy=ly/Nby; %epaisseur elementaire
m=zeros(Nbx,Nby,20); %matrice resultat
dep=dx; %deplacement elementaire du rayon
parfor e=1:20 %criblage de plusieur concentration en biomasse
    X=e/10; %concentration en biomasse correspondante (g/L)
    mm=zeros(Nbx,Nby); %matrice de calcul
for i=1:I
    %Tirage du rayon
    dev1=sqrt(rand)*C; %incidence dans la source
    dev2=rand*360;
    if rand<0.4% si source interne
        tta=90/4*(1+randi([0 1])*2);%direction de la source
        phi=90;
        offset=asind(ledi*sind(dev1*sind(dev2))/ri)+tta;
        tta=tta+dev1*sind(dev2); %applique la deviation
        phi=phi+dev1*cosd(dev2);
        %caracteristique du rayon: indice de maille, position, direction
        p=[ 0 0;ri*cosd(offset) ri*sind(offset); 0 0];
    else %ou source externe
        tta=90/6*(1+randi([0 2])*2)+180;
        phi=90;
        offset=mod(tta,90)-asind(lede*sind(dev1*sind(dev2))/re);
        tta=tta+dev1*sind(dev2);
        phi=phi+dev1*cosd(dev2);
        p=[ 0 0;re*cosd(offset) re*sind(offset); 0 0];
    end
    l=1; %intialise la puissance intiale du rayon
    while l>0 %boucle tant que le rayon existe
        %longueure du chemin optique avant diffusion en nb d'iteration
        d=floor(-log(rand)/(D*X)/dep)+randi([0 1]);
        %determine le vecteur direction du rayon dans le repere
        p(3,:)= dep*sind(phi)*[cosd(tta) sind(tta)];
```

```
        for j=1:d %deplacement iteratif le long du chemin
            %integration du passage
            p(1,:)=floor(p(2,:)./[dx dy])+[1 1]; %determine la maille
            %integre l energie ayant traversee la maille
            mm(p(1,1),p(1,2))= mm(p(1,1),p(1,2)) + l;
            l=l*exp(-A*X*dep); %diminue la puissance du rayon

            p(2,:)=p(2,:)+p(3,:); %deplacement incremente la position
            %test  geometrique
                %si le photon sort du domaine radiale:
                if sqrt(p(2,1)^2+p(2,2)^2)>re %paroi externe
                   offset=atand(p(2,2)/(p(2,1)))+90; %incidence a la paroi
                   tta=-tta+2*offset; %change la angle de propagation
                   p(3,:)=dep*sind(phi)*[cosd(tta) sind(tta)]; %direction
                end
                if sqrt(p(2,1)^2+p(2,2)^2)<ri %paroi ineterne
                  offset=atand(p(2,2)/(p(2,1)))+90;
                  tta=-tta+2*offset;
                  p(3,:)=dep*sind(phi)*[cosd(tta) sind(tta)];
                end
                %si le photon sort du domaine angulaire:
                if p(2,1)<0
                  offset=p(2,1);%il est replacer sur l'autre face
                  p(2,1)=p(2,2);
                  p(2,2)=-offset;
                  tta=tta-90;  %et son angle de propagation est change
                  p(3,:)= dep*sind(phi)*[cosd(tta) sind(tta)]; %direction
                end
                if   p(2,2)<0
                    offset=p(2,2);
                    p(2,2)=p(2,1);
                    p(2,1)=-offset;
                    tta=tta+90;
                    p(3,:)=dep*sind(phi)*[cosd(tta) sind(tta)];
                end
        end
        %diffusion
        %tirage de la deviation selon henyey greenstein
        dev1=acosd((1+G^2-((1-G^2)./(1+G*cosd(179*rand+0.5))).^2)/(2*G));
        dev2=rand*360;%tirage dans le conne de diffusion
        tta=tta+dev1*sind(dev2); %applique la deviation
        phi=phi+dev1*cosd(dev2);
        %termaison des rayons
        if l < seuil; %si intensite faible
           l=0; %termine le parcourdu photon cf."while"
        end
    end
end
m(:,:,e)=mm; %enregistre le resultat de l'etape 'e' dans la matrice finale
end
m=5*m/(I*dx*100); %normalise le resultat
save('last.mat','m','-v7.3') % sauvegarde le resultat
disp('termine')
%affiche le resultat
surf(0:ly/(Nby-1):ly, 0:lx/(Nbx-1):lx, log10(m(:,:,5)),'lineStyle','none');
colormap jet; axis equal;view(2);ylim([0 ly]); xlim([0 lx]);
grid off; box off;
```

Annexe F : Script calculant la DO_{680} pour le photobioréacteur homogène ; Remarque : Il doit être placé dans dossier contenant les acquisitions (le FLAT étant dans un sous-dossier "FLAT")

```
clear all;
%propriété des images:
dt=60; %laps de temps entre deux images (sec)
X=1280; %largueur (pixel)
Y=1024; %hauteur (pixel)
lexp=280; %larguer du champ d'observation (pixel)
lblanc=90; %lagueur du blanc (pixel)
cuveD=1:lexp; %coordonnées de la cuve droite (pixel)
cuveG=X-lexp:X; %coordonnées de la cuve gauche(pixel)
ref=floor(X-lblanc)/2:floor(X+lblanc)/2 ; %coordonnées du blanc (pixel)
%extraction du BLANC
cdexp=cd; %adresse de BdD
cdflat=[cdexp,'\FLAT']; %addresse du blanc
cd(cdflat); %change de dossier de travail
list=dir(cdflat); %liste les ficher contenu dans le dossier
N=length(list); %qte de fichiers dans le dossier
%Ne conserve que les images
not=0; %initialise la liste des éléments a ne pas garder
for i=1:N
    if length(list(i).name)<20 %vérifie que le fichier a un nom d'image
        not=cat(1,not,i);
    end
end
%surprime de la liste les fichiers qui ne sont pas une image
list(not(2:end))=[];
N=length(list); % qte d'images à traiter
clear not
%Extrait les données du flat
flata=zeros(Y,X,N,'uint16'); %créer la matrice de toutes les images
for i=1:N
    if length(list(i).name)>20 %vérifie que le fichier a un nom d'image
        disp(['blanc: ', num2str(i/N*100),'%']) % indicateur d'avancement
        flata(:,:,i)=imread(list(i).name);% charge l'image dans la matrice
    end
end
flat=mean(flata,3); %moyenne les acquisitions du flat
flat=flat./max(max(flat(:,ref))); %normalise le flat
clear flata list
%Extraction des acquisitions
cd(cdexp); %change de dossier de travail
list=dir(cdexp); %liste les ficher contenu dans le dossier
N=length(list); %qte de fichiers dans le dossier
%Ne conserve que les images
not=0;% initialise la liste des éléments a ne pas garder
for i=1:N
    if length(list(i).name)<20 %vérifie que le fichier a un nom d'image
        not=cat(1,not,i);
    end
end
%surprime de la liste des fichiers ceux qui ne sont pas une image
list(not(2:end))=[];
N=length(list); % qte d'image a traiter
clear not
```

```
%Extrait les données
img=zeros(Y,X,'double'); %creer la matrice de toutes les images
imgc=zeros(Y,X); %matrice de l'image corrigée
grey=zeros(3,N); %matrice des niveaux de gris resp. droite, ref, gauche
for i=1:N
    if length(list(i).name)>50 %vérifie que le fichier a un nom d'image
        disp(['images: ', num2str(i/N*100),'%']) %indicateur d'avancement
        img(:,:)=imread(list(i).name); %charge l'image dans la matrice
        imgc=img(:,:)./flat; %correction par le flat
        grey(1,i)=mean(mean(imgc(:,cuveD))); %niveau de gris cuve droite
        grey(2,i)=mean(mean(imgc(:,ref))); %niveau de gris reference
        grey(3,i)=mean(mean(imgc(:,cuveG))); %niveau de gris cuve gauche
    end
end
clear list blanc img imgc
% calcul de la DO
do=zeros(4,N);% matrice resp. date(s); DO droite; DO gauche: DO moyenne
do(1,:)=[dt:dt:dt*N]/3600; % horizon de temps
do(2,:)=log10(grey(2,:)./grey(1,:));  % DO cuve droite
do(3,:)=log10(grey(2,:)./grey(3,:));  % DO cuve gauche
do(4,:)=mean(do(2:3,:),1);  %moyenne sur les deux cuves
clear blanc exp expc grey i
plot(do(1,:),do(4,:)); %affichage graphique de la mesures
nom=[cdexp(39:end), '.xlsx']; %nom de  l'acqusition
save nom % sauvegarde le resultat
```

Annexe G : Code du photobioréacteur numérique et de ses sous-fonctions

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Resolution du système d'equations de croissance de la spiruline
%en bacth selon plusieurs hypothèses de modèle
%entrees: -conditions reactionnelles:
%             -irradiance : densite de probabilite volumique d'irradiance
%             dans le PBR (fichier ".mat") : irradiance: les donnees, src :
%             nombre de sources utilisees pour le calcul des donnees
%             -temp : temperature du milieu en (°C)
%             -ilum : flux lumineux en parois (µmol/m²/s)
%             -dg : debit de gaz de bullage (l/min)
%             -sources : le nombre de sources lumineuses utilisees
%         -conditions initiales du système:
%              -y0 :bicarbonate,carbonate,acide,base,azote,x(biomasse): la
%              composition initiale du milieu (g/L)
%         -domaine de resolution:
%             -tf : duree temporelle de la simulation (j)
%             -pas : nombre de discretisation par unite de temps (j-1)
%sorties: Yi:matrice des valeurs de composition du milieu au cours du temps
%          avec i : 1-hypothèse d'un equilibre instantane entre Sp et le
%                  flux lumineux "instantaneous adaptation"
%                  2-hypothèse d'un equilibre de Sp avec le flux lumineux
%                  moyen dans le milieu  "full integration"
%                  3-hypothèse d'un equilibre dynamique entre Sp et le
%                  flux lumineux
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
clear all; clf; format short;

% declaration des variables globales du programme
global Kg temp cas Kl0 Kl1 Kl2 Kl3 Kn1 Kn2 Kn3 Kt1 Kt2 Kt3...
    Kt4 Kt5 Kt6 Kc1 Kc2 Kc3 Kh Ceq Kn0 Kc0 mu_max ilum Ka1 Ka2 Ke Ion...
    gamma irradiance

% domaine de resolution:
tf=50; %duree temporelle de la simulation (j)
pas=1/200; %nombre de discretisation par unite de temps (-)

% conditions reactionnelles:
load irradiance_phyto %charge l'eclairement dans le reacteur
temp=35; tempk=temp+273.15; %temperature (°C) et (K)
ilum=350; %irradiance en paroi eclairee (mmol/m²/s)
dg=10; %debit gaz d'agitation (l/min)
sources=3; %nombre de sources

% conditions initiales :
x=0.2;% concentration en biomasse(g/l)
bicarbonate=19; % bicarbonate(g/L)
carbonate=0; % carbonate (g/L)
acide=0+10^-7; % acide fort H+ (g/l)
base=1.4+10^-7;% base forte OH- (g/L)
azote=4.33;% nitrate (g/l)

%constantes:
Mcarbonique=62; % masse molaire de l'acide carbonique
Mbicarbonate=84; % masse molaire du bicarbonate (g/mol)
Yc=0.142857; % proportion massique de carbone dans le bicarbonate de sodium
Mcarbonate=100; % masse molaire du carbonate de calcium(g/mol)
Macide=36.461 ; % masse molaire de l'acide chloridrique (g/mol)
Mbase=40; % masse molaire de la base (g/mol)
Yn=0.1387; % proportion massique d'azote de le KNO3
```

```
Mazote=101.1; % masse molaire de la source azote (g/mol)
Pc=4.08*10^-4; % pression partielle en Co2
Ceq=Pc*3.4*10^-2;% concentration du CO2 à l'equilibre (mol/L);
Kh=1.7*10-3; % coefficient dissociation co2 hco3
Ka1=exp(-12092.1/tempk-36.7816*log(tempk)+235.482); % constante première
                                    % acidite du carbone inorganique ~6,33
Ka2=exp(-12431.7/tempk-35.4819*log(tempk)+220.067);% constante de seconde
                                   % acidite du carbone inorganique ~10,33
Ke=exp(-13445.9/tempk-22.4773*log(tempk)+140.932); % produit ionique ~10-14
mu_max=log(2); %taux de croissance maximal de la spiruline (j-1)
Kn0=-0.12/Mazote/Yn;  % coefficient stoechiometrique du nitrate
Kn1=1.14; % coefficients cinetiques de l'influence du nitrate
Kn2= 0.0025;
Kn3=0.738;
Kt1=0.150; % coefficients cinetiques de l'influence de la temperature
Kt2=-2.55;
Kt3=0.00769;
Kt4=0.723;
Kt5=-0.0909 ;
Kt6=4.27;
Kl0=2.46; % coefficients cinetiques de l'influence de l'irradiance
Kl1=1.05;
Kl2=200;
Kl3=18;
Kc0=-0.468/Mbicarbonate/Yc; % coefficient stoechiometrique du bicarbonate
Kc1=1.24; %coefficients cinetiques de l'influence du bicarbonate
Kc2=0.00658;
Kc3=-10.6;

%creation des variables de travail
Ion= bicarbonate/Mbicarbonate + 2* carbonate/Mcarbonate - acide/Macide ...
 + base/Mbase ; % bilan de charges sur les ions (pour electroneutralite)
y0=[0; bicarbonate/Mbicarbonate ; carbonate/Mcarbonate ;acide/Macide;...
       base/Mbase ; azote/Mazote ; x ]; % composition initiale du milieu
irradiance(2:end)=irradiance(2:end)*sources/src; % corrige la distribution
                                 % des irradiances par la quantite de sources
gamma=0.0107*dg+0.0589; % module d'integration pour le calcul
                                            % de la cinetique avec dynamique
Kg=0; % coefficient de transfert de matière Liq/Gaz, fonction de dg (s-1)

% Evolution iterative du système:
    %selon trois hypothèses: cas= 1: equilibre instantanee de Sp avec I
    % 2: equilibre avec Imoyen, 3: modelisation dynamique
cas=1;
Y1=zeros(7,tf/pas+1 ); % creation de la matrice resultat pour le 'cas 1'
Y1(:,1)=y0; % initialisation du système
for i=1:tf/pas % boucle temporelle
    Y1(:,i)= eq_alg_newton(Y1(:,i)); % mise à l'equilibre de la chimie
    Y1(:,i+1)=eq_diff(pas,Y1(:,i)); % evolution sur le pas de temps
    disp([cas i*pas/tf*100]) % indicateur d'avancement du calcul
 end

cas=2;
Y2=zeros(7,tf/pas +1 ); %creation de la matrice resultat pour le 'cas 2'
Y2(:,1)=y0; % initialisation du système
for i=1:tf/pas % boucle temporelle
    Y2(:,i)= eq_alg_newton(Y2(:,i)); % mise à l'equilibre de la chimie

    Y2(:,i+1)=eq_diff(pas,Y2(:,i)); % evolution sur le pas de temps
    disp([cas i*pas/tf*100]) % indicateur d'avancement du calcul
end
```

```
cas=3;
Y3=zeros(7,tf/pas +1 ); % creation de la matrice resultat pour le 'cas 3'
Y3(:,1)=y0; % initialisation du système
for i=1:tf/pas % boucle temporelle
    Y3(:,i)= eq_alg_newton(Y3(:,i)); % mise à l'equilibre de la chimie
    Y3(:,i+1)=eq_diff(pas,Y3(:,i)); % evolution sur le pas de temps
    disp([cas i*pas/tf*100]) % indicateur d'avancement du calcul
end

%Sauvegarde et representation graphique:

%possibilite de superposer une courbe experimentale
% hold on ; plot(points_x,points_y,'+k','markersize',20)

yyaxis left
plot(0:pas:tf, Y3(2,:),'m-',...
     0:pas:tf, Y3(3,:),'r-',...
     0:pas:tf, Y3(6,:),'b-',...
     0:pas:tf, Y1(7,:),'g--',...
     0:pas:tf, Y2(7,:),'g:',...
     0:pas:tf, Y3(7,:),'g-',...
     'linewidth',2);
 legend(' HCO_3^- (mol.L^{-1})',' CO_3^{2-} (mol.L^{-1})',...
     ' N (mol.L^{-1})',' X (g/L)','location','nw')
ylabel(' Concentrations'); ylim([0 2])
yyaxis right
plot(0:pas:tf, -log10(Y3(4,:)),'k-','linewidth',3);
ylabel('pH'); ylim([9.5 11]); xlim([0 tf]); xlabel(' Temps \itt \rm(j)')
title(' Simulation culture batch')
set(gca,'fontsize',30,'fontName','Arial','LineWidth',3); grid off; box on

save last % sauvegarde de la derniere simulation
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function Csol = eq_alg_newton( C )
% systeme d'equations algebriques des reactions chimiques du milieu:
    % mise à l'equilibre du systeme par une resolution Newton-Raphson
% critères d'arret de l'algorithme:
Nmax=20; % nombre d'iteration maximum
bilan=0.0001; % critère sur la validite de la solution
convergence=0.0001; % critère de convergence de la solution
% initialisation des critères d'arret
n=1; % nombre d'iterations effectue
k=1; % validite de la solution
l=1; % convergeance de la solution
% calcul du carbone total (equation de conservation)
Ct=C(1)+C(2)+C(3);
% boucle de calcul iteratif jusqu'à un des critères d'arret
while (n<Nmax && k>convergence && l>bilan )
    %nouvelle composition du milieu :
    Csol= C - eq_alg_jacobien(C)\eq_alg_systeme(C,Ct);
    l=max(abs(eq_alg_systeme(Csol,Ct))); % validite de la solution
    k=max(abs((Csol-C)./C)); % convergeance de la solution
    n=n+1; % nombre d'iteration effectuees
    C=Csol; % initialisation de la prochaine iteration
end
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function [ F ] = eq_alg_systeme(C,Ct)
%Système des equations predominantes regissant la chimie du milieu
%   -C : concentrations des espèces chimiques dans le milieu (mol/L)
%                               {1:H2CO3;2:HCO3-;3:CO3--;4:H+;5:HO-}
%   -Ct : carbonne total dans le milieu (mol/L)
global Ka1 Ka2 Ke Ion % variables globales
% systeme :
F(1,1)=C(5) + C(2) + 2* C(3) - C(4) - Ion; % electroneutralite
F(2,1)= C(1) +C(2) + C(3)- Ct; % conservation de la quantite de carbone
F(3,1)=( C(1) * Ka1 - C(2)*C(4))/Ka1; % equilibre première acidite du C
F(4,1)=( C(2) * Ka2 - C(3)*C(4))/Ka2; % equilibre seconde acidite du C
F(5,1)=( Ke -C(4)*C(5))/Ke ; % produit ionique de l'eau
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function [ FJ ] = eq_alg_jacobien( C )
% jacobien du système d'equations de la fonction 'chimie_eq'
% C={1:H2CO3; 2:HCO3- ; 3:CO3--; 4:H+; 5:HO-}
global Ka1 Ka2 Ke %variables gloabales
% système :
FJ=[0 1 2 -1 1 0 0; ...                               %electroneutralite
    1 1 1 0 0 0 0;...          %conservation de la quantite de carbone
    1 -C(4)/Ka1 0 -C(2)/Ka1 0 0 0;... %equilibre première acidite du C
    0 1 -C(4)/Ka2 -C(3)/Ka2 0 0 0;...  %equilibre seconde acidite du C
    0 0 0 -C(5)/Ke -C(4)/Ke 0 0];            %produit ionique de l'eau
end
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function Y = eq_diff( pas , Y )
%systeme d'equations differentielles physiques et biologiques :
global Kg cas Ceq Kn0 Kc0 Kh % variables globales
%lecture et test de la quantite de spiruline
X=Y(7);
if X<0.1 || X>=2
    disp('hors gamme de concentration')
end
switch cas % choix de l'hypothèses faite sur la lumière
    case 1 % equilibre instantane Sp avecI
        dX= X *mu_tcn(Y) *mu_ia(X);
    case 2 % equilibre moyenne de Sp avec I
        dX= X *mu_tcn(Y) *mu_fi(X);
    case 3 % equilibre dynamique
        dX= X *mu_tcn(Y) *mu_bio(X);
end
 % système d'equations differentielles
Y(1)=Y(1) +pas*86400 * Kg *(Ceq-Y(1)/Kh); %transfert gaz
Y(2)=Y(2) +pas *Kc0 *dX; % consommation du bicarbonate par la biomasse
Y(6)=Y(6) +pas *Kn0 *dX; % consommation du nitrate par la biomasse
Y(7)=X +pas *dX; % croissance de la biomasse
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function mu= mu_tcn(Y)
%influence sur la cinetique de : temp, bicarbonate et nitrate
% constantes cinetiques :
global Kn1 Kn2 Kn3 Kt1 Kt2 Kt3 Kt4 Kt5 Kt6 Kc1 Kc2 Kc3 mu_max temp
N=Y(6); bC=Y(2); C=Y(3); %lecture des concentrations
if (temp<17) || (temp>47)
   mu= 0;
end
if (temp>17) && (temp<23)
   mu= mu_max* (temp*Kt1+Kt2)* (Kc1*bC/(Kc2+bC)+Kc3*C)*...
        (Kn1*N/(Kn2+N+(N/Kn3)^2));
end
if (temp>23) && (temp<36)
    mu= mu_max* (temp*Kt3+Kt4)* (Kc1*bC/(Kc2+bC)+Kc3*C)*...
        (Kn1*N/(Kn2+N+(N/Kn3)^2));
end
if (temp>36) && (temp<47)
    mu= mu_max* (temp*Kt5+Kt6)* (Kc1*bC/(Kc2+bC)+Kc3*C)*...
        (Kn1*N/(Kn2+N+(N/Kn3)^2));
end
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function mu=mu_bio(x)
%cinetique de croissance de la biomasse relativement à la lumière avec
%avec une cinetique dynamique ('cas=3')
global gamma
mu=gamma*(mu_fi(x)-mu_ia(x))+mu_ia(x);
end
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function mu=mu_fi(x)
%cinetique de croissance de la biomasse relativement à la lumière dans
%l'hypothèse d'un equilibre moyen ('cas=2')
global ilum Kl0 Kl1 Kl2 Kl3 irradiance %constantes cinetiques
%fonction donnant la cinetique en fonctiond de l'irradiance
mu_lum=@(I)  Kl0*(I-Kl1)./(Kl2 + (I-Kl1) + ((I-Kl1)./Kl3).^2 );
%encadrement de la concentration
xc=x*10;x_a=floor(xc);x_b=x_a+1;
%encadrement de la cinetique
mu_a=mu_lum(sum(linspace(0,ilum,1000).*irradiance(:,x_a)'));
mu_b=mu_lum(sum(linspace(0,ilum,1000).*irradiance(:,x_b)'));
%interpolation de la cinetique
mu=((xc-x_a)*mu_b+(x_b-xc)*mu_a)/(x_b-x_a);
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function mu=mu_ia(x)
%cinetique de croissance de la biomasse relativement à la lumière dans
%l'hypothèse d'un equilibre instantane ('cas=1')
global ilum Kl0 Kl1 Kl2 Kl3 irradiance %constantes cinetiques
%fonction donnant la cinetique en fonctiond de l'irradiance
mu_lum=@(I)  Kl0*(I-Kl1)./(Kl2 + (I-Kl1) + ((I-Kl1)./Kl3).^2 );
%encadrement de la concentration
xc=x*10;x_a=floor(xc);x_b=x_a+1;
%encadrement de la cinetique
mu_a=sum(mu_lum(linspace(0,ilum,1000)).*irradiance(:,x_a)');
mu_b=sum(mu_lum(linspace(0,ilum,1000)).*irradiance(:,x_b)');
%interpolation de la cinetique
mu=((xc-x_a)*mu_b+(x_b-xc)*mu_a)/(x_b-x_a);
end
```

Annexe H : Article

These are not the final page numbers! ↘↘

Chemical Engineering & Technology Research Article 1

Vincent Gernigon
Mohammed A. Chekroun
Arnaud Cockx
Pascal Guiraud
Jérôme Morchain*

How Mixing and Light Heterogeneity Impact the Overall Growth Rate in Photobioreactors

The microalgae growth rate in photobioreactors responds with inertia to light stimuli. Here, light variations experienced by the algae are accessed through a coupling of an irradiance field calculation and a Lagrangian particle tracking. The response of algae to fluctuating light is then described by a relaxation model involving a single time constant, the value of which is identified from published data. The overall growth rate is calculated as the sum of individual growth rates of all particles. Instantaneous adaptation and full integration asymptotic behaviors are recovered whilst a finite time constant reveals that the overall growth rate is dependent both on mixing and light distribution. This methodology thus quantitatively relates the design parameters to the photobioreactor performance.

Keywords: Growth models, Light heterogeneity, Microalgae, Photobioreactor, Simulation

Received: February 08, 2019; *revised:* April 15, 2019; *accepted:* April 24, 2019

DOI: 10.1002/ceat.201900102

Supporting Information available online

1 Introduction

Microalgae are grown in aqueous media consisting of water, dissolved inorganic or organic carbon, and mineral salts, and use artificial or solar light as energy supply. The relationship between the specific growth rate μ and the intensity I of the light flux (irradiance) is typically measured under constant light irradiation in small batch experiments, at low cell concentrations to avoid self-shadowing effects. A typical curve is presented in Fig. S1 in the Supporting Information revealing a nonlinear relationship. This nonlinearity implies that a mere and global light energy balance cannot predict the actual growth rate in a given photobioreactor (PBR) because each irradiance level does not contribute to the biomass growth to the same extent.

As usual PBRs are not operated under very dilute cell concentration, light attenuation occurs due to absorption and scattering by the cells [1, 2]. Whatever the PBR design, the light field evolves in time as the cell concentration increases. So, in general, the dark volume fraction of the reactor where no growth takes place has to be considered [3]. As far as the calculation of the overall growth rate is concerned, the literature offers two asymptotic approaches referred as instantaneous adaptation and full integration behaviors [4]. The first one, instantaneous adaptation, supposes that algae growth is fully determined by the local light intensity at the cell location. The second one, full integration, assumes that the growth rate of all algae can be computed from the volume average light intensity. The two assumptions lead to different results because of the nonlinear function $\mu = f(i)$.

Still, the dark volume fraction itself, or more precisely, the light distribution in volume, is insufficient because algae dynamically respond to the light field they experience. Indeed, beside the known effect of daily light variation, algae respond to fluctuating light signals of higher frequencies (0.1–100 Hz). This effect is usually called flashing light effect (FLE) [5, 6]. Its experimental quantification has been investigated [7], either by controlling the culture medium flow rate from enlightened to dark zones [8] or directly by temporally managing the light energy transmitted to the microalgae [4, 5, 9–11]. These results prove that some inertia exists in the response of algae to light variation: it cannot be assumed that the growth rate is a function of the local light intensity only. Thus, the mixing effect on algal growth is due to the light intensity fluctuations, at the cell scale, resulting from the coupling between the flow and a heterogeneous light field [12–15].

Quantifying the consequences of such a coupling on the overall growth rate remains a challenge. This requires a time-resolved data set of algae lifelines in the reactor, a precise knowledge of the irradiance field, a biological model which accounts for the algae response to the light varying signal, and the integration over the entire population of algae present in the reactor. In recent years, numerous works proposed some advances regarding one or several of the aforementioned points. Wu and Merchuk [8], Hartmann et al. [16], or Nikolaou et al. [17] coupled the light fluctuations to the growth rate using the photosynthetic unit model of Eilers and Peeters [18].

Vincent Gernigon, Mohammed A. Chekroun, Prof. Arnaud Cockx, Prof. Pascal Guiraud, Prof. Jérôme Morchain
morchain@insa-toulouse.fr
LISBP, University of Toulouse, CNRS, INRA, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France.

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

More refined dynamic models accounting for the dynamic response of the photon absorption chain have been published, e.g., by Nicolaou, Bernard and co-workers [19–22]. However, their intrinsic complexity in terms of number of variables limits their use to homogeneous reactors [23, 24] and leads to parameter identification issues. Some other authors combined particle tracking and light signal to provide a depiction of the temporal light exposure seen by the cells [25] and under various simplifying assumptions [26]. In particular, the statistical relevancy of the particle trajectory database with respect to the sampling of the light field is not discussed to our knowledge.

This study aims at presenting a general methodology for the calculation of the overall growth rate in a heterogeneous PBR by coupling the light exposition experienced by the cells and its biological consequences on the growth rate.

2 Methodology and Case Study

2.1 Methodology

The gas-induced two-phase flow is investigated through computational fluid dynamics (CFD) with a transient Euler-Euler approach. A set of algae trajectories is acquired through the unsteady Lagrangian tracking of thousands of massless particles. The CFD details and discussion are presented in Sect. 2 of the Supporting Information. Irradiance fields are computed independently using a Monte-Carlo algorithm. Two designs were computed depending on whether light devices are placed vertically or horizontally upon the walls of the annular PBR.

Following our previous works on biological response to external fluctuations [27, 28], a dynamic model for the growth response to light fluctuation is proposed and validated against experimental data available in the literature [10]. The dynamic adaptation to light fluctuations induces some diversity among the population of Lagrangian particles. The accurate calculation of the overall growth rate is accessed through a summation over a large number of particles forming a statistically representative sample of the physiological diversity present in the reactor.

2.2 Case Study

The studied PBR (Fig. 1) is a 100-L annular tank with a flat bottom. Mixing is induced by three-sieves air spargers placed on an equilateral triangle at mid-distance from the inner and outer walls. The PBR is enlightened through its transparent walls by light-emitting diode (LED) strips. Two versions of the same device are simulated keeping the wall light flux and the total enlightened surface identical for both cases, so that the energy inputs are strictly the same.

The two investigated configurations only differ in the resulting spatial distribution of light in the volume of the PBR. The first one (case 1) is equipped with 20 vertical strips, 12 upon the external wall and 8 upon the internal wall, all being regularly disposed along the walls. The total LED strips length is 16.92 m, the width 1.5×10^{-2} m, so the enlightened surface is 0.254 m^2. The second case (case 2) consists in 24 horizontal strips, 12 upon the external wall and 12 upon the internal wall. The inner and outer strips are facing each other by pair, and they are also regularly disposed along the height of the PBR. In that second case, the total LED strips length is 16.21 m, the width being 1.57×10^{-2} m, so the enlightened surface is also 0.254 m^2. Parameter values for both irradiance and hydrodynamics calculations are summarized in Sect. 3 of the Supporting Information. As an example, the chosen microalgae is *Arthrospira platensis* (vernacular: *Spirulina*), for which the relevant data can be found in the literature (cited in the Supporting Information).

3 Results and Discussion

3.1 Light Received by the Cells along their Trajectories

The irradiance signals, which the microalgal cells see, are obtained from the Lagrangian particles tracking during an unsteady CFD simulation coupled with the irradiance field

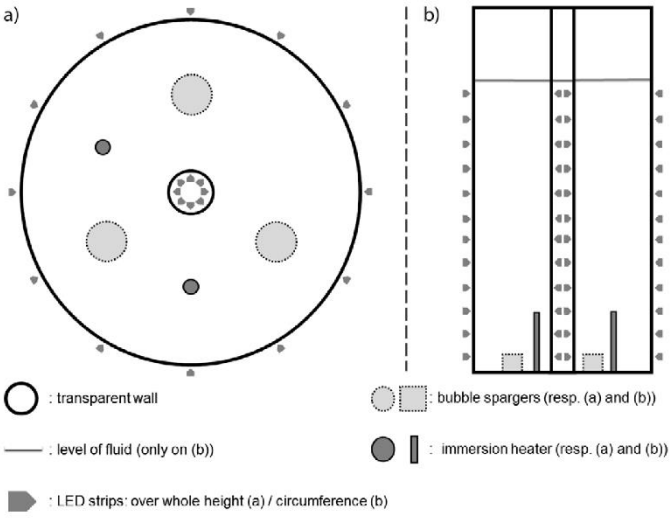


Figure 1. Outline of the annular V = 100 L PBR illustrating the two light disposals: (a) top view of the PBR with its vertical LED strips (case 1), (b) side view of the PBR with horizontal LED strips (case 2). The external diameter is 390 mm and the total height is 846 mm. The diameter of the internal cylinder located on the axis is 40 mm.

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

simulation. One example of particle trajectory is provided in Fig. 2. The general flow structure is a vertical loop induced by the ascending gas motion. Swirls along the trajectory are due to macro-instabilities that develop in this density gradient-driven unsteady two-phase flow.

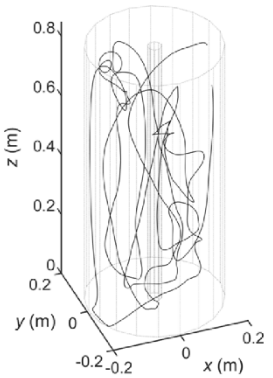


Figure 2. Example of a trajectory followed by one massless particle over 100 s.

The temporal light signal experienced by a particle p, $I_{@p}(t)$[1)], is post-processed out of the CFD calculations, from the successive locations of the particles in the light field. This approach is more accurate than implementing the irradiance field calculation in the CFD code. Indeed, a poorly resolved light field would be produced by this last technique due to the insufficient spatial resolution of the CFD mesh grid, when light gradients are sharper than velocity gradients, especially at high concentrations.

3.1.1 Light Field Model

The radiative transfer equations (RTE) governing light propagation are quite difficult to solve analytically due to light scattering by microalgae, even if some results were proposed for simple cases as punctual source in an infinite media [29]. An approximation of the RTE could be done, e.g., the two-flux simplification [30, 31] reducing the scattering to a unidimensional phenomenon. As already applied by several authors [29, 32–34], a Monte-Carlo method was adopted to calculate the irradiance field, $I(x,y,z)$. Absorption (Beer-Lambert), scattering phase function (Henyey-Greenstein) [29], reflection on surfaces (Fresnel), and refraction (Descartes) through the transparent walls of the PBR were taken into account in a MATLAB 2016a homemade code. The absorption and scattering coefficients of *Spirulina* are given by Pruvost [35], $E_a = 162\,m^2kg^{-1}$ and $E_s = 640\,m^2kg^{-1}$. The anisotropy of the scattering phase function is taken from Dauchet [36], $g = 0.97$.

1) List of symbols at the end of the paper.

Twenty irradiance fields are computed to span cell concentrations ranging from 0.1 to 2 g L^{-1}. This allows the simulation of light and growth couplings over the entire course of a cultivation. The irradiance fields at 0.5 g L^{-1} of biomass for the two PBR designs under consideration here are presented in Fig. 3, clearly showing dark and illuminated zones which will be crossed successively by the microalgae along their trajectories.

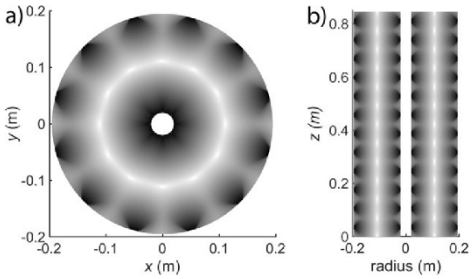


Figure 3. Irradiance fields with 0.5 g L^{-1} of biomass; (a) case 1, (b) case 2.

Irradiance field calculations were validated against analytical solutions and it was verified that the volume-averaged irradiance was the same for the two PBR designs.

3.1.2 Light Signal Modeling Methodology and Data Base Validation

Prior to using the resulting light signal as boundary conditions for a biological model, it must be checked that the trajectory database contains enough information for an accurate sampling of the PBR in terms of irradiance. As the particles are homogeneously distributed within the volume, if they are numerous enough, then the irradiance seen by the particle population is statistically representative of the whole irradiance field in the PBR $<I>$, as stated in Eq. (1). Note that this result holds true for any instant t, so it should also be verified with the numerical particle database on condition that the particle motion does not produce artificial segregation (particles are and remain homogeneously distributed).

$$\forall t \lim_{N_p \to \infty} \tilde{I}(t) = \langle I \rangle \quad \text{with} \quad \begin{cases} \tilde{I}(t) = \frac{1}{N_p} \sum_{p=1}^{N_p} I_p(t) \\ \langle I \rangle = \frac{1}{V} \iiint I \delta V \end{cases} \tag{1}$$

Similarly, the time average of the light field along any particle path should converge towards the volumetric mean too, as formulated in Eq. (2):

$$\begin{cases} \forall p,\ \overline{I_p} = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{T} \int_{t=0}^{T} I_p(t) \delta t = \text{cst} \\ \forall t,\ \lim_{N_p \to \infty} \tilde{I}(t) = \langle I \rangle \end{cases} \Rightarrow \quad \forall p\ \overline{I_p} = \langle I \rangle \tag{2}$$

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Nevertheless, in our simulations, neither the number of particles nor the sampling time are infinite. Therefore, the average over all particles at one particular instant does not actually match the volume average of the irradiance field. Likewise, each single particle did not spend enough time to sample the entire light field accurately. However, the ensemble average I_{ens}, over the entire database as defined in Eq. (3), this is to say over all N_p particles p and over all N_k sampling events k may contain enough information in view of the objectives. Indeed, it is not mandatory that each particle visited the entire volume because the relaxation time of the biological response to light fluctuations has a finite value.

It will be shown that the time scale of this biological memory effect is larger than the numerical time step and much smaller than the trajectory simulation time. To assess the database, it is sufficient to check that (i) the ensemble average I_{ens} converges towards the expected value <I> and that (ii) the probability density of irradiance light signals viewed by the cells obtained by the Lagrangian simulations fits the probability density of irradiance inside the PBR. It is verified in Fig. S5 that the ensemble averaged is stable after 30 s and close to the volume average while the fluctuation of the instantaneous average over all particles reveals that the number of particles is insufficient to sample the entire volume at each instant.

$$I_{ens}(t) = \frac{1}{N_k}\sum_{k=1}^{N_k}\tilde{I}(k) \tag{3}$$

The relative difference between <I> and I_{ens} lower than 6 % for cases 1 and 2 may be due to a remaining bias upon the particle location in the near wall zone, as it can be inferred from Fig. S4. Fig. 4 clearly demonstrates, however, that the irradiation intensity distribution among the whole PBR volumes is well described by the ensemble distribution over the events recorded in the Lagrangian database. This verification is a key point of the methodology: if this verification fails, the light energy balance over the reactor is not verified by the simulations.

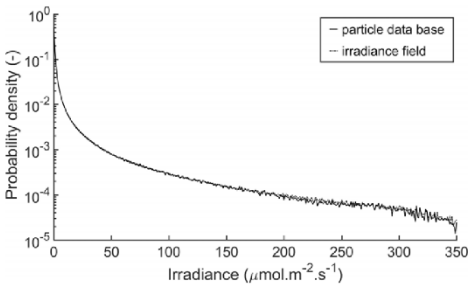


Figure 4. Irradiance probability density distributions of the Lagrangian database compared to the irradiance field distribution in the PBRs (case 1).

3.2 Biomass Growth Model

3.2.1 Modeling Principles

The overall growth rate at the reactor scale μ_{PBR} is computed as the ensemble average of the $N_k \times N_p$ growth rates reflecting the diversity of biomass growth rates within the reactor (4).

$$\mu_{PBR} = \frac{1}{N_k N_p}\sum_{k=1}^{N_k}\sum_{p=1}^{N_p}\mu_p \tag{4}$$

In order to investigate the coupling between the light signal and the biological response, a dynamic model is needed. In the continuation of previous work in this field [28, 37], a relaxation model is proposed here in Eq. (5).

$$\frac{\partial i_p}{\partial t} = \frac{1}{\tau}\left(KI_{@p} - i_p\right), \quad \mu_p = f\left(i_p\right) \tag{5}$$

It is basically a single parameter, non-equilibrium model allowing the internal variable i_p to relax towards the light intensity $I_{@p}(t)$ seen by the particle, with a time constant τ. The parameter K can be regarded as a responsiveness coefficient here set to 1 for convenience as i_p is not physically defined. The actual growth rate of a particle is given by the relationship, $\mu_p = f(i_p)$, where f is the function depicted in Fig. S1.

Since the results fitted by f correspond to dilute cultures under homogeneous and constant light, it can be assumed that the internal variable had experimentally enough time to reach its equilibrium value. Hence, these equilibrium data are relevant to calculate the growth rate from the internal variable i_p. The latter can therefore be regarded as defining the instantaneous growth capability, and interferes with the dynamic light conversion mechanism, such as a rate-determining step. The same underlying idea was invoked for the irradiance related part of the dynamic model recently published by Nikolaou et al. [19] or Takache et al. [38]. Other remarks about the model can be found in Sect. 4 of the Supporting Information.

3.2.2 Characteristic Time of the Biological Kinetic

The dynamic growth model was successfully fitted against the experimental data obtained by Xue et al. [10] on *Spirulina* concerning the growth response to the light signal frequencies (Fig. 5). Details about the experiment are given in Sect. 5 of the Supporting Information. The transition between asymptotic kinetics for various light efficiencies are correctly described by our model with a unique time constant $\tau = 0.3$ s. Similar behaviors and time constants can be found in the literature for other photosynthetic biomass with the same orders of magnitude and frequencies [4, 5, 9, 11, 39] resp. for *Dunaliella, Phaeodactylum, Nanochloropsis, Chlamydomonas*, and *Chlorella*.

The characteristic time scale of the light variation experimented by the cells is related to the convolution of the fluid velocity and light fields. The consequences are illustrated in Fig. 6 for the internal variable i (upper graph 6.a) and for the induced growth rate (lower graph 6.b) considering an exemplary 10-s sample of the instantaneous irradiance signal $I_{@p}$.

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

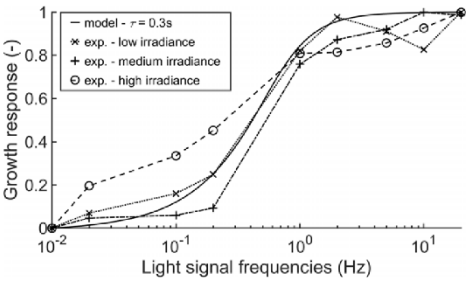


Figure 5. Comparison of the biological response model (τ = 0.3 s) and experimental data vs. light exposition frequency, on the *y*-axis: 0 stands for instantaneous adaptation and 1 for full integration growth kinetics. Experimental data from Xue et al. [10], Fig. 6 b, c, and d, respectively, for "exp. - low/medium/high irradiance".

For $\tau = 0$ s, $i = I_{@p}$ and $\mu(t)$ corresponds to instantaneous adaptation (upper script ia). Eq. (6) shows that the overall growth rate equals the volume average of the local growth rates, i being always at equilibrium with the local irradiance $I_{@p}$. Consequently, the volume light distribution suffices to calculate the overall growth rate, but its distribution can affect the overall growth rate depending on the $\mu(I)$ function.

$$\forall\{t;p\}\begin{cases} i_p^{ia}(t) = \lim\limits_{\tau\to 0^-} i_p(t) = I_{@p}(t) \\ \lim\limits_{N_p\to\infty} \widetilde{\mu(I_{@p})} = \langle\mu(I)\rangle \end{cases} \rightarrow \quad \mu_{PBR}^{ia} = \widetilde{\mu(i^{ia})} = \langle\mu(I)\rangle \tag{6}$$

For $\tau = \infty$, $\mu(t)$ corresponds to full integration (upper script fi): light fluctuations are filtered out. The biomass reacts so slowly that its growth rate is based on the time average of the light it is exposed to, as depicted by the assertion (7). The overall growth is driven by the average value of irradiance inside the volume; microalgae grow as if they were continuously exposed to the time-averaged value of the irradiance signal which matches the volume average. This can also be calculated directly from the irradiance field and only the average irradiance matters.

$$\forall k \quad i_k^{fi} = \lim_{\tau\to\infty} i_p = \overline{I_k} = \langle I\rangle \quad \rightarrow \quad \mu_{PBR}^{fi} = \widetilde{\mu(i^{fi})} = \mu(\langle I\rangle) \tag{7}$$

For τ = 0.3 s, the actual time constant fitted from [22], the highest frequencies are filtered whilst lower ones induce variations in the internal variable i and in the related growth rate $\mu(i)$.

3.3 Simulated PBR Biological Growth Rate

The overall growth rate μ_{PBR} corresponding to the two PBR designs were calculated for algae concentrations ranging from 0.1 to 2 g L^{-1}. These results lie between the two asymptotic cases represented with open symbol in Fig. 7 along with their related analytical solutions in plain and dash line (cf. Eqs. (6) and (7)). The difference between the two asymptotic cases is all the more pronounced that the algae concentration is high (heterogeneous light field). It reaches 100 % at 1 g L^{-1}. Our overall growth rate calculation asymptotically converges towards the well-established asymptotic results. It shows that none of these approaches are actually relevant and provides an actual intermediate value that proves to be sensitive to the reactor design.

Indeed, whilst they share the same energy input, one PBR is more productive than the other. This can be explained by the fact that the two cases did not provide the same light exposure to their microalgae. In case 1, the irradiance experimented by the cells remains rather constant along their vertical paths whereas in the other case, frequent light variations enhancing the biomass growth are experienced. This clearly shows that an optimal design of the PBR relies on the coupling of the flow and light fields with a biological dynamic model.

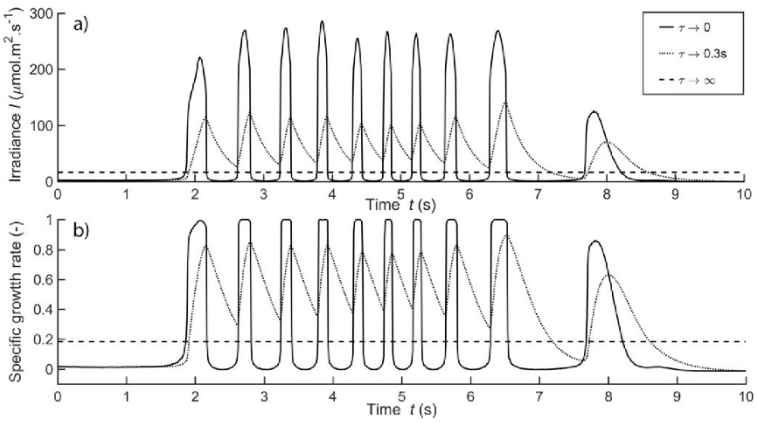


Figure 6. 9 s of simulated irradiance signal (a) experienced by a particle in case 2, with 0.5 g L^{-1} of *Spirulina*, and the corresponding growth kinetics (b).

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

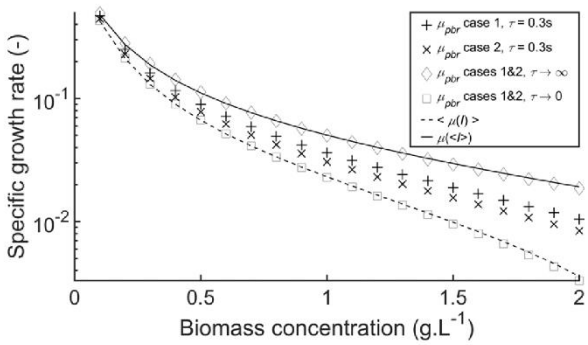


Figure 7. PBR overall growth rate versus the biomass concentration. Data points are numerical experiments including the biological model at different biological time constants τ. Continuous lines correspond to asymptotic behaviors.

A Damköhler number Da is now introduced to compare the characteristic time of the biological response (i.e., τ) to the characteristic time t_I of the light fluctuations. Thus, Da represents, for a given PBR, the ability of algea to keep up with the undergone light signal:

$$Da = \frac{\tau}{t_I} \tag{8}$$

If $Da << 1$, the instantaneous adaptation assumption can be made; if $Da >> 1$, the observed kinetic is closer to the full integration one. The time constant τ depends on the microalgae strain and can be experimentally obtained, as described previously. The characteristic time t_I is a consequence of the PBR hydrodynamics and light fields: t_I can be externally imposed by a modulated light source, it equals the circulation time in a closed-loop reactor. In general, it emerges as the integral time scale of light fluctuations.

By applying this simple scaling rule to literature results, the found t_I values are larger than 10^2 s for raceways [16,40] or close to 1 s in falling-film devices [41]. Considering a microalgae characteristic time around 0.3 s as observed in this work, the raceway could be simulated using the hypothesis of a full integration kinetic. For falling-film devices and the PBR studied here where t_I = 4.3–0.8 s (resp. for case 1 and 2), a fully coupled simulation of light and flow along with the biological response dynamics, as detailed here, is mandatory.

4 Conclusions

Knowing at the cell scale how the light is modulated constitutes a powerful tool to understand how mixing and light fields impact the biomass growth. The fluctuating light signal experienced by algae in a photobioreactor is simulated using CFD, particle tracking, and irradiance field calculations. A dynamic model based on the algae adaptation to light conditions is proposed and validated against experimental results from the literature. This dynamic model is integrated along each particle trajectory in order to estimate the actual growth rate in two PBRs which only differ in terms of their light signal structure.

Although the same amount of light energy is provided, the magnitude and frequencies of light fluctuations varies from one PBR design to the other, and, as a consequence, the growth rates also differ. Indeed, more than the light spatial gradients, the rate of change in the light intensity seen by the algae is of paramount importance. This rate of change is driven by the hydrodynamics induced by the mixing as well as by the light distribution. A Damköhler number Da is proposed and used to identify situations where the proposed approach is required.

Acknowledgment

This work was funded by the project PLAISIR of the Investissement d'Avenir CMI 2030.

The authors have declared no conflict of interest.

Symbols used

Da	[–]	Damköhler number
E_a	[m^{2}kg^{-1}]	absorption coefficient
E_s	[m^{2}kg^{-1}]	scattering coefficient
f	[–]	μ versus I or i function
g	[–]	scattering coefficient
I	[mol photons m^{-2}s^{-1}]	irradiance
i	[a.u.]	internal cell property
K	[a.u. mol photons^{-1}m^{2}s]	gain of the biological model
N_k	[–]	event number
N_p	[–]	particle number
T	[s]	sampling time
t	[s]	time
t_I	[s]	characteristic time of the light fluctuations
V	[m^3]	PBR volume
x,y,z	[m]	spatial coordinates

Greek letters

μ	[h^{-1}]	specific growth rate
τ	[s]	time constant of the biological model

Sub- and superscripts

ens	ensemble
fi	full integration
ia	instantaneous adaptation
k	event
p	particle (here a cell)
@p	at particle p
PBR	at the reactor scale

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Abbreviations

CFD computational fluid dynamics
FLE flashing light effect
LED light-emitting diode
PBR photobioreactor
PMMA poly(methylmethacrylate)
RTE radiative transfer equations

References

[1] A. Soulies, *Ph.D. Thesis*, Université de Nantes **2014**.
[2] J. Dauchet, *Ph.D. Thesis*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand **2012**.
[3] J. F. Cornet, C. G. Dussap, *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25 (2)*, 424–435. DOI: https://doi.org/10.1002/btpr.138
[4] K. L. Terry, *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28 (7)*, 988–995. DOI: https://doi.org/10.1002/bit.260280709
[5] J. S. Burlew, B. Kok, in *Algal Culture, from Laboratory to Pilot Plant*, Carnegie Institution, Washington, D.C. **1976**, 63–75.
[6] E. A. Laws, K. L. Terry, J. Wickman, M. S. Chalup, *Biotechnol. Bioeng.* **1983**, *25 (10)*, 2319–2335. DOI: https://doi.org/10.1002/bit.260251004
[7] M. Li, D. Hu, H. Liu, *Ecol. Eng.* **2014**, *73*, 162–167. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.010
[8] X. Wu, J. C. Merchuk, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56 (11)*, 3527–3538. DOI: https://doi.org/10.1016/S0009-2509(01)00048-3
[9] C. Combe, P. Hartmann, S. Rabouille, A. Talec, O. Bernard, A. Sciandra, *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112 (6)*, 1111–1121. DOI: https://doi.org/10.1002/bit.25526
[10] S. Xue, Z. Su, W. Cong, *J. Biotechnol.* **2011**, *151 (3)*, 271–277. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.012
[11] E. Sforza, D. Simionato, G. M. Giacometti, A. Bertucco, T. Morosinotto, *PLoS ONE* **2012**, *7 (6)*, e38975. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038975
[12] C. Zarrouk, *Ph.D. Thesis*, Univeristé de Paris **1966**.
[13] A. Vonshak, *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology, and Biotechnology*, Taylor & Francis, London **1997**.
[14] J. P. Jourdan, *Manuel de Culture Artisanale de Spiruline* **2016**.
[15] R. D. Fox, *La Spiruline, Technique, Pratique et Promesse*, Edisud, Aix-en-Provence **1999**.
[16] P. Hartmann, D. Demory, C. Combe, R. Hamouda, A. C. Boulanger, M. O. Bristeau, J. Sainte-Marie, B. Sialve, J. P. Steyer, S. Rabouille, A. Sciandra, O. Bernard, *IFAC Proc. Vol.* **2014**, *47 (3)*, 6216–6221.
[17] A. Nikolaou, P. Booth, F. Gordon, J. Yang, O. Matar, B. Chachuat, *IFAC-PapersOnLine* **2016**, *49 (26)*, 324–329.
[18] P. H. C. Eilers, J. C. H. Peeters, *Ecol. Modell.* **1988**, *42 (3–4)*, 199–215. DOI: https://doi.org/10.1016/0304-3800(88)90057-9
[19] A. Nikolaou, P. Hartmann, A. Sciandra, B. Chachuat, O. Bernard, *J. Theor. Biol.* **2016**, *390*, 61–72. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.004
[20] A. Bernardi, A. Nikolaou, A. Meneghesso, T. Morosinotto, B. Chachuat, F. Bezzo, *PLoS ONE* **2016**, *11 (6)*, e0156922. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156922
[21] A. Bernardi, A. Nikolaou, A. Meneghesso, T. Morosinotto, B. Chachuat, F. Bezzo, *PLoS ONE* **2016**, *11 (4)*, e0152387. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152387
[22] A. Bernardi, G. Perin, E. Sforza, F. Galvanin, T. Morosinotto, F. Bezzo, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53 (16)*, 6738–6749. DOI: https://doi.org/10.1021/ie500523z
[23] C. Baroukh, R. Muñoz-Tamayo, O. Bernard, J. P. Steyer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 198–205. DOI: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.002
[24] C. Baroukh, J. P. Steyer, O. Bernard, B. Chachuat, *IFAC-PapersOnLine* **2016**, *49 (7)*, 791–796. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.07.285
[25] M. Janssen, J. Tramper, L. R. Mur, R. H. Wijffels, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81 (2)*, 193–210. DOI: https://doi.org/10.1002/bit.10468
[26] J. Pruvost, J. F. Cornet, J. Legrand, *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63 (14)*, 3679–3694. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.04.026
[27] J. Morchain, J. C. Gabelle, A. Cockx, *AIChE J.* **2013**, *59 (2)*, 369–379. DOI: https://doi.org/10.1002/aic.13820
[28] J. Morchain, *Bioreactor Modeling: Interactions between Hydrodynamics and Biology*, ISTE Press Ltd., London **2017**.
[29] A. Liemert, A. Kienle, *Phys. Rev. A* **2011**, *83 (1)*, 015804. DOI: https://doi.org/10.1103/PhysRevA.83.015804
[30] J. F. Cornet, C. G. Dussap, J. B. Gros, in *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*, Springer **1998**, 153–224.
[31] J. F. Cornet, C. G. Dussap, J. B. Gros, C. Binois, C. Lasseur, *Chem. Eng. Sci.* **1995**, *50 (9)*, 1489–1500. DOI: https://doi.org/10.1016/0009-2509(95)00022-W
[32] J. Dauchet, S. Blanco, J. F. Cornet, M. El Hafi, V. Eymet, R. Fournier, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **2013**, *128*, 52–59. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2012.07.004
[33] J. M. Heinrich, I. Niizawa, F. A. Botta, A. R. Trombert, H. A. Irazoqui, *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88 (4)*, 952–960. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01149.x
[34] V. Rochatte, *Ph.D. Thesis*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2, **2016**.
[35] J. Pruvost, J. F. Cornet, V. Goetz, J. Legrand, *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28 (3)*, 699–714. DOI: https://doi.org/10.1002/btpr.1540
[36] J. Dauchet, S. Blanco, J. F. Cornet, R. Fournier, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **2015**, *161*, 60–84. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2015.03.025
[37] J. Morchain, C. Fonade, *AIChE J.* **2009**, *55 (11)*, 2973–2984. DOI: https://doi.org/10.1002/aic.11906
[38] H. Takache, J. Pruvost, H. Marec, *Algal Res.* **2015**, *8*, 192–204. DOI: https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.009
[39] P. J. Graham, B. Nguyen, T. Burdyny, D. Sinton, *Sci. Rep.* **2017**, *7 (1)*, 1–11. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-12923-1
[40] A. Nikolaou, P. Booth, F. Gordon, J. Yang, O. Matar, B. Chachuat, *IFAC-PapersOnLine* **2016**, *49 (26)*, 324–329.
[41] T. S. Severin, A. C. Apel, T. Brück, D. Weuster-Botz, *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *132*, 436–444. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.01.036

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers! ↘↘

Chemical Engineering Technology Research Article 8

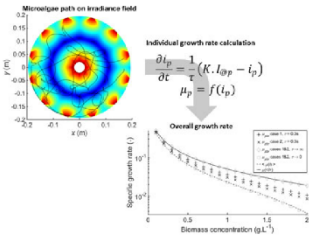
Research Article: A general methodology is developed and applied for the calculation of the overall growth rate in a heterogeneous photobioreactor. The light exposition experienced by the cells obtained from their Lagrangian tracking on two-phase non-stationary computational fluid dynamics simulations is coupled to a biological growth model based on an experimental characteristic relaxation time.

How Mixing and Light Heterogeneity Impact the Overall Growth Rate in Photobioreactors

V. Gernigon, M. A. Chekroun, A. Cockx, P. Guiraud, J. Morchain*

Chem. Eng. Technol. **2019**, *42 (XX)*, XXX … XXX

DOI: 10.1002/ceat.201900102



Supporting Information available online

 © 2019 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Supporting Information

How Mixing and Light Heterogeneity Impact the Overall Growth Rate in Photobioreactors

Vincent Gernigon, Mohammed A. Chekroun, Arnaud Cockx, Pascal Guiraud, Jérôme Morchain*

DOI: 10.1002/ceat.201900102

Correspondence: Prof. Jérôme Morchain (morchain@insa-toulouse.fr), LISBP, University of Toulouse, CNRS, INRA, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France.

1 Biomass Growth Versus Continuous Irradiance for Spirulina

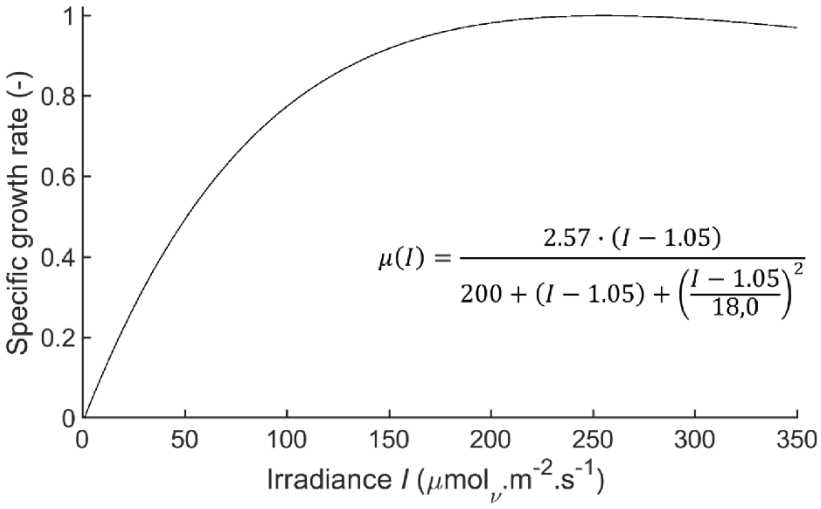


Figure S1. Biomass growth versus continuous irradiance of Spirulina in turbidostat under diluted condition (avoiding shelf-shadowing effect) - Zarrouk medium at 30°C (with the courtesy of lab PBA IFREMER).

2 Gas-Liquid Hydrodynamics – Cell Trajectories – Irradiance Fields

2.1 CFD Model

Unsteady 3D CFD simulations of the two-phase flow induced by gas injection are performed using an Euler-Euler approach in ANSYS-FLUENT 16.2. The dispersed laminar model is used along with added mass term [1] and the Karamanev [2], Legendre-Magnaudet [3] models respectively for bubble drag and lift. A no-slip condition is imposed at the walls. A constant inlet gas velocity is imposed on the sparger surface to set the gas flow rate. The bubble size was experimentally determined as 6.7 10^{-3} m. A degassing condition is used for the free surface. The mesh was built using the cut-cell method, resulting in approximately

140k cubic cells, with 20 mm wide in coarser zones and down to 0.5-mm near injectors and walls. The unsteady calculation is run in double precision with a 0.005-s time step until the hydrodynamics is established. The convergence of the unsteady flow was judged through the examination of the time average of the gas volume fraction in the entire reactor: Fig. S2 shows that the total gas fraction converges within about 45 s.

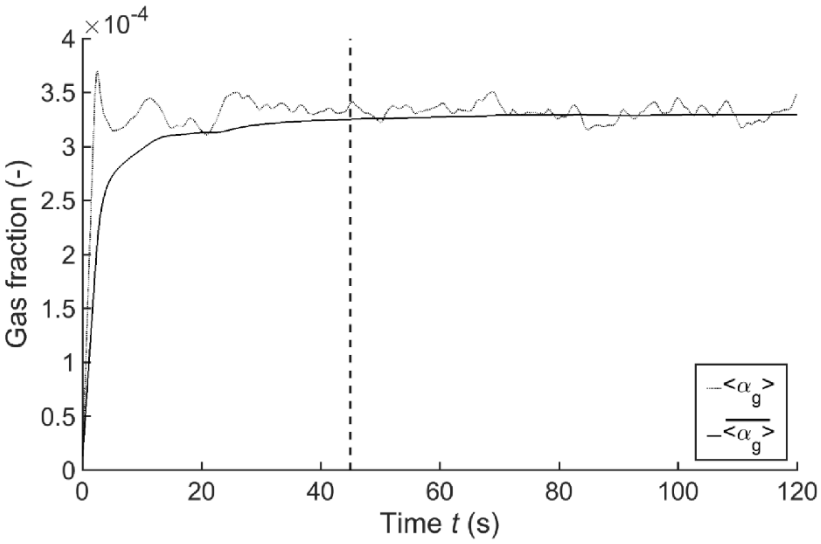


Figure S2. Global gas volume fraction $<\alpha_g>$, and its time average, $<\overline{\alpha g}>$.

2.2 Cell Trajectories via Lagrangian Particle Tracking

Once a stationary velocity field was obtained, massless particles (consistent with a Stokes number < 1) were injected at randomly defined locations. Their trajectories were obtained from the Lagrangian Particle Tracking (LPT) along with the unsteady simulation of the two-phase flow. This coupling is mandatory for it was observed experimentally that the bubble plumes tend to produce large scale instabilities that are well reproduced by simulations as illustrated on Fig. S3.

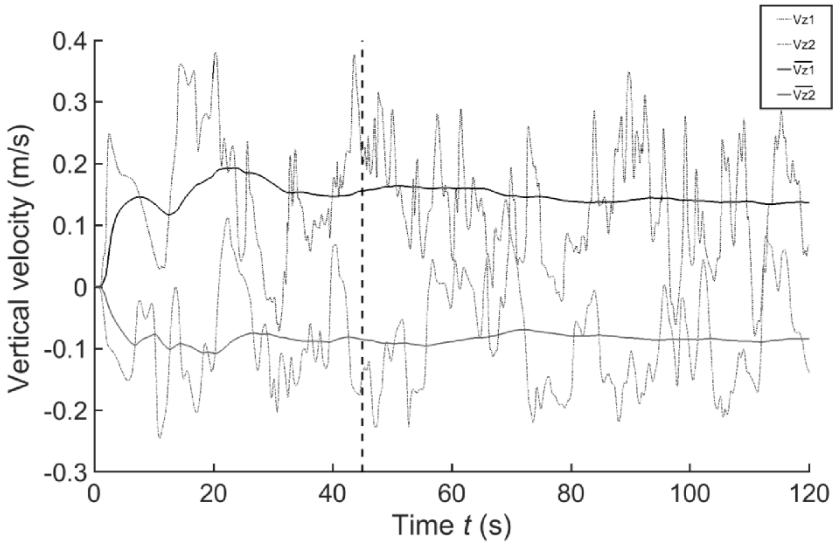


Figure S3. Hydrodynamic convergence of two vertical velocities Vz1 (inside a bubble plume) and Vz2 (between the plumes) and their time average noted with overbars.

Since particles are massless, the continuous phase is not impacted by their presence, and, for the same reason, particle-particle interactions are neglected. In order to obtain an accurate description of every possible path, ten thousand particles were tracked and their location recorded over two mixing times (i.e., ~100 s), with a 0.01-s time step. The aim of this LPT is to record a statistical representation of the movement of microalgae inside the photobioreactor.

The normalized particle concentration profiles (measured concentration/expected homogeneous concentration) presented in Fig. S4 illustrate the spatial homogeneity of the particle spreading over the whole volume of the PBR during the recorded sequence. As reported by [4], if the sampled particle concentration is not homogeneous, it would induce a bias when evaluating the integral of the irradiance field from the particle location, and would lead to invalidate the energy balance in the PBR, and thus the evaluation of growth rates.

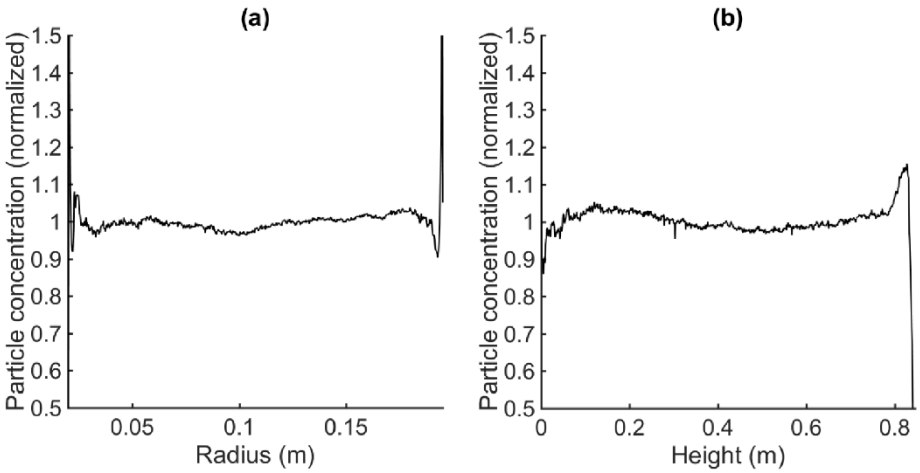


Figure S4. Radial (a) and vertical (b) profiles of the sampled particle concentration.

2.3 Irradiance Viewed by the Cells

Fig. S5 presents the instantaneous values of the average over all particles irradiance, as well as the ensemble average and the volume average.

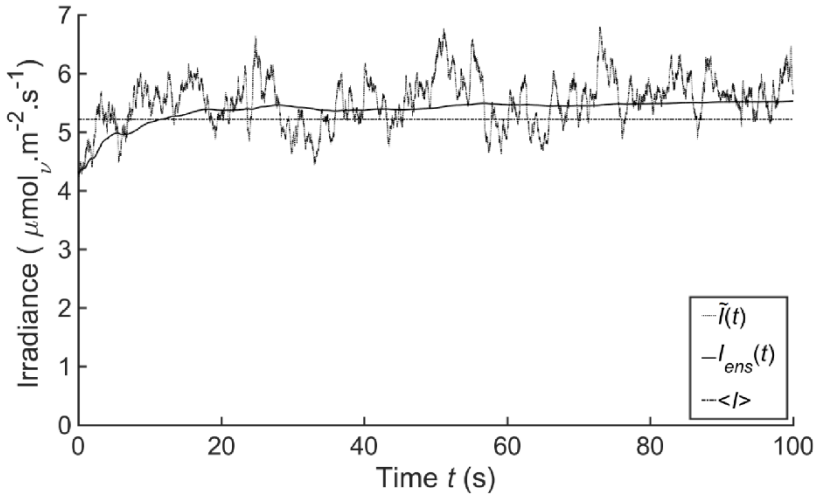


Figure S5. Instantaneous values of the average over all particles $\tilde{I}(t)$, ensemble average I_{ens} and volume average $\langle I \rangle$.

3 Main Modelling Parameters

Table S1. Main modelling parameters.

Variable	Value	Origin
Biomass	*Arthrospira Platensis var. Paracas* (vernacular: *Spirulina*)	G. Planchon's strain, pretreated by IFREMER
Concentration	0.1 to 2.0 [gL^{-1}]	arbitrary
Temperature	308 [K]	arbitrary
Mixing time	45 [s]	measured: conductivity monitoring of a tracer (HAMILTON, Conducell)
Liquid broth surface tension	62 10^{-3} [$N.m^{-1}$]	measured: Du Noüy ring method (KRÜSS, K6 with RI 011)
Liquid broth viscosity	1.0 10^{-3} [$Pa.s^{-1}$]	measured: rheometer (THERMO SCIENTIFIC, MARS III)
Liquid broth density	1008.1 [$kg.m^{-3}$]	measured: weighting of a known volume (SARTORIUS, ED224S)
Broth volume	100 [L]	arbitrary
Gas (air) viscosity	1.882 10^{-5} [$kg.m^{-1}.s$]	literature: [5]
Gas (air) density	1.146 [$kg.m^{-3}$]	literature: [5]
Bubble d_{3-0} equivalent diameter in volume	6.7 10^{-3} [m]	measured: image acquisition and processing, [6]
Gas bubble velocity	0.25 [$m.s^{-1}$]	literature: [7,8]
Total gas flow rate	0.6 [$m^3.h^{-1}$]	arbitrary
LED strips length	16.92 [m] and 16.21 [m] (resp. case 1 and 2)	arbitrary
Enlighten zone width	1.5 10^{-2} [m] and 1.57 10^{-2} [m] (resp. case 1 and 2)	arbitrary
Light beam collimation	80°	arbitrary
Wall irradiance	350 [$\mu mol_v.m^2.s^{-1}$]	arbitrary
Wall refractive index	1.49 [-]	literature: [9]
Broth refractive index	1.34 [-]	measured: refractometer (CETI, Convex)
Light absorption coefficient	162 [$m^2.kg^{-1}$]	literature: [10]
Light scattering coefficient	640 [$m^2.kg^{-1}$]	literature: [10]
Light scattering anisotropy	0.97 (Henyey-Greenstein phase function)	literature: [11]

4 Remarks About the Biological Model

- The model introduces a response time between the exposure to light/dark and the corresponding increase/decrease in terms of growth rate. From a biological point of view it seems more reasonable than assuming that the growth rate (an integral quantity by essence) adapts instantaneously to any light fluctuation.
- The dynamic model behaves as a low pass filter. The key parameter is therefore the ratio between the characteristic time of light fluctuations and the characteristic time of the biological response to them, as shown in Fig. S6.
- The model does not account for light inhibition in the dynamic response of the microalgae, contrary to the Eilers and Peeters's model [12] for instance. A sudden light flash cannot negatively impact growth. However, the detrimental effect of a prolonged exposure to high light intensities is included in the relationship $\mu = f(i)$ as reflected by the decreasing part of the growth curve (Fig. S1).
- A single time τ is used meaning that the algae would build up and degrade their growth ability at a similar rate, which may not be the most accurate description of the reality but allows a simple implementation and understanding of a dynamic behavior of the micro-algae.

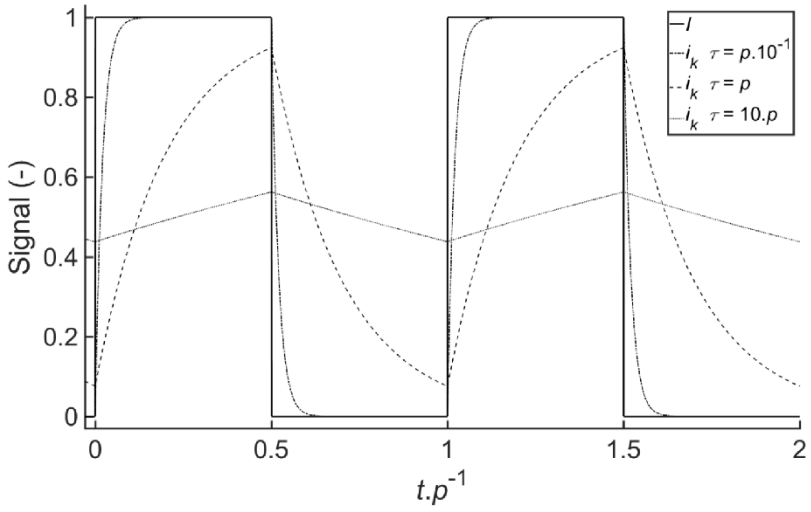


Figure S6. Influence over the internal variable of response time τ on a model signal of period p and 50-% duty cycle.

5 Experimental Conditions of Xue [13]

The biomass was cultivated in diluted condition in a 10-mm thick planar PBR (thus a homogeneous light distribution inside the vessel is assumed), and was exposed to a controlled modulated light. This study was led with a square light signal of various frequencies between 0.01 and 20 Hz, various duty cycle between 5 and 20 %, and intensities between 3 to 77 Wcm^{-2} (nb. another light measuring unit was used in that study).

References

[1] J. Magnaudet, M. Rivero, J. Fabre, *J. Fluid Mech.* **1995**, *284 (1)*, 97. DOI: 10.1017/S0022112095000280

[2] D. G. Karamanev, L. N. Nikolov, *AIChE J.* **1992**, *38 (11)*, 1843–1846. DOI: 10.1002/aic.690381116

[3] D. Legendre, J. Magnaudet, *J. Fluid Mech.* **1998**, *368*, 81–126. DOI: 10.1017/S0022112098001621

[4] J. Pruvost, J. F. Cornet, J. Legrand, *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63 (14)*, 3679–3694. DOI: 10.1016/j.ces.2008.04.026

[5] International Civil Aviation Organization, *Manual of the ICAO Standard Atmosphere Extended to 80 Kilometres (262 500 feet)*, ICAO (Montreal) **2002**.

[6] D. Laupsien, Hydrodynamics, *Mass Transfer and Mixing induced by Bubble Plumes in Viscous Fluids*, Ph.D. Thesis, INSA de Toulouse **2017**.

[7] R. Clift, J. R. Grace, M. E. Weber, *Bubbles, Drops, and Particles*, Academic Press, New York **1978**.

[8] H. D. Mendelson, *AIChE J.* **1967**, *13 (2)*, 250–253. DOI: 10.1002/aic.690130213

[9] M. J. Weber, *Handbook of Optical Materials*, The CRC Press Laser and Optical Science and Technology Series, CRC Press, Boca Raton, FL **2003**.

[10] J. Pruvost, J. F. Cornet, V. Goetz, J. Legrand, *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28 (3)*, 699–714. DOI: 10.1002/btpr.1540

[11] J. Dauchet, S. Blanco, J. F. Cornet, R. Fournier, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **2015**, *161*, 60–84. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2015.03.025

[12] P. H. C. Eilers, J. C. H. Peeters, *Ecol. Model.* **1988**, *42 (3–4)*, 199–215. DOI: 10.1016/0304-3800(88)90057-9

[13] S. Xue, Z. Su, W. Cong, *J. Biotechnol.* **2011**, *151 (3)*, 271–277. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.12.012

Annexe I : Article

ACS Sustainable Chemistry & Engineering

Research Article

Cite This: ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804

pubs.acs.org/journal/ascecg

Bicarbonate Concentration Induces Production of Exopolysaccharides by *Arthrospira platensis* That Mediate Bioflocculation and Enhance Flotation Harvesting Efficiency

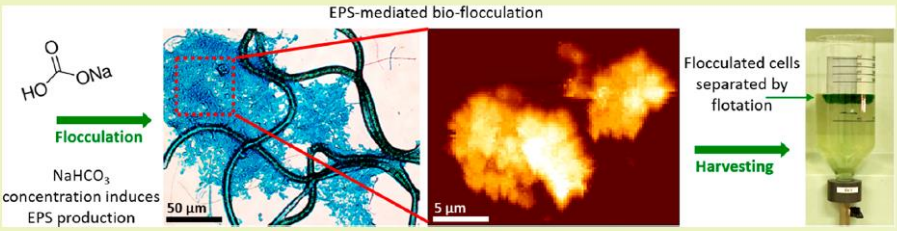
J. B. Vergnes,[†] V. Gernigon,[†] P. Guiraud,[†,‡] and C. Formosa-Dague*[,†,‡,§]

[†]TBI, Université de Toulouse, INSA, INRA, CNRS, 31077 Toulouse, France

[‡]Fédération de Recherche FERMAT, CNRS, 31062 Toulouse, France

[§]LAAS, Université de Toulouse, CNRS, 31031 Toulouse, France

Supporting Information



ABSTRACT: *Arthrospira platensis*, or spirulina, is a cyanobacterial species mainly exploited for its nutritional qualities and able to produce exopolysaccharides (EPS) under specific conditions. In this work we identify that the bicarbonate concentration is a key parameter that induces EPS production by the cells. Using flocculation/flotation harvesting experiments, in addition to atomic force microscopy to characterize the biophysical properties of EPS, we show that EPS produced by *A. platensis* cells form a soft, adhesive gel in the medium that forms aggregates in which cells are entrapped and thus bioflocculated. This results in the creation of microalgae flocs in which ascending microbubbles produced in the flotation process get trapped, thus enhancing the efficiency of the microalgae separation from water. This interdisciplinary study provides new insights into culture conditions that positively influence the EPS production, while allowing both a high final biomass concentration and a harvesting efficiency superior to 90% to be reached.

KEYWORDS: *Arthrospira platensis, Exopolysaccharides, Bioflocculation, Flotation, Atomic force microscopy*

INTRODUCTION

Arthrospira platensis, commonly known as spirulina, is an edible filamentous cyanobacterium originally isolated from alkaline lakes in Africa and presently cultivated in tropical, subtropical, and temperate regions of the world. Because of its important nutritive qualities, this microalgae is now one of the most commercialized microalgae species.[1,2] Indeed, *A. platensis* is considered as a most valuable source of protein, as up to 70% of its biomass can be composed of this fraction, with a profile that includes the full range of essential amino acids.[3−5] The most valuable protein this cyanobacterium is able to produce is phycocyanin, which is used as a coloring agent in food and cosmetics.[6] Moreover, *A. platensis* is also a source of polyunsaturated fatty acids, vitamins (B_{12}), and other pigments (chlorophyll *a* and carotene) and has been evaluated for therapeutic use. For instance, *A. platensis* features include hypolipidemic, hypoglycemic, and antihypertensive properties, but it also has antioxidant and microbial-modulating activities.[7]

Another important aspect of *A. platensis* is that this microalgae species is capable of producing extracellular exopolysaccharides (EPS). A wide range of microalgae (eukaryotic and cyanobacteria) produce EPS, which act as a protective layer around the cells to preserve them from unfavorable environmental conditions.[8] EPS from microalgae also have potential applications in industry and health.[9] For example, EPS can be used as thickening agents to alter water rheological properties, as heavy-metal removal agents for wastewater treatments, or even as food additives in the food industry.[10−12] They also display several biological properties, such as anti-inflammatory, antitumor, antiviral, antiparasitic, and immunomodulatory activities.[9,12] For these reasons they have been the subject of many studies, with much effort focused on the determination of their composition or the optimization of culture conditions that favor their production. In the case of the EPS produced by *A. platensis*, studies have shown that they are rich polymers composed of complex heteropolysaccharides with protein moieties[13] and that temperature, light intensity, and the cell's trophic mode

Received: March 20, 2019
Revised: July 10, 2019
Published: July 16, 2019

ACS Publications © 2019 American Chemical Society

could influence their production.[14,11] Another study also showed that their presence in water inhibits cell growth, which has implications in water recycling.[15]

While *A. platensis*-rich biomass and EPS are sought after for various applications, a limiting factor is their harvesting. Harvesting is usually a challenge in the case of microalgae because they grow at low concentrations, thereby resulting in a need to treat large volumes of water. This crucial step accounts for up to one-third of the entire biomass production cost.[16] In the case of *A. platensis*, the most commonly used technique to harvest the cells is by filtration, given their large size. Indeed, filtration tends to work better with larger microalgae rather than with smaller microalgae that can clog the membranes used in filtration.[17−19] While this technique is usually efficient for *A. platensis* cultures that produce no EPS, it has been shown that for *A. platensis* cultures that produce the EPS, these often clog the membranes, thus resulting in low efficiency harvesting with high operating costs.[20,21] Centrifugation can also be used in the case of *A. platensis*,[22] yet the operating costs of centrifugation are high due to the high energy input of this technique but also the cell damage and loss resulting from the high-shear forces applied.[23,24] Flotation is a promising technique that has the advantages of having a low energy input, reduced operating costs, and low space and equipment requirements. This technique has been shown to be efficient to harvest cells cultivated in high-nutritive conditions if the cells are left to flocculate before the introduction of the bubbles.[25] In this case the efficiency of the process could also be enhanced by adding cationic floculants to the cell suspension ($CaCl_2$, $MgCl_2$, $FeCl_3$).[25] However, such added flocculants can then end up in the harvested biomass and interfere with the final product quality.[26] An interesting and sustainable alternative to this problem is natural auto- or bioflocculation. For *A. platensis*, three cases of bioflocculation have been reported. In these three cases, the same mechanism is described where bioflocculation is directly induced by the accumulation of carbohydrates by the cells under nutrient stress conditions (phosphorus and nitrogen) or at high salinities, leading to an increase in their specific density.[27−29] However, in these conditions, the nutrient deprivation results in reduced cell growth and biomass production.

The present study addressed the two important aspects in *A. platensis*, EPS production and harvesting. We show the direct influence of EPS on the recovery efficiency of the biomass using a flocculation/flotation technique. For this we developed a culture strategy of *A. platensis* to assess the role of culture medium bicarbonate concentration on the production of EPS by the cells. Their implication in the flocculation/flotation harvesting process was then evaluated in experiments at laboratory-scale. Finally, using an advanced atomic force microscopy[30] imaging technique, we characterized the biophysical properties of EPS to understand their role in flocculation. Altogether we describe an original bioflocculation mechanism and we provide culture conditions that allow for optimized biomass production and efficient harvesting.

MATERIALS AND METHODS

Strain and Culture Conditions. An *A. platensis* strain isolated from the Paracas lake in Peru was used in this study and cultivated in tap water containing the following: Ca (0.025 g/L), Cl (0.045 g/L), K_2O (0.297 g/L), NO_3 (1.779 g/L), Mg (0.012 g/L), Mn (0.230 g/L), Zn (0.461 mg/L), Cu (0.229 mg/L), B (0.229 mg/L), SO_4 (0.583 g/L), complexed iron (micronutriFe, Prayon, Belgium, 0.003 g/L), P_2O_5 (0.178 g/L), and a variable concentration of $NaHCO_3$ and NaOH to adjust the initial pH to 9.5. Cultures were achieved in 6-L poly(methyl methacrylate) photobioreactors (PBRs) and were continuously agitated by the gentle bubbling of atmospheric air (2 L/min). Illumination was provided by three submerged tubes containing warm white LEDs (BDL, vs-f600ww-12 V-3528-10 mm-2700K) delivering an irradiance of 280 or 350 $\mu mol_p/m^2/s$ for a total of 916 cm^2 of illuminated walls. The temperature of the culture was regulated at 30 or 35 °C using an immersion heater (Scientax). The protocol used to cultivate the cells is described in Figure 1. Cultures were maintained in an inoculum-culturing PBR (subcultures at an OD of 0.3 every week) at moderate cell growth conditions (30 °C, 280 $\mu mol_p/m^2/s$). For inoculating the experiments PBRs, 6 L from the inoculum-culturing PBR was filtered on a 56 μm sieve (Retsch, 60.131.000056); approximately 2 g of the retentate was then diluted in 6 L of new culture medium at different $NaHCO_3$ concentrations. The culture of the experiments PBRs lasted 4 days in high cell growth conditions (35 °C, 350 $\mu mol_p/m^2/s$) and were monitored twice a day by measuring the optical density at 680 nm. The $NaHCO_3$ concentration was maintained constant during the 4 days of the culture by measuring the pH twice a day and adding $NaHCO_3$. The pH measure was used in the following eq 1

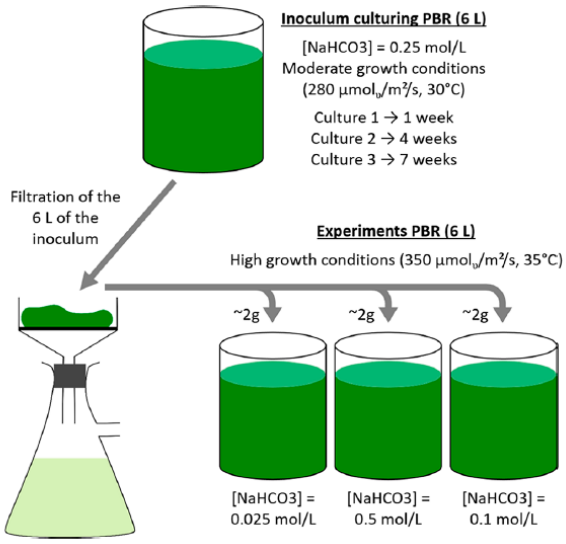


Figure 1. Schematic representation of the culturing protocol and conditions. *A. platensis* cells extracted from a maintaining tank where cell growth is low (outdoor lighting and temperature, in a 200 L tank) are cultured in a 6 L PBR in moderate growth conditions. This PBR is diluted every 5 days to an OD (680 nm) of 0.3, before stationary phase is reached. To perform the experiments, cells cultured in the inoculum PBR during 1, 4, or 7 weeks (culture 1, 2, and 3, respectively) are harvested by filtration: 2 g of the cells are then inoculated into the experiments PBRs at high growth conditions in culture medium containing different concentrations of $NaHCO_3$.

$$[Bic]_i + \Delta[Bic] = \frac{[Ct]_i + 0.5\Delta[Bic]}{1 + 10^{pK_{a1} - pH_m} + 10^{pH_m - pK_{a2}}} \quad (1)$$

where $[Bic]_i$ and $[Ct]_i$ are HCO_3^- concentration and $NaHCO_3$ concentration at the beginning of the culture. $\Delta[Bic]$ is the variation of the bicarbonate ions concentration and is the unknown parameter of the equation. pK_{a1} = 6.3 and pK_{a2} = 10.3 are the two acid dissociation constants of the sodium bicarbonate in a water solution. pH_m is the measured value of the pH. This equation was solved with the Microsoft Excel solver after every measure and a quantity of

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804

$NaHCO_3$ corresponding to the value obtained for Δ[Bic] was added to the culture medium.

Flocculation/Flotation Experiments. A detailed presentation of the laboratory-scale flotation experiments can be found in refs 31 and 32. DAF experiments were performed in a Multiplace Orchidis FTH3 Flottatest. Three flotation-test beakers were run simultaneously, in which 600 mL samples were collected from the algal cultures and added to each beaker. The depressurization at atmospheric pressure of 200 mL of culture medium free of algae and saturated by air at 6 bar for 15 min induced the formation of microbubbles. The recycle ratio (pressurized culture medium volume/initial sample volume) was of 33%. In each case, prior to depressurization, the cells were left to flocculate during 20 min under gentle mechanical mixing (100 rpm). Harvesting efficiency quantification is based on optical density measurements. The harvesting efficiency represents the quantity of algae floated compared to the quantity in the initial suspension, which was evaluated using the following eq 2

$$E\ (\%) = \left(1 - \frac{OD_a V_a}{OD_i V_i}\right) \times 100 \qquad (2)$$

where OD_i and V_i are the initial optical density at 680 nm and the volume of algal suspension before flotation, and OD_a and V_a are the optical density at 680 nm of the aqueous phase and the volume of the aqueous phase after injection of pressurized water.

Filtration Experiments. Filtration experiments were performed in a 200 mL Amicon cell (Merck, 10402511) using an inox filter with a 10 μm pore size (Negofiltres, stainless steel 316L). One liter samples were collected from the algal cultures and added to a pressurized tank; filtration was then performed under 0.5 bar. The filtrate was collected in a beaker on a monitored scale and the weight of the filtrate was measured every 5 s for 900 s. The filtrate density was 1000 g/L and the variation of the flow rate was calculated over time with the measure of the mass over time.

Optical and AFM Imaging. The optical images of *A. platensis* cells before flocculation/flotation experiments were directly obtained by sampling 1 mL of the cell suspension. These samples were then deposited on glass surfaces and allowed to stand for 30 min at room temperature. An Alcian Blue staining was then used to color the EPS.[33] To this end, 1 mL of a solution made of 0.06% acetic acid and 0.03% of Alcian Blue was deposited on the glass surfaces and allowed to stand for 15 min. Glass surfaces were then immersed in distilled water for 15 min in order to remove the nonfixed staining. Finally, images (resolution of 1024 × 768 pixels) were recorded at high magnification (×50) using an inverted Axio Observer Z1 microscope (Zeiss). In order to evaluate the relative quantity of EPS from the optical images, images were analyzed using ImageJ software in order to determine the area of the image covered by EPS. For that, the color optical images were first split into the three color channels red, blue, and green. As only the EPS are stained by the Alcian Blue, both red and green channels were subtracted from the blue channel, to obtain an image of only the blue signal. This image was then binarized: on the binary image, a white pixel corresponds to blue and a dark pixel corresponds to the other colors on the initial image. The percentage of the area covered by EPS was calculated by extracting the number of white pixels on the binary image compared to the total number of pixels of the image. For AFM imaging, 1 mL of cell suspension was sampled and directly immobilized on polyethylenimine (PEI, Sigma P3143) coated glass slide prepared as previously described.[34] Briefly, freshly oxygen activated glass slides were covered by a 0.2% PEI solution in deionized water and left for incubation overnight. Then the glass slides were rinsed with deionized water and dried under nitrogen. A total of 1 mL of cell suspension was then deposited on the PEI slides and allowed to stand for 30 min at room temperature. Images were recorded using the quantitative imaging mode available on the Nanowizard III AFM (Bruker). Multiparametric images were recorded with MLCT-BIO cantilevers (Bruker, nominal spring constant of 0.01 N/m) using an applied force of 1.0 nN, a constant approach/retract speed of 100 μm/s, and a *z*-range of 3 μm.

RESULTS AND DISCUSSION

Bicarbonate Concentration in the Growth Medium Influences EPS Production. Prior to initiating experimental conditions, all cells were cultured and maintained in an inoculum-culturing PBR at low light intensity and moderate temperature (30 °C), with a bicarbonate concentration of 0.25 mol/L (18.9 g/L), similar to Zarrouck's[35] medium commonly used to cultivate *A. platensis*. Cells were then filtered and inoculated in three experiments PBRs containing culture medium with bicarbonate concentrations of 0.025 mol/L (2.1 g/L, PBR1), 0.05 mol/L (4.2 g/L, PBR2) or 0.1 mol/L (8.4 g/L, PBR3) (Figure 1). These concentrations of bicarbonate are lower than the ones found in the literature.[13−15,28] Because *A. platensis* grows in alkaline waters, the amount of dissolved CO_2 is low, so the bicarbonate is added to be used as a source of carbon and assimilated due to the energy the cells capture from light. As bicarbonate ions are consumed by the cells, hydroxide ions are released into the medium, thereby increasing the pH over the course of the culture.[36] To avoid this and to assess only the role of the bicarbonate concentration on the EPS production, we chose to perform our cultures at a pH of 9.5 and to maintain the bicarbonate concentration constant over 4 days of culture in the experiments PBRs. Toward this end, the pH of the culture medium was measured twice a day, which indicated the quantity of bicarbonate consumed by the cells, which could then be compensated by adding bicarbonate into the medium (the detailed procedure is found in the Materials and Methods).

Characterization of the EPS produced by *A. platensis* has been the subject of considerable study.[13,37] Previous studies have shown that the EPS consist of heteropolysaccharides with protein moieties and that the polysaccharidic fraction is composed of neutral sugars and uronic acids, in different proportions depending on the strains and the culture conditions used. EPS were also shown to form aggregates that could be detected by using histological staining with dyes, such as Alcian Blue, that react with acidic polysaccharides.[38,39] We selected this technique to qualitatively evaluate the effects of bicarbonate concentration on the production of EPS in samples taken from the three experiments PBRs of culture 1 (1 week in inoculating PBR). Our results, presented in Figure 2, show that no EPS could be detected in cells grown at the lowest bicarbonate concentration (Figure 2a). However, in the case of cells grown with bicarbonate concentrations of 0.05 and 0.1 mol/L (Figure 2c,d), aggregated EPS could be detected around cells and the quantity was positively correlated to the concentration of bicarbonate. To relatively quantify the observed differences in EPS concentrations, we developed an original image treatment strategy allowing us to measure on these images the area covered by the EPS. Toward this end, the blue signal only was first extracted from each image: the blue images were then converted into binary images (Figure 2b,d,f), where white pixels correspond to blue and dark pixels correspond to the other colors on the initial images. Then, knowing the pixel resolution of our images, we could extract the number of white pixels and calculate the percentage of the area covered by the EPS. The results of these analyses, performed in each case on 7 different images for each conditions, are presented in Figure 2g. At low $NaHCO_3$ concentration, the mean area covered by EPS in the recorded images is of 5.5 ± 2.3%, whereas it increases to 8.2 ± 1.0% at a

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804

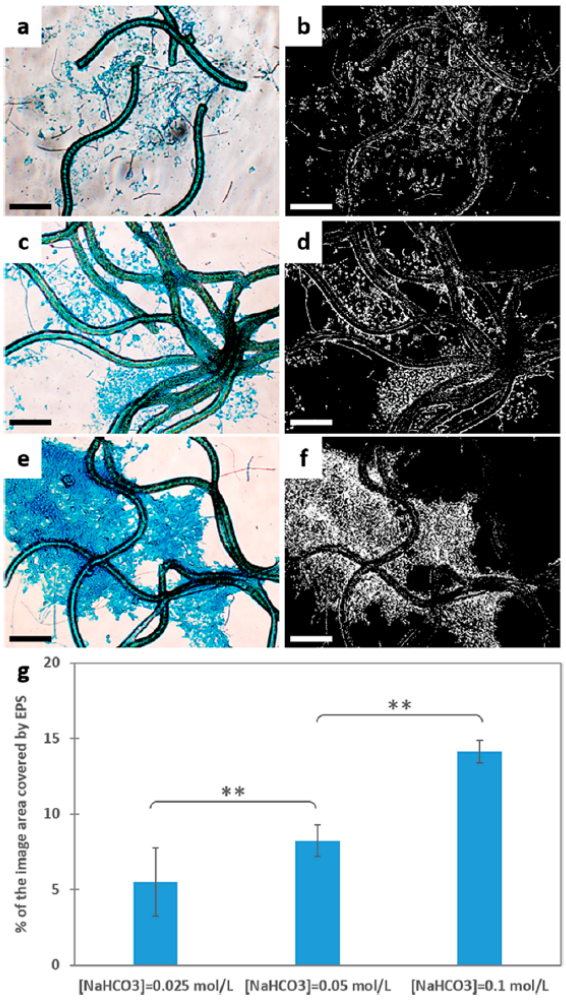


Figure 2. Optical imaging of EPS produced by *A. platensis* grown at different $NaHCO_3$ concentrations. Optical image of *A. platensis* cells from culture 1, grown at a $NaHCO_3$ concentration of (a) 0.025 mol/L, (c) 0.05 mol/L, and (e) 0.1 mol/L. The blue aggregates correspond to Alcian Blue-stained polysaccharides. Images in parts b, d, and f are the binary images of the blue signals from the images respectively in parts a, c, and e. The scale-bar corresponds to 50 μm. (g) Histogram showing the average percentage of the area covered by EPS for *A. platensis* cells cultured at the different $NaHCO_3$ concentrations. The stars indicate that the differences observed are significant at a *p*-value <0.05 (Mann–Whitney test).

concentration of 0.05 mol/L, and to 14.1 ± 0.7% at a concentration of 0.1 mol/L (differences are significant at a *p*-value <0.05, using the Mann–Whitney test). These analyses then allow us to quantitatively show the increase in EPS production with the bicarbonate concentration and to show that their relative quantity depends on the bicarbonate concentration. This observation proves that the bicarbonate concentration in the culture medium influences the production of EPS in our culture conditions, and that the more bicarbonate that was present, the more EPS that could be produced. This is the first time to our knowledge that this factor is showed to influence EPS production in *A. platensis* and, more generally, in cyanobacteria. Previous studies on this particular species have showed that factors influencing their production were light, temperature, and the cell's trophic mode.[14,11] More globally for cyanobacteria, other factors have been identified, such as phosphate, nitrogen, and sulfate deprivation or pH and aeration.[8] The positive influence of carbon availability on the EPS production that we observe here could be explained by the fact that cells use the carbon needed for their growth, and in favorable conditions (high temperature and high light intensity), they use the remaining available carbon to produce EPS.

We next wanted to understand the impact of bicarbonate concentration on cell growth. Indeed, in phosphate- or nitrogen-deprived conditions that also favor EPS production, cells do not grow and thus a balance must be met between EPS production and biomass. To evaluate if a low bicarbonate concentration also has impacts on the biomass production, we followed the cultures over 4 days using different concentrations, in three different cultures. The results, presented in Figure 3, show the changes in biomass concentration over time for the three different cultures (Figure 3a–c). The qualitative observation of these three cultures suggests that the $NaHCO_3$ concentration does not have a significant impact on the growth, even if a small effect can be observed in the case of the first culture. To quantitatively assess this point, the average growth factors were calculated in each case, and the histograms are presented in Figure 3d. We found that the average growth factor obtained for each bicarbonate concentrations over the three cultures was similar, thus indicating that even at the lowest bicarbonate concentration, the growth rate of the cells is not affected. Moreover, higher $NaHCO_3$ concentrations were also used (up to 0.25 mol/L) which also has no effects on the cell growth rate (data not showed). One interesting note, however, is that while the growth rate does not vary with the bicarbonate concentration, the final biomass concentration reached decreases in cultures 2 and 3 compared to culture 1. Indeed, in culture 1, the average final biomass concentration is approximately 1400 mg/L, while in culture 2 it is 1230 mg/L and in culture 3 it is 925 mg/L, even if the initial biomass concentrations are almost identical. This can be explained by the time cells spent in the inoculum-culturing PBR before being used for experiments (Figure 1). In this PBR, bicarbonate concentration is high (18.9 g/L), but temperature and light intensity are moderate. Previous work by Trabelsi et al. indicated that 30 °C with low light intensity still induces the production of EPS by the cells but at low quantity.[14] Thus, we can suppose that after 1 week in this PBR (culture 1), no or low quantity of EPS was produced, but that after 4 weeks (culture 2) and 7 weeks (culture 3), cells could have produced more EPS. Thus, when filtrating this biomass to inoculate the experiments PBRs, EPS are also retained and inoculated. Less biomass, in fact, is inoculated, which leads to lower biomass production in the end. Moreover, the presence of EPS in the medium has been shown to inhibit the cell growth.[15] These two reasons may explain why the final biomass concentration reached in the experiments PBRs decreases with the time the inoculated biomass spent in the inoculum-culturing PBR. Therefore, in the range of concentrations tested here, we show that the more bicarbonate present in the medium, the more EPS produced by the cells in optimal conditions of light and temperature. Another important point is that even at low bicarbonate concentration (2.1 g/L), cell growth is unaffected, if this concentration is maintained over the culture. Using

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796–13804

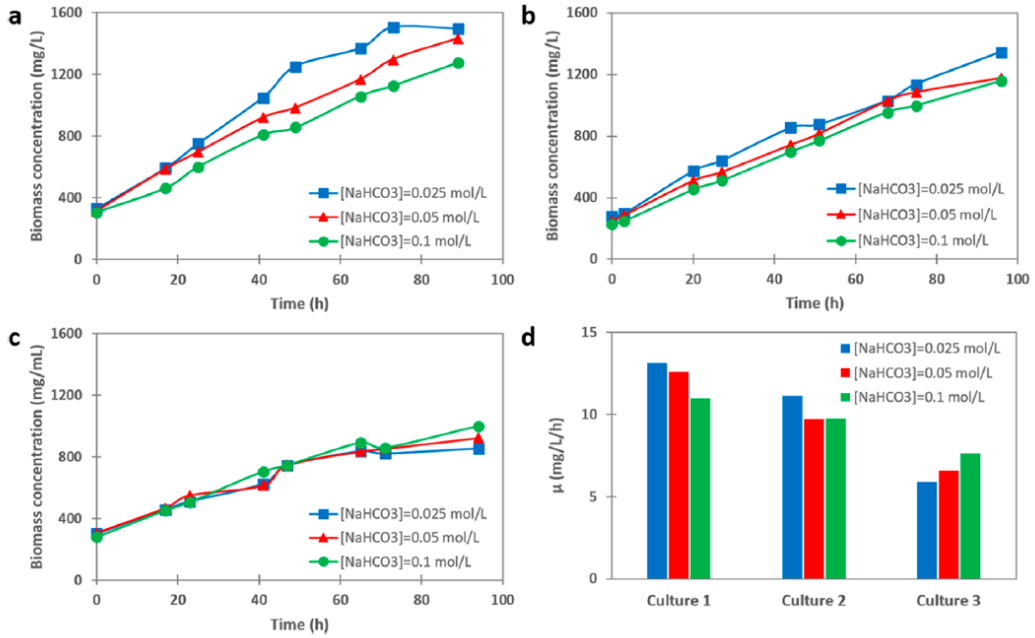


Figure 3. Growth rate of *A. platensis* under different $NaHCO_3$ concentrations. Biomass concentration as a function of time for (a) culture 1 (1 week of culture in the inoculum PBR), (b) culture 2 (4 weeks of culture in the inoculum PBR), and (c) culture 3 (7 weeks of culture in the inoculum PBR) at a $NaHCO_3$ concentration of 0.025 mol/L (blue line), 0.05 mol/L (red line), and 0.1 mol/L (green line). (d) Histogram showing the growth factor μ (mg/L/h) of the three different cultures at the different $NaHCO_3$ concentrations.

higher $NaHCO_3$ concentrations thus only increases the quantity of EPS produced by the cells and has no impact on the cell growth. But what about the effects of EPS production on harvesting?

The Presence of EPS Has a Positive Influence on the Flocculation/Flotation Efficiency. In an effort to determine if the EPS had an effect on harvesting, we performed flocculation/flotation harvesting experiments for each bicarbonate concentration and each culture. The results are presented in Figure 4, where Figure 4a shows images extracted from a video recording of the flocculation/flotation experiment in the case of the three experiments PBRs of culture 1. The full video recording is available in the Supporting Information. In these images, the flotation-test beakers are first filled with the cells grown at the different bicarbonate concentrations and left to flocculate during 20 min with gentle agitation. After this time, microbubbles are added (with increasing volume) and the beakers are left for 10 min. The images show that, in the case of low bicarbonate concentration (0.025 mol/L, left flotation-test beaker), only a small fraction of the cells float to the surface and the treated phase remains an intense green. For the intermediate bicarbonate concentration (0.05 mol/L, middle flotation-test beaker), a large fraction of the cells accumulate at the surface, while the treated phase contains cells, as judged by the less intense green color still visible. Finally, for the highest bicarbonate concentration (0.1 mol/L, right flotation-test beaker), most of the cells have reached the surface, and the treated phase is colorless. The treated phase was then filtered in each case; the remaining filters obtained in the case of culture 1 are shown in Figure 4b. We observe that for bicarbonate concentrations of 0.025 and 0.05 mol/L, cells remained on the filter (top and middle filters), and that in the case of a bicarbonate concentration of 0.1 mol/L, no cells are visible. However, in this case, a beige layer can be observed on the filter, which could correspond to the retention of EPS.

Finally, the efficiencies of harvesting were calculated using eq 2) by measuring the optical density in the treated phases; the results are presented in Figure 4c. We found that, in the case of the first culture (1 week in the inoculum preparing PBR), the efficiency at low bicarbonate concentration reaches only 7.4%, while for the higher concentrations it is 85.1% and 97.4%. Further increasing the $NaHCO_3$ concentration, up to 0.25 mol/L, did not further increase the harvesting efficiency (data not showed). In the case of the first culture, where no EPS coming from the inoculum are present, only the EPS produced during the 4 days of culture are present, and thus, only their effect on the flocculation/flotation is assessed. It seems, thus, that the EPS production is directly related to the flocculation/flotation efficiency, as the more EPS produced, the more efficient the harvesting. For cultures 2 and 3, an important point is that, at low bicarbonate concentration, the harvesting efficiency is increased in culture 2 to 41.3% and in culture 3 to 86.6%, whereas the cells in this condition do not produce EPS. As discussed previously, this can be explained by the fact that EPS produced in the inoculum-culturing PBR are transferred into the experiments PBRs; their presence enhances flocculation/flotation efficiency, even if they are not produced by the cells directly during the culture in the experiments PBRs. This further shows the direct correlation between the EPS and the flocculation/flotation efficiency, as EPS have a positive influence on the harvesting efficiency. To further show this correlation, we performed filtration experiments in the case of culture 1 (Supporting Information). We show that for cells with low bicarbonate concentration, both

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804

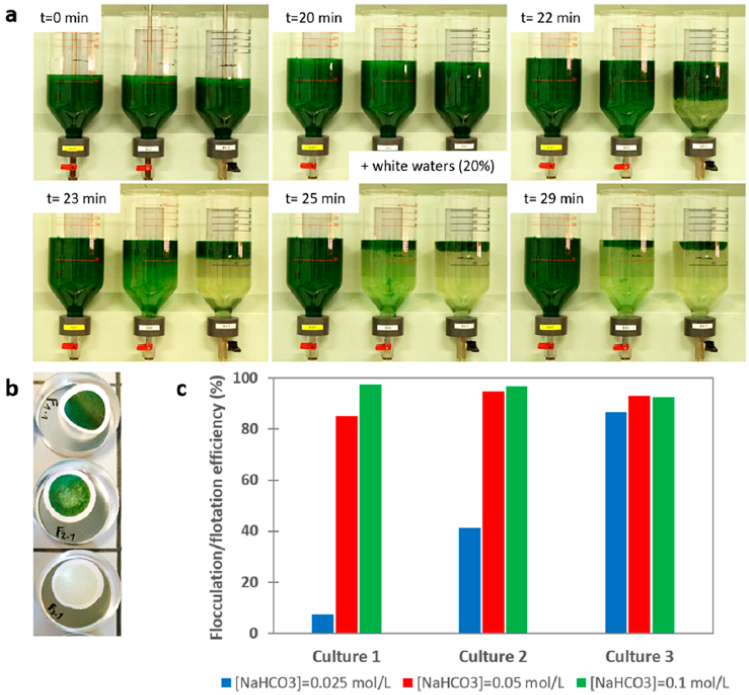


Figure 4. Flocculation/flotation harvesting of *A. platensis* at different $NaHCO_3$ concentrations. (a) Images extracted from a video recording of the flocculation/flotation of the cells from culture 1 in a laboratory-scale DAF device. The left flotation-test beaker contains cells grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.025 mol/L, the middle flotation-test beaker contains cells grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.05 mol/L, and the right flotation-test beaker contains cells grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.1 mol/L. Prior to white waters injection, the cells are left to flocculate during 20 min under agitation. (b) Photograph of filters used to filtrate the treated phase of the cells from culture 1 after flocculation/flotation. The top filter corresponds to the treated phase of cells grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.025 mol/L, the middle filter corresponds to the treated phase of cells grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.05 mol/L, and the bottom filter corresponds to the treated phase of cells grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.1 mol/L. (c) Histogram showing the flocculation/flotation efficiency of the cells from the three different cultures at the different $NaHCO_3$ concentrations.

the filtered biomass and the filtration flow rate are high. By increasing the bicarbonate concentration in the medium, these two measured parameters decreased. This finding is in accordance with the literature, where the EPS present can clog the membranes used, which results in low filtration efficiency.[15,20] So while the positive influence of EPS on flocculation/flotation harvesting is here clearly demonstrated, we next wanted to identify the basis of this positive influence.

EPS Induce *A. platensis* Bioflocculation. EPS, and more globally all the algal organic matter (AOM) excreted by microalgae cells during their growth, which include proteins, polysaccharides, nucleic acids, lipids, and small molecules, can be involved in microalgae flocculation. Several studies have shown the influence of AOM on induced flocculation (alkaline flocculation or flocculation induced by chitosan or cationic polymers) in a positive or negative way, as for example demonstrated for *Chlorella vulgaris* cells.[40,41] However, the direct role of EPS in bioflocculation has never been described for any microalgae species. For *A. platensis*, the only studies reporting cases of bioflocculation describe that nutrient-deprived conditions or high salinity can trigger an accumulation of carbohydrates in cells, which changes the density of the cells and allows their flocculation and settling. It is clear in these studies that no EPS are responsible for the flocculation observed.[25,27,29,28] In our study, the cells are not nutrient-deprived or grown at high salinities. As such, cells do not accumulate carbohydrates; therefore, the mechanism previously described cannot apply to our case. Thus, our hypothesis, given our harvesting results showing the direct link between EPS and flocculation/flotation efficiency, is that the EPS induces bioflocculation of the cells in our culture conditions, thus enhancing the efficiency of cell separation by flotation.

To verify this hypothesis we performed atomic force microscopy (AFM) imaging experiments on the EPS produced by the cells. We used an advanced imaging technique, called quantitative imaging, in which a bare tip is pushed toward the sample and retracted at high-speed over a matrix of points on the sample. Recorded force curves are then analyzed in different ways, so that correlated images of the structure, adhesion, and mechanics of the samples can be obtained simultaneously.[42] Such correlated images of isolated aggregates of EPS produced by *A. platensis* cells from culture 1 and grown at a bicarbonate concentration of 0.1 mol/L are presented in Figure 5. These images show that the EPS produced form a thick layer that reaches 4 μm in height, as shown by the cross-section (Figure 5b) taken along the gray line on the height image presented in Figure 5a. The image in Figure 5c shows the same EPS structure but from the nanomechanical point of view. To obtain this image, the force curves obtained were analyzed using a theoretical model, the Hertz model,[43] that allows extracting the Young modulus (Ym) of the sample. Ym refers to the resistance of the sample to the compression

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804

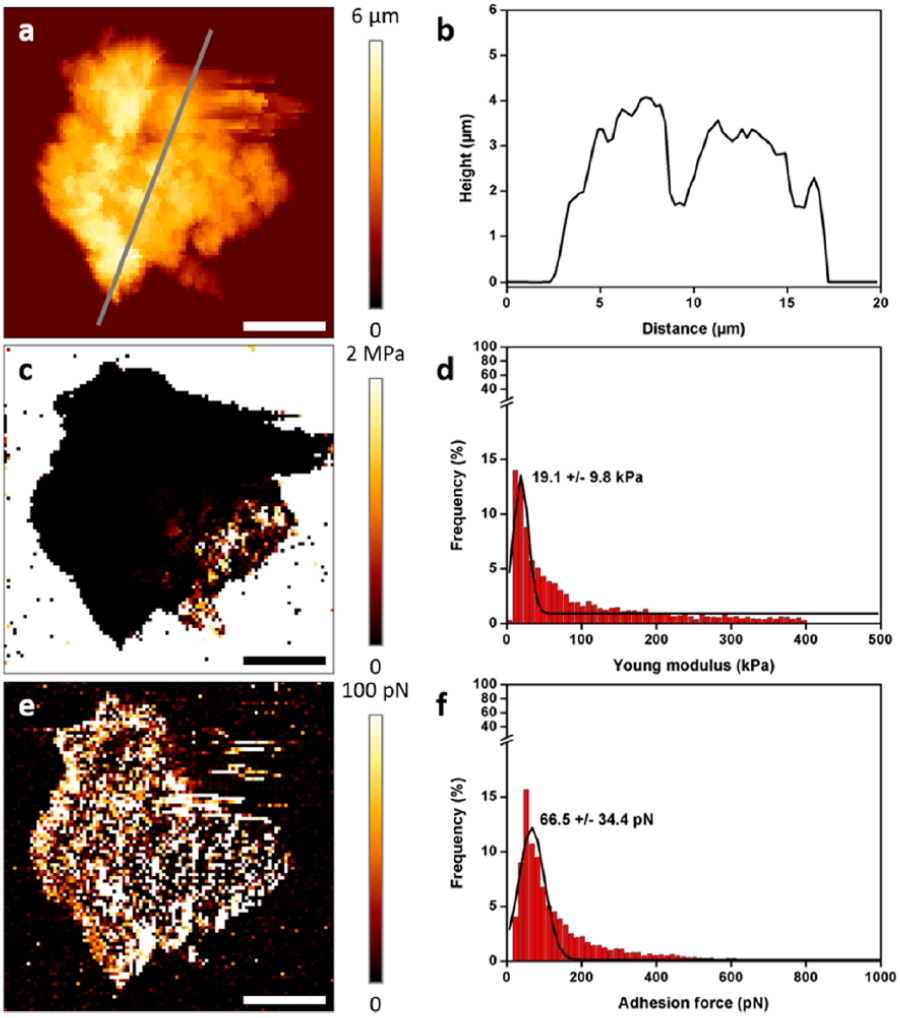


Figure 5. AFM multiparametric imaging of *A. platensis* EPS. (a) AFM height image of an isolated aggregate of EPS and (b) cross-section taken along the gray line in part a. (c) Corresponding nanomechanical image of the isolated EPS aggregate presented in part a. (d) Histogram presenting the distribution of the Young modulus values obtained on three different isolated aggregates of EPS. (e) Corresponding adhesion image of the isolated EPS aggregate presented in part a. (e) Histogram presenting the distribution of the adhesion values obtained on three different isolated aggregates of EPS. Scale-bars correspond to 5 μm.

exerted by the tip at a given applied force. The lower the Ym value, the softer the sample. The nanomechanical image (Figure 5c) shows that EPS is a rather soft structure (pixels corresponding to EPS are dark on the image), which is further confirmed by the quantification of the Ym values plotted in Figure 5d (n = 4976 force curves on three isolated EPS aggregates), yielding values of 19.1 ± 9.8 kPa. These values are consistent with Ym values reported for other types of extracellular organic matter from bacterial cells[44] and demonstrate that EPS from *A. platensis* form a soft gel-like structure surrounding the cells. Figure 5e is the adhesion image and represents the adhesive behavior of the EPS, which is assessed by measuring the interactions between the tip and the sample for each force curve; bright pixels on the image correspond to a high force interaction, meaning that the sample is adhesive. It is then clear on this image that EPS, forming a soft gel layer around the cells, are also adhesive (pixels corresponding to EPS are bright on the image), based on the adhesion values obtained: 66.5 ± 34.4 pN (n = 8059 force curves on three isolated EPS aggregates) (Figure 5f). These values are comparable with other type of extracellular polymers.[44] Thus, these results validate our hypothesis that EPS are responsible of the bioflocculation of the cells. Indeed, our nanoscale observations show that EPS form a soft and sticky gel in which the cells are enmeshed, resulting in their flocculation. This is also consistent with the observations from Alcian Blue staining that showed that cells are indeed entrapped in EPS aggregates (Figure 2b,c). We thus describe here an original bioflocculation mechanism in *A. platensis*, where the EPS produced by the cells under specific culture conditions stick to the cells and aggregate them in flocs. As a result, microbubbles produced in the flotation process trap microalgae flocs, thereby enhancing the harvesting efficiency.

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804

CONCLUSIONS

The work presented here identified a new factor influencing the EPS production in *A. platensis*. While temperatures superior to 30 °C and intense light are needed, the concentration of bicarbonate in the culture medium and thus the availability of carbon induced the production of EPS by the cells. In view of our observations within the concentration range tested, the more carbon available, the more EPS produced. We then showed that the induced production of EPS had a key role in harvesting. Indeed, EPS form a soft and adhesive gel that aggregates, trapping and thus bioflocculating cells, without requiring any addition of external flocculants. As a result, microbubbles produced in the flotation process were trapped in these microalgae flocs, which then allowed for their efficient separation from the water. We provide here culture conditions in which high biomass and EPS production is possible and for which a sustainable harvesting by flocculation/flotation results in separation efficiencies superior to 90%. These culture conditions can also be adapted for filtration harvesting. If filtration harvesting is preferred, we show that at a low bicarbonate concentration a high biomass production can be reached without production of EPS, which can clog filtration membranes. Further study is now required to characterize the EPS production for *A. platensis* in the conditions we describe and to determine the structure–function relationship of the different fractions of the EPS. More work should also be performed to investigate if this original EPS production and bioflocculation mechanism can also apply to different species of microalgae that are of industrial interest.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591.

Caption describing the harvesting video and a figure summarizing the filtration harvesting of *A. platensis* at different $NaHCO_3$ concentrations, showing filtered mass and filtration flow rate as a function of time (PDF)

Video recording of *A. platensis* cells from culture 1 grown at a $NaHCO_3$ concentration of 0.025 mol/L (left), 0.05 mol/L (middle), and 0.1 mol/L (right) (AVI)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: formosa@insa-toulouse.fr.

ORCID

C. Formosa-Dague: 0000-0002-8627-3784

Author Contributions

C.F.-D. and P.G. conceived the project. C.F.-D., J.-B.V., and V.G. conceived the experimental work. J.-B.V. performed the experiments. All authors discussed and interpreted the results. C.F.-D. wrote the manuscript. All authors reviewed, contributed to, and approved the final manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

C.F.-D. is a postdoctoral researcher supported by the AgreenSkills fellowship programme, which has received funding from the EU's Seventh Framework Programme under grant agreement No. FP7-609398 (AgreenSkills+contract). This work has been supported by the ANR JCJC project FLOTALG to C.F.-D. (ANR-18-CE43-0001-01) and by the project INSPIRO, cofunded by the EU-FEDER (Fonds Européen de Développement Régional), the Région Occitanie, France, and INSA-LISBP.

REFERENCES

(1) Kim, C.-J.; Jung, Y.-H.; Oh, H.-M. Factors Indicating Culture Status during Cultivation of Spirulina (Arthrospira) Platensis. *J. Microbiol. Seoul Korea* **2007**, *45* (2), 122–127.

(2) Raja, R.; Coelho, A.; Hemaiswarya, S.; Kumar, P.; Carvalho, I. S.; Alagarsamy, A. Applications of Microalgal Paste and Powder as Food and Feed: An Update Using Text Mining Tool. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2018**, *7* (4), 740–747.

(3) Dillon, J. C.; Phuc, A. P.; Dubacq, J. P. Nutritional Value of the Alga Spirulina. *World Rev. Nutr. Diet.* **1995**, *77*, 32–46.

(4) Rodrigues, M. S.; Ferreira, L. S.; Converti, A.; Sato, S.; de Carvalho, J. C. M. Influence of Ammonium Sulphate Feeding Time on Fed-Batch Arthrospira (Spirulina) Platensis Cultivation and Biomass Composition with and without PH Control. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (11), 6587–6592.

(5) de la Jara, A.; Ruano-Rodriguez, C.; Polifrone, M.; Assunçao, P.; Brito-Casillas, Y.; Wägner, A. M.; Serra-Majem, L. Impact of Dietary Arthrospira (Spirulina) Biomass Consumption on Human Health: Main Health Targets and Systematic Review. *J. Appl. Phycol.* **2018**, *30* (4), 2403–2423.

(6) Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101* (2), 87–96.

(7) Finamore, A.; Palmery, M.; Bensehaila, S.; Peluso, I. Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly Spirulina. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 3247528.

(8) Pereira, S.; Zille, A.; Micheletti, E.; Moradas-Ferreira, P.; De Philippis, R.; Tamagnini, P. Complexity of Cyanobacterial Exopolysaccharides: Composition, Structures, Inducing Factors and Putative Genes Involved in Their Biosynthesis and Assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33* (5), 917–941.

(9) Markou, G.; Nerantzis, E. Microalgae for High-Value Compounds and Biofuels Production: A Review with Focus on Cultivation under Stress Conditions. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (8), 1532–1542.

(10) Raposo, M. F. de J.; de Morais, R. M. S. C.; Bernardo de Morais, A. M. M. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (1), 233–252.

(11) Trabelsi, L.; Ben Ouada, H.; Zili, F.; Mazhoud, N.; Ammar, J. Evaluation of Arthrospira Platensis Extracellular Polymeric Substances Production in Photoautotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Conditions. *Folia Microbiol. (Dordrecht, Neth.)* **2013**, *58* (1), 39–45.

(12) Delattre, C.; Pierre, G.; Laroche, C.; Michaud, P. Production, Extraction and Characterization of Microalgal and Cyanobacterial Exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34* (7), 1159–1179.

(13) Trabelsi, L.; M'sakni, N. H.; Ben Ouada, H.; Bacha, H.; Roudesli, S. Partial Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by Cyanobacterium Arthrospira Platensis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2009**, *14* (1), 27–31.

(14) Trabelsi, L.; Ben Ouada, H.; Bacha, H.; Ghoul, M. Combined Effect of Temperature and Light Intensity on Growth and Extracellular Polymeric Substance Production by the Cyanobacterium Arthrospira Platensis. *J. Appl. Phycol.* **2009**, *21* (4), 405–412.

(15) Depraetere, O.; Pierre, G.; Noppe, W.; Vandamme, D.; Foubert, I.; Michaud, P.; Muylaert, K. Influence of Culture Medium Recycling on the Performance of Arthrospira Platensis Cultures. *Algal Res.* **2015**, *10*, 48–54.

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796–13804

(16) Molina Grima, E.; Belarbi, E. H.; Acien Fernandez, F. G.; Robles Medina, A.; Chisti, Y. Recovery of Microalgal Biomass and Metabolites: Process Options and Economics. *Biotechnol. Adv.* **2003**, *20* (7−8), 491−515.
(17) Rossi, N.; Petit, I.; Jaouen, P.; Legentilhomme, P.; Derouiniot, M. Harvesting of Cyanobacterium Arthrospira Platensis Using Inorganic Filtration Membranes. *Sep. Sci. Technol.* **2005**, *40* (15), 3033−3050.
(18) Rossi, N.; Jaouen, P.; Legentilhomme, P.; Petit, I. Harvesting of Cyanobacterium Arthrospira Platensis Using Organic Filtration Membranes. *Food Bioprod. Process.* **2004**, *82* (3), 244−250.
(19) Drexler, I. L. C.; Yeh, D. H. Membrane Applications for Microalgae Cultivation and Harvesting: A Review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* **2014**, *13* (4), 487−504.
(20) Rossi, N.; Derouiniot-Chaplain, M.; Jaouen, P.; Legentilhomme, P.; Petit, I. Arthrospira Platensis Harvesting with Membranes: Fouling Phenomenon with Limiting and Critical Flux. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99* (14), 6162−6167.
(21) Barros, A. I.; Gonçalves, A. L.; Simões, M.; Pires, J. C. M. Harvesting Techniques Applied to Microalgae: A Review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2015**, *41*, 1489−1500.
(22) Morist, A.; Montesinos, J. L.; Cusidó, J. A.; Gòdia, F. Recovery and Treatment of Spirulina Platensis Cells Cultured in a Continuous Photobioreactor to Be Used as Food. *Process Biochem.* **2001**, *37* (5), 535−547.
(23) Pragya, N.; Pandey, K. K.; Sahoo, P. K. A Review on Harvesting, Oil Extraction and Biofuels Production Technologies from Microalgae. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2013**, *24*, 159−171.
(24) Garg, S.; Wang, L.; Schenk, P. M. Flotation Separation of Marine Microalgae from Aqueous Medium. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *156*, 636−641.
(25) Kim, S. G.; Choi, A.; Ahn, C. Y.; Park, C. S.; Park, Y. H.; Oh, H. M. Harvesting of Spirulina Platensis by Cellular Flotation and Growth Stage Determination. *Lett. Appl. Microbiol.* **2005**, *40* (3), 190−194.
(26) Vandamme, D.; Foubert, I.; Muylaert, K. Flocculation as a Low-Cost Method for Harvesting Microalgae for Bulk Biomass Production. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31* (4), 233−239.
(27) Markou, G.; Chatzipavlidis, I.; Georgakakis, D. Carbohydrates Production and Bio-Flocculation Characteristics in Cultures of Arthrospira (Spirulina) Platensis: Improvements Through Phosphorus Limitation Process. *BioEnergy Res.* **2012**, *5* (4), 915−925.
(28) Depraetere, O.; Pierre, G.; Deschoenmaeker, F.; Badri, H.; Foubert, I.; Leys, N.; Markou, G.; Wattiez, R.; Michaud, P.; Muylaert, K. Harvesting Carbohydrate-Rich Arthrospira Platensis by Spontaneous Settling. *Bioresour. Technol.* **2015**, *180*, 16−21.
(29) Toyoshima, M.; Aikawa, S.; Yamagishi, T.; Kondo, A.; Kawai, H. A Pilot-Scale Floating Closed Culture System for the Multicellular Cyanobacterium Arthrospira Platensis NIES-39. *J. Appl. Phycol.* **2015**, *27* (6), 2191−2202.
(30) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56* (9), 930−934.
(31) Besson, A.; Guiraud, P. High-PH-Induced Flocculation-Flotation of the Hypersaline Microalga Dunaliella Salina. *Bioresour. Technol.* **2013**, *147*, 464−470.
(32) Besson, A.; Formosa-Dague, C.; Guiraud, P. Flocculation-Flotation Harvesting Mechanism of *Dunaliella salina*: From Nanoscale Interpretation to Industrial Optimization. *Water Res.* **2019**, *155*, 352.
(33) Passow, U.; Alldredge, A. L. Distribution, Size and Bacterial-Colonization of Transparent Exopolymer Particles (TEP) in the Ocean. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **1994**, *113*, 185−198.
(34) Francius, G.; Tesson, B.; Dague, E.; Martin-Jézéquel, V.; Dufrêne, Y. F. Nanostructure and Nanomechanics of Live Phaeodactylum Tricornutum Morphotypes. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10* (5), 1344−1356.
(35) Zarrouk, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spiruline maxima (Setch et Gardner) Geitler. PhD Thesis, Univeristé de Paris, Paris, 1966.
(36) Miller, A. G.; Colman, B. Evidence for HCO3- Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) Coccochloris Peniocystis1. *Plant Physiol.* **1980**, *65* (2), 397−402.
(37) Filali Mouhim, R.; Cornet, J.-F.; Fontane, T.; Fournet, B.; Dubertret, G. Production, Isolation and Preliminary Characterization of the Exopolysaccharide of the Cyanobacterium Spirulina Platensis. *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15* (6), 567−572.
(38) Reddy, K. J.; Soper, B. W.; Tang, J.; Bradley, R. L. Phenotypic Variation in Exopolysaccharide Production in the Marine, Aerobic Nitrogen-Fixing Unicellular Cyanobacterium Cyanothece Sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *12* (4), 311−318.
(39) Shiraishi, H. Association of Heterotrophic Bacteria with Aggregated Arthrospira Platensis Exopolysaccharides: Implications in the Induction of Axenic Cultures. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2015**, *79* (2), 331−341.
(40) Vandamme, D.; Foubert, I.; Fraeye, I.; Muylaert, K. Influence of Organic Matter Generated by Chlorella Vulgaris on Five Different Modes of Flocculation. *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 508−511.
(41) Beuckels, A.; Depraetere, O.; Vandamme, D.; Foubert, I.; Smolders, E.; Muylaert, K. Influence of Organic Matter on Flocculation of Chlorella Vulgaris by Calcium Phosphate Precipitation. *Biomass Bioenergy* **2013**, *54*, 107−114.
(42) Chopinet, L.; Formosa, C.; Rols, M. P.; Duval, R. E.; Dague, E. Imaging Living Cells Surface and Quantifying Its Properties at High Resolution Using AFM in QI™ Mode. *Micron* **2013**, *48*, 26−33.
(43) Hertz, H. Ueber Die Beruhrung Fester Elastischer Korper. *J. Reine Angew. Math.* **1881**, *92*, 156−171.
(44) Formosa-Dague, C.; Feuillie, C.; Beaussart, A.; Derclaye, S.; Kucharíková, S.; Lasa, I.; Van Dijck, P.; Dufrêne, Y. F. Sticky Matrix: Adhesion Mechanism of the Staphylococcal Polysaccharide Intercellular Adhesin. *ACS Nano* **2016**, *10* (3), 3443−3452.

DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01591
ACS Sustainable Chem. Eng. 2019, 7, 13796−13804