



**HAL**  
open science

**Étude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur.  
Établissement d'un modèle structuré. Applications à un  
écosystème clos artificiel.**

Jean-François Cornet

► **To cite this version:**

Jean-François Cornet. Étude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur. Établissement d'un modèle structuré. Applications à un écosystème clos artificiel.. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Paris XI Orsay, 1992. Français. NNT: . tel-01302386

**HAL Id: tel-01302386**

**<https://hal.science/tel-01302386>**

Submitted on 14 Apr 2016

**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.

ORSAY  
N° d'ordre : 1989

**UNIVERSITE DE PARIS - SUD**  
**CENTRE D'ORSAY**

**THESE**

présentée  
pour obtenir

Le **GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES**  
**DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

**PAR**

**Jean - François CORNET**

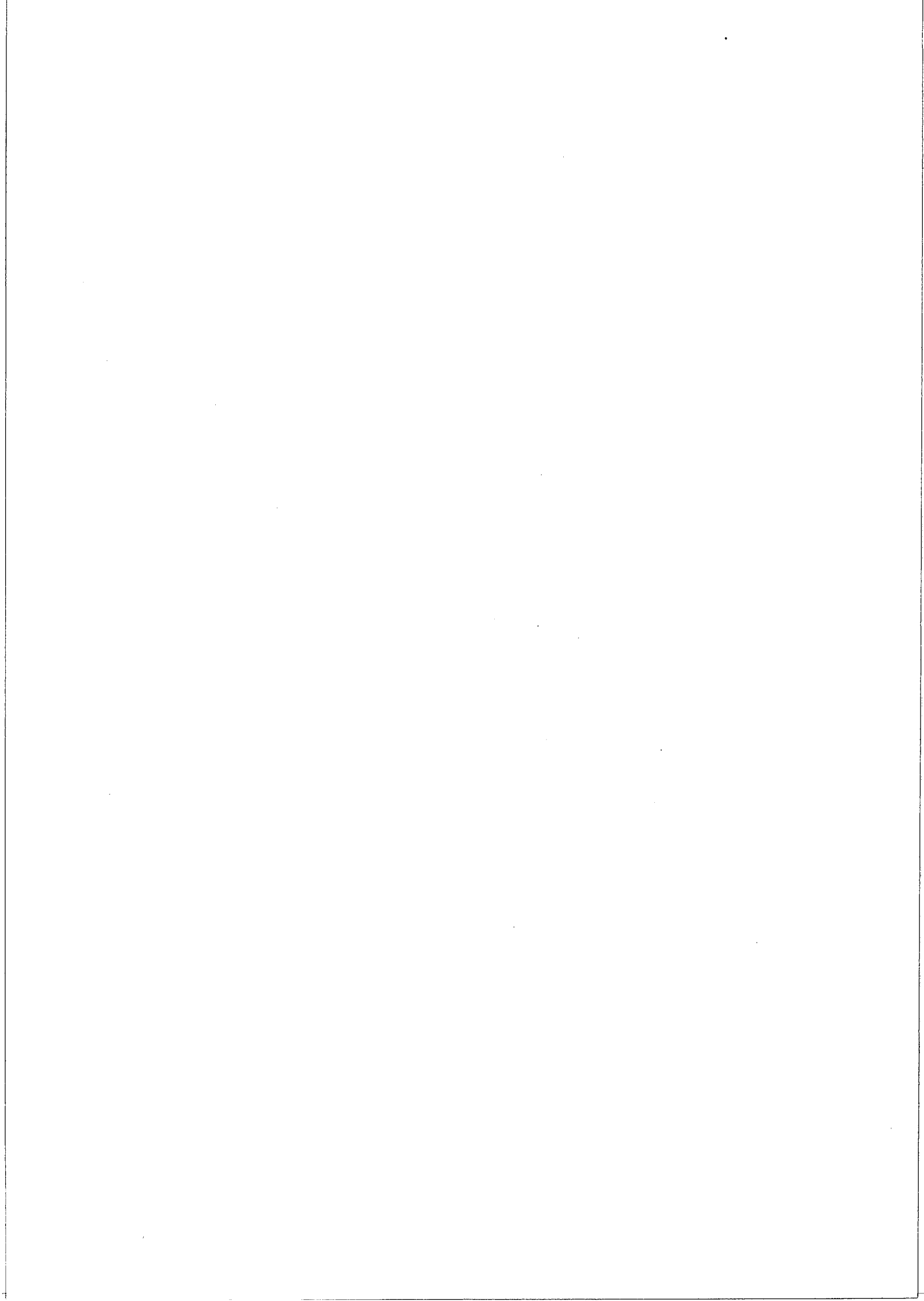
---

**SUJET: ETUDE CINETIQUE ET ENERGETIQUE D'UN PHOTOBIOREACTEUR**  
**ETABLISSEMENT D'UN MODELE STRUCTURE.**  
**APPLICATIONS A UN ECOSYSTEME CLOS ARTIFICIEL.**

Soutenue le 27 février 1992 devant la Commission d'Examen:

**MM. B. SAUGIER                      Président**  
**G. DUBERTRET**  
**C.G. DUSSAP**  
**J.M. BRIANTAIS**  
**J.B. GROS**

**Membres invités: R.A. BINOT**  
**C. CHIPAUX**



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement la société MATRA ESPACE pour laquelle j'ai réalisé ce travail, et particulièrement Claude CHIPAUX qui m'a fait confiance pour le mener à bien et m'a toujours encouragé.

Je remercie également Antoine TREMOLIERES, directeur du laboratoire de Biochimie Fonctionnelle des Membranes Végétales du CNRS de Gif sur Yvette de m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire où j'ai effectué cette étude. J'y ai travaillé dans une ambiance idéale et j'y ai trouvé un excellent directeur de thèse en la personne de Guy DUBERTRET, que je remercie profondément pour l'aide qu'il m'a apportée et la grande disponibilité dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Je ne saurais bien sûr oublier tous les membres du laboratoire de Biochimie Fonctionnelle des Membranes Végétales qui m'ont rapidement adopté et qui ont contribué à conférer un cadre amical et chaleureux à la réalisation de ce travail. A travers eux, je remercie particulièrement l'ami et le photographe de talent qu'est Roland BOYER, et également Catherine GERARD-HIRNE pour sa précieuse aide technique, Michel HOURS pour m'avoir fait profiter de ses compétences en matière de biotechnologie, et Alain PICAUD qui a bien voulu relire et corriger le présent ouvrage.

S'il est une personne dont j'apprécie le jugement et la compétence scientifique depuis maintenant de nombreuses années, c'est bien mon ami et maître spirituel Claude-Gilles DUSSAP du laboratoire de Génie Chimique Biologique de l'Université B. Pascal de Clermont-Ferrand, que je remercie vivement pour le temps qu'il a consacré au suivi des aspects théoriques et technologiques de cette thèse.

D'autre part, monsieur Bernard SAUGIER, du laboratoire d'Ecologie Végétale de l'Université d'Orsay, m'a fait confiance en acceptant la responsabilité de cette thèse et je lui en sais gré.



Je voudrais également témoigner ma profonde sympathie aux personnes qui ont accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail, c'est-à-dire messieurs Jean-Bernard GROS, directeur du laboratoire de Génie Chimique Biologique de l'Université de Clermont-Ferrand, et Jean-Marie BRIANTAIS du laboratoire d'Ecologie Végétale de l'Université d'Orsay. Il en va de même pour monsieur Roger BINOT, de l'Agence Spatiale Européenne, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens également à remercier ici monsieur Jean-Marie TEULER, du Centre Inter Régional de Calcul Electronique d'Orsay, pour la remarquable disponibilité dont il a fait preuve ainsi que pour ses précieux conseils en calcul intensif.

Je n'oublie pas non plus les organismes qui ont participé au support financier de cette étude, et sans lesquels ce travail n'aurait certainement pas été possible. J'ai nommé le Centre National d'Etudes Spatiales, l'Agence Spatiale Européenne, et la direction des sciences de la vie du CNRS.

Enfin, je terminerai ces remerciements à l'adresse des nombreux stagiaires qui ont travaillé à mes côtés et qui ont contribué à mener cette étude à terme. Ils ont pour nom Rémi FILALI-MOUHIM, Patrick CLUZEL, Philippe PREAUDAT, Gaël RUCHE, Lionel MEUNIER, et Emmanuelle ARNAUD.

## PREAMBULE

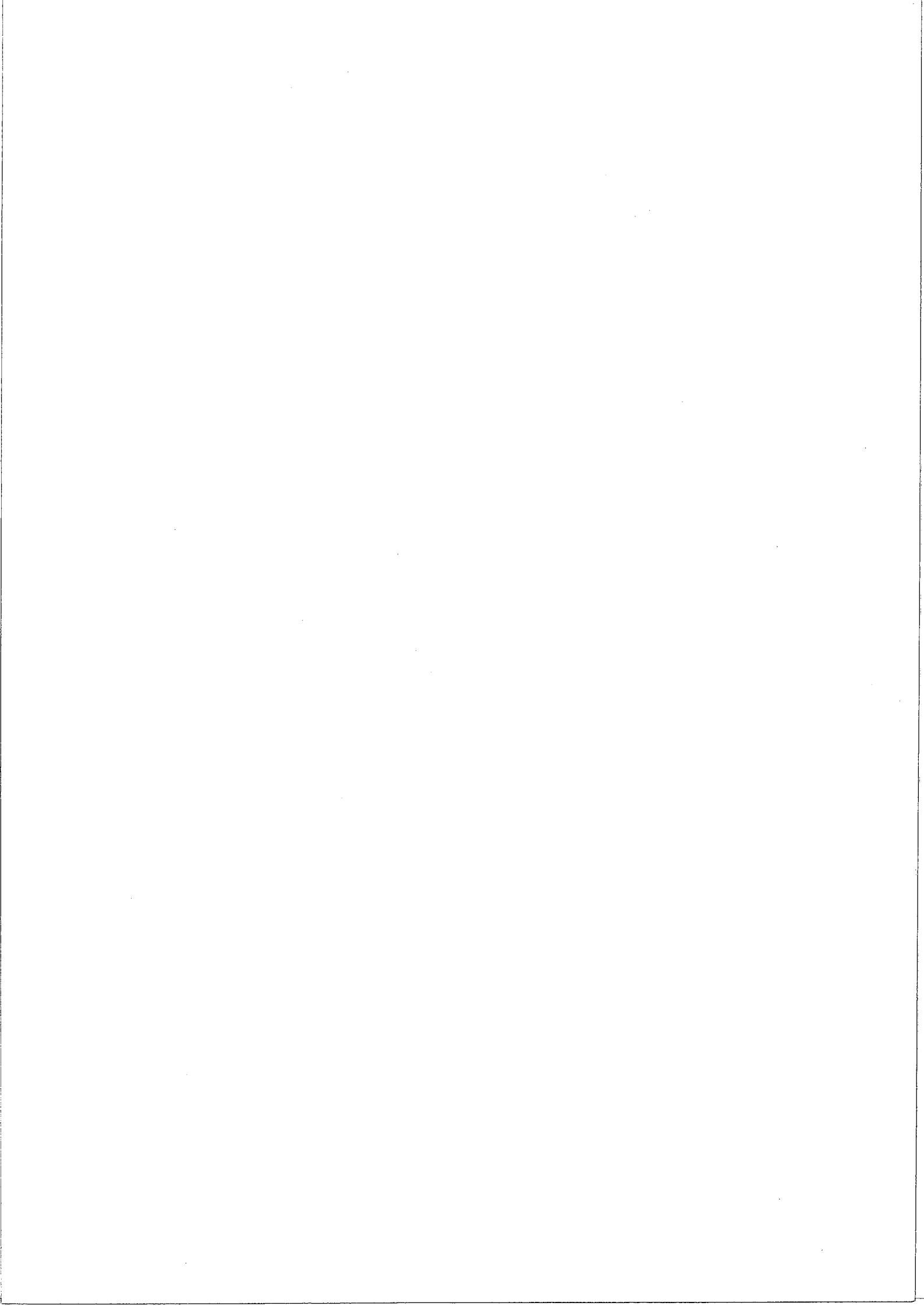
Ἐο σὺφρων ἐπίσταται ὅτι οὐδεν οἶδεν.

SOCRATE 469-399 av. J.C.

Le présent travail s'inscrit dans un vaste projet de recherches dans le domaine spatial, devant se poursuivre jusqu'au début du vingt et unième siècle. Il est donc destiné à être utilisé et exploité par des personnes d'horizons scientifiques très différents. C'est pourquoi d'aucuns le trouveront sans doute un peu trop long et détaillé, mais j'en assume pleinement la responsabilité car il m'a semblé important d'en faire un document relativement exhaustif qui puisse servir de base de travail.

Les unités adoptées dans cet ouvrage sont le plus souvent celles du Système International. Deux exceptions notables sont toutefois à signaler. Il s'agit des unités données au chapitre 2 qui sont adaptées aux méthodes présentées, et du choix de l'heure comme unité de temps pour les cinétiques de croissance de dynamique lente.

Le nombre de variables intervenant dans cet ouvrage étant important, il n'a pas toujours été possible de leur faire correspondre une lettre particulière. Certaines lettres représentent donc plusieurs variables, mais dans des parties indépendantes, et leur signification est alors précisée avant l'emploi de façon à éviter toute confusion.



## SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE 1: CAHIER DES CHARGES POUR LA MODELISATION DES PHOTOBIOREACTEURS ET SON APPLICATION AUX ECOSYSTEMES CLOS ARTIFICIELS</u>	5
1.1. INTERET DES PHOTOBIOREACTEURS ET CONTEXTE GENERAL	6
1.2. LES ECOSYSTEMES CLOS ARTIFICIELS	11
1.2.1. Définitions et généralités	11
1.2.2. Le compartiment photosynthétique	17
1.2.3. Le projet MELISSA	19
1.3. MODELISATION MATHEMATIQUE DES ECOSYSTEMES CLOS ARTIFICIELS	23
1.3.1. Complexité de la mise en équations des écosystèmes clos artificiels et de l'étude des solutions	23
1.3.2. Démarche requise pour la modélisation d'un écosystème clos artificiel	29
1.3.3. limites de la modélisation d'un écosystème clos artificiel	30
1.4. APPROCHE MODULAIRE SEQUENTIELLE	31
1.4.1. La méthode	32
1.4.2. Le module compartiment photosynthétique	33
CONCLUSION	35

<b><u>CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES</u></b>	37
<b>2.1. LA SOUCHE, SON ENTRETIEN, ET LES MILIEUX DE CULTURE</b>	38
2.1.1. Purification	38
2.1.2. Vérification de la pureté de la souche	38
2.1.3. Les milieux de culture de <i>Spirulina platensis</i>	39
2.1.4. Entretien de la souche	41
<b>2.2. ELECTRODES A OXYGENE DISSOUS, ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE ET DE LA RESPIRATION</b>	41
2.2.1. Electrode de Clark	41
2.2.2. Electrode de Haxo-Blinks	43
<b>2.3. LES SPECTRES D'EMISSION DE FLUORESCENCE</b>	47
<b>2.4. LES PHOTOREACTEURS ET LES CULTURES CONTROLEES</b>	47
2.4.1. Les cultures en fiole de Roux	47
2.4.2. Les cultures en cuve agitée	51
<b>2.5. MESURE DES FLUX LUMINEUX</b>	59
<b>2.6. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LA PHASE LIQUIDE</b>	61
2.6.1. Poids secs	61
2.6.2. Dosage de la biomasse active et de la biomasse totale	61
2.6.3. Dosage des pigments photosynthétiques	63
2.6.4. Dosage des protéines	65
2.6.5. Dosage des sucres totaux	67
2.6.6. Méthodes d'extraction de l'exopolysaccharide et de détermination de sa composition	67

2.6.7. Dosage de l'exopolysaccharide	67
2.6.8. Dosage des nitrates	69
A - L'ELECTRODE SPECIFIQUE A NITRATES	69
B - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DANS LE VISIBLE	70
C - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DANS L'ULTRAVIOLET	70
2.6.9. Dosage des sulfates	71
2.6.10. Dosage des phosphates	72
2.6.11. Dosage des lipides totaux	73
2.6.12. Dosage des bicarbonates et carbonates	73
2.7. DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE TRANSFERT ET DES TEMPS DE MELANGE DANS LE REACTEUR A CUVE AGITEE	73
2.7.1. Détermination des temps de mélange	73
2.7.2. Détermination des coefficients volumétriques de transfert	74
2.8. METHODES DE MESURE DES COEFFICIENTS D'EXTINCTION DE LAMBERT ET DES COEFFICIENTS D'ABSORPTION ET DE DIFFUSION VRAIES DE LA LUMIERE	75
2.8.1 Obtention de l'atténuation semi-intégrale	76
2.8.2. Méthode de mesure des coefficients d'absorption, de diffusion, et d'extinction de Lambert relatifs à chaque longueur d'onde	79
A - COEFFICIENT D'EXTINCTION DE LAMBERT	79
B - COEFFICIENTS D'ABSORPTION ET DE DIFFUSION	79
2.8.3. Détermination des coefficients globaux	81
A - COEFFICIENTS D'EXTINCTION GLOBAUX	81
B - COEFFICIENTS D'ABSORPTION ET DE DIFFUSION GLOBAUX	82
2.9. METHODE DE MESURE DE LA VITESSE VOLUMETRIQUE D'ABSORPTION DE L'ENERGIE LUMINEUSE DANS UN PHOTOREACTEUR PARALLELEPIPEDIQUE	83

2.10. ETUDE RHEOLOGIQUE	84
2.11. ANALYSES ELEMENTAIRES	84
2.12. MATERIEL INFORMATIQUE ET METHODES NUMERIQUES	84
<b><u>CHAPITRE 3: RESULTATS RELATIFS A LA PHYSIOLOGIE ET A LA CROISSANCE DE <i>Spirulina platensis</i></u></b>	87
3.1. RESULTATS RELATIFS A LA PHYSIOLOGIE ET AU METABOLISME DE <i>Spirulina platensis</i>	88
3.1.1. Le microorganisme <i>Spirulina platensis</i>	88
A - CLASSIFICATION ET MORPHOLOGIE	88
B - COMPOSITION ET QUALITE NUTRITIVE	92
C - CONDITIONS DE CULTURE	95
D - DONNEES METABOLIQUES	96
3.1.2. Etude de la photosynthèse chez <i>Spirulina platensis</i>	102
A - SATURATION ET INHIBITION DE LA PHOTOSYNTHESE. EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE LA TENEUR EN PHYCOCYANINES	102
B - ETUDE DE L'INHIBITION DE RESPIRATION A LA LUMIERE	107
C - CARACTERISATION DES PIGMENTS CHEZ <i>S. platensis</i> ET ADAPTATION CHROMATIQUE	109
D - SPECTRES D'ACTION DE LA PHOTOSYNTHESE ET DE L'INHIBITION DE RESPIRATION	113
3.1.3. Effet de la température sur la respiration de <i>Spirulina platensis</i>	115
3.1.4. Effet de la force ionique sur la physiologie et la croissance de <i>Spirulina platensis</i>	116
3.1.5. Effet de l'agitation	119
3.1.6. L'exopolysaccharide de <i>Spirulina platensis</i>	120
A - COMPOSITION ET STRUCTURE	120
B - RHEOLOGIE	121

C - CINETIQUE DE PRODUCTION DU POLYSACCHARIDE	124
3.1.7. Etablissement des stoechiométries	124
3.2. RESULTATS CONCERNANT LA CULTURE EN MASSE DE <i>Spirulina platensis</i>	127
3.2.1. Aspects liés à la limitation par la lumière et à la respiration à l'obscurité	128
A - CULTURES EN PHOTOBIOREACTEUR. INFLUENCE DE LA VITESSE D'ABSORPTION DE L'ENERGIE LUMINEUSE	128
B - CULTURES EN PHOTOBIOREACTEUR. INFLUENCE DE LA QUALITE DE LA LUMIERE	134
3.2.2. Limitation par la concentration en nitrates	140
3.2.3. Limitation par la concentration en sulfates	149
3.2.4. Limitation par la concentration en phosphates	151
3.2.5. Etude cinétique de production de l'exopolysaccharide	155
3.2.6. Limitation par la source de carbone et par le transfert de gaz. Bilans gazeux sur le réacteur	157
CONCLUSION	166
<u>CHAPITRE 4: LIMITATIONS PHYSIQUES DANS LES PHOTOBIOREACTEURS</u>	169
4.1. INTRODUCTION	170
4.2. LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE LUMIERE ET BILAN ENERGETIQUE	171
4.2.1. Revue bibliographique	171
4.2.2. Bilans d'énergie sur un fluide absorbant et diffusant la lumière.	
Application aux photobioréacteurs	174
A - PHASE MATERIELLE	175
B - PHASE PHOTONIQUE	177
C - BILAN D'ENERGIE LOCAL SUR UN	



PHOTOBIOREACTEUR	203
D - BILANS D'ENERGIE GLOBAUX SUR UN PHOTOBIOREACTEUR	204
<b>4.3. LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE CO<sub>2</sub>.</b>	
<b>BILANS GAZEUX</b>	207
<b>4.3.1. Transfert de CO<sub>2</sub> dans les milieux de culture complexes à pH alcalin</b>	207
A - DIFFERENTS REGIMES DE TRANSFERT POUR LE CO <sub>2</sub>	208
B - ACCELERATION DU TRANSFERT PAR REACTION CHIMIQUE	211
C - MODELE REACTIONNEL PROPOSE POUR L'ECRITURE DES BILANS MASSIQUES SUR LA PHASE LIQUIDE	220
D - MODELE DIFFERENTIEL SUR LES PHASES GAZ ET LIQUIDE POUR LE SYSTEME CO <sub>2</sub> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	223
<b>4.3.2. Détermination de la vitesse volumétrique de production d'oxygène. Obtention du quotient photosynthétique par bilans gazeux</b>	228
<b>4.3.3. Propriétés physico-chimiques relatives à l'oxygène et au système CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> dans les milieux de culture à force ionique élevée</b>	231
A - SOLUBILITE DE L'OXYGENE	232
B - SOLUBILITE DU CO <sub>2</sub> ET DETERMINATION DES COEFFICIENTS D'ACTIVITE DU SYSTEME CO <sub>2</sub> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	233
<b>4.4 HYDRODYNAMIQUE, PUISSANCE DISSIPÉE ET OBTENTION DES COEFFICIENTS VOLUMÉTRIQUES DE TRANSFERT DANS LES MILIEUX DE CULTURE NON NEWTONIENS</b>	235
<b>4.4.1. Puissance dissipée dans les cuves agitées aérées</b>	236
<b>4.4.2. Temps de mélange et de circulation dans les cuves agitées</b>	239
<b>4.4.3. Obtention des coefficients volumétriques de transfert</b>	241

CONCLUSION	243
<b><u>CHAPITRE 5: MODELISATION MATHEMATIQUE DE LA CULTURE DE</u></b> <b><u>Spirulina platensis EN PHOTOBIOREACTEUR</u></b>	245
5.1. MODELES MATHEMATIQUES NON STRUCTURES	246
5.1.1. Interactions entre le transfert de lumière et le métabolisme des microorganismes photosynthétiques	246
A - INTRODUCTION	246
B - OBTENTION DES VITESSES LOCALES DE CROISSANCE DANS LES PHOTOBIOREACTEURS	248
C - OBTENTION DES VITESSES GLOBALES DE CROISSANCE DANS LES PHOTOBIOREACTEURS	252
D - BILAN ENTHALPIQUE	256
5.1.2. Résultats	257
A - LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE LUMIERE	257
B - LIMITATIONS BIOLOGIQUES PAR LES MINERAUX	268
C - LIMITATION BIOLOGIQUE PAR LA SOURCE DE CARBONE, LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE CO <sub>2</sub>	275
5.2. MODELES MATHEMATIQUES BIOCHIMIQUEMENT STRUCTURES DE LA PHOTOSYNTHESE	280
5.2.1. Intérêt de ces modèles	281
5.2.2. Etablissement des stoechiométries	282
5.2.3. Analyse thermodynamique du couplage phosphorylation-photosynthèse	287
5.2.4. Résultats préliminaires	296
A - VALIDATION DES STOECHIOMETRIES	296
B - VALIDATION DES VALEURS THEORIQUES DE P/2e <sup>-</sup>	298
5.3. APPLICATION DES MODELES DEVELOPPES AUX CULTURES EN CONTINU	300

<u>CONCLUSION</u>	309
<u>NOMENCLATURE</u>	319
<u>ABREVIATIONS</u>	331
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	333

## INTRODUCTION

Les écosystèmes clos artificiels sont des systèmes de support de la vie qui échangent uniquement de l'énergie avec l'extérieur. Ils sont donc capables de recycler les éléments principaux en masse que sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le soufre, et le phosphore, et qui sont nécessaires à la vie.

Ces systèmes sont composés de compartiments, assurant chacun un rôle bien particulier de transformation de la matière, et entre lesquels existent de nombreuses opérations de séparation des flux.

Ils possèdent obligatoirement un compartiment photosynthétique chargé de produire de la biomasse consommable à partir de minéraux, de  $\text{CO}_2$ , et d'eau, avec une source d'énergie lumineuse extérieure.

L'analyse et la conception de ces systèmes nécessitent une modélisation mathématique approfondie, mais leur complexité est telle qu'il n'est pas envisageable pour l'instant d'aborder le problème globalement.

L'approche modulaire séquentielle, qui consiste en la modélisation préalable de chaque compartiment pour en calculer les flux de sortie à partir des flux d'entrée en fonction de contraintes imposées, semble la mieux adaptée à l'étude des écosystèmes clos artificiels.

Le présent travail concerne l'étude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur, en vue de créer un module de simulation d'un compartiment photosynthétique, destiné à s'intégrer dans un ensemble plus complexe tel qu'un écosystème artificiel. C'est le cas, par exemple, du projet MELISSA (Microbial Ecological Life Support System Alternative) de l'Agence Spatiale Européenne, dans le cadre duquel la cyanobactérie *Spirulina platensis* est utilisée

pour produire de l'oxygène et de la biomasse consommable.

Pour comprendre et par là même modéliser le comportement de microorganismes cultivés en réacteur, il est nécessaire d'appréhender à la fois des phénomènes physiques et biologiques.

De prime abord, ceux-ci apparaissent comme disjoints et répondent en tout cas à un formalisme et à une méthodologie bien différents. Les phénomènes physiques comprennent la description des transferts de matière tels que le mélange, les échanges entre les phases liquide et gazeuse, la description des transferts de chaleur et, dans le cas des photobioréacteurs, la description du transfert de l'énergie lumineuse et de sa distribution au sein du volume réactionnel; ils sont décrits par des systèmes d'équations algébriques, différentielles ou intégral-différentielles. Les phénomènes biologiques comprennent la description du métabolisme et de ses modifications en fonction des conditions de limitation en différents nutriments. Loin de privilégier l'un ou l'autre de ces aspects, ce travail tente de les réunir et de comprendre comment et dans quelle mesure les microorganismes réagissent à des modifications de leur environnement. Bien entendu, un soin très particulier sera apporté aux questions de diffusion de l'énergie lumineuse et à sa conversion en énergie chimique par les microorganismes.

En effet, chez les microorganismes photosynthétiques, l'établissement des cinétiques et du bilan énergétique repose sur le calcul de la vitesse d'absorption de l'énergie lumineuse en chaque point du réacteur. Cette vitesse est une étape limitante au même titre que peuvent l'être de faibles concentrations en minéraux ou en carbone inorganique dissous dans la phase liquide.

Le problème le plus complexe réside alors dans la connaissance de l'évolution des rendements de conversion des substrats en produits, en fonction des contraintes externes imposées au métabolisme.

Deux analyses des résultats expérimentaux seront envisagées.

- L'analyse stoechiométrique permettra au moins de traiter les résultats en s'assurant que la conservation des éléments est satisfaite. Ceci conduira notamment à la validation des méthodes expérimentales dans le cas où les mesures sont redondantes. Certains rendements de conversion resteront cependant à identifier à partir des résultats expérimentaux.

- Afin d'élargir le domaine de validité du modèle, l'écriture de modèles biochimiquement structurés sera envisagée. Ceux-ci reposent sur une connaissance plus approfondie du métabolisme, qui permet d'étudier l'efficacité avec laquelle s'effectuent les couplages entre les différentes réactions métaboliques impliquant les transporteurs d'énergie de la cellule, comme l'ATP et les cofacteurs réduits. Les rendements sont alors calculés en appliquant au métabolisme les lois de la thermodynamique phénoménologique linéaire des processus irréversibles.

Ces modèles permettront d'envisager des simulations de cultures en photobioréacteur, en discontinu ou en continu, et dans une large gamme de conditions opératoires, ouvrant ainsi des voies vers l'optimisation et le dimensionnement de tels procédés.

Le premier chapitre est un chapitre introductif qui reprend et formalise certains points développés dans le cadre de cette introduction, notamment sur les écosystèmes clos artificiels et l'approche modulaire séquentielle, ainsi que sur les potentialités des microorganismes photosynthétiques.

Les méthodes expérimentales utilisées au cours de cette étude sont décrites dans le deuxième chapitre.

Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus sur *Spirulina platensis*, que ce soit à l'échelle cellulaire ou à l'échelle de cultures en masse. Les informations recueillies sont à la base, d'une part d'hypothèses

cinétiques et métaboliques du modèle, et d'autre part, de l'identification numérique et de la validation des paramètres du modèle.

Les limitations physiques pouvant survenir dans les photobioréacteurs, et notamment la limitation quasi-permanente par le transfert de lumière, sont détaillées dans le quatrième chapitre. Les résultats théoriques obtenus, indépendants du microorganisme étudié, seront repris et intégrés dans le modèle mathématique proposé.

En raison de l'approche qui a été choisie, ce travail doit également permettre d'obtenir des informations utilisables pour la conception de photobioréacteurs, tant il est vrai que les microorganismes photosynthétiques présentent des intérêts industriels, loin d'être encore entièrement connus.

Le modèle mathématique est développé dans le cinquième chapitre sous deux formes différentes.

- Un modèle non structuré dont le domaine de validité est limité aux conditions expérimentales utilisées pour l'identification des coefficients du modèle.

- Un modèle biochimiquement structuré qui permet d'envisager la connaissance du comportement de *S. platensis* quelles que soient les contraintes extérieures, physiques ou biologiques, régissant son métabolisme.

A cette étape, certains résultats expérimentaux discutés au chapitre trois seront repris et comparés aux résultats théoriques donnés par les modèles proposés.

CHAPITRE 1

CAHIER DES CHARGES POUR

LA MODELISATION DES PHOTOBIOREACTEURS

ET SON APPLICATION AUX ECOSYSTEMES CLOS ARTIFICIELS.



### 1.1. INTERETS DES PHOTOBIOREACTEURS ET CONTEXTE GENERAL.

Le but de ce paragraphe n'est pas de dresser une liste exhaustive des potentialités des photobioréacteurs, mais plutôt de situer dans le contexte actuel la présente recherche par rapport à l'abondante littérature déjà disponible sur le sujet.

La culture contrôlée de microorganismes photosynthétiques s'est développée à partir des années 50 aux Etats Unis, et à partir des années 60 en France. A l'époque, il s'agissait surtout de trouver de nouvelles sources d'énergie renouvelable, et la conversion de l'énergie solaire (inépuisable) par les algues semblait intéressante. Ces recherches ont donné lieu à de nombreux articles sur la culture d'algues en masse rassemblés dans l'ouvrage de BURLEW (1964). Dans ce contexte, les recherches engagées en France pendant cette période sont dues principalement à l'Institut Français du Pétrole, et au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA).

Ces cultures en masse étaient presque toujours réalisées en bassins ouverts, éclairées par le soleil et donc peu contrôlées. Mais dès 1970, le Japon s'intéressa à l'étude des photobioréacteurs à éclairage artificiel. Un tel regain d'intérêt, lié à l'essor des biotechnologies, était dû à la possibilité de produire, par l'intermédiaire des microalgues, des molécules à haute valeur ajoutée justifiant des investissements plus importants.

C'est dans cette optique que se sont poursuivies les recherches récentes sur les cultures contrôlées des microalgues.

Néanmoins, la conception de bioréacteurs à éclairage artificiel apparait comme un problème majeur qui encore aujourd'hui empêche le développement industriel de tels procédés.

Une alternative est fournie par le réacteur développé par le CEA Cadarache, et par USSI Ingénierie, mais ce procédé utilise l'énergie solaire (GUDIN et THEPENIER, 1986).

Les potentialités connues des microorganismes photosynthétiques sont pourtant nombreuses. On trouvera dans les documents de DERMOUN (1987), STADLER *et al.* (1988), DE LA NOUE et DE PAUW (1988), et RICHMOND (1986), une liste relativement exhaustive de molécules intéressantes issues de la culture de microalgues. On citera brièvement ici, outre l'utilisation directe de la biomasse comme source de protéines d'origine unicellulaire (P.O.U.) dans des pays comme la Martinique, les Etats Unis, Israël, le Mexique, le Japon (LEE, 1986, FOX, 1986); les quatre grandes catégories suivantes:

- Les lipides et hydrocarbures:

On retiendra essentiellement dans cette catégorie l'acide  $\gamma$  linoléique qui est un acide gras essentiel précurseur des prostaglandines et que l'on trouve en grande quantité chez *Spirulina platensis*, ainsi que les hydrocarbures produits par *Botryococcus braunii*.

Il est à noter qu'une découverte récente (GUSTAFSON *et al.* 1989), met en évidence le rôle protecteur joué par un sulfolipide de cyanobactérie dans les mécanismes d'infection par le virus du Sida.

- Les pigments:

Les industries cosmétiques et alimentaires s'intéressent aux pigments des microalgues comme colorants. Les principaux sont les  $\beta$ -carotènes, les phycoérythrine, les phycocyanines, et l'astaxanthine. Les espèces *Porphyridium* et *Spirulina* sont particulièrement riches en pigments.

- Les polysaccharides:

Toutes les microalgues et les bactéries produisent en plus ou moins grande quantités des polysaccharides dont la structure et les propriétés rhéologiques sont souvent intéressantes. La microalgue la plus connue dans ce domaine est certainement *Porphyridium cruentum*. Les débouchés potentiels de tel polysaccharides sont nombreux: alimentation, emballage, textile, pharmacologie, cosmétique, récupération assistée du pétrole.

- Les antibiotiques et antifongiques:

C'est probablement dans ce domaine que le plus grand nombre de molécules reste à découvrir. De nombreux composés ont déjà été identifiés, notamment des polysaccharides sulfatés.

Enfin, on notera que les microalgues jouent un rôle important dans le traitement résiduaire des eaux usées.

Malgré ces marchés potentiels, le développement de photobioréacteurs entièrement artificiels s'est toujours heurté au problème technologique de distribution de la lumière à l'intérieur du réacteur. Aussi les recherches en modélisation et optimisation de procédés de ce type ont manqué de moyens matériels jusqu'au début des années 80. A cette date, le problème a été relancé par le biais de diverses agences spatiales, notamment aux USA, en URSS, et au Japon, puis par l'Agence Spatiale Européenne (ESA) à la fin de la décennie.

Il s'agissait alors d'utiliser les microalgues dans le but de produire de la biomasse consommable et de recycler l'atmosphère de vaisseaux spatiaux, au sein de ce que l'on appela des écosystèmes clos artificiels ou C.E.L.S.S. (Closed Ecological Life Support System). La réalisation de tels systèmes constitue un pari qui ne peut être gagné que par une étude approfondie de chaque étape,

devant mener à une modélisation complète ainsi qu'à une optimisation de chaque compartiment, puis du système complet.

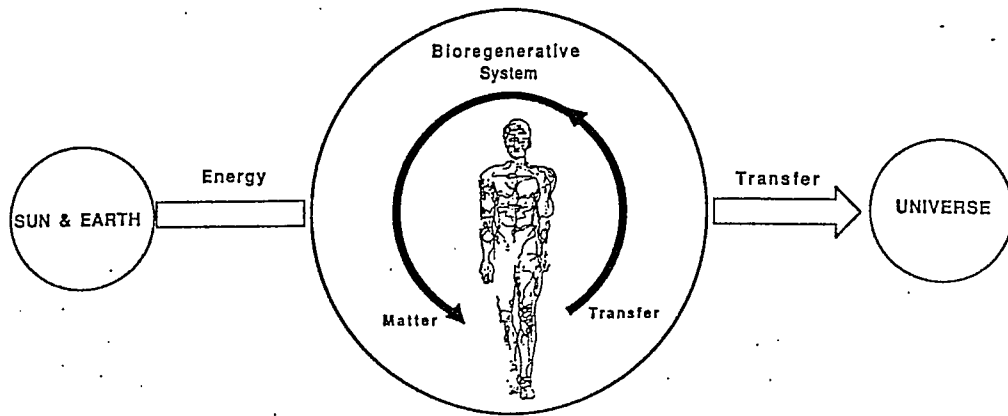
Ce sont donc ces projets qui ont relancé l'intérêt pour les recherches sur les photoréacteurs et qui ont amené de nouveaux moyens. Les travaux engagés devraient déboucher, à terme, sur une meilleure connaissance de la mise en oeuvre de procédés biophotochimiques. Cette étape est nécessaire pour la réalisation d'écosystèmes clos artificiels; elle l'est également dans l'éventualité où il deviendrait industriellement rentable de concevoir et d'exploiter des photobioréacteurs.

Le présent travail s'inscrit tout à fait dans le cadre qui vient d'être décrit. Il est né d'une collaboration entre l'ESA, le Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), la société Matra Espace, et le laboratoire de Biochimie Fonctionnelle des Membranes Végétales du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), et sa vocation est double:

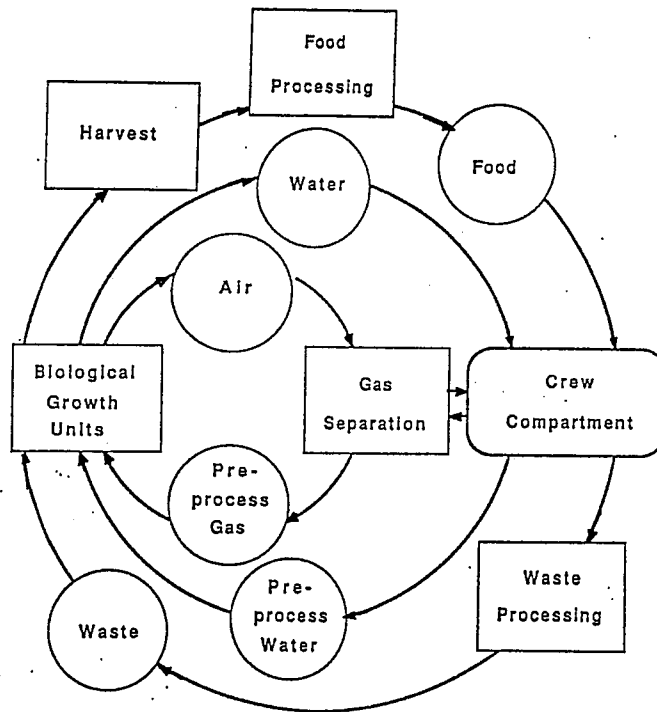
- étudier les problèmes physiques, physiologiques et biochimiques posés par les cultures de microorganismes photosynthétiques en bioréacteur.

- appliquer les résultats obtenus et fournir les outils nécessaires à la réalisation du compartiment photosynthétique d'un écosystème clos.

C'est cette dernière étape qui a notamment guidé le choix du microorganisme ainsi qu'un certain nombre d'orientations de l'étude. Néanmoins, les principaux problèmes pour la réalisation de photobioréacteurs étant surtout d'ordre physique (limitation par la lumière et par le transfert de gaz), on pourra considérer que les résultats obtenus à cet égard au cours de cette étude, sont indépendants du microorganisme choisi, et totalement extrapolables quelle que soit la conception de réacteur envisagée lors de développements futurs.



Man as part of an artificial Ecological Loop.



Integrated Bioregenerative System

Figure 1.1: Caractéristiques d'un écosystème clos artificiel (d'après TAMPONNET et al. 1991).

## 1.2. LES ECOSYSTEMES CLOS ARTIFICIELS.

### 1.2.1. Définitions et généralités:

En raison de l'extension de l'activité humaine dans l'espace (vols habités, stations permanentes), la réalisation d'écosystèmes clos est devenue indispensable afin de réduire les coûts logistiques et de rendre possibles les voyages de longue durée. Ainsi, les principales agences spatiales subventionnent des programmes concernant les écosystèmes clos artificiels ou C.E.L.S.S. (Closed Ecological Life Support System).

Un C.E.L.S.S. peut être défini comme un système écologique biorégénératif composé d'un ensemble d'êtres humains, de plantes, et de microorganismes intégrés au sein de procédés mécaniques et physico-chimiques (SKOOG et BROUILLET, 1981). Il doit posséder les caractéristiques suivantes:

- régénération de l'atmosphère;
- recyclage de l'eau;
- recyclage des déchets solides et liquides;
- production de nourriture.

Les déchets solides doivent donc être transformés pour produire de la nourriture de manière à recycler les principaux éléments C,H,O,N,S,P, (figure 1.1). Du point de vue thermodynamique, il s'agit donc d'un système fermé, et l'emploi du qualificatif "clos" se réfère probablement au préfixe "éco-", puisque les écosystèmes naturels ne sont pas clos. On comprend donc pourquoi il est nécessaire de préciser également qu'il s'agit de systèmes artificiels.

Bien que les conceptions aient évolué au cours des dix dernières années, il ne semble pas possible de réaliser un système parfaitement clos, et il sera probablement nécessaire de faire un apport en nutriments, tout en concédant une perte de carbone et de déchets non recyclables (LEISEIFER et al. 1983).

Les principales différences entre écosystèmes naturels et

	Natural	Agricultural Ecosystems	Artificial
Behavior of single components	deterministic	deterministic	deterministic
Longterm dynamics	mainly stochastic	not known	not known
Shortterm dynamics	partly deterministic and stochastic	deterministic with stochastic influences of environment and economy	deterministic
Age	~billion yrs	~10000 yrs	----
Size	earth	some ha	$10^2$ - $10^3$ m <sup>2</sup>
Number of species	very large	small	small
Time scales	geological time scale	1 to 10 yrs	?
Variability within species	large	reduced by selection	reduced by selection
Variability of environment	large	large	small
Control	---	input of fertilizers and pesticides, irrigation, crop rotation, breeding of resistant varieties	controlled environment
Nutrient cycles	closed	only partly closed	closed
Environment	biosphere	biosphere	artificial environment, technosphere, spaceship

**Figure 1.2:** Propriétés fonctionnelles et dynamiques des écosystèmes (d'après RICHTER et DIEKKRUGER, 1990).

artificiels ont été identifiées par RICHTER et DIEKKRUGER (1990) et sont résumées sur la figure 1.2.

Ces définitions, on le voit, sont suffisamment vastes, pour autoriser une grande diversité dans la conception et la conduite des recherches sur les écosystèmes clos artificiels.

Exposer ici l'état des recherches de la décennie passée dans ce domaine serait hors de propos. Ce travail a d'ailleurs été réalisé dans un récent congrès par GITELSON (1990) pour l'URSS, et par MAC ELROY (1990) pour les USA et le Japon.

Depuis 1970, des études sont menées à l'institut de biophysique d'URSS sur les C.E.L.S.S. (GITELSON *et al.* 1976). Actuellement, des êtres humains se relayent tous les 180 jours dans un écosystème clos baptisé "Bios 3", et ceci pour un total de plus de deux ans. Ces études ont permis de mettre en évidence l'apparition de phénomènes de toxicité liés à l'accumulation de produits non régénérés.

Aux USA et au Japon, les recherches se sont essentiellement focalisées sur la mise au point technologique de compartiments photosynthétiques, à base d'algues ou de plantes supérieures. Très peu de données sont disponibles sur des études de systèmes complets, même très simplifiés (SMERNOFF *et al.* 1986; VOLK et RUMMEL, 1986; NISHI *et al.* 1986). Cela est certainement dû, entre autres, à la difficulté de choisir parmi les nombreuses options existantes pour le recyclage des déchets. Néanmoins, lorsque ces données existent, c'est le plus souvent l'option physico-chimique qui a été retenue (HOLTZAPPLE, 1989).

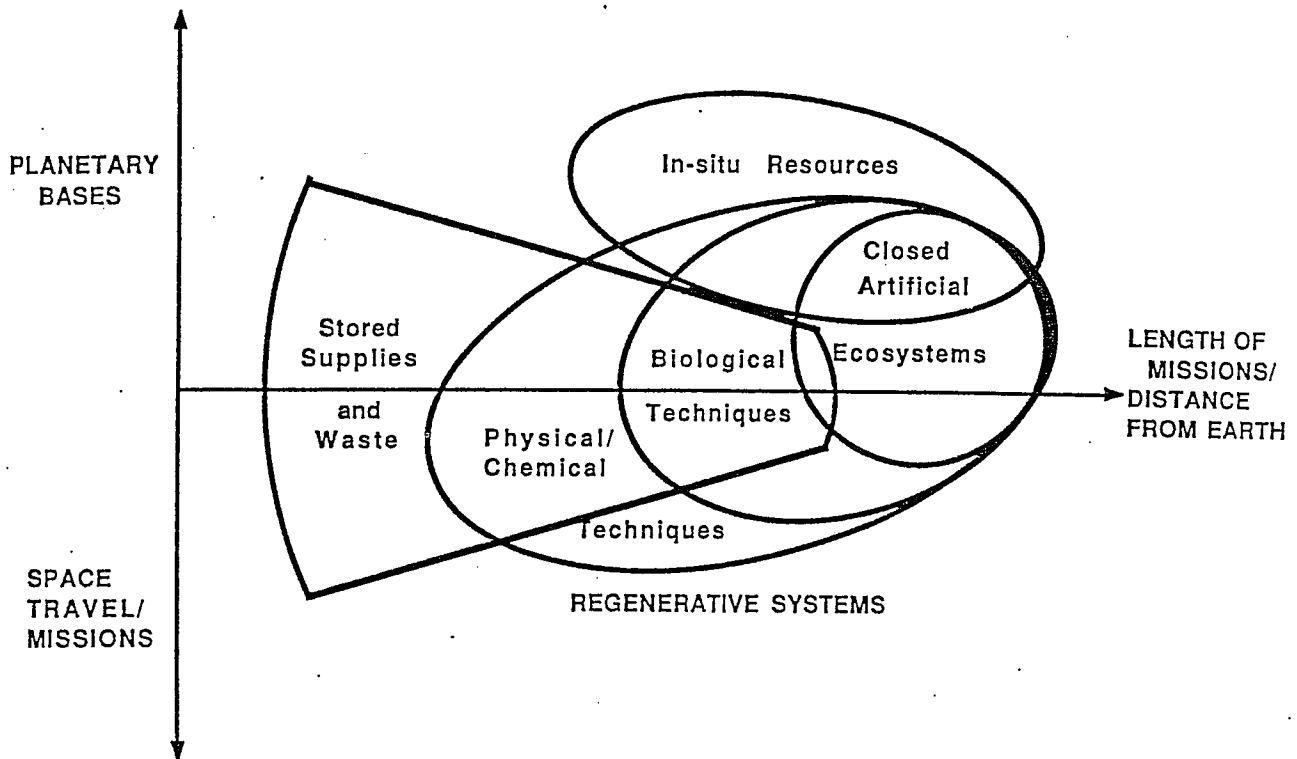
Ces choix restent malgré tout arbitraires, et l'on ne peut pas dire, compte tenu de l'avancement des travaux, si l'option physico-chimique est préférable à l'option biologique. Les avantages et inconvénients de ces deux options ont été dégagés par GITELSON (1990), et sont consignés dans la figure 1.3.



COMPARATIVE SPECIFICATIONS BIOLOGICAL (BLSS) AND PHYSICAL - CHEMICAL (PCLSS) LIFE-SUPPORT SYSTEMS

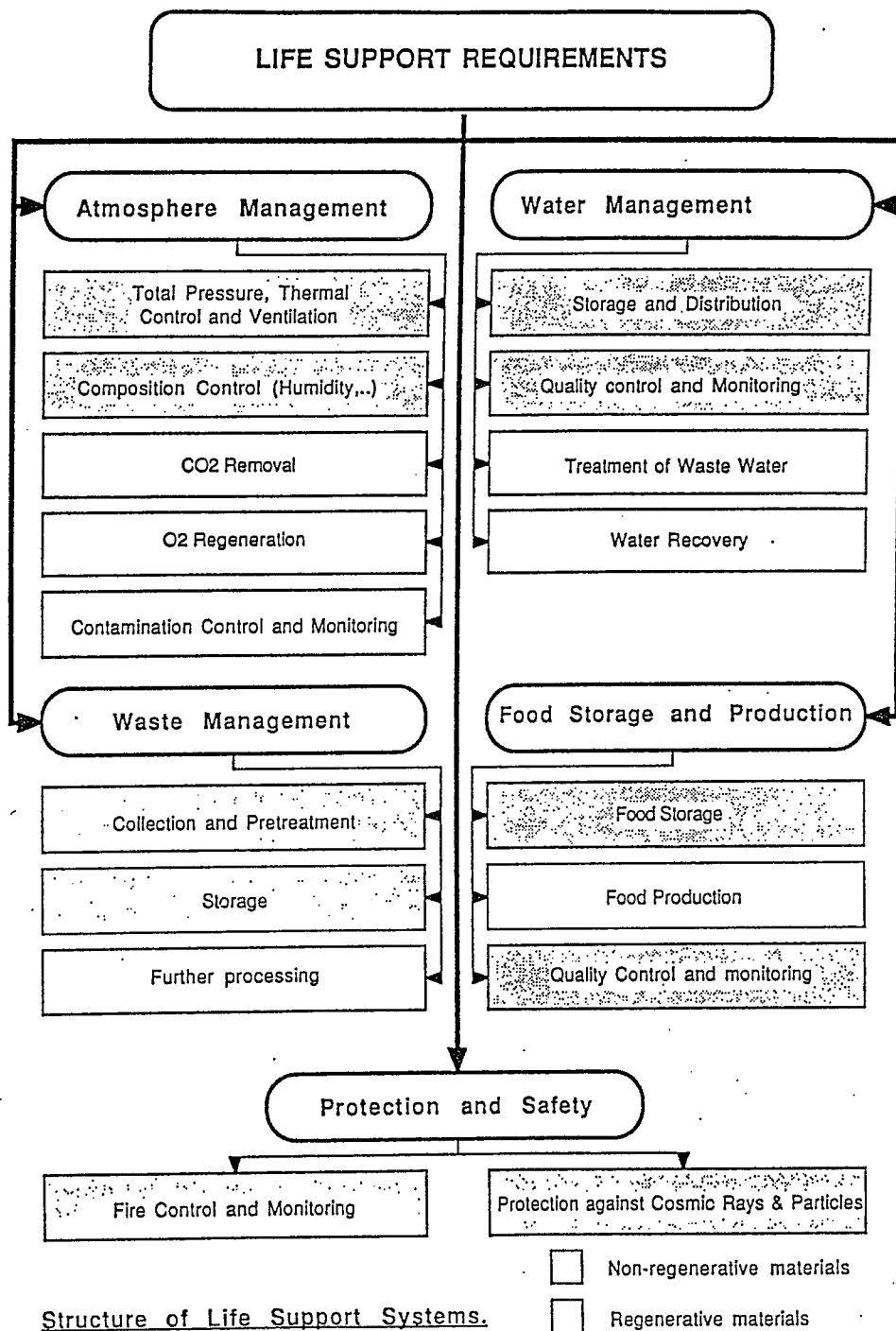
	MERITS	DEMERITS
<p><b>PCLSS Functions :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Absorption of CO<sub>2</sub></li> <li>- Release of O<sub>2</sub></li> <li>- Absorption of man excreta</li> <li>- Water purification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Small size</li> <li>- Weight 250-350 kg</li> <li>- Energy cost 0,7-0,8 kWt</li> <li>- Independence on Sun-orientation of the spacecraft</li> <li>- Indisputable feasibility of using in space</li> <li>- Comparative simplicity of the main physical and chemical processes</li> <li>- Habitual designing traditions</li> <li>- Easy temperature control</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High pressure, temperatures, toxic gases, for example CO in immediate vicinity of man</li> <li>- Impossibility to reproduce natural food for man in principle</li> <li>- Sophisticated control</li> <li>- No self-recovery ability</li> <li>- Atmospheric microgases, probably essential for normal physiological, and psychological human status do not reproduce privation in habitual living environment of man</li> <li>- All regeneration functions release of O<sub>2</sub>, absorption of CO<sub>2</sub>, water purification are performed separately</li> <li>- The system was never run on the whole, no experimental assessment of the environment regenerated for man stability of the system has never been tested in long-term experiments</li> </ul>
<p><b>BLSS Functions :</b> regeneration of water and atmosphere</p> <p><u>Algal gas and water exchange :</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Weight 250-300 kg</li> <li>- Energy cost 1,2 kWt sun light</li> <li>- Regeneration of water and atmosphere in one process with urine absorption</li> <li>- No temperatures, pressures and toxic gases dangerous for man</li> <li>- Ability of rapid self-recovery</li> <li>- Simple control</li> <li>- Ability of direct use solar radiation</li> <li>- Biological working efficiency in weightlessness</li> <li>- Well elaborated theory, method and technique of continuous cultivation of algae</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vegetable food doesn't reproduce</li> <li>- Sun-orientation dependence</li> <li>- No elaborated biotechnological systems to cultivate algae in weightlessness</li> <li>- Impossibility to use as food the major part of the synthesized biomass due to incompatibility of its biochemical composition with the food requirements of man</li> </ul>
<p><u>Chemosynthetic gas and water exchange :</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Weight not more than 250 kg</li> <li>- Energy cost 0,7-0,8 kWt</li> <li>- Regeneration of atmosphere and water process with urine absorption</li> <li>- No temperatures and pressure dangerous for man</li> <li>- Ability to self-reproduce rapidly</li> <li>- Simple control</li> <li>- Independence of Sun-orientation</li> <li>- Highly efficient use of electric energy</li> <li>- Well-developed theory, method and technology of continuous cultivation of bacteria</li> <li>- Biological working efficiency in weightlessness</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Use of explosion mixture (O<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>) (safe versions of chemosynthesis are possible excluding other species of bacteria)</li> <li>- Separation of the atmosphere of the cultivator and the cabin</li> <li>- No elaborated technology to cultivate bacteria in weightlessness</li> </ul>
<p><b>BLSS with higher plants - Function :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- All regeneration processes, including food production solved by one key process of photosynthesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- regeneration of traditional vegetable food</li> <li>- Traditionally comfortable environment for man</li> <li>- Energy cost 1,5-2 kWt sun light</li> <li>- Ability to self-reproduce rapidly</li> <li>- No pressures, temperatures, gases dangerous for man</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Considerable dimensions to accommodate the plants 30 m<sup>2</sup>-50 m<sup>2</sup> per man</li> <li>- Necessity to remove large quantity of low temperature heat</li> <li>- Dependence of Sun-orientation</li> <li>- Feasibility to cultivate plants in weightlessness</li> </ul>

Figure 1.3: Comparaison entre les options biologiques et physico-chimiques pour le recyclage des déchets dans les systèmes de support de vie (d'après GITELSON, 1990).



Length of Missions/ Distance from Earth vs. type of Life Support systems

Figure 1.4: Choix du type de système de support de vie dans l'espace en fonction de la durée de la mission et de son éloignement de la Terre (d'après TAMPONNET et al. 1991).



Structure of Life Support Systems.

Figure 1.5: Structure d'un écosystème clos artificiel (d'après TAMPONNET et al. 1991).

Depuis 1990, la démarche la plus rationnelle en matière de définition de grands objectifs, et de planification sur le moyen et long terme, semble vouloir être adoptée par l'ESA. En effet, SAVAGE et al. (1990), estiment qu'un premier système à base de bactéries et d'algues sera prêt dans 3 à 4 ans. La mise au point d'un système complet est prévue pour l'an 2000. L'ensemble sera compris dans un cylindre de 5 à 6 mètres de diamètre et 8 à 12 mètres de hauteur. Ce système clos permettra de simuler le fonctionnement des premiers modules biologiques spatiaux prévus dès 2010. Les orientations choisies par l'ESA sont résumées par les figures 1.4 et 1.5.

S'il apparaît clairement que les recherches qui viennent d'être exposées présentent un caractère appliqué et technologique indéniable, il faut noter que l'étude d'écosystèmes clos artificiels intéresse de plus en plus de domaines fondamentaux aussi différents que l'écologie générale ou la dynamique des systèmes dissipatifs.

#### 1.2.2. Le compartiment photosynthétique:

Il apparaît dans ce qui vient d'être exposé, que le compartiment photosynthétique joue un rôle crucial dans la réalisation d'écosystèmes clos artificiels. En effet, la production de nourriture, à partir des minéraux, n'est envisageable que par cet intermédiaire, que la photosynthèse soit productrice d'oxygène ou non. Si, de plus, l'option biologique est retenue pour la régénération de l'atmosphère, c'est ce compartiment qui en sera chargé.

Le compartiment photosynthétique est donc un élément obligatoire pour un écosystème artificiel.

A ce stade, différents types de biomasse peuvent être envisagés. Les microalgues, les bactéries photosynthétiques, et

les plantes supérieures, présentant chacun des avantages et des inconvénients. En effet, les microorganismes photosynthétiques ont des vitesses de croissance et un rendement de conversion de l'énergie élevés, ils peuvent être cultivés dans un volume réduit (photoréacteur), et sont entièrement digestibles. Par contre, la biomasse produite est essentiellement constituée par des protéines donc conduit à recycler complètement l'azote et le soufre.

Les plantes supérieures possèdent des rendements beaucoup plus faibles, demandent des surfaces de culture et des temps de croissance importants et produisent des déchets non assimilables, mais leur biomasse est surtout riche en carbohydrates qui représentent l'essentiel de la ration énergétique de l'homme. Les plantes supérieures sont donc très propices au recyclage du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène.

De façon à produire une ration alimentaire équilibrée, indispensable au recyclage des éléments C,H,O,N,S,P, il conviendra donc, pour un système élaboré, de diversifier le compartiment photosynthétique avec à la fois des microorganismes et des plantes supérieures (TAMPONNET et BINOT, 1991).

C'est probablement sur le sujet du compartiment photosynthétique que la littérature est la plus abondante, et il n'est pas question, dans cette présentation, de passer en revue tous les travaux qui ont été publiés. On trouvera dans le cadre de ce travail, uniquement quelques exemples relatifs à l'utilisation de microorganismes photosynthétiques cultivés en bioréacteur.

Dans ce domaine, on doit d'abord au Japon les recherches les plus originales. Des bioréacteurs fonctionnant en continu, à éclairage interne réalisé par des fibres optiques, ont été étudiés (MORI et al. 1988). L'énergie lumineuse provient du soleil ou de lampes xénon, et elle est captée par des miroirs de Fresnel. Les microorganismes utilisés sont essentiellement *Chlorella* et *Spirulina*. Ces réacteurs sont couplés à des systèmes d'échange et de récupération des gaz par membranes, fonctionnelles en microgravité (MORI et al. 1986; OGUCHI et al. 1987; OGUCHI et al.

1988; OGUCHI et al. 1989). Des systèmes de séparation de la biomasse ont également été mis au point. La principale originalité de ces recherches réside néanmoins dans le concept de réacteurs pilotes éclairés de l'intérieur, ce qui semble être une étape vers la réalisation d'unités de culture en masse plus importantes.

De tels bioréacteurs avaient déjà été envisagés en URSS dès 1969 (KOVROV et al. 1969), et comportaient des tubes fluorescents internes. Actuellement, l'écosystème BIOS-3 utilise plusieurs réacteurs pour cultiver des chlorelles avec des systèmes d'échanges gazeux (GITELSON, 1990), et de nombreuses études ont également été réalisées sur *Spirulina* en Union Soviétique au cours des 20 dernières années.

Des cultures en discontinu et en continu ont également été étudiées aux USA, notamment sous la direction de la NASA, mais dans ce domaine, les résultats obtenus aussi bien sur le plan technologique que scientifique ne font pas preuve d'une grande originalité (RADMER et al. 1982; RADMER et al. 1984; AVERNER et al. 1984; RADMER et al. 1987).

Nous sommes pour notre part engagés depuis 1988, sous la direction de l'ESA, dans le cadre du projet MELISSA (Microbial Ecological Life Support System Alternative), et avec le support du CNES, dans l'étude et la modélisation d'un photobioréacteur pour la culture de *Spirulina platensis* (CORNET et DUBERTRET, 1990).

### 1.2.3. Le projet MELISSA:

MELISSA (Microbial Ecological Life Support System Alternative) est un projet de l'Agence Spatiale Européenne. Il forme une boucle partielle destinée essentiellement au traitement des déchets, et à la régénération de la ration protéique d'un consommateur potentiel (un équipage par exemple). Il contribue donc, pour une large part, au recyclage de l'azote et du soufre. Sa principale originalité est de n'être basé que sur des compartiments bactériens, y compris en ce qui concerne le

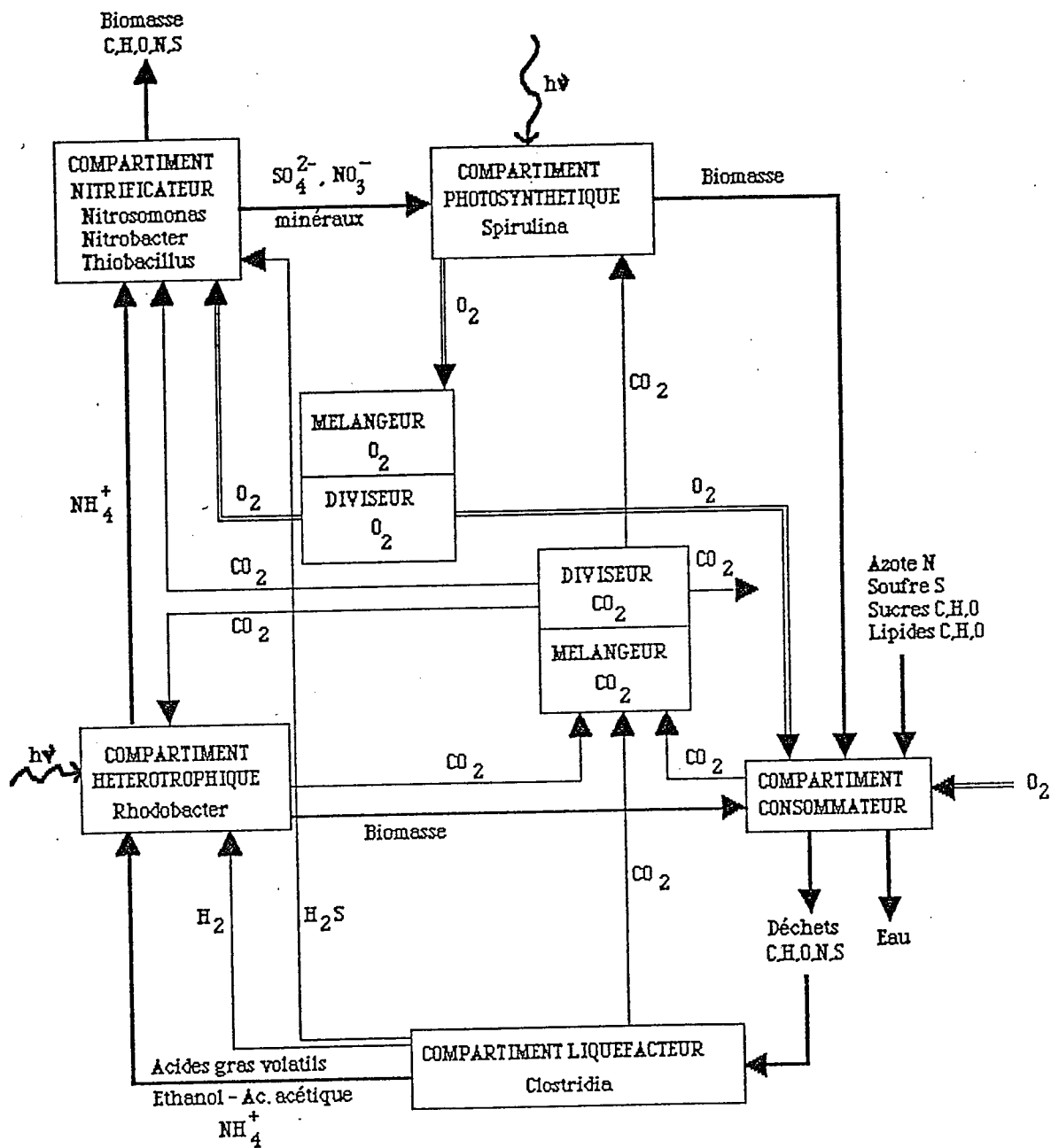


Figure 1.6: Schéma de l'écosystème artificiel MELISSA (d'après MERGEAY et al. 1988).

recyclage des déchets (Figure 1.6).

Il s'agit, en tout état de cause, d'une première étape dans l'étude et la conception d'écosystèmes clos artificiels, la structure MELISSA étant totalement évolutive. On peut envisager notamment, l'incorporation de techniques physico-chimiques et une diversification du compartiment photosynthétique, de façon à produire une biomasse plus équilibrée en vue du recyclage des éléments C,H,O.

Au stade préliminaire du projet, la biomasse photosynthétique est représentée par la cyanobactérie *Spirulina platensis*. Ce choix, qui sera discuté plus loin, a déterminé la conception des autres compartiments de l'écosystème artificiel (MERGEAY *et al.* 1988). En effet, *Spirulina platensis* requiert entre autres des nitrates, des sulfates et du gaz carbonique pour sa croissance; aussi quatre compartiments microbiologiques sont apparus indispensables pour la minéralisation et le recyclage des déchets issus du compartiment consommateur:

- un compartiment liquéfacteur anaérobie constitué de *Clostridia* et adapté à la dégradation des polymères biologiques (polysaccharides, protéines);

- un compartiment photohétérotrophique constitué de *Rhodobacter* qui a pour rôle de transformer les acides gras volatils et l'hydrogène issus du compartiment précédent en ammoniacque et en protéines de haute valeur nutritive;

- un compartiment nitrificateur contenant des bactéries telles que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* capables d'oxyder l'ammoniacque en nitrate, ainsi que *Thiobacillus* responsable de la transformation des sulfures en sulfates;

- un compartiment photosynthétique servant d'une part à régénérer l'atmosphère et d'autre part à produire de la biomasse consommable riche en protéines.



Le taux d'acides nucléiques (4% du poids sec) de *S. platensis* impose de limiter l'apport en microorganismes à 100 g/jour/personne, en raison de l'accumulation possible et néfaste d'acide urique dans l'organisme humain. A partir d'une estimation des besoins énergétiques journaliers, et compte tenu de l'apport en énergie issue de la consommation des microorganismes, il apparaît nécessaire de compléter la ration alimentaire avec des sucres (300 g/jour/personne), et avec des lipides (40 g/jour/personne).

- Raisons du choix de *Spirulina platensis*:

Nous ne reviendrons pas ici sur le choix d'un microorganisme dans le compartiment photosynthétique puisque les inconvénients et les avantages en ont été discutés plus haut. Des algues vertes telles que *Chlorella* et *Scenedesmus* auraient pu être utilisées, mais elles présentent une faible digestibilité du fait de l'existence d'une paroi cellulosique, peu assimilable par l'homme sans traitement préalable. La cyanobactérie *Spirulina platensis*, quant à elle, répond le mieux aux principales caractéristiques requises pour une utilisation dans un C.E.L.S.S. En effet, elle possède les avantages suivants (MERGEAY et al. 1988; CORNET et DUBERTRET, 1990).

- Un bon rendement énergétique de la photosynthèse.
- Une valeur nutritionnelle élevée, avec notamment des teneurs en acides aminés répondant aux normes de la F.A.O., exception faite des acides aminés soufrés, ainsi qu'une importante quantité d'acides gras essentiels.
- Un temps de génération raisonnablement court.
- Une faible sensibilité aux pathogènes et aux parasites en raison d'un pH optimum de croissance alcalin (8 à 10).
- Une bonne digestibilité et pas de toxicité rapportée.

Les substances glucidiques de la paroi sont peu digestes mais n'empêchent pas l'assimilation des autres éléments nutritifs. Le

choix définitif s'est orienté vers *Spirulina platensis* car il semble que ce soit l'espèce possédant le taux protéique le plus élevé (70% du poids sec).

### 1.3. MODELISATION MATHEMATIQUE DES ECOSYSTEMES CLOS ARTIFICIELS.

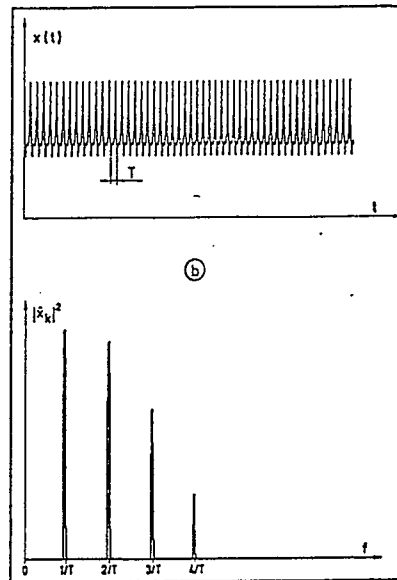
#### 1.3.1. Complexité de la mise en équations des écosystèmes clos artificiels et de l'étude des solutions:

Il apparait clairement, compte tenu de ce qui a déjà été mentionné lors de la présentation des écosystèmes clos artificiels, que ces systèmes font intervenir un grand nombre d'opérations unitaires. Leur mise en équations pose donc un triple problème inhérent au degré de complexité de tels modèles mathématiques.

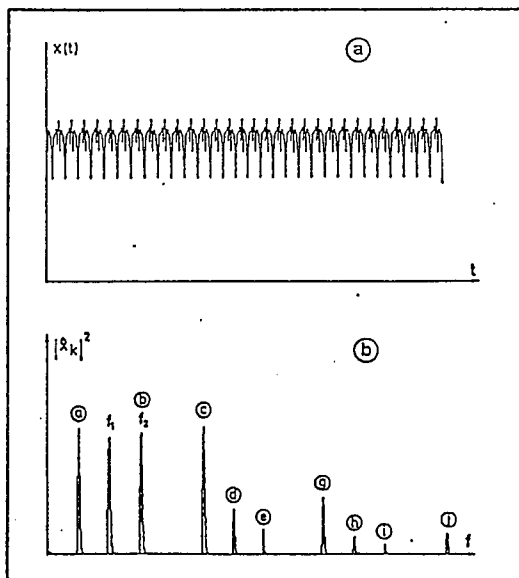
- Le choix des variables d'état qui nécessite la connaissance de chaque opération.
- La détermination des nombreux paramètres du modèle, dont on cherchera d'ailleurs à diminuer le nombre.
- La résolution du système d'équations obtenu.

En effet, au regard des lois physiques gouvernant un écosystème clos (systèmes dynamiques dissipatifs) et de la conception même de ces systèmes (recyclage de la matière), les problèmes à résoudre sont fortement non linéaires.

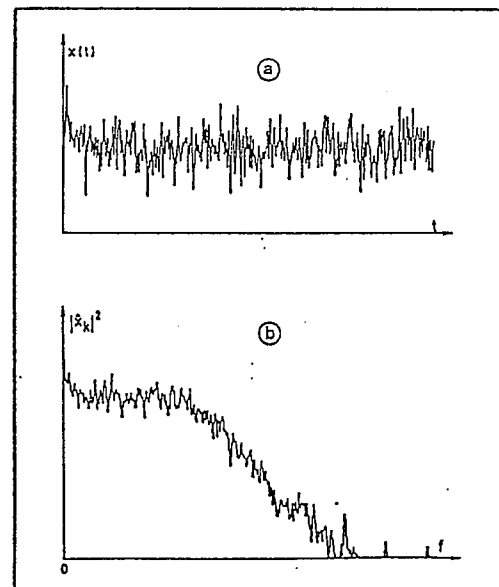
On est donc confronté à des systèmes potentiellement chaotiques (KERNEVEZ et al. 1990; RICHTER et DIEKKRUGER, 1990). Néanmoins, les évolutions à court ou moyen terme sont beaucoup plus probablement asymptotiques ou périodiques, en raison des constantes de temps élevées pour les facteurs qui en dépendent. Ces facteurs, susceptibles de faire apparaître un comportement chaotique, sont essentiellement liés aux étapes biologiques, et l'on peut affirmer ainsi que la tendance à l'établissement d'un régime aperiodique (chaotique) croit avec le nombre de ces étapes. La figure 1.7 résume les différents régimes dynamiques pouvant



Fonction périodique contenant des harmoniques



Fonction quasi-périodique



Fonction aperiodique

Figure 1.7: Différentes évolutions temporelles possibles pour un écosystème clos artificiel (d'après BERGE et al. 1988).

a- Signal temporel.

b- Spectre de Fourier

être atteints par le système (BERGE *et al.* 1988).

La démarche à suivre, face à de tels problèmes, consisterait d'abord dans l'étude de l'existence et de l'unicité de la solution du système, puis dans l'étude de sa stabilité, et enfin dans son estimation numérique. Les récents progrès dans le domaine de l'analyse fonctionnelle (méthodes variationnelles, méthodes de Galerkin, semigroupes...), exposés dans les ouvrages de BREZIS (1983) et ZEIDLER (1990), ne permettent pas, dans l'état actuel des connaissances, de fournir une réponse sur l'existence de la solution d'écosystèmes clos complexes. L'impossibilité de traiter le problème globalement apparaît donc ici pour la première fois.

La stabilité d'une solution de régime permanent peut se définir par le caractère perpétuellement voisin d'une solution presque coïncidente à l'instant initial.

Les notions de stabilité de Lyapunov et de stabilité asymptotique sont exposées dans les ouvrages de WIGGINS (1990) et de THOMPSON et STEWART (1991); elles sont représentées sur la figure 1.8. Notons que lorsqu'une solution est instable, elle dépend fortement de la condition initiale; la prédiction d'un état futur présente donc peu d'intérêt dans ce cas, et il est plus utile de s'intéresser à l'ensemble des solutions asymptotiques que peut prendre le système, en fonction de l'ensemble des conditions initiales admissibles.

Cette démarche semble aujourd'hui possible, pour un petit nombre d'équations présentant des non linéarités du type de celles rencontrées dans un écosystème clos artificiel, en utilisant le théorème de la variété centrale (WIGGINS, 1990) qui permet de prédire des comportements bifurcatoires de la solution en régime permanent. Malheureusement, ces méthodes ne donnent pour le moment des résultats que sur des cas particuliers relativement simples, et il s'avère impossible d'envisager leur utilisation pour des systèmes aussi complexes que ceux qui nous intéressent ici. Une fois encore, le problème ne peut pas être traité dans sa

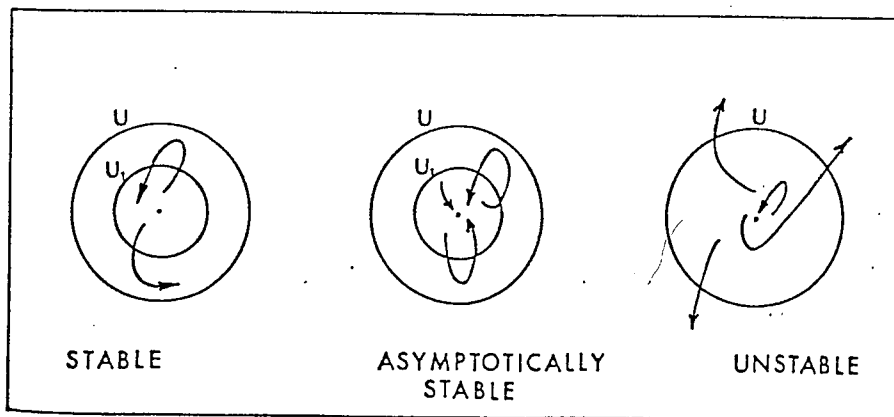
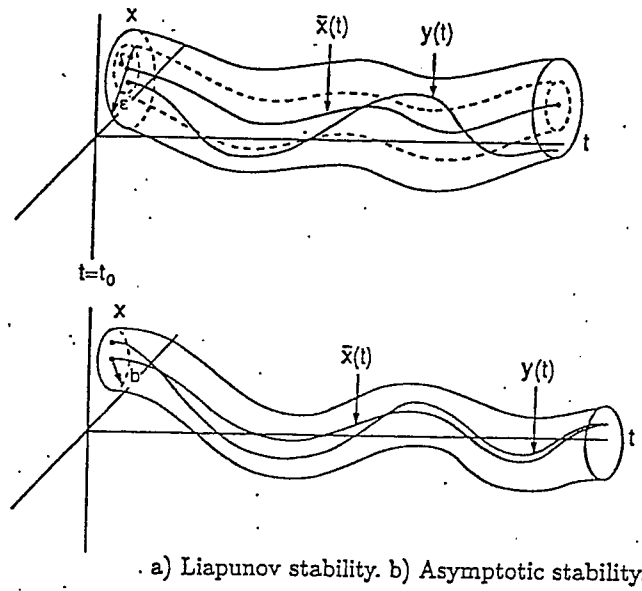


Figure 1.8: Stabilité au sens de Liapunov et stabilité asymptotique pour un système dynamique (d'après THOMPSON et STEWART, 1991; et WIGGINS, 1990).

globalité.

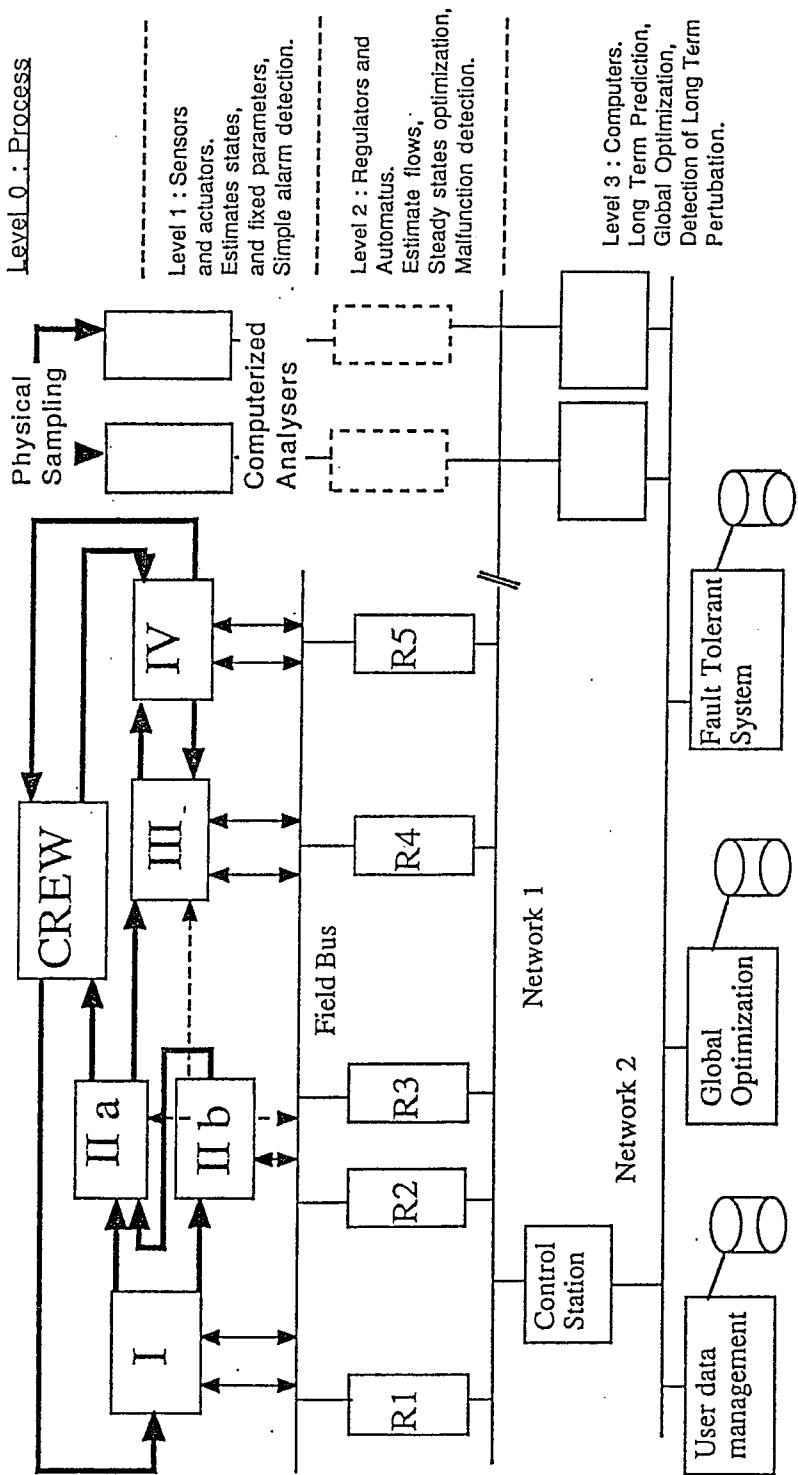
Les propos tenus jusqu'ici constituent des généralités et ne doivent pas contribuer à dévier de la seule démarche qui nous est aujourd'hui permise. En effet, l'étude de l'existence et de la stabilité de solutions chaotiques est non seulement encore impossible, mais ne présente que peu d'intérêt. Il n'est pas inutile de rappeler que les écosystèmes clos artificiels ont pour objectif premier le support de la vie et que, par conséquent, seule la recherche et l'étude d'une solution stable est envisageable et pourra être étudiée. Cette solution doit être atteinte, au besoin, en multipliant les contraintes. Ainsi, dans la suite de cette étude, nous nous restreindrons à la discussion de solutions stables et asymptotiques, en supposant que l'on soit capable de les produire.

Dans ces conditions, on comprend aisément le rôle primordial joué par le contrôle du système.

On retrouve ici, à nouveau, deux approches suivant la conception que l'on a d'un écosystème artificiel:

- une approche holistique qui propose de se servir des régulations internes propres, caractérisant les écosystèmes naturels dans lesquels sont associées de nombreuses espèces;
- une approche déterministe qui consiste à développer des systèmes de contrôle externes séparés, de façon à construire un système complet.

Il est clair, compte tenu de la discussion précédente, que la première hypothèse conduit à développer un contrôle non linéaire, qui, s'il est connu sur des cas très simples, n'est pas ici envisageable (MEEROV *et al.* 1983; LASSEUR et BINOT, 1991). D'autre part, ce type d'approche ne permet pas d'envisager d'action externe importante sur le système, ni son optimisation en terme de support de vie. C'est-à-dire que le système est très peu contrôlable au sens défini par KERNEVEZ *et al.* (1990). Un écosystème compartimenté sans possibilité de contrôle externe est



Example of Control System Structure Applied to MELISSA

( I : Clostridia, II a and b : Rhodobacter, III : Nitrobacter, IV : Spirulina )

Figure 1.9: Exemple de la structure d'un système de contrôle appliqué à l'écosystème artificiel MELISSA (d'après LASSEUR et BINOT, 1991).

donc synonyme d'instabilité (LASSEUR et BINOT, 1991).

Pour les raisons qui viennent d'être exposées, mais également par continuité avec ce que nous avons précédemment discuté, nous nous plaçons d'emblée dans l'hypothèse déterministe. Celle ci consiste à découper le système en sous unités représentant des entités physiques, et à traiter le problème global en termes de stabilité de chaque sous système. Ces systèmes sont par nature instables, mais leur stabilité peut être assurée par un contrôle externe à tous les niveaux (LASSEUR et BINOT, 1991). Cette démarche requiert une hiérarchisation des fonctions sous la forme suivante: paramètres d'état, flux, boucle fermée, optimisation (LASSEUR et al. 1991). Elle présente en outre, l'intérêt de pouvoir traiter le problème du contrôle au moyen d'algorithmes linéaires connus, mais nécessite une modélisation mathématique robuste. La figure 1.9 montre un exemple de ce que pourrait être la structure d'un système de contrôle appliqué à l'écosystème MELISSA.

### 1.3.2. Démarche requise pour la modélisation d'un écosystème clos artificiel:

La discussion esquissée dans le paragraphe précédent dégage 3 aspects fondamentaux relatifs à la modélisation des écosystèmes clos artificiels:

- La modélisation globale du système est impossible car les équations obtenues, non linéaires, ne sont pas solubles numériquement dans l'état actuel des connaissances.

- une modélisation globale ne permet pas non plus l'identification des nombreux paramètres impliqués dans le modèle car on ne sait pas minimiser des critères lorsque le nombre de paramètres est trop élevé (RICHTER et DIEKCRUGER, 1990).

- Le contrôle externe du système nécessaire au maintien d'un régime permanent stable nécessite qu'il soit divisé en plusieurs sous unités.



On conçoit donc que la démarche consistant à vouloir traiter dans son ensemble le problème de la modélisation d'un écosystème clos artificiel soit relativement stérile. Elle serait, en tout état de cause, limitée à l'étude soit d'un très petit nombre d'opérations dont la modélisation a été simplifiée à outrance, soit du bilan stoechiométrique simpliste d'un plus grand nombre d'étapes (VOLK et RUMMEL, 1986).

L'approche la plus réaliste semble donc bien être l'approche modulaire séquentielle, qui consiste à réduire le système à un certain nombre de modules, correspondant à des opérations unitaires, chacun étant modélisé de façon approfondie. Il devient alors possible de calculer le flux sortant du module, si l'on connaît le flux qui y entre. Dans ce cas, l'identification des paramètres se fait sur chaque module, ce qui la rend possible par réduction du nombre de paramètres. La résolution du système non linéaire peut se faire de proche en proche par des moyens qui seront discutés dans le paragraphe suivant.

Cette approche a déjà été envisagée (MODELL, *et al.* 1988; CORNET et DUBERTRET, 1990), ou est envisagée pour des développements futurs notamment par l'ESA (LASSEUR et BINOT, 1991).

### 1.3.3. Limites de la modélisation d'un écosystème clos artificiel:

Malgré toutes les informations que peut apporter une modélisation mathématique au niveau de la simulation, du contrôle, de l'optimisation, et du dimensionnement, on ne doit pas perdre de vue que, dans le cas d'écosystèmes clos, l'expérimentation reste obligatoire pour vérifier l'adéquation du choix des variables d'état, et éventuellement, l'effet de variables non prises en compte initialement. En effet, un modèle, aussi performant soit-il, ne peut jamais faire autre chose que de prédire l'évolution des variables d'état qui ont été déterminées pour

modéliser le système. Il ne peut pas non plus, dans l'état actuel des connaissances, prendre en compte d'éventuelles bifurcations pouvant survenir sur l'évolution de ces variables. Ces bifurcations peuvent se produire lorsqu'il existe des facteurs internes dépendant du temps, ce qui est le cas pour des compartiments biologiques sur le long terme.

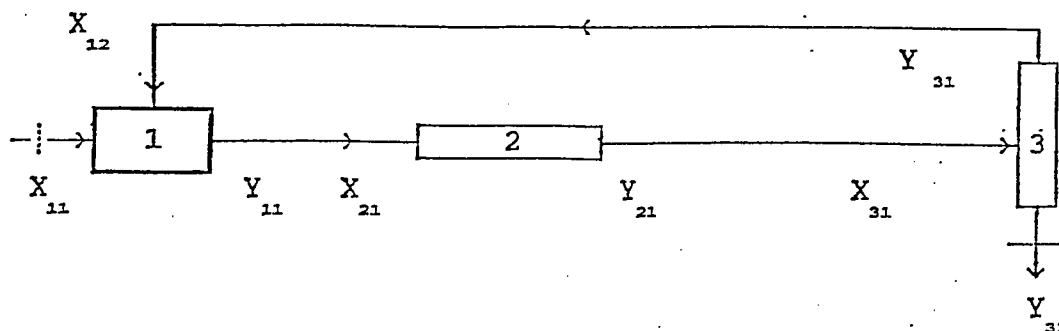
Les résultats obtenus par les soviétiques (GITELSON, 1990) sur l'accumulation dans les systèmes clos de molécules toxiques en quantités infimes, et à la limite, non détectables ou très difficilement identifiables, montre bien les limites de la modélisation et ce que l'on peut en attendre. Il reste que c'est une étape obligatoire à bien des niveaux pour la mise au point de tels systèmes, et le paragraphe suivant est destiné à mettre en évidence les objectifs que l'on peut s'assigner lorsqu'on débute un travail de modélisation.

#### **1.4. APPROCHE MODULAIRE SEQUENTIELLE.**

Cette approche, qui consiste à découper le système en modules, présente un grand nombre d'avantages qui ont été discutés précédemment. Le but de ce paragraphe est de présenter rapidement la théorie de la méthode, puis de préciser les choix qui ont été faits pour le module représentant le compartiment photosynthétique (*Spirulina platensis*).

1.4.1. La méthode:

Soit l'élément d'écosystème clos à 3 compartiments suivant:



→  
 $X_{jk} = (x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n, T, P)$ , est le vecteur caractéristique du courant k entrant dans le module j.

→  
 $Y_{jl} = (y_1, y_2, \dots, y_i, \dots, y_n, T, P)$ , est le vecteur caractéristique du courant l sortant du module j.

→  
 $U_j = (u_1, \dots, u_i, \dots, u_n)$ , sont les paramètres du modèle pour le module j.

$x_i, y_i$ , les débits partiels du constituant i.

En régime stationnaire, on a  $\frac{d(X,Y)}{dt} = 0$ , et il faut résoudre, pour p modules, à partir des équations des modèles de chaque module, un système du type:

$$\begin{aligned}
 & \begin{matrix} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \\ F_1(X_{1k}, Y_{1l}, U_1) & = & 0 \end{matrix} \\
 & \begin{matrix} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \\ F_2(X_{2k}, Y_{2l}, U_2) & = & 0 \end{matrix} \\
 & \vdots \\
 & \begin{matrix} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \\ F_j(X_{jk}, Y_{jl}, U_j) & = & 0 \end{matrix} \\
 & \vdots \\
 & \begin{matrix} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \\ F_p(X_{pk}, Y_{pl}, U_p) & = & 0 \end{matrix}
 \end{aligned}$$

assorti des équations de connexion qui s'écrivent, pour l'exemple ci dessus:

$$\begin{array}{r} \rightarrow \\ X \\ \rightarrow^{12} \\ X \\ \rightarrow^{21} \\ X \\ \rightarrow_{31} \end{array} - \begin{array}{r} \rightarrow \\ Y \\ \rightarrow^{31} \\ Y \\ \rightarrow^{11} \\ Y \\ \rightarrow_{21} \end{array} = 0$$

Il est impossible de résoudre globalement ces deux systèmes, et on a donc recours à l'approche modulaire séquentielle. C'est-à-dire que l'on calcule les flux de sorties à partir des flux d'entrées et des paramètres; de proche en proche, avec les équations de connexion, on arrivera à calculer toutes les variables du système. Les équations à résoudre sont alors du type:

$$\begin{array}{r} \rightarrow \\ Y \\ \rightarrow_{j1} \end{array} = f_{j1} \left( \begin{array}{r} \rightarrow \\ X \\ \rightarrow_{jk} \end{array}, \begin{array}{r} \rightarrow \\ U \\ \rightarrow_j \end{array} \right)$$

Tous les courants recyclés comme  $\begin{array}{r} \rightarrow \\ X \\ \rightarrow_{12} \end{array}$  doivent être initialisés pour que le calcul puisse se faire jusqu'à la convergence. On doit donc résoudre globalement un système algébrique non linéaire  $\begin{array}{r} \rightarrow \\ X \\ \rightarrow \end{array} = G(X)$ . Les fonctions  $f_{j1}$  peuvent être des équations algébriques, différentielles, ou aux dérivées partielles.

#### 1.4.2. Le module compartiment photosynthétique:

Ce module est représenté par le photobioréacteur et son modèle mathématique. Celui-ci doit permettre la simulation du compartiment en régime instationnaire et continu, ce qui est à la base du dimensionnement, de l'optimisation, de l'automatisation, et de l'étude de stabilité de l'écosystème (figure 1.10).

Le module doit pouvoir effectuer les tâches suivantes (CORNET et DUBERTRET, 1990).

- Calculer les bilans matière sur le compartiment pour les principaux éléments.

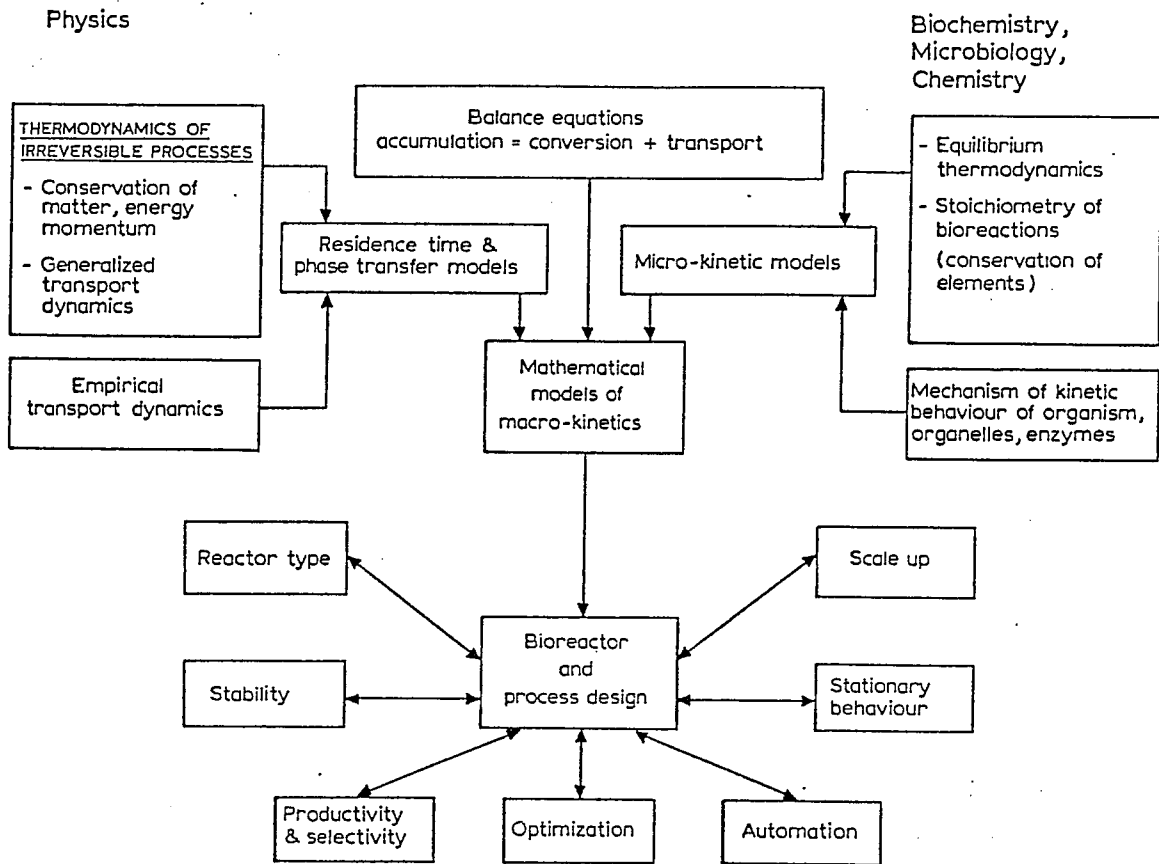


Figure 1.10: Domaines impliqués dans la résolution de problèmes en génie des procédés biologiques (d'après ROELS, 1983).

- Calculer les principales propriétés thermodynamiques impliquées dans le procédé (solubilités, coefficients de transfert, coefficients d'activité, constantes de vitesse, constantes d'équilibre, enthalpies,...).

- Réaliser le bilan énergétique du compartiment.

- Calculer les vitesses en discontinu ou les productivités en continu, pour les composants de chaque courant sortant du module.

De telles caractéristiques sont possibles si l'on choisit un certain nombre de variables d'état prioritaires qui sont censées décrire le procédé. Le module utilitaire doit alors pouvoir calculer la valeur de ces variables en sortie, connaissant les valeurs à l'entrée.

Le choix des variables d'état décrivant le compartiment photosynthétique *Spirulina* est guidé par le fait que les principaux éléments C,H,O,N,S,P, représentent 97% de la matière qui transite dans le compartiment et sont donc susceptibles de modifier les cinétiques aussi bien que les stoechiométries. D'autre part, l'énergie lumineuse absorbée dans le réacteur joue un rôle crucial dans les cinétiques et le bilan énergétique.

La réalisation de modèles mathématiques robustes, susceptibles de bien rendre compte de situations diverses pouvant apparaître sur les variables d'un écosystème artificiel, nécessite la maîtrise d'un certain nombre d'outils qui sont résumés sur la figure 1.10 (ROELS, 1983).

## CONCLUSION.

Le développement technologique des photobioréacteurs contrôlés est longtemps resté limité en raison des problèmes techniques engendrés par la distribution de la lumière à l'intérieur des réacteurs. Malgré cela, les microorganismes photosynthétiques présentent des intérêts industriels reconnus, et leurs potentialités sont loin d'avoir été entièrement identifiées et exploitées.

---

Les projets d'écosystèmes clos artificiels, qui se sont développés à partir des années 80 par le biais des agences spatiales, ont fait naître un regain d'intérêt pour l'étude des photobioréacteurs. En effet, ces écosystèmes clos artificiels destinés à recycler les principaux éléments de la matière, comportent tous une étape photosynthétique qui est seule capable de produire de la biomasse consommable à partir de dioxyde de carbone et de minéraux. C'est le cas de l'écosystème artificiel MELISSA, un projet de l'ESA, qui est basé sur le recyclage de l'azote et du soufre de la ration protéique par l'intermédiaire de la cyanobactérie *Spirulina platensis*.

L'étude de la stabilité, du bilan énergétique, et la conception de ces systèmes nécessitent un travail très important de modélisation mathématique, mais leur complexité est telle que l'on doit d'emblée abandonner l'idée d'une modélisation globale.

L'approche la mieux adaptée semble l'approche modulaire séquentielle, déjà utilisée en génie des procédés.

Cela conduit notamment à l'étude cinétique et énergétique des photobioréacteurs, dans une large gamme de conditions de fonctionnement, le but étant la réalisation d'un module de simulation. Celui-ci doit fournir également les informations nécessaires au dimensionnement, à l'optimisation et au contrôle des photobioréacteurs.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES.



## **2.1. LA SOUCHE, SON ENTRETIEN, ET LES MILIEUX DE CULTURE.**

La souche utilisée est la souche de *Spirulina platensis* 8005 provenant de l'Institut Pasteur. Elle a été purifiée au laboratoire de Biochimie Fonctionnelle des Membranes Végétales.

### **2.1.1. Purification:**

La souche de l'Institut Pasteur n'étant pas exempte de bactéries contaminantes, sa purification a été réalisée au laboratoire. La méthode consiste à découper stérilement sous une loupe binoculaire, un morceau de gélose contenant un filament unique de *S. platensis*, et à le repiquer au centre d'une boîte de pétri. Cette opération est répétée un grand nombre de fois, et les boîtes sont mises à incuber à 35°C, à la lumière continue. Cette technique repose sur le fait que les spirulines, sur boîte de pétri, ne forment pas des colonies, mais peuvent se mouvoir dans la gélose. On obtient alors un gradient de concentration en filaments, du centre de la boîte vers les bords où se trouvent les filaments uniques. Si l'on repique un grand nombre de filaments, on pourra obtenir, statistiquement, une boîte sur laquelle les filaments sont purs.

### **2.1.2. Vérification de la pureté de la souche:**

La pureté de la souche peut être vérifiée de plusieurs façons. Un test grossier consiste à observer au microscope l'absence de bactéries contaminantes, qui se trouvent souvent accrochées aux filaments, ou l'absence d'une autre microalgue. Le test le plus fiable consiste à ensemencer avec la culture de spirulines une boîte de pétri contenant un milieu favorable aux bactéries contaminantes. Pour cela, on utilise un milieu gélosé minéral (à base du milieu minéral de la cyanobactérie dont on veut

vérifier la pureté), additionné de glucose à 0,2% et d'hydrolysate de caséine à 0,02%. En effet, les bactéries contaminant les cyanobactéries se développent surtout dans les milieux hypersalins.

Les boîtes sont ensuite placées à 37°C et à l'obscurité.

### 2.1.3. Les milieux de culture de *Spirulina platensis*:

Plusieurs milieux ont été utilisés pour la culture de *S. platensis*, notamment lors de l'étude de l'effet de la force ionique sur la croissance. Néanmoins, ces milieux dérivent tous du milieu proposé par ZARROUK (1966). La principale modification apportée concerne uniquement les proportions du tampon carbonate-bicarbonate, qui permet d'obtenir un pH directement égal à 9,5. Le milieu de base (MB) est donc le milieu de ZARROUK (1966), modifié comme suit:  $\text{NaHCO}_3$ : 10,5 g/l,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 7,6 g/l.

Une préculture a également été maintenue dans un milieu de plus faible force ionique (MF), qui est le milieu de base dont toutes les concentrations ont été divisées par 4, sauf celles des oligoéléments. Ces précultures ont servi, outre à l'étude de l'effet de la force ionique, àensemencer les réacteurs lors de l'étude des limitations minérales, puisque l'apport en minéraux de l'inoculum devait être faible.

Deux autres milieux ont été ponctuellement utilisés pour l'étude de l'effet de la force ionique. Il s'agissait d'un milieu intermédiaire (MI) pour lequel les concentrations du milieu de base étaient divisées par deux, et d'un milieu de forte force ionique (MS) pour lequel les concentrations du milieu de base ont été multipliées par deux.

Les compositions complètes des quatre milieux utilisés sont consignées sur la figure 2.1.

M.B.			M.F.		
	(mol/l).10 <sup>3</sup>	kg/m <sup>3</sup>		(mol/l).10 <sup>3</sup>	kg/m <sup>3</sup>
NaCl	17,1	1,0	NaCl	4,275	0,25
CaCl <sub>2</sub>	0,27	0,03	CaCl <sub>2</sub>	0,0675	0,0075
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,7	1,0	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,425	0,25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,81	0,2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2025	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,9	0,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,725	0,125
NaNO <sub>3</sub>	29,4	2,5	NaNO <sub>3</sub>	7,35	0,625
NaHCO <sub>3</sub>	128,0	10,5	NaHCO <sub>3</sub>	32,0	2,625
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	72,0	7,6	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	18,0	1,9
EDTA	0,22	0,08	EDTA	0,055	0,02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,036	0,01	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,009	0,0025
I= 0,42 mol/l			I= 0,105 mol/l		
M.I.			M.S.		
	(mol/l).10 <sup>3</sup>	kg/m <sup>3</sup>		(mol/l).10 <sup>3</sup>	kg/m <sup>3</sup>
NaCl	8,55	0,5	NaCl	34,2	2,0
CaCl <sub>2</sub>	0,935	0,015	CaCl <sub>2</sub>	0,54	0,06
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,85	0,5	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11,4	2,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,405	0,1	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,62	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,45	0,25	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,8	1,0
NaNO <sub>3</sub>	14,7	1,25	NaNO <sub>3</sub>	58,8	5,0
NaHCO <sub>3</sub>	64,0	5,25	NaHCO <sub>3</sub>	256,0	21,0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	36,0	3,8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	144,0	15,2
EDTA	0,11	0,04	EDTA	0,44	0,16
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,018	0,005	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,072	0,02
I= 0,21 mol/l			I= 0,84 mol/l		

Figure 2.1: Différents milieux utilisés pour la culture de *Spirulina platensis*, et leur force ionique respective (I).

#### 2.1.4. Entretien de la souche:

La souche est conservée dans l'algothèque du laboratoire, en milieu liquide, à 20°C, et sous faible lumière alternée (12h/12h). Les repiquages ont lieu tous les deux mois.

Des précultures en erlenmeyer de 500 ml sont repiquées tous les 15 jours de façon à avoir en permanence du matériel biologique pour l'expérimentation ou pour l'ensemencement des réacteurs. Ces précultures sont réalisées dans un incubateur à CO<sub>2</sub> GALLEMKAMP, à agitation orbitale, dans lequel est maintenue une atmosphère à 2% de CO<sub>2</sub>. L'éclairage est de 5 W/m<sup>2</sup> et la température de 35°C.

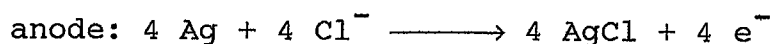
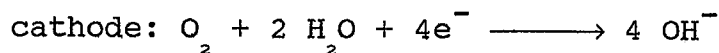
### 2.2. ELECTRODES A OXYGENE DISSOUS. ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE ET DE LA RESPIRATION.

Deux types d'électrodes à O<sub>2</sub> ont été utilisées pour l'étude de la photosynthèse et de la respiration chez *S. platensis*:

une électrode ampérométrique de type Clark dont le principe est identique à celui de l'électrode du photoréacteur, et une électrode ampérométrique de type HAXO et BLINKS (1950).

#### 2.2.1. Electrode de Clark:

L'électrode de Clark mesure un courant entre une cathode et une anode reliées par un électrolyte. Les réactions sont les suivantes:



L'inconvénient majeur de ce type d'électrode est sa dynamique relativement lente. En effet, son temps de réponse à 95% est de l'ordre de 0,1 à quelques secondes. D'autre part, sa sensibilité est limitée à 10<sup>-8</sup> mole d'O<sub>2</sub> par seconde.

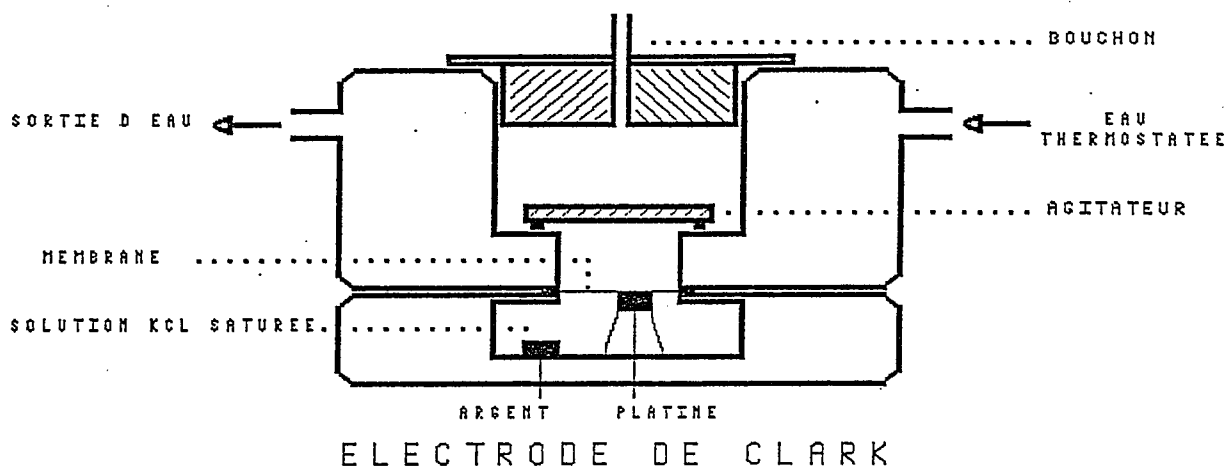


Figure 2.2: Schéma du dispositif de mesure de l'oxygène dissous au moyen d'une électrode de Clark.

Cette électrode a été utilisée pour l'étude de la photosynthèse et de la respiration en fonction de la température et de la teneur relative en pigments. Le dispositif se présente sous la forme d'une cuve thermostatée de 3 ml, fermée par un bouchon, et agitée par une toupie à entraînement magnétique (figure 2.2). Les mesures peuvent se faire à l'obscurité ou à la lumière au moyen d'un faisceau convergent sur la cuve. Dans ce dernier cas, plusieurs valeurs de flux lumineux peuvent être obtenues par l'interposition de filtres neutres de différentes transmissions.

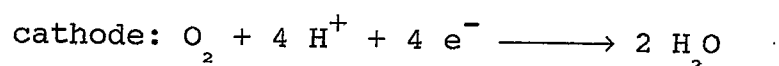
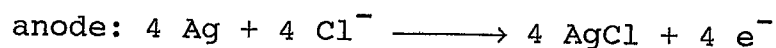
Lors de l'étude de la photosynthèse, la concentration en pigments dans la cuve de mesure a toujours été maintenue très faible de façon à éviter tout profil de flux lumineux à l'intérieur, et obtenir ainsi des résultats extrapolables à l'échelle de la cellule seule.

Au contraire, lors de l'étude de la respiration qui est toujours faible chez les cyanobactéries, la concentration était élevée de façon à avoir, cette fois, un signal interprétable.

Les résultats obtenus sont exprimés, par exemple, en moles d'O<sub>2</sub>.kg de cellules<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, à la température précisée et sous une atmosphère, en tenant compte de la solubilité de l'oxygène dans le milieu de culture.

### 2.2.2. Electrode de Haxo-Blinks:

L'électrode de HAXO et BLINKS (1950) est également une électrode ampérométrique, mais sa conception est différente. L'échantillon est directement en contact avec une électrode de platine. Les réactions générant le courant sont les suivantes:



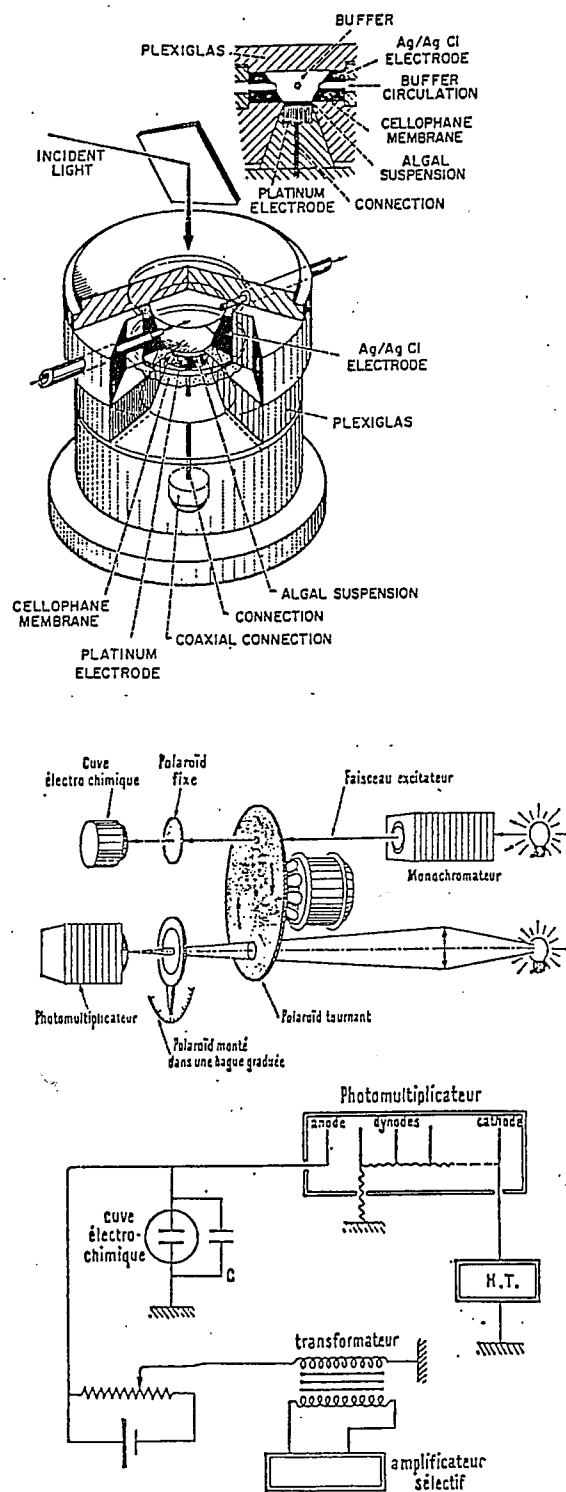
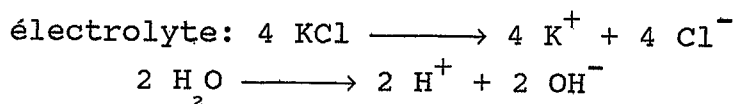


Figure 2.3: Schéma du dispositif de mesure de l'oxygène dissous au moyen d'une électrode Haxo-Blinks. Système utilisé pour les mesures en lumière modulée (d'après JOLIOT, 1966).



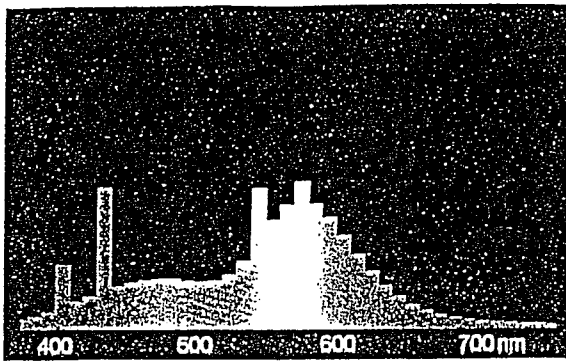
Cette électrode possède un temps de réponse beaucoup plus rapide, de l'ordre de la milliseconde, ainsi qu'une sensibilité accrue puisqu'elle permet de détecter jusqu'à  $10^{-16}$  mole/seconde. Elle présente néanmoins l'inconvénient de ne donner qu'une information relative car il est impossible de l'étalonner.

Le dispositif expérimental décrit sur la figure 2.3 est constitué d'une électrode de platine sur laquelle on dépose la suspension cellulaire, recouverte d'un film cellophane au dessus duquel circule un électrolyte, dont la concentration en oxygène est constante et dans lequel se trouve l'électrode d'argent. La membrane de cellophane limite l'épaisseur de la couche de cellules à 0,2 mm, ce qui est la taille d'une spiruline. L'épaisseur de la couche d'algues sédimentées est en réalité déterminée par la concentration de la suspension introduite dans la cuve. Elle est de l'ordre de quelques micromètres. Compte tenu de la taille des spirulines, on peut, là encore considérer que l'on obtiendra des résultats à l'échelle cellulaire.

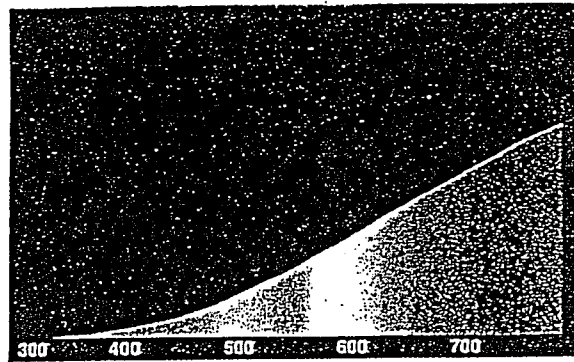
Les caractéristiques de cette électrode de vitesse permettent d'envisager l'étude de cinétiques de dégagements d'oxygène extrêmement rapides. Or, on sait que dès l'envoi d'un signal lumineux modulé à 25 ou 50 Hz, la respiration n'est plus mesurée, alors que la photosynthèse répond encore à 500 hz (JOLIOT, 1966). L'envoi d'un signal continu et modulé (figure 2.3), permettra donc d'obtenir par différence, et pour des flux lumineux différents, une courbe de saturation de la photosynthèse, ainsi qu'une courbe de saturation de l'inhibition de respiration à la lumière chez les cyanobactéries. La méthode est analogue à celle décrite par JOLIOT (1966). Les résultats obtenus conduiront à une hypothèse très importante du modèle mathématique.

Cette électrode couplée à un monochromateur sur le faisceau incident, a permis de réaliser un spectre d'action de la

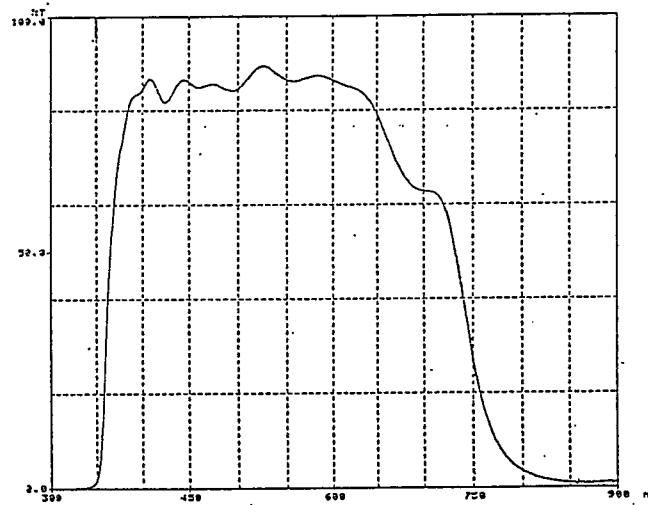




(a)



(b)



(c)

**Figure 2.4:** Spectres d'émission des lampes utilisées pour la culture de *Spirulina platensis*:

a- tubes fluorescents "blanc industrie"

b- lampes halogènes.

c- Spectre de transmission du filtre anticalorique utilisé pour les mesures de flux d'énergie lumineuse radiante.

photosynthèse, et un spectre d'action de l'inhibition de respiration.

### 2.3. LES SPECTRES D'EMISSION DE FLUORESCENCE.

Le spectrofluorimètre utilisé est un spectrofluorimètre à double monochromateur fabriqué au laboratoire.

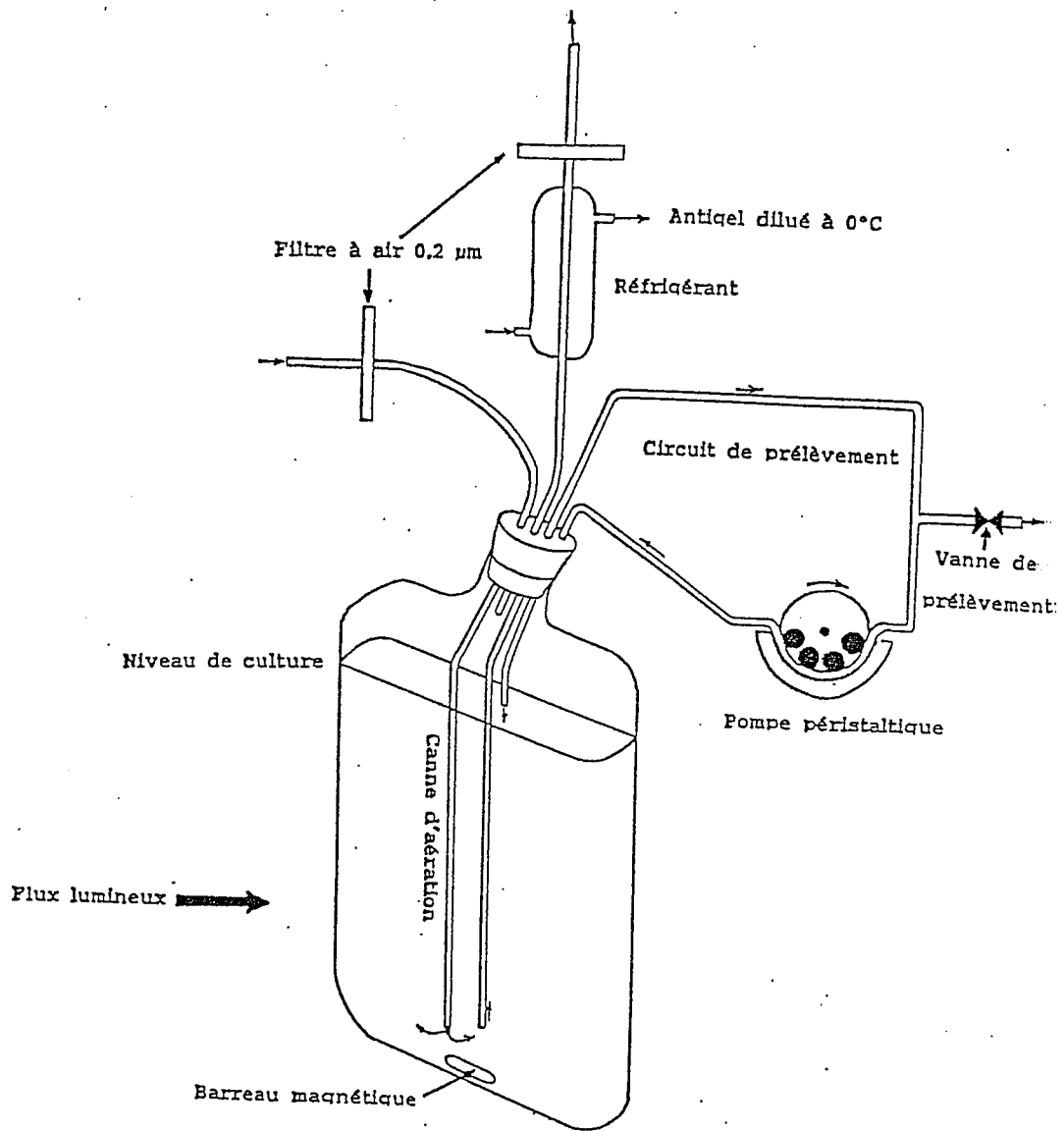
Il a permis de réaliser des spectres d'émission de fluorescence dans l'azote liquide à 77 K chez *S. platensis*. Pour cela, l'échantillon est fixé sur une pastille de papier filtre, tout d'abord par capillarité, puis par congélation dans l'azote liquide. La pastille est placée sur la cellule de mesure. Un premier monochromateur sur le faisceau incident permet de choisir la longueur d'onde d'excitation. Un deuxième monochromateur autorise le défilement de toutes les longueurs d'onde du spectre visible, pour recueillir la fluorescence émise. Deux excitations successives sont utilisées puisqu'une longueur d'onde de 540 nm excite les phycocyanines (pigment récepteur du photosystème II), alors qu'une longueur d'onde de 440 nm excite les chlorophylles a (pigment récepteur du photosystème I).

Les résultats obtenus permettent de caractériser les pigments de la spiruline et leurs évolutions, notamment lors de cultures sous différentes qualités de lumière pour l'étude de l'adaptation chromatique.

### 2.4. LES PHOTOREACTEURS ET LES CULTURES CONTROLEES.

#### 2.4.1. Les cultures en fioles de Roux:

Des fioles de Roux de 0,5 ou 4 litres ont été utilisées pour certaines cultures. L'utilisation de ces fioles présente l'intérêt de simplifier considérablement les aspects de modélisation liés au transfert de la lumière. La fraction de réflexion de la lumière pour ces fioles est de 0,10 (voir paragraphe 2.8.1).



**Figure 2.5:** Schéma du photobioréacteur parallélépipédique utilisé pour l'étude des limitations minérales lors des cultures en masse de *Spirulina platensis*.

Ces fioles sont éclairées au moyen de tubes fluorescents de 20 W MAZDAFLUOR blanc industrie TF, sur toute la hauteur de la fiole. Le spectre d'émission de ces tubes est donné figure 2.4.

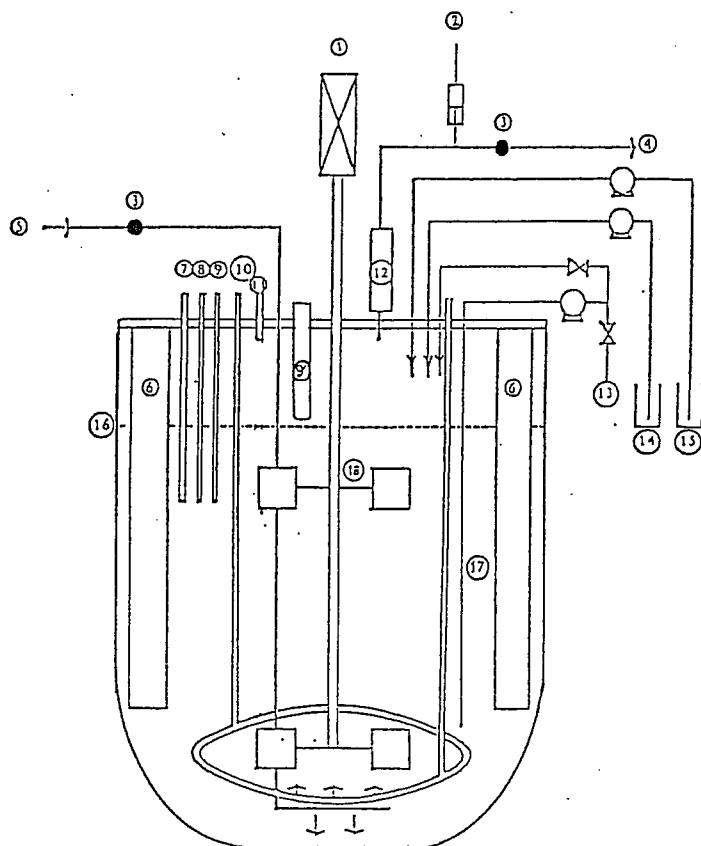
Les fioles de Roux de 500 ml ont été utilisées uniquement pour l'obtention d'informations qualitatives, ou dans un but comparatif (étude des effets de la qualité de la lumière par exemple). Dans ce cas, le pH est régulé par la teneur en CO<sub>2</sub> dans le gaz que l'on envoie dans la fiole. Un réglage manuel permet de réguler de façon satisfaisante le pH en transférant, par conséquent, autant de CO<sub>2</sub> qu'il en est consommé par les microorganismes. Le gaz envoyé permet également l'agitation du milieu de façon à le rendre homogène.

La température est maintenue à 36°C par la thermostatisation de la pièce. Les prélèvements sont effectués en ouvrant stérilement la fiole.

Au cours de l'étude de l'effet de la qualité de la lumière, 4 types de lumières incidentes ont été testées. Ces différentes lumières ont été obtenues par l'interposition de filtres KODAK Wratten, sur la face de la fiole par laquelle entrait la lumière. Les lumières incidentes étaient les suivantes:

- lumière blanche témoin [350-750 nm].
- lumière orange [550-750 nm].
- lumière bleue [380-480 nm].
- la lumière magenta [350-480 + 560-750 nm], qui est la somme des deux précédentes.

Les fioles de Roux de 4 litres ont été utilisées pour l'étude des limitations minérales (figure 2.5). Il s'agit, dans ce cas, de véritables photoréacteurs à géométrie parallélépipédique. Un condenseur dans lequel circule un liquide réfrigérant permet d'éviter les pertes d'eau par évaporation. Les prélèvements sont effectués en faisant circuler du milieu grâce à une pompe péristaltique dans un circuit de tuyaux muni d'un robinet. Le pH



- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Moteur d'agitation       | 10. Circuit de régulation de température |
| 2. Soupape de sécurité      | 11. Capteur de pression absolue          |
| 3. Filtre à air 0,2 µm      | 12. Condenseur                           |
| 4. Sortie d'air             | 13. Circuit de prélèvement               |
| 5. Entrée d'air             | 14. Solution d'acide chlorhydrique       |
| 6. Chicanes                 | 15. Antimousse                           |
| 7. Sonde pH                 | 16. Niveau de la phase liquide           |
| 8. Sonde à oxygène          | 17. Canne de prélèvement                 |
| 9. Sonde à température      | 18. Deux turbines Rushton (6 pales)      |
| 9'. Sonde à CO <sub>2</sub> |  |

Figure 2.6: Schéma du photobioréacteur cylindrique (cuve agitée aérée) utilisé pour les cultures contrôlées de *Spirulina platensis*.

et la température sont contrôlés de la même façon que pour les petites fioles de Roux. L'agitation du milieu est ici améliorée par un barreau magnétique.

Dans toutes les conditions de culture, la lumière entre par une seule face, et les trois côtés de la fiole par lesquels la lumière ne pénètre pas sont recouverts d'un papier noir, pour éviter les réflexions ou une entrée de lumière provenant d'un autre endroit de la pièce.

L'utilisation de fioles de Roux comme photoréacteurs parallélépipédiques permet de ramener le problème de l'éclairage à une seule dimension d'espace, ce qui conduit à une simplification considérable du traitement des résultats.

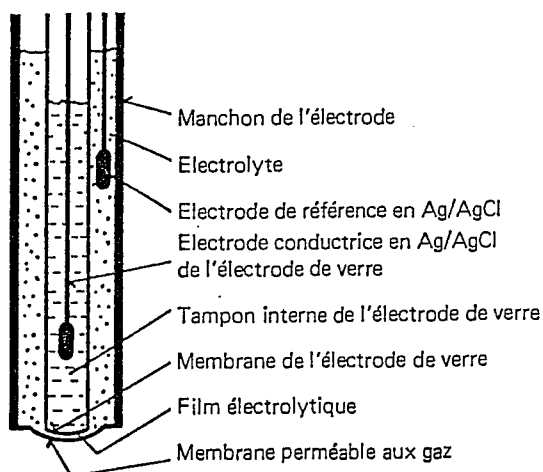
#### 2.4.2. Les cultures en cuve agitée:

On a utilisé pour cela, un bioréacteur APPLIKON de 5 litres utiles (volume total de 7 litres, figure 2.6).

La fraction de réflexion de la lumière de ce réacteur est de 0,06 (voir paragraphe 2.8.1).

Le réacteur APPLIKON est une cuve standard agitée au moyen de deux turbines Rushton à 6 pales, et qui possède en outre 4 chicanes fixes. L'arbre d'agitation est relié à un moteur d'une puissance de 310 W par l'intermédiaire d'un accouplement magnétique, ce qui élimine tout risque de contamination. Le moteur est commandé par un régulateur de vitesse électronique permettant de réguler l'agitation entre 0 et 1250 t/mn.

La platine supérieure est équipée d'un certain nombre de capteurs, notamment un capteur de pression absolue JPB Tb 304, une électrode de pH de 350 mm INGOLD, une électrode polarographique INGOLD d'un diamètre de 19 mm pour la mesure de la pression partielle en oxygène dissous (il s'agit d'une électrode de type Clark dont le principe est identique à celui décrit au paragraphe



COURBE D' ETALONNAGE DE L' ELECTRODE  
 A CO<sub>2</sub> ENTRE 0 ET 1500 ppm

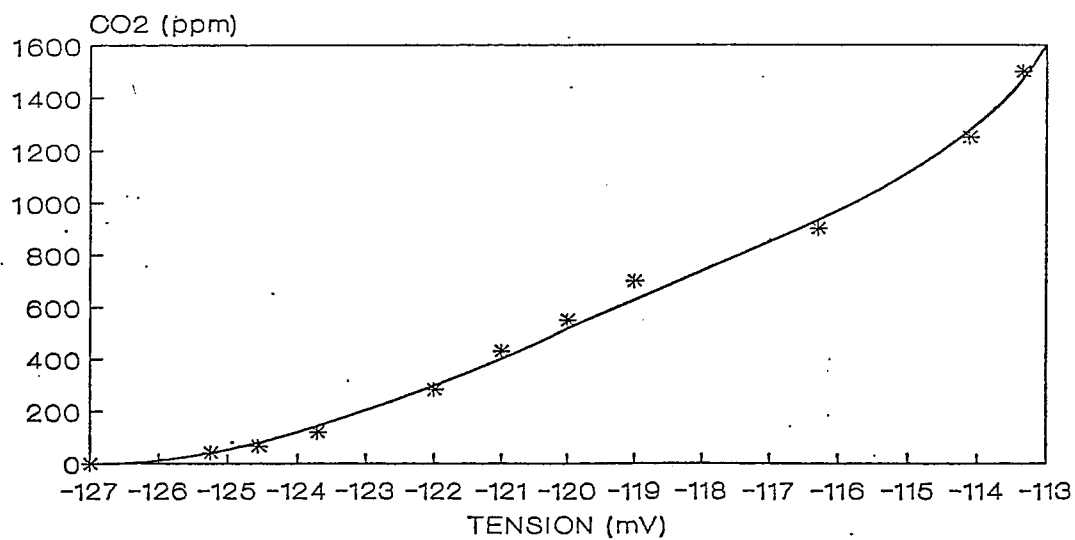


Figure 2.7: Schéma de l'électrode à CO<sub>2</sub> dissous. Courbe d'étalonnage obtenue entre 0 et 1500 ppm de CO<sub>2</sub>, en fonction de la tension de sortie délivrée par l'électrode.

2.2.1), et une électrode INGOLD de 25 mm de diamètre pour la mesure de la pression partielle en  $\text{CO}_2$  dissous.

Le réacteur est éclairé par deux lampes halogène PHILIPS R7S de 500 W chacune (spectre d'émission donné figure 2.4).

L'électrode de mesure de la pression partielle en  $\text{CO}_2$  est une électrode potentiométrique, le gaz diffuse à travers une membrane sélectivement perméable jusqu'à un électrolyte (figure 2.7). A l'intérieur du manchon, une électrode mesure le pH du film électrolytique. La concentration en bicarbonate de l'électrolyte est élevée, si bien que la pression partielle en  $\text{CO}_2$  est proportionnelle à la concentration en ions  $\text{H}_3\text{O}^+$ . L'électrode répond donc à la pression partielle du  $\text{CO}_2$  de la solution à mesurer selon la loi de Nernst:

$$E = E_0 + S \cdot \log (p_{\text{CO}_2})$$

La relation précédente est valable entre 1 et 1000 mbar de  $\text{CO}_2$ . Cette électrode présente l'avantage de pouvoir s'étalonner facilement en cours de culture, au moyen de 2 solutions tampon de pressions partielles définies. Elle présente néanmoins l'inconvénient d'avoir une sensibilité minimale de 1000 ppm en fraction molaire de  $\text{CO}_2$ , ce qui est une valeur beaucoup trop élevée pour envisager l'étude d'une limitation de la photosynthèse par le transfert de  $\text{CO}_2$ .

Lors de cette étude, la pression partielle pourra avoisiner 0, et il est très important de pouvoir mesurer le  $\text{CO}_2$  dissous bien en dessous du seuil de sensibilité de l'électrode.

En réalité, l'électrode répond très bien en dessous de 1000 ppm, à condition de modifier légèrement son impédance, mais elle ne suit plus la loi de Nernst. Il sera donc nécessaire de réaliser un étalonnage point par point. La courbe d'étalonnage obtenue (figure 2.7) montre qu'il est possible d'obtenir une réponse jusqu'à 40 ppm en fraction molaire de  $\text{CO}_2$ , avec une précision tout



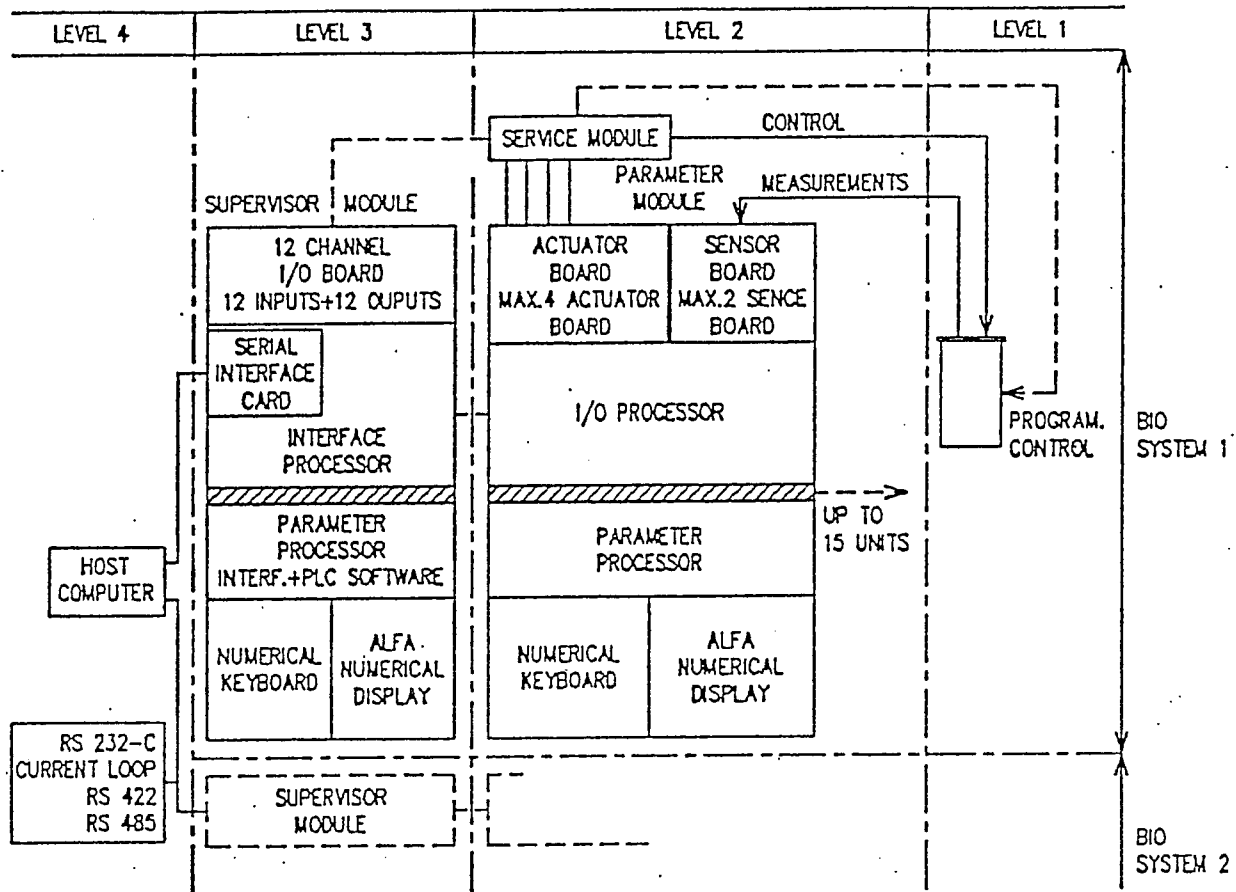


Figure 2.8: Configuration du bioprocresseur ADI 1020 (APPLIKON) utilisé pour le contrôle des cultures en bioréacteur et l'acquisition des données.

à fait satisfaisante; elle permet d'établir la relation suivante donnant la teneur en CO<sub>2</sub> gaz en fonction de la tension de sortie U (en mV):

$$\text{Fraction molaire en CO}_2 \text{ (ppm)} = 4,23.U^2 + 1122,3.U + 74300$$

Le système de contrôle et de régulation du réacteur est un bioprocasseur APPLIKON ADI 1020 (figure 2.8).

Les données du bioprocasseur sont acquises sur un ordinateur de type IBM PC, au moyen d'une liaison RS 232, et d'un logiciel APPLIKON (BIOWATCH, figure 2.9).

Lors de l'étude des bilans gazeux et de la limitation par le transfert de CO<sub>2</sub>, les débits étaient régulés par des régulateurs massiques TYLAN FC-260. La précision de ces régulateurs est de 1% pleine échelle, et ils délivrent directement un débit normalisé (0°C, 1 atmosphère). Trois régulateurs différents ont été utilisés:

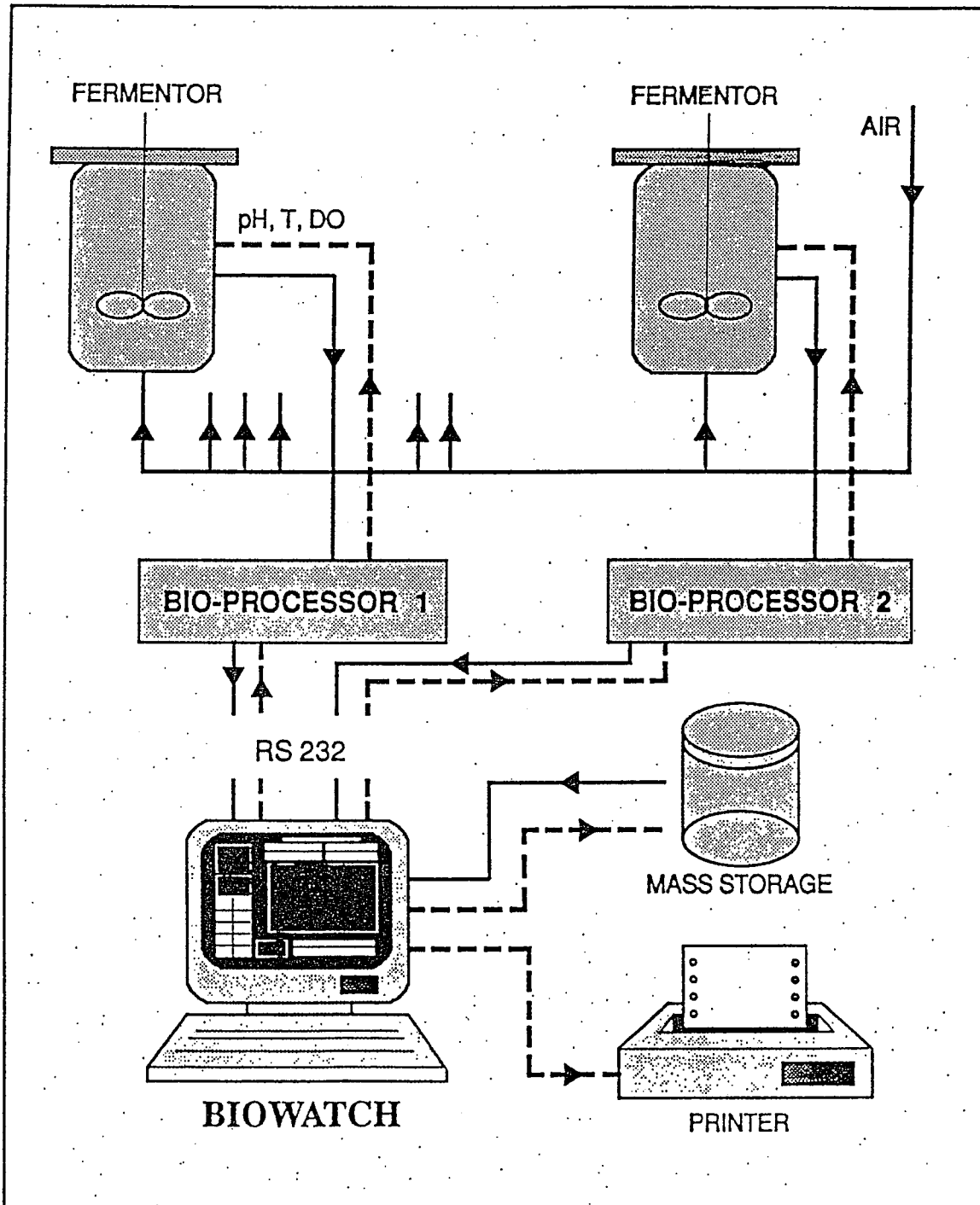
- le régulateur R1 pour le CO<sub>2</sub> délivrant 5 Ncm<sup>3</sup>/mn pleine échelle (étalonnage réalisé avec N<sub>2</sub>O, le facteur de correction pour le CO<sub>2</sub> est de 1,04).

- le régulateur R2 pour l'air délivrant 3 Nl/mn pleine échelle.

- le régulateur R3 pour le mélange entrant dans le réacteur, délivrant 0.3 Nl/mn pleine échelle.

Les régulateurs R2 et R3 ont été étalonnés avec N<sub>2</sub>, il n'est donc pas nécessaire de faire une correction pour l'air ou le mélange gazeux.

La mesure de la teneur en CO<sub>2</sub> gazeux à l'entrée et à la sortie du réacteur est obtenue au moyen d'un analyseur différentiel infrarouge ADC de type cellule de Luft. Deux échelles peuvent être utilisées en fonction de la valeur de la différentielle, 500 ppm, ou 5000 ppm. Dans les deux cas, la



**Figure 2.9:** Principe du logiciel d'acquisition de données Biowatch (APPLIKON), utilisé pour le suivi des cultures en cuve agitée aérée.

précision est de 1% de la pleine échelle. La linéarité de la réponse de l'analyseur entre 0 et 5000 ppm a été vérifiée lors de l'étalonnage.

La figure 2.10 représente l'installation complète relative aux cultures en cuve agitée aérée. Lors de ces cultures, l'éclairage s'effectue sur la moitié du cylindre du réacteur, l'autre moitié étant recouverte par du papier noir.

La température est régulée au moyen d'un échangeur dans lequel circule un fluide caloporteur.

Le pH est régulé par l'ajout d'acide chlorhydrique 1N, ou de soude 1N.

L'antimousse utilisé est de l'huile alimentaire.

#### Le circuit gaz à l'entrée du réacteur:

Les matériaux utilisés pour le montage sont inertes, non poreux pour les gaz transportés, et indéformables sous les pressions de fonctionnement adoptées.

Le gaz est séché à l'entrée des régulateurs et à l'entrée de l'analyseur par passage sur du silicagel.

Le trajet effectué par les gaz entre les régulateurs massiques, le réacteur, et l'analyseur, a été réduit au mieux de façon à diminuer les temps de réponse de l'analyseur.

Différentes parties du circuit peuvent être isolées, sans interrompre le débit gazeux nécessaire à l'analyseur au moyen de vannes tout ou rien. Une dérivation du réacteur est notamment possible, pour réaliser l'étalonnage de l'analyseur.

Le mélange gazeux souhaité est obtenu au moyen de deux régulateurs massiques, l'un sur du CO<sub>2</sub> pur, et l'autre sur de l'air débarrassé de son CO<sub>2</sub> par passage à travers un récipient contenant de la potasse. La pression amont des régulateurs est de 3 bars. La pression aval étant faible, le mélange réalisé est

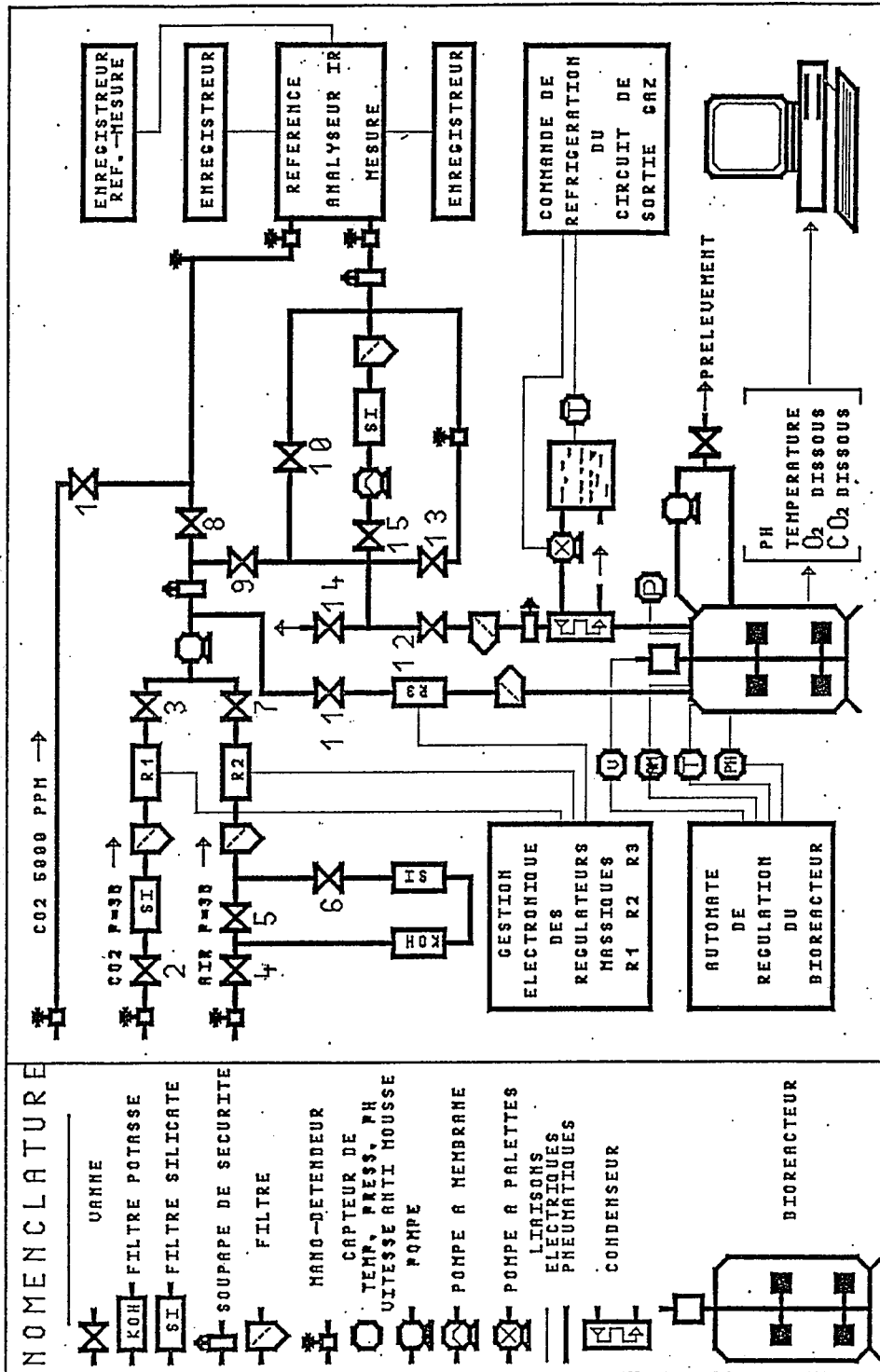


Figure 2.10: Schéma de l'installation complète utilisée pour l'étude de la limitation par la source de carbone, et pour la réalisation des bilans gazeux, lors des cultures en photobioréacteur cylindrique.

comprimé afin que le régulateur contrôlant le débit d'entrée dans le réacteur puisse fonctionner avec une pression suffisamment importante. Cette pression est maintenue à 2,5 bars au moyen d'une soupape. L'excédent du débit est alors dirigé sur la référence de l'analyseur où il est détendu à la pression constante de 0,2 bar. Le troisième régulateur sert à alimenter le réacteur au débit souhaité pour le mélange.

#### Le circuit gaz à la sortie du réacteur (DE VITA, 1989):

A la sortie du réacteur, le gaz traverse un condenseur dans lequel circule un liquide réfrigérant à 0°C, ceci pour limiter les pertes d'eau dans le réacteur. Une soupape de sécurité tarée à 0,8 bar est située avant le filtre de sortie afin de prévenir un éclatement de la cuve en cas de bouchage de ce filtre. Le gaz circule ensuite dans une boucle de compression dont le but est de rendre l'analyseur indépendant des variations de pression du réacteur. La pression est augmentée dans la boucle au moyen d'un petit compresseur à membrane KNF, jusqu'à une pression maximale de 1 bar fixée par une soupape. Pour éviter la mise sous vide du réacteur, une boucle recircule une partie du gaz en amont du compresseur, l'équilibre de la boucle étant obtenu par un détendeur bulle à bulle, ce qui permet le contrôle de la pression dans le réacteur. Le gaz de sortie est ensuite détendu à 0,2 bar pour alimenter l'analyseur à pression constante.

#### 2.5. MESURE DES FLUX LUMINEUX.

Toutes les mesures de flux d'énergie radiante lumineuse ont été réalisées au moyen d'un radiomètre LI-COR, LI-185B. Seules les longueurs d'onde visibles du spectre d'émission (350-750nm) ont été prises en compte, en interposant un filtre anticalorique CALFLEX dont le spectre de transmission est donné figure 2.4. Les mesures sont données dans le système d'unités internationales, en

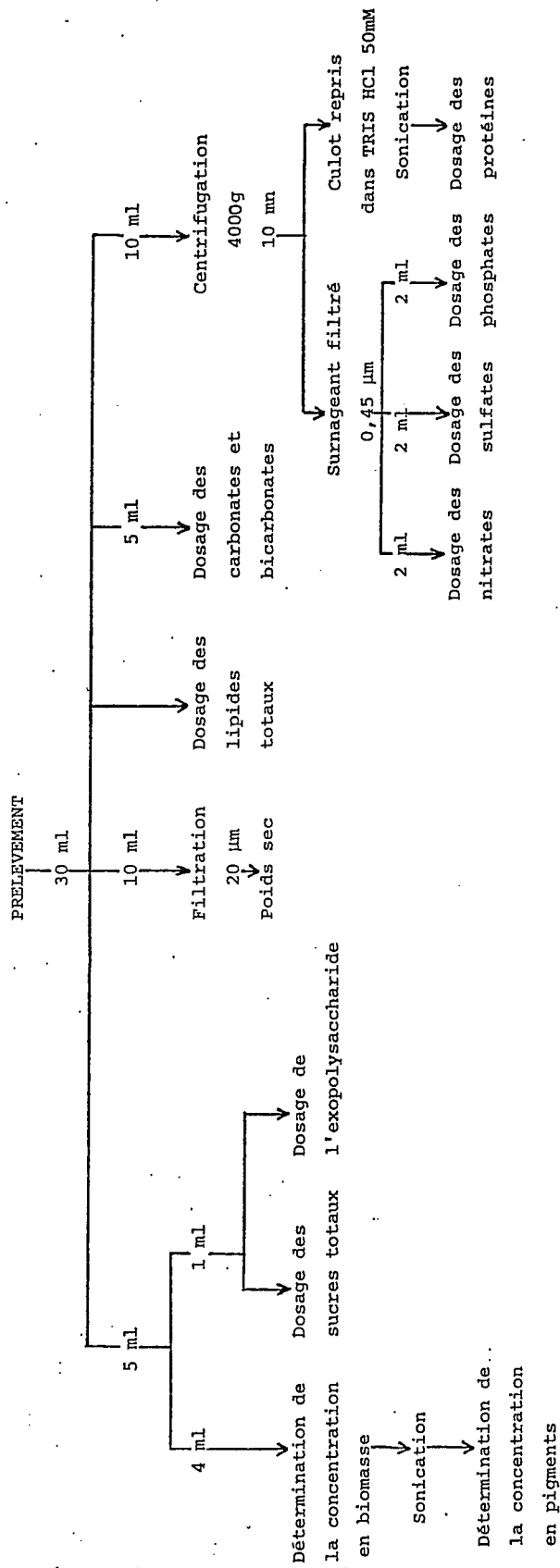


Figure 2.11: Traitement d'un prélèvement de la phase liquide du réacteur, en vue des différents dosages pour le suivi des cultures.

W/m<sup>2</sup>.

## 2.6. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE LA PHASE LIQUIDE.

Lors du suivi des cultures, des prélèvements de la phase liquide sont régulièrement effectués. La figure 2.11 résume l'ensemble des dosages effectués et le volume d'échantillon nécessaire. Les méthodes de dosage utilisées sont pour la plupart des méthodes spectrophotométriques, et sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Toutes les mesures spectrophotométriques ont été réalisées grâce à un spectrophotomètre UVIKON 860 (KONTRON INSTRUMENT). Toutes les corrélations sont établies à partir de mesures effectuées dans le compartiment pour échantillons diffusants, qui se trouve très proche du photomultiplicateur.

### 2.6.1. Poids secs:

Les poids secs sur la phase liquide sont réalisés en filtrant 10 ml de milieu sur des filtres de pores 20  $\mu$ m. Les filtres sont ensuite mis à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant (à peu près 24 heures).

### 2.6.2. Dosage de la biomasse active et de la biomasse totale:

La biomasse active est constituée par la bactérie sans sa gaine exopolysaccharidique, alors que la biomasse totale comprend l'exopolysaccharide dont les proportions sont variables suivant les conditions de culture.

La biomasse active est estimée par la mesure de la densité optique (D.O.) à 750 nm où les cyanobactéries ainsi que le polysaccharide n'absorbent pas. Dans ce cas, on mesure donc la diffusion de la lumière par les spirulines, qui est



proportionnelle à la concentration en biomasse. Néanmoins, l'expérience a prouvé que la diffusion d'une suspension de spirulines était fonction du type d'agitation utilisé pour la culture. En effet, plus l'agitation est vigoureuse, plus la diffusion est augmentée. Ce phénomène a été entièrement quantifié lors de la détermination des coefficients d'absorption et de diffusion (résultats donnés au chapitre 5). On doit donc proposer plusieurs corrélations en fonction du type d'agitation.

- Agitation pneumatique, orbitale ou par turbines Rushton à une vitesse inférieure à 150 t/mn:

$$\text{Concentration en biomasse (kg/m}^3\text{)} = 1,28.D.O._{750}$$

- Agitation par turbines Rushton à une vitesse comprise entre 150 et 250 t/mn:

$$\text{Concentration en biomasse (kg/m}^3\text{)} = 1,15.D.O._{750}$$

- Agitation par turbines Rushton à une vitesse comprise entre 250 et 350 t/mn:

$$\text{Concentration en biomasse (kg/m}^3\text{)} = 1,03.D.O._{750}$$

- Agitation par turbines Rushton à une vitesse supérieure à 350 t/mn:

$$\text{Concentration en biomasse (kg/m}^3\text{)} = 0,90.D.O._{750}$$

Pour obtenir le facteur de conversion donnant la biomasse totale, il faut augmenter le facteur de conversion de la biomasse active correspondant du pourcentage d'exopolysaccharide synthétisé. Ce pourcentage est très variable en fonction des conditions de culture, mais il est néanmoins possible d'établir une

corrélation entre la D.O.<sub>750</sub> et le poids sec, pour chaque culture.

### 2.6.3. Dosage des pigments photosynthétiques:

Comme le montre la figure 2.12, le spectre d'absorption de *S. platensis* présente trois pics importants:

chlorophylle *a*, à 678 nm,

phycocyanines, à 620 nm,

chlorophylle *a* et carotène, à 440 nm.

Il serait intéressant de quantifier les pigments à partir des coefficients d'absorption existant dans la littérature mais deux problèmes se posent.

A 678 nm, les phycocyanines absorbent légèrement mais de manière non négligeable; de même la chlorophylle *a* absorbe à 620 nm.

*S. platensis* qui se présente sous forme d'un trichome hélicoidal, diffuse beaucoup la lumière et donc les D.O. mesurées à 678 et 620 nm ne sont pas dûes uniquement à l'absorption. Des corrélations faisant intervenir les coefficients d'absorption de chaque pigment aux deux longueurs d'onde citées ont été établies (ARNON *et al.*, 1974; MYERS *et al.*, 1980; DER VARTANIAN *et al.*, 1981), mais elles sont applicables pour des cyanobactéries unicellulaires et ne tiennent pas correctement compte de la diffusion de la lumière. Il faut corriger les D.O. à 678 et à 620 nm pour obtenir l'absorption réelle (A):

$$\begin{aligned} A_{678} &= D.O._{678} - 1,17.D.O._{750} \\ A_{620} &= D.O._{620} - 1,31.D.O._{750} \end{aligned}$$

La sonication des échantillons trois fois, durée de cycle de 50%, position 4 avec un appareil Vibra Cells (Sonic & materials), permet de casser les trichomes en lysant peu de cellules. Le spectre d'absorption ainsi obtenu montre une forte augmentation du pic de la chlorophylle *a*, alors que celui des phycocyanines est

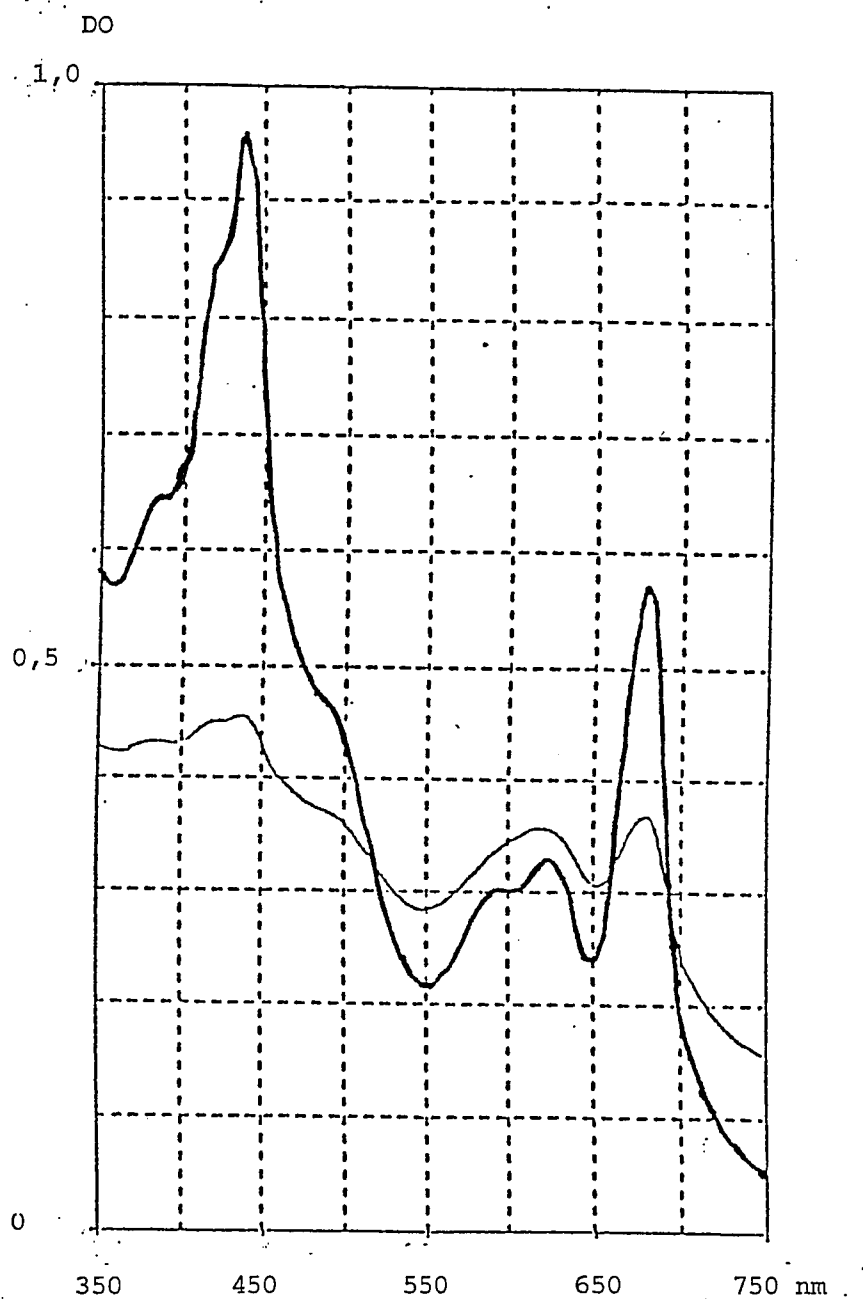


Figure 2.12: Spectre d'absorption de *Spirulina platensis* dans le domaine des longueurs d'onde visibles.

- Trait fin: cellules entières.
- Trait épais: cellules soniquées.

presque semblable (figure 2.12). Les corrélations de la littérature ne donnant pas de bons résultats, il s'est avéré nécessaire de réaliser une extraction des pigments pour établir une nouvelle corrélation. La chlorophylle a est solubilisée dans l'acétone 80% en volume, et estimée en utilisant le coefficient d'absorption de 8200 m<sup>2</sup>/kg à 663 nm (MYERS et al., 1980). Les phycocyanines sont extraites totalement après 7 congélations à l'azote liquide et une centrifugation à 10000 g, 5 minutes. Elles sont quantifiées à l'aide de la corrélation citée par BENNET et BOGORAD (1973):

$$\begin{aligned} \text{Phycocyanine C (kg/m}^3\text{)} &= (\text{D.O.}_{615} - 0,474.\text{D.O.}_{652}) / 5,34 \\ \text{Allophycocyanine (kg/m}^3\text{)} &= (\text{D.O.}_{652} - 0,208.\text{D.O.}_{615}) / 5,09 \end{aligned}$$

A partir de ces résultats expérimentaux, la corrélation suivante a pu être établie:

$$C_{\text{CH}} = 1,04.10^{-2}.A_{678} - 4,09.10^{-3}.A_{620}$$

$$C_{\text{PC}} = 0,297.A_{620} - 0,076.A_{678}$$

$C_{\text{CH}}$  : concentration en chlorophylle a en kg/m<sup>3</sup>.

$C_{\text{PC}}$  : concentration en phycocyanines et allophycocyanines en kg/m<sup>3</sup>.

#### 2.6.4. Dosage des protéines:

Le dosage des protéines a été réalisé à l'aide d'un kit BCA (Pierce). Les protéines réagissent avec le cuivre II alcalin pour produire du cuivre I; l'acide bicinchoninique réagit avec le cuivre I pour former un complexe qui présente un pic d'absorption à 562 nm. La gamme étalon établie avec de la sérum albumine bovine à 36°C est linéaire jusqu'à 0,4 kg/m<sup>3</sup> de protéines.

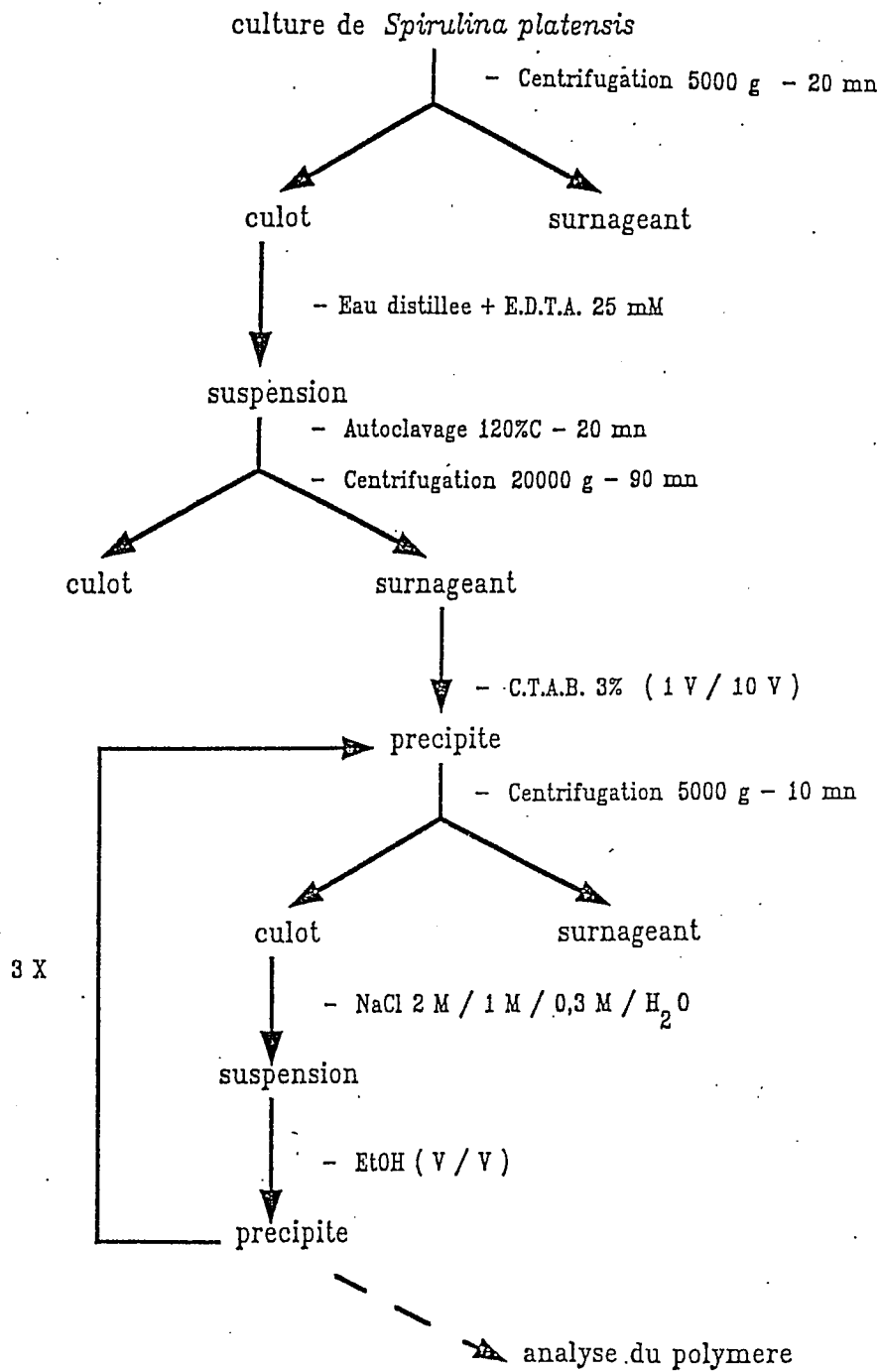


Figure 2.13: Méthode d'extraction de l'exopolysaccharide de *Spirulina platensis*.

#### 2.6.5. Dosage des sucres totaux:

Les sucres totaux, glycogène intracellulaire, exopolysaccharide, et sucres de paroi, sont déterminés spectrophotométriquement à 625 nm après chauffage de l'échantillon en présence du réactif à l'antrone; le D-glucose est utilisé comme standard. L'avantage majeur de cette méthode, est que le glucose libre et ses polysides (glycogène, cellulose, etc...) donnent quantitativement la même valeur d'absorption par mole de glucose (HERBERT *et al.*, 1971).

#### 2.6.6. Méthodes d'extraction de l'exopolysaccharide et de détermination de sa composition:

L'exopolysaccharide de *S. platensis* est extrait et purifié suivant le protocole décrit sur la figure 2.13.

Sa composition en sucres a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie liquide haute performance.

Le fractionnement du polymère a été réalisé par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de gel de D.E.A.E. Trisacryl, et par gel filtration sur colonne de Sépharose CL 2B. La teneur en sulfates est obtenue par chromatographie ionique à pH élevé.

La structure de l'exopolysaccharide a été approchée en utilisant des techniques d'hydrolyses ménagées et de méthylations.

Ces techniques sont détaillées dans le rapport de stage de FILALI-MOUHIM (1991).

#### 2.6.7. Dosage de l'exopolysaccharide:

Deux méthodes de dosage ont été utilisées pour la détermination de la concentration en exopolysaccharide. Dans les deux cas, le polysaccharide des échantillons ayant servi à l'établissement de la gamme étalon a été extrait par la méthode

précédemment décrite.

- La première méthode de dosage a consisté à utiliser le dosage des sucres totaux par la méthode à l'antrone précédemment décrit (HERBERT *et al.*, 1971), et à établir une corrélation entre la D.O.<sub>625</sub> et la concentration en polysaccharide extrait. Le résultat obtenu est:

$$\text{Concentration en polysaccharide (kg/m}^3\text{)} = 0,732 \cdot \text{D.O.}_{625} - 0,032.$$

- La deuxième méthode repose sur le fait que l'exopolysaccharide de *S. platensis* est très riche en acides uroniques. L'établissement d'une corrélation à partir de leur dosage est donc envisageable, à condition de vérifier que la teneur en acides uroniques reste constante au cours du temps dans le polysaccharide. Les acides uroniques sont dosés par la méthode de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973). Chauffés à 100°C avec un mélange acide sulfurique concentré/tétraborate de sodium, les acides uroniques donnent un chromophore absorbant à 520 nm lorsqu'ils sont traités avec le méta-hydroxydiphényl.

#### -Réactifs:

Solution 1: tétraborate de sodium 0,0125M dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

Solution 2: méta-hydroxydiphényl 0,15% dans NaOH 0,5%.

#### -Méthode:

Le principe de la méthode repose sur la différence de D.O. existant entre l'échantillon et un témoin. On ajoute, dans deux tubes à essai, 100 µl de la solution à titrer, 6 ml de solution 1 et 900 µl d'eau. Les tubes sont mis à chauffer 5 minutes au bain marie bouillant, puis refroidis. Dans le tube témoin, on ajoute alors 100 µl de NaOH 0,5%, et dans l'échantillon, on rajoute 100

$\mu$ l de solution 2. Après 5 minutes, on lit l'absorbance à 520 nm du témoin et de l'échantillon, contre un blanc composé de 6 ml de solution 1, 1 ml d'eau, et 100  $\mu$ l de solution 2. La corrélation établie par rapport à l'extraction du polysaccharide est la suivante:

$$\text{Concentration en polysaccharide (kg/m}^3\text{)} = 0,809 \cdot \text{A.D.O.}_{520}$$

Cette méthode semble plus fiable et plus précise que la précédente, car elle est spécifique de l'exopolysaccharide.

#### 2.6.8. Dosage des nitrates:

Trois méthodes de dosage ont été utilisées.

##### A - L'ELECTRODE SPECIFIQUE A NITRATES:

L'électrode sélective aux ions nitrates (HEITO) et l'électrode de référence BR 45 (HEITO) sont reliées à un pH/mV-mètre PPD 41 (HEITO). Le dosage par cette méthode des ions nitrates dans un milieu de culture riche en sels minéraux s'est avéré délicat. En effet, la présence d'ions chlorures et bicarbonates notamment, créent des interférences. Les bicarbonates ont été éliminés par abaissement du pH à 4 avec de l'acide sulfurique 1N. Les ions chlorures sont précipités par le sulfate d'argent.

La grandeur primaire mesurée étant une tension proportionnelle à l'activité des ions nitrates, il est nécessaire d'ajuster la force ionique à une valeur élevée (0,25 M) de manière à égaliser autant que possible les coefficients d'activité des nitrates dans les solutions d'étalonnage et d'échantillons. Ceci est obtenu par addition d'une solution de sulfate d'ammonium 2M. La température de dosage est maintenue constante par un bain marie à  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .



En dépit de ces précautions, il n'a pas été possible d'établir une droite d'étalonnage correcte pour des concentrations inférieures à  $10^{-3}$  M ( $6,2 \cdot 10^{-3}$  kg/m<sup>3</sup>), or, la détermination de paramètres concernant la limitation par les nitrates nécessite la mesure de concentrations minimales de l'ordre de  $10^{-3}$  kg/m<sup>3</sup>. Cette méthode ne peut donc pas être utilisée sur toute la durée de la culture.

B - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DANS LE VISIBLE (NORME AFNOR NF T 90012):

Les nitrates réagissent avec l'acide sulfosalicylique pour former un composé coloré détectable à 415 nm. Après élimination des bicarbonates par addition d'acide acétique et filtration de l'échantillon sur un filtre 0,2  $\mu$ m, cette méthode permet de détecter des quantités faibles de nitrates, de l'ordre de 10  $\mu$ g. Néanmoins, elle présente trois inconvénients majeurs:

- une assez faible précision, qui impose de faire au moins trois essais par dilution d'échantillons;

- une mise en oeuvre longue, qui nécessite plusieurs évaporations à sec;

- un volume important d'échantillon, supérieur à 20 ml est nécessaire lorsque la concentration en nitrates est inférieure à  $10^{-2}$  kg/m<sup>3</sup>.

C - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DANS L'ULTRAVIOLET:

L'échantillon est dilué dans de l'acide perchlorique à 5% en volume. Son absorption est mesurée contre le milieu de culture dépourvu d'azote, à 210 nm où les nitrates absorbent fortement, et à 275 nm où leur absorption est négligeable (CAWSE, 1967). En soustrayant le double de la valeur à 275 nm (absorption de la matière organique) à celle obtenue à 210 nm, on estime la valeur de l'absorption due uniquement aux nitrates. La filtration des

échantillons sur des filtres  $0,2 \mu\text{m}$  est nécessaire pour éliminer les interférences éventuelles avec l'exopolysaccharide. Cette méthode donne de bons résultats et permet de détecter jusqu'à  $10^{-3}$   $\text{kg/m}^3$  de nitrates.

#### 2.6.9. Dosage des sulfates:

La méthode décrite par TERHO et HARTIALA (1971) a été adaptée au milieu de culture des spirulines. Elle utilise la propriété qu'a le rhodizonate de sodium de fixer les ions  $\text{Ba}^{2+}$  pour constituer un complexe coloré. Lorsque du sulfate inorganique est présent, du  $\text{BaSO}_4$  se forme et l'on observe une diminution de la coloration. Cette décroissance de la densité optique est directement proportionnelle à la quantité de sulfates présents dans le milieu.

##### - Réactifs:

	Solution de $\text{BaCl}_2$ :
acide acétique 2M	10 ml
$\text{BaCl}_2$ 0,005M	2 ml
$\text{NaHCO}_3$ 0,02 M	8 ml
éthanol absolu	80 ml

##### Solution de rhodizonate de sodium:

On dissout 5 mg de rhodizonate de sodium (Aldrich Chem) dans 20 ml d'eau distillée. Puis on ajoute 100 mg d'acide ascorbique (Sigma). Le volume est complété à 100 ml avec de l'éthanol absolu, la couleur est alors marron clair. la solution est mise au réfrigérateur, à l'obscurité, et utilisée 30 minutes après sa préparation.

##### - Procédure:

Dans un tube à essai, on prélève 0,5 ml de l'échantillon ou de la solution standard que l'on acidifie à un pH voisin de 4 par

185  $\mu$ l d'acide acétique pur. On évite ainsi l'influence des bicarbonates. On ajoute ensuite 2 ml d'éthanol absolu, 1ml de solution  $\text{BaCl}_2$ , et 1,5 ml de solution de rhodizonate. Les tubes sont agités et placés pendant 10 minutes à l'obscurité et température ambiante. La D.O. de la coloration est ensuite mesurée à 520 nm. Les blancs sont réalisés avec du milieu de culture sans sulfate.

La corrélation suivante a été établie:

$$\text{Concentration en } \text{SO}_4^{2-} \text{ (kg/m}^3\text{)} = 0,036 \cdot \text{AD.O.}_{520}$$

Les concentrations en ions chlorures et phosphates sont trop faibles dans le milieu de culture pour créer des interférences.

Cette méthode permet de mesurer des concentrations jusqu' à  $5 \cdot 10^{-4}$  kg/m<sup>3</sup> de sulfates. Elle est simple et rapide à mettre en oeuvre mais le complexe formé est instable.

#### 2.6.10. Dosage des phosphates:

Le dosage des phosphates a été réalisé en utilisant le kit Sigma Phosphorus inorganic. La méthode utilisée est dérivée de celle de FISKE et SUBBAROW (1925). L'échantillon est traité avec de l'acide trichloroacétique pour minéraliser toutes les formes de phosphore. Les phosphates obtenus réagissent avec le molybdate d'ammonium en solution acide pour former du phosphomolybdate. Un mélange de bisulfite de sodium, de sulfite de sodium, et d'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique réduit le phosphomolybdate pour former un complexe bleu de phosphomolybdenum. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en phosphate, et est mesurée à 750 nm.

La sensibilité de la méthode a été améliorée par chauffage de l'échantillon à 50°C pendant exactement 30 minutes.

La miniaturisation de la méthode, pour diminuer la quantité de milieu prélevé, n'affecte ni la linéarité de la réponse, ni la

sensibilité de la méthode, qui permet de mesurer jusqu'à  $10^{-5}$  kg/m<sup>3</sup>.

La gamme étalon a permis d'établir la corrélation suivante:

$$\text{Concentration en HPO}_4^{2-} \text{ (kg/m}^3\text{)} = 5,77 \cdot 10^{-3} \cdot \text{D.O.}_{750}$$

#### 2.6.11. Dosage des lipides totaux:

L'extraction s'effectue selon la méthode de BLIGH et DYER (1959). Après centrifugation, le culot de spiruline est fixé tout d'abord dans un volume d'éthanol bouillant pendant 2 minutes afin d'inactiver les lipases. On ajoute du chloroforme puis de l'eau, volume par volume, et on obtient ainsi deux phases. Après centrifugation (3000 t/mn, 5 mn), les lipides se trouvent dans la phase chloroformique en bas du tube. Cette phase est récoltée avec une pipette pasteur, et les lipides sont soit pesés après évaporation, soit analysés par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Delsi).

#### 2.6.12. Dosage des bicarbonates et des carbonates:

Le suivi des concentrations en carbonates et bicarbonates dans la phase liquide s'effectue par titration acide/base, avec HCl 0,1N.

### 2.7. DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE TRANSFERT ET DES TEMPS DE MELANGE DANS LE REACTEUR A CUVE AGITEE.

#### 2.7.1. Détermination des temps de mélange:

Les temps de mélange dans le réacteur ont été déterminés en utilisant un traceur coloré.

### 2.7.2. Détermination des coefficients volumétriques de transfert:

La mesure des coefficients de transfert du  $\text{CO}_2$  peut s'apparenter à celle de l'oxygène puisque les coefficients de diffusion de ces deux molécules sont très proches (dans l'eau, à  $25^\circ\text{C}$ ,  $2,10 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  pour l'oxygène, et  $1,92 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  pour le dioxyde de carbone; SHERWOOD, 1975). Il est donc inutile de développer des méthodes de mesure spécifiques du  $\text{CO}_2$ , et l'on pourra utiliser les méthodes connues relatives à l'oxygène.

Nous avons utilisé la méthode dynamique consistant à enregistrer la réponse d'une électrode dans un liquide où la concentration en oxygène dissous a été amenée à zéro par l'oxydation du sulfite en sulfate.

La mesure de coefficients à très faible débit (3 à 60 l/h), oblige néanmoins à considérer l'épuisement possible en oxygène dans le gaz de sortie.

Dans ce cas, la réponse de l'électrode peut être obtenue en écrivant trois bilans (dans les équations qui suivent, C désigne la concentration en oxygène, seule molécule considérée):

- bilan sur la phase liquide:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 \cdot a \cdot (C^* - C) \quad (2.1)$$

- bilan sur l'oxygène dans la phase gazeuse:

$$\frac{P \cdot V_g}{RT \cdot V_1} \cdot \frac{dy}{dt} = \frac{G^E}{V_1} \cdot y^E - \frac{G^S}{V_1} \cdot y^S - k_1 \cdot a \cdot (C^* - C) \quad (2.2)$$

- bilan sur l'inerte en phase gazeuse:

$$G^E(1-y^E) = G^S(1-y^S) \quad (2.3)$$

Si l'on considère la phase gazeuse comme parfaitement agitée,  $y=y^S$ , et  $C^* = H_e \cdot y^S$ , d'où le système suivant, si l'on tient compte

de la dynamique de l'électrode par un premier ordre avec une constante de temps  $\alpha$ :

$$\frac{P.V_g}{RT.V_1} \cdot \frac{dy^s}{dt} = \frac{G^E}{V_1} \cdot \left( Y^E - y^s \cdot \frac{1 - Y^E}{1 - y^s} \right) - k_1 \cdot a \cdot (\text{He} \cdot y^s - C) \quad (2.4)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_1 \cdot a \cdot (\text{He} \cdot y^s - C) \quad (2.5)$$

$$\frac{dC}{dt} = \alpha \cdot (C - C_m) \quad (2.6)$$

Si la phase gazeuse est en écoulement piston, on a les mêmes équations avec:

$$y = \frac{Y^E - Y^S}{\ln (Y^E / Y^S)}, \text{ et } C^* = \text{He} \cdot y \quad (2.7)$$

Les valeurs obtenues de cette façon seront à comparer avec celles obtenues en négligeant l'évolution de la fraction molaire en  $O_2$  dans le gaz, ce qui est l'approximation classique. Dans ce cas, la réponse de l'électrode est donnée par seulement les deux dernières équations du système.

## 2.8. METHODES DE MESURE DES COEFFICIENTS D'EXTINCTION DE LAMBERT ET DES COEFFICIENTS D'ABSORPTION ET DE DIFFUSION VRAIES DE LA LUMIERE.

La mesure des coefficients d'absorption et de diffusion d'une suspension de cellules de *S. platensis*, est d'une importance capitale puisque toute la partie physique du modèle traitant des transferts radiatifs repose sur leur détermination. En outre, les modèles simplifiés traduisant la limitation physique par la lumière (voir chapitres 4 et 5), conduisent à des équations algébriques que l'on peut résoudre si l'on connaît les conditions

aux limites (le flux lumineux incident sur le réacteur), et les coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière. Une attention toute particulière sera donc apportée à leur détermination.

A un degré moindre, la connaissance des coefficients d'extinction de Lambert pour la suspension cellulaire, apporte une information limitée quant à l'atténuation des flux lumineux dans les cultures de microorganismes photosynthétiques.

Deux types de coefficients peuvent être obtenus selon la précision avec laquelle on souhaite travailler: les coefficients relatifs à chaque longueur d'onde du spectre visible, ou les coefficients globaux sur le spectre, qui sont en fait la moyenne intégrale des premiers. Les coefficients globaux sont plus faciles à obtenir en raison de la simplicité, dans ce cas à mesurer l'atténuation semi intégrale (SHIBATA, 1958). Dans l'autre cas, il faut utiliser un spectrophotomètre dans lequel cette mesure n'est pas aisée.

### 2.8.1. Obtention de l'atténuation semi intégrale:

Le premier problème pour l'évaluation de coefficients relatifs à l'atténuation d'un flux lumineux réside dans la mesure expérimentale de l'atténuation semi intégrale, c'est-à-dire la mesure du flux diffusé à la frontière de sortie du milieu considéré. Les rappels de spectrophotométrie qui suivent ont été développés par SHIBATA (1958).

Si  $F_{\lambda}$  est le flux lumineux relatif à la longueur d'onde  $\lambda$  traversant une suspension cellulaire, on définit les grandeurs suivantes:

- $F_{\lambda}^p$  est la lumière transmise parallèle.
- $F_{\lambda}^d$  est la lumière transmise diffusée.
- $F_{\lambda}^o$  est la lumière initiale parallèle.
- $F_{\lambda}^r$  est la lumière réfléchie diffusée.

La lumière incidente  $F_{\lambda}^o$  est pour une part absorbée par la suspension ( $F_{\lambda}^a$ ), et pour une autre part transmise au détecteur. Cette lumière transmise est la somme de la lumière parallèle et diffusée qui atteint le détecteur (une partie de l'énergie diffusée en sens inverse est réfléchié).

D'une façon générale, la configuration des spectrophotomètres est telle que le détecteur se trouve plus ou moins près de la cuve de mesure, ce qui conduit à sous estimer plus ou moins la valeur de la lumière diffusée  $F_{\lambda}^d$ , alors que cela n'altère pas la mesure de la lumière parallèle  $F_{\lambda}^p$ . On définit donc la lumière transmise:

$$F_{\lambda}^t = F_{\lambda}^p + f \cdot F_{\lambda}^d. \quad (0 < f < 1) \quad (2.8)$$

D'autre part on peut écrire le bilan d'énergie suivant:

$$F_{\lambda}^o = F_{\lambda}^a + F_{\lambda}^r + F_{\lambda}^t \quad (2.9)$$

On définit alors la quasi atténuation comme:

$$E_{p \text{ pfd}} = \log \frac{F_{\lambda}^o}{F_{\lambda}^p + f \cdot F_{\lambda}^d} = \log \frac{F_{\lambda}^o}{F_{\lambda}^t} \quad (2.10)$$

L'indice p, à gauche, signifie que la lumière initiale est parallèle. Les indices pfd de droite sont relatifs au dénominateur (la lumière transmise est la somme de la lumière parallèle et d'une fraction de la lumière diffusée). Remarquons que ce rapport est souvent appelé densité optique.

Deux grandeurs nous intéresseront dans la suite, il s'agit de la transmission:

$$T(\lambda) = \frac{F_{\lambda}^t}{F_{\lambda}^o} = 10^{-E_{p \text{ pfd}}} \quad (2.11)$$



et de la réflexion:

$$R(\lambda) = \frac{F_{\lambda}^r}{F_{\lambda}^o} \quad (2.12)$$

D'autre part, on remarque que la quasi atténuation comporte 2 cas limites qui sont:

$$f = 0, \quad E_{p \quad p} = \log \frac{F_{\lambda}^o}{F_{\lambda}^t} \quad \text{atténuation rectiligne.} \quad (2.13)$$

$$f = 1, \quad E_{p \quad pd} = \log \frac{F_{\lambda}^o}{F_{\lambda}^p + F_{\lambda}^d} \quad \text{atténuation semi intégrale.} \quad (2.14)$$

Cette dernière grandeur est celle que nous cherchons à atteindre, elle suppose que l'on puisse recueillir toute la lumière diffusée à l'arrière de l'échantillon (cas théorique où le détecteur est sur la cuve).

Il est facile de mesurer l'atténuation semi intégrale avec un radiomètre, sur des cuves de différentes épaisseurs, pour l'obtention de coefficients globaux sur l'ensemble du spectre visible. Cela est beaucoup moins facile dans un spectrophotomètre puisque le photomultiplicateur n'est jamais à la sortie de la cuve. SHIBATA (1958), propose l'utilisation de lames opalines qui diffusent fortement la lumière et suppriment la lumière parallèle, de telle façon que la même fraction de lumière diffusée arrive sur le détecteur, après l'échantillon ou après le blanc. D'autre part, les réflexions multiples peuvent être évitées par l'interposition entre la cuve et la lame, d'un filtre gris à faible transmission (15%). Cette méthode a été utilisée pour la détermination des coefficients d'absorption et de diffusion dans un spectrophotomètre.

### 2.8.2. Méthode de mesure des coefficients d'absorption, de diffusion et d'extinction de Lambert relatifs à chaque longueur d'onde:

Ces déterminations doivent être réalisées dans un spectrophotomètre, pour pouvoir faire varier la longueur d'onde. Dans ce cas, le chemin optique est celui des cuves de mesure et il est égal à 1 cm. 40 longueurs d'onde ont été choisies dans le spectre visible [350-750 nm], certaines représentant des valeurs remarquables du spectre d'absorption de *S. platensis*, les autres étant régulièrement espacées. La transmission  $T(\lambda)$  a été mesurée pour chaque longueur d'onde, en utilisant le dispositif de lames opalines décrit ci dessus.

#### A - COEFFICIENTS D'EXTINCTION DE LAMBERT:

La loi de Lambert-Beer donnant l'atténuation d'un flux lumineux dans un milieu absorbant s'écrit (voir chapitre 4):

$$F_{z\lambda} = F_{o\lambda} \cdot e^{-m_{a\lambda} \cdot C_x \cdot z} \quad (2.15)$$

On a donc directement, par mesure de la transmission, et compte tenu de ce qui a été dit au paragraphe précédent:

$$m_{a\lambda} = \frac{\ln \frac{1}{T(\lambda)}}{C_x \cdot z} \quad (2.16)$$

#### B - COEFFICIENTS D'ABSORPTION ET DE DIFFUSION:

Dans ce cas, la méthode utilisée est celle qui a été proposée par AIBA (1982). On mesure tout d'abord la transmission de la suspension cellulaire à une longueur d'onde qui n'est pas absorbée, c'est-à-dire dans le proche infra-rouge. La valeur

obtenue est notée T'. Puisque la lumière n'est pas absorbée, on peut écrire le bilan suivant:

$$F'_o = F'_t + F'_r \quad (2.17)$$

ou encore:

$$T' + R' = 1 \quad (2.18)$$

Si le coefficient de diffusion est indépendant de la longueur d'onde jusqu'à 350 nm, ce qui est vérifié pour les suspensions de spirulines, le rapport de la transmission sur la réflexion est constant sur tout le spectre visible (SHIBATA, 1958), et on a:

$$T(\lambda)/R(\lambda) = T'/R' \quad (2.19)$$

Si tel n'est pas le cas, par exemple pour des microorganismes unicellulaires dont la taille se rapproche des longueurs d'ondes visibles, il est encore possible de connaître l'évolution de ce rapport d'après les résultats de SHIBATA (1958).

Les coefficients peuvent alors être déterminés en résolvant le système non linéaire suivant (SCHUSTER, 1905):

$$T(\lambda) = \frac{4\alpha}{(1+\alpha)^2 \cdot e^\delta - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (2.20)$$

$$R(\lambda) = \frac{(1-\alpha^2) \cdot (e^\delta - e^{-\delta})}{(1+\alpha)^2 \cdot e^\delta - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (2.21)$$

L étant le chemin optique,  $\alpha$  et  $\delta$  sont respectivement égaux à:

$$\alpha = \left[ EA_\lambda / (EA_\lambda + ES_\lambda) \right]^{1/2} \quad (2.22)$$

$$\delta = L \cdot \left[ EA_\lambda \cdot (EA_\lambda + ES_\lambda) \right]^{1/2} \quad (2.23)$$

Connaissant la concentration en biomasse  $C_x$ , on obtient les

coefficients massiques d'absorption et de diffusion  $Ea_\lambda$  et  $Es_\lambda$  par:

$$Ea_\lambda = \frac{EA_\lambda}{C_X}, \text{ et } Es_\lambda = \frac{ES_\lambda}{C_X} \quad (2.24)$$

Ces coefficients sont caractéristiques du microorganisme.

### 2.8.3. Détermination des coefficients globaux:

Ces coefficients peuvent être obtenus soit par intégration sur tout le spectre des coefficients déterminés précédemment, soit globalement, en mesurant la transmission d'une suspension de cellules au moyen d'un radiomètre entre 350 et 750 nm.

#### A - COEFFICIENTS D'EXTINCTION GLOBAUX:

Ces coefficients peuvent être calculés directement en intégrant les coefficients précédents sur tout le spectre. On a alors:

$$m_a = \frac{\ln \frac{1}{\Delta\lambda} \cdot \int_{350}^{750} \frac{1}{T(\lambda)} \cdot d\lambda}{C_X \cdot z} \quad (2.25)$$

Il peuvent également s'obtenir par mesure directe de la lumière blanche à la sortie d'une cuve avec et sans cellules. Cette méthode conduit précisément à l'atténuation semi intégrale, mais l'existence de longueurs d'onde essentiellement diffusées (550 nm) oblige à définir les coefficients à dilution infinie ou à trajet optique nul. En effet, s'il n'en est pas ainsi, les coefficients mesurés sont d'autant plus faibles que la concentration ou le trajet optique sont élevés. La définition que

l'on peut proposer pour la mesure du coefficient d'extinction par cette méthode est la suivante:

$$m_a = \frac{\partial}{\partial C_X} \cdot \left[ \frac{\ln \frac{1}{T(\lambda)}}{z} \right] \Big|_{C_X=0} \quad (2.26)$$

ou encore:

$$m_a = \frac{\partial}{\partial C_X} \cdot \left[ \frac{\ln 10 \cdot E_p}{z \cdot p d} \right] \Big|_{C_X=0} \equiv m_{a.max} \quad (2.27)$$

Pour les déterminations en lumière blanche, les mesures ont été effectuées sur deux cuves de chemins optiques respectivement égaux à 2 et 5 cm.

#### B - COEFFICIENTS D'ABSORPTION ET DE DIFFUSION GLOBAUX:

On peut soit déterminer une transmission moyenne par intégration de chaque coefficient sur tout le spectre, soit mesurer directement une transmission en lumière blanche.

La transmission moyenne s'obtient par:

$$T = \frac{1}{\Delta\lambda} \cdot \int_{350}^{750} T(\lambda) \cdot d\lambda \quad (2.28)$$

Dans les deux cas, les coefficients d'absorption et de diffusion massiques globaux  $E_a$  et  $E_s$  sont obtenus en résolvant le système de deux équations, donnant la transmission et la réflexion, développé au paragraphe 2.8.2.

Les mêmes cuves que précédemment ont servi à la mesure globale en lumière blanche (chemins optiques de 2 et 5 cm).

## 2.9. METHODE DE MESURE DE LA VITESSE VOLUMETRIQUE D'ABSORPTION DE L'ENERGIE LUMINEUSE DANS UN PHOTOREACTEUR PARALLELEPIPEDIQUE.

La méthode est celle proposée par AIBA (1982); elle repose sur l'utilisation de lames opalines que l'on doit placer à l'arrière du réacteur. Si  $F_o$  désigne le flux lumineux sortant du réacteur rempli d'eau,  $F_t$  le flux sortant après une suspension cellulaire,  $F'_o$  et  $F'_t$  respectivement les mêmes flux en lumière infra-rouge, on peut écrire le bilan suivant, si l'on fait à nouveau l'hypothèse que le rapport de la réflexion sur la transmission est indépendant de la longueur d'onde (SHIBATA, 1958):

$$\frac{F_a}{F_o} = 1 - \frac{F_t}{F_o} \cdot \frac{F'_o}{F'_t} \quad (2.29)$$

Si l'on mesure des flux après des lames opalines, on doit tenir compte de leur efficacité  $\alpha$ . La mesure de flux avec un appareil de type radiomètre oblige à introduire des rendements relatifs aux mesures. Si  $f_1$  est le rendement pour le réacteur rempli d'eau,  $f_2$  le rendement pour le réacteur rempli avec une suspension de cellules, on a:

$$\frac{f_1}{f_2} = \frac{f'_1}{f'_2} \quad (2.30)$$

Le bilan devient donc:

$$\frac{F_a}{F_o} = 1 - \frac{\alpha F_t f_2}{\alpha F_o f_1} \cdot \frac{\alpha F'_o f'_1}{\alpha F'_t f'_2} \quad (2.31)$$

Les simplifications à partir des grandeurs mesurées conduisent au même bilan qu'au départ, on accède donc directement au flux d'énergie absorbée dans le réacteur,  $F_a$ . Si l'on divise la valeur obtenue par l'épaisseur du réacteur  $L$ , on obtient la

vitesse volumétrique d'absorption de l'énergie lumineuse dans le réacteur en  $W/m^3$ :

$$\langle A \rangle = \frac{F}{L} \quad (2.32)$$

### 2.10. ETUDE RHEOLOGIQUE.

Plusieurs viscosimètres ont été utilisés pour réaliser l'étude rhéologique de l'exopolysaccharide de *S. platensis*, en fonction de la vitesse de déformation souhaitée. Tous étaient des viscosimètres CONTRAVES de type Couette, à cylindres coaxiaux. Pour les faibles vitesses de déformation, nous avons utilisé un low shear 30. Pour les vitesses plus élevées, il s'agissait d'un Rhéomat 115. La température était toujours réglée à 25°C.

### 2.11. ANALYSES ELEMENTAIRES.

Toutes les analyses élémentaires en C,H,O,N,S,P, ou en minéraux ont été réalisées au service de microanalyse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS à Gif sur Yvette.

### 2.12. MATERIEL INFORMATIQUE ET METHODES NUMERIQUES.

Les calculs ou simulations ne nécessitant pas de moyens importants ont été réalisés sur des ordinateurs de type IBM PC. Des machines plus performantes ont été nécessaires pour la réalisation du maillage numérique en intensité lumineuse des photoréacteurs. Le logiciel de maillage a été développé sur station HP/APPOLO DN 10000 sous UNIX. Les simulations utilisant ce maillage ont été effectuées au Centre Inter-Régional de Calcul Electronique d'Orsay, sur un supercalculateur vectoriel SIEMENS VP 200 sous VSP, d'une puissance de 570 MFLOPS.

Hormis le maillage numérique des photoréacteurs qui sera détaillé au chapitre 4, les méthodes numériques utilisées sont des programmes de calcul classiques.

Les systèmes d'équations différentielles sont résolus par un algorithme Runge-Kutta-Merson du quatrième ordre à pas variable.

L'identification de paramètres est réalisée au moyen d'un algorithme de Newton, basé sur le calcul de la matrice de Hesse.

La résolution de systèmes non linéaires s'effectue au moyen d'un algorithme de Wegstein du premier ordre, ou d'un algorithme de Newton-Raphson du deuxième ordre.

Tous les algorithmes cités ici sont clairement exposés dans les ouvrages de BOUMHRAT et GOURDIN (1983), ou HOLLAND et LIAPIS (1983).





CHAPITRE 3

RESULTATS RELATIFS

A LA PHYSIOLOGIE ET A LA CROISSANCE

DE SPIRULINA PLATENSIS.

Les résultats consignés dans ce chapitre rassemblent des données physiologiques dont la connaissance préliminaire est nécessaire pour l'établissement d'un modèle mathématique. Celui-ci nécessite en effet la formulation d'hypothèses reposant sur les résultats expérimentaux. De même, certains paramètres du modèle seront déterminés à partir de ces résultats.

Il ne s'agit donc pas ici d'une étude physiologique détaillée au sens que pourraient lui donner certains lecteurs, mais d'un support expérimental en vue de l'établissement et de la validation d'un modèle mathématique devant traduire le comportement de microorganismes photosynthétiques dans de nombreuses conditions de culture.

La modélisation requiert que toutes les molécules impliquées dans le processus étudié soient correctement identifiées et dosées; c'est pourquoi nous introduirons dans ce chapitre la notion de pourcentage de récupération des éléments.

Enfin, il sera également fait allusion à des aspects stoechiométriques, avec notamment l'introduction des rendements massiques de conversion des substrats en biomasse.

### 3.1 RESULTATS RELATIFS A LA PHYSIOLOGIE ET AU METABOLISME DE SPIRULINA PLATENSIS:

#### 3.1.1. Le microorganisme *Spirulina platensis*:

##### A - CLASSIFICATION ET MORPHOLOGIE:

La nature procaryotique des cyanobactéries n'a été définitivement reconnue que dans les années 1970. Leur type photosynthétique et leur composition pigmentaire les avaient fait inclure dans le règne végétal (algues bleu-vertes, cyanophytes, cyanophycées).

Les cyanobactéries représentent actuellement l'une des dix

lignées évolutives des eubactéries, selon une classification basée sur l'analyse des catalogues de séquences d'ARN 16S (FORTERRE, 1986). La classification admise est celle mise en place par RIPPKA (1979, tableau 3.1). Les cyanobactéries sont divisées en cinq sections qui regroupent les différents genres. Cette taxonomie est basée sur des analyses systématiques des modes de division, de la structure cellulaire, et d'un certain nombre de traits physiologiques (fixation de l'azote, modes trophiques, capacité de différenciation...). Cette classification est affinée par d'autres critères, prenant en compte la nature des pigments photosynthétiques, des lipides membranaires, la composition et la taille du génome.

*Spirulina* appartient à l'ordre des Nostocales, elle est classée dans la section III des cyanobactéries. *Spirulina platensis* est l'espèce originaire du lac Tchad. Elle se présente sous la forme d'un trichome hélicoïdal pluricellulaire de 6 à 11  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une longueur atteignant 0,2 mm. Elle ne possède pas d'hétérocyste (FOX, 1986; RIPPKA, 1988).

La paroi cellulaire semble être composée de quatre couches de mucopolymères (VAN EYKELENBURG, 1977), et elle présente les caractéristiques des bactéries Gram négatif. Elle est recouverte d'une gaine polysaccharidique extracellulaire.

Le cytoplasme de ce microorganisme procaryotique contient des vacuoles à gaz, des granules de polyglucanes et de polyphosphates, des carboxysomes, des mésosomes et beaucoup de thylacoïdes (CIFERRI, 1983, figure 3.1). Il existe aussi des granules de cyanophycines, qui sont composées d'une chaîne d'acide aspartique et d'arginine, et dont le poids moléculaire varie entre 25 et 100 kdaltons (kd). Elles semblent servir de réserves azotées car elles apparaissent lors de limitations, à l'exception de celle par l'azote, et résultent du catabolisme des protéines (ALLEN et al. 1980; SIMON, 1987).

Les thylacoïdes sont des membranes lipoprotéiques supportant les pigments photosynthétiques: chlorophylle *a*, caroténoïdes,

Unicellaire	division binaire	Section I	
	division multiple	Section II	
Filamenteuse	pas de différenciation cellulaire		Section III
	présence d'hétérocystes	trichomes non branchés	Section IV
		trichomes branchés	Section V

Les différentes sections de cyanobactéries

Section I	<i>Gloeobacter</i> <i>Gloeotheca</i> <i>Cyanothece</i> <i>Cyanobium</i> <i>Synechococcus</i> <i>Cyanobacterium</i> <i>Synechocystis</i> <i>Chamaesiphon</i> <i>Gloeocapsa</i>	Section III	<i>Spirulina</i> <i>Oscillatoria</i> Groupe LPP-A * Groupe LPP-B * <i>Pseudanabaena</i>
Section II	<i>Dermocarpa</i> <i>Xenococcus</i> <i>Dermocarpella</i> <i>Myxosarcina</i> <i>Chroococoidopsis</i> <i>Pleurocapsa</i>	Section IV	<i>Anabaena</i> <i>Nodularia</i> <i>Cylindrospermum</i> <i>Nostoc</i> <i>Scytonema</i> <i>Calothrix</i> <i>Cyanospira</i>
		Section V	<i>Fischereilla</i> <i>Chlorogloeopsis</i>

\* *Lyngbya* / *Phormidium* / *Plectonema*

Tableau 3.1: Classification des cyanobactéries (d'après RIPPKA, 1979).

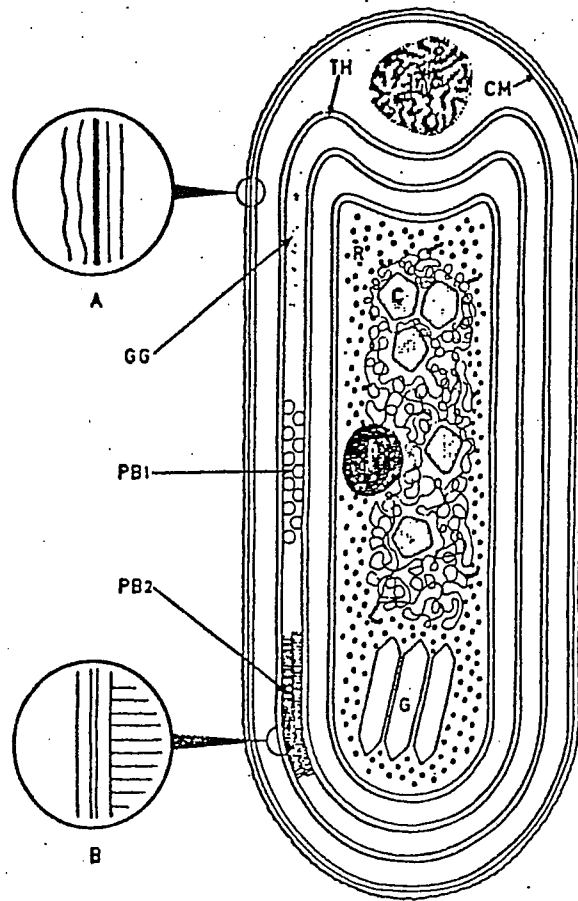


Figure 3.1: Schéma d'une coupe de cellule de cyanobactérie.

CM, membrane cellulaire ; TH, thylacoïdes ; PB1 et PB2 , vue respectivement de face et de profil des phycobilisomes ; GG , granules de glycogène ; CY, granules de cyanophycine ; P, granules de polyphosphate ; C, carboxysomes entourés de nucléoplasme ; R, ribosomes ; G, vacuoles à gaz ; Agrandissement A : Enveloppe cellulaire montrant la membrane cytoplasmique, le peptidoglycane et la gaine externe. Agrandissement B : Partie de thylacoïde montrant les phycobilisomes attachés à la membrane (STANIER, 1988).

phycocyanine C, allophycocyanine. La phycoérythrine et la phycoérythrocyanine semblent être absentes (COHEN-BAZIRE et BRYANT, 1982). La phycocyanine C et l'allophycocyanine dont les masses moléculaires sont respectivement de 44 et 38 kd sont des complexes oligomériques composés de deux sous unités. Elles sont constituées d'une chaîne non cyclique de noyaux tétrapyrroles, chromophores qui leur confèrent leurs propriétés d'absorption de la lumière, associés à une apoprotéine par une liaison covalente (CIFERRI et TIBONI, 1985).

Les phycocyanines sont regroupées en phycobilisomes, protéines extrinsèques des thylacoïdes, et forment les antennes collectrices de photons du photosystème II (PS II). Ce dernier comporte aussi une antenne intermédiaire formée par un complexe protéine-chlorophylle a, un centre réactionnel P 680, et différents transporteurs d'électrons. Les électrons produits lors de l'oxydation d'une molécule d'eau par le P 680 sont transférés, par l'intermédiaire de transporteurs d'électrons, au centre réactionnel du photosystème I, le P 700. Ces électrons réduisent ensuite la ferredoxine, ce qui permet finalement la réduction du  $\text{NADP}^+$  en  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  (figure 3,3). La formation de molécules d'ATP est couplée au transport des électrons sur les chaînes de transporteurs.

L'ATP et le  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  ainsi produits servent à la synthèse des principales molécules constituant la cellule (protéines, glucides, lipides, acides nucléiques), et qui vont maintenant être décrites.

#### B - COMPOSITION ET QUALITE NUTRITIVE:

Les analyses chimiques des spirulines ont été réalisées par de nombreux auteurs. Les résultats diffèrent un peu, probablement en raison des méthodes de mesure et des conditions de culture.

Néanmoins, en se basant sur les résultats de FOX (1986), de CLEMENT (1975), et sur nos propres données en ce qui concerne les

fractions sucres-lipides-protéines, on peut proposer la composition détaillée suivante pour la biomasse active de *Spirulina platensis* (nous appelons biomasse active, la biomasse sans l'exopolysaccharide).

- Protéines:

Les protéines constituent la majeure partie de la matière sèche de *S. platensis*, entre 60% et 74% suivant les auteurs (tableau 3.2). Pour notre souche, elles représentent 68% de la matière sèche. Leur composition en acides aminés répond aux standards de la F.A.O., excepté pour les acides aminés soufrés; elle est donnée par le tableau 3.2.

- Sucres totaux (hormis l'exopolysaccharide):

Ils représentent environ 15% de la matière sèche, et sont surtout localisés dans la paroi, excepté le glycogène sulfaté (SEKHARAM et al. 1989), qui constitue une des réserves carbonées de *S. platensis*. Ils se partagent de la façon suivante:

glucosane, glucosamine: 2,5%

glycogène sulfaté: 0,5% à 1%

rhamnose: 9%

acide muramique: 1%

cyclitols: 2%

- Lipides totaux:

Ils représentent 10% de la masse totale et se divisent en 5 catégories:

Monogalactosyldiacylglycérol: 3%

digalactosyldiacylglycérol: 1,5%

sulfolipide: 1,5%

phosphatidylglycérol: 2%

triglycéride: 2%

Notons que *S. platensis* possède des acides gras essentiels, tels que l'acide linoléique et l'acide  $\gamma$  linoléique.



EN POURCENTAGE DU POIDS SEC			
	<u>S. platensis</u>	<u>S. maxima</u>	<u>Chlorelles</u>
Protéines brutes	64 à 74	60 à 71	50
Lipides totaux	9 à 14	9 à 15	10
Hydrates de carbone	12 à 20	10 à 16	30
Acides nucléiques	4	3 à 4,5	3 à 6

Composition de S. platensis, de S. maxima et de Chlorelles  
(Données de FOX, 1986 et de CIFERRI, 1983)

ACIDES AMINES	g.d'acides aminés pour 100g de protéines		
	(1)	(2)	(3)
Isoleucine	6,4	6.37	4.0
Leucine	10.4	9.84	7.0
Lysine	4.4	4.79	5.5
Méthionine	2.2	2.63	5.5
Phénylalanine	5.4	4.57	6.0
Thréonine	5.4	5.52	4.0
Tryptophane	1.5	1.60	1.0
Valine	7.5	6.87	5.0
Arginine	7.8	6.66	
Histidine	1.8	1.61	
Alanine	7.6	7.95	
Acide aspartique	11.0	9.21	
Acide glutamique	16.3	0.94	
Cystine	0.7	0.94	
Glycine	5.4	4.99	
Proline	3.7	3.89	
Serine	4.8	5.59	
Tyrosine	5.0	4.87	

Composition de S. platensis en acides aminés  
(1) Données de FOX, 1986  
(2) Données de CLEMENT, 1975  
(3) Standard F.A.O.

Tableau 3.2: Pourcentage de la biomasse sèche et caractéristiques des protéines de S. platensis.

- Acides nucléiques:

Ils constituent 4% de la matière sèche et se partagent en 78% d'ARN, et 22% d'ADN.

*Spirulina platensis* synthétise également un exopolysaccharide en quantité variable. Le paragraphe 3.1.6 est entièrement consacré à ce polysaccharide, sur lequel nous n'avons jusqu'à présent aucune source bibliographique. L'ensemble de la biomasse active et de l'exopolysaccharide constitue ce que nous appellerons la biomasse totale.

D'un point de vue nutritionnel, il faut savoir que cette cyanobactérie est consommée depuis très longtemps, de manière non exclusive, et sans effet nocif apparent, par certaines tribus sur les rives du lac Tchad. Les études sur l'homme ou les animaux indiquent que les spirulines peuvent être consommées, même de manière prolongée, sans risque de troubles physiologiques.

Cependant, elles ne doivent pas constituer le seul apport nutritif. Ainsi, chez le porc pris comme modèle nutritionnel de l'homme, il est prudent d'en limiter l'apport à 25%. Enfin, des expériences chez l'homme ont montré que, même si les spirulines représentent 50% de la ration protéique, aucun trouble intestinal n'est observé. De même, les bilans azote, sodium, potassium, ne sont aucunement affectés (SAUTIER et TREMOLIERES, 1976).

En 1990, la spiruline a fait l'objet d'une autorisation à la consommation en France, délivrée par le Conseil National Supérieur d'Hygiène et de Sécurité.

C - CONDITIONS DE CULTURE:

Comme tout organisme photosynthétique, *S. platensis* a besoin de lumière, de gaz carbonique, d'une source d'azote et de sels minéraux.

ZARROUK (1966) a déterminé la composition précise du milieu

naturel de *S. platensis* en analysant les eaux du lac Tchad. Ceci a conduit à la réalisation d'un milieu synthétique, qui est à la base de tous les milieux actuellement utilisés. Le pH de ces milieux varie entre 8,3 et 10 selon les auteurs, car ZARROUK (1966), a montré que le pH dans cette gamme avait peu d'influence sur la croissance. Néanmoins, si l'on se base sur les études de croissance et sur celles de la photosynthèse, il semble que l'on puisse dégager un pH optimum de 9,5, qui est d'ailleurs celui du milieu naturel. Un pH externe de 9,5 conduit à un pH interne de 7,5 qui est le pH optimum de la ribulose 1-5-diphosphate carboxylase (Rubisco) (COLEMAN et COLMAN, 1981). Le pH basique est obtenu par un tampon carbonate-bicarbonate dont la contribution confère au milieu une force ionique élevée (0,42 kmol/m<sup>3</sup> pour le milieu de base).

Ne possédant pas d'hétérocyste, cette bactérie ne peut pas fixer l'azote moléculaire. Il est donc impératif de faire un apport en nitrate, qui est le composé azoté le plus favorable, bien que ZARROUK (1966) ait démontré que *S. platensis* pouvait utiliser l'urée.

La température optimale de croissance se situe entre 34 et 40°C (ZARROUK, 1966; FOX, 1986). Cette donnée sera précisée lors de l'étude de la photosynthèse que nous avons menée (paragraphe 3.1.2).

Cette étude a également permis de dégager les valeurs des éclairagements saturants et inhibants qui seront discutées dans le paragraphe suivant.

Sur ces deux derniers points, on peut trouver dans la littérature une étude sur les modifications morphologiques de *Spirulina platensis* en fonction de la température et de l'intensité de la lumière (VAN EYKELENBURG, 1979).

#### D. - DONNEES METABOLIQUES:

Après de nombreuses controverses, il semble aujourd'hui bien

établi que la source primaire de carbone chez les cyanobactéries est le bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  (MILLER et COLMAN, 1980; COLEMAN et COLMAN, 1981; BADGER et ANDREWS, 1982; KAPLAN et al. 1982). Le mécanisme proposé d'assimilation du carbone chez les cyanobactéries est représenté sur la figure 3.2 (VOLOKITA et al. 1984; BADGER et al. 1985).

Le bicarbonate extérieur est en équilibre avec le  $\text{CO}_2$  mais seul le bicarbonate traverse la membrane plasmique. Le  $\text{CO}_2$  est probablement hydraté dans la membrane plasmique sur un site proche du site actif de transport des ions bicarbonate. Il s'agit d'un transport actif par échange de protons, qui se fait contre le gradient d'ions  $\text{HCO}_3^-$ . En effet, les auteurs précédents rapportent qu'en conditions de limitation par la source de carbone, il y a accumulation du bicarbonate à l'intérieur des cellules. Ce fait est d'autant plus marquant que la limitation est importante. Par exemple, pour des conditions de culture où la source de carbone est le  $\text{CO}_2$  de l'air, il a été mesuré à l'intérieur des cellules des concentrations en bicarbonate 500 à 1000 fois supérieures à la concentration extracellulaire.

Le bicarbonate est ensuite transformé par voie enzymatique en  $\text{CO}_2$  via l'anhydrase carbonique. Ces deux dernières étapes sont contrôlées par la lumière, et sont notamment inexistantes à l'obscurité.

Ce mécanisme a pour effet de maintenir constante l'affinité de la Rubisco pour le  $\text{CO}_2$ , même en condition de limitation par la source de carbone, et de limiter la photorespiration. Il semble en effet que la photorespiration soit inexistante ou très faible, quelles que soient les conditions de culture (CHENG et COLMAN, 1974; LLOYD et al. 1977; BIRMINGHAM et al. 1982; NILSEN et JOHNSEN, 1982).

Néanmoins, le transport actif du bicarbonate est très coûteux en ATP, ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de croissance.

Notons que, plus récemment, certains auteurs situent l'étape

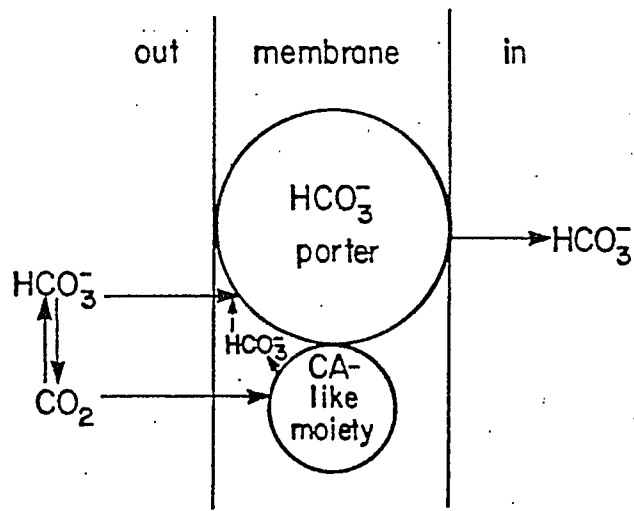
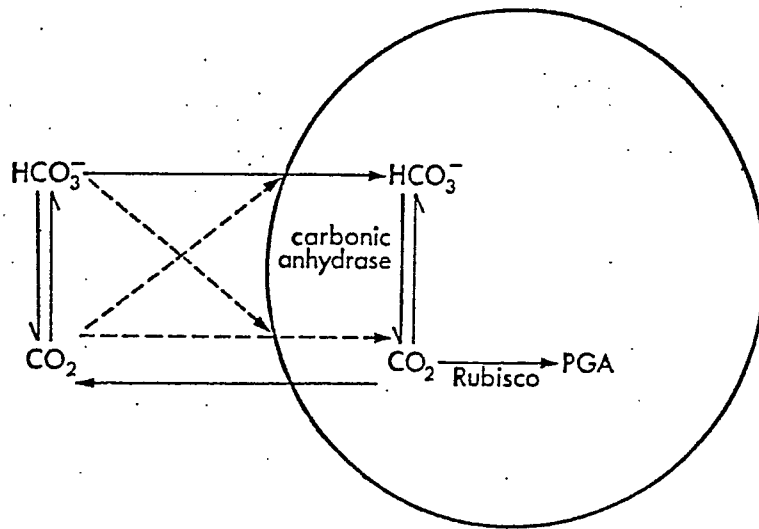


Figure 3.2: Schéma d'assimilation du bicarbonate chez les cyanobactéries (d'après BADGER *et al.* 1985; et VOLOKITA *et al.* 1984).

limitante du transport actif dans les membranes des carboxysomes, où se trouve la Rubisco et l'anhydrase carbonique, et proposent une diffusion passive du CO<sub>2</sub> dans la membrane plasmique (REINHOLD et al. 1989).

Il est maintenant admis que le métabolisme carboné des cyanobactéries est de type C<sub>3</sub>, bien que des controverses persistent pour certaines espèces.

A l'obscurité, les cyanobactéries consomment leurs réserves carbonées pour leur maintenance (SMITH, 1983). Chez *S. platensis*, il s'agit essentiellement de glycogène sulfaté (SEKHARAM et al. 1989), et de polyhydroxybutyrate (VINCENZINI et al. 1990). Cependant, la proportion intracellulaire de ces deux composés ne représente que 1% de la biomasse en conditions normales de culture, ce qui limite la durée des périodes d'obscurité dans la conduite d'expériences comportant des alternances lumière-obscurité.

Les vitesses de respiration sont très faibles chez les cyanobactéries, environ 10 à 50 fois inférieures aux vitesses de photosynthèse (PESCHEK, 1987). D'autre part, la respiration est inhibée à la lumière (MYERS et KRATZ, 1955).

La figure 3.3 représente les principales voies métaboliques chez les cyanobactéries, et leur bilan énergétique. On remarquera que le cycle de Krebs est incomplet et fonctionne par le shunt du glyoxylate. Cette figure est une synthèse des données métaboliques disponibles dans les ouvrages de CARR et WHITTON (1973), FOGG et al. (1973), CARR et WHITTON (1982), FAY et VAN BAALEN (1987).

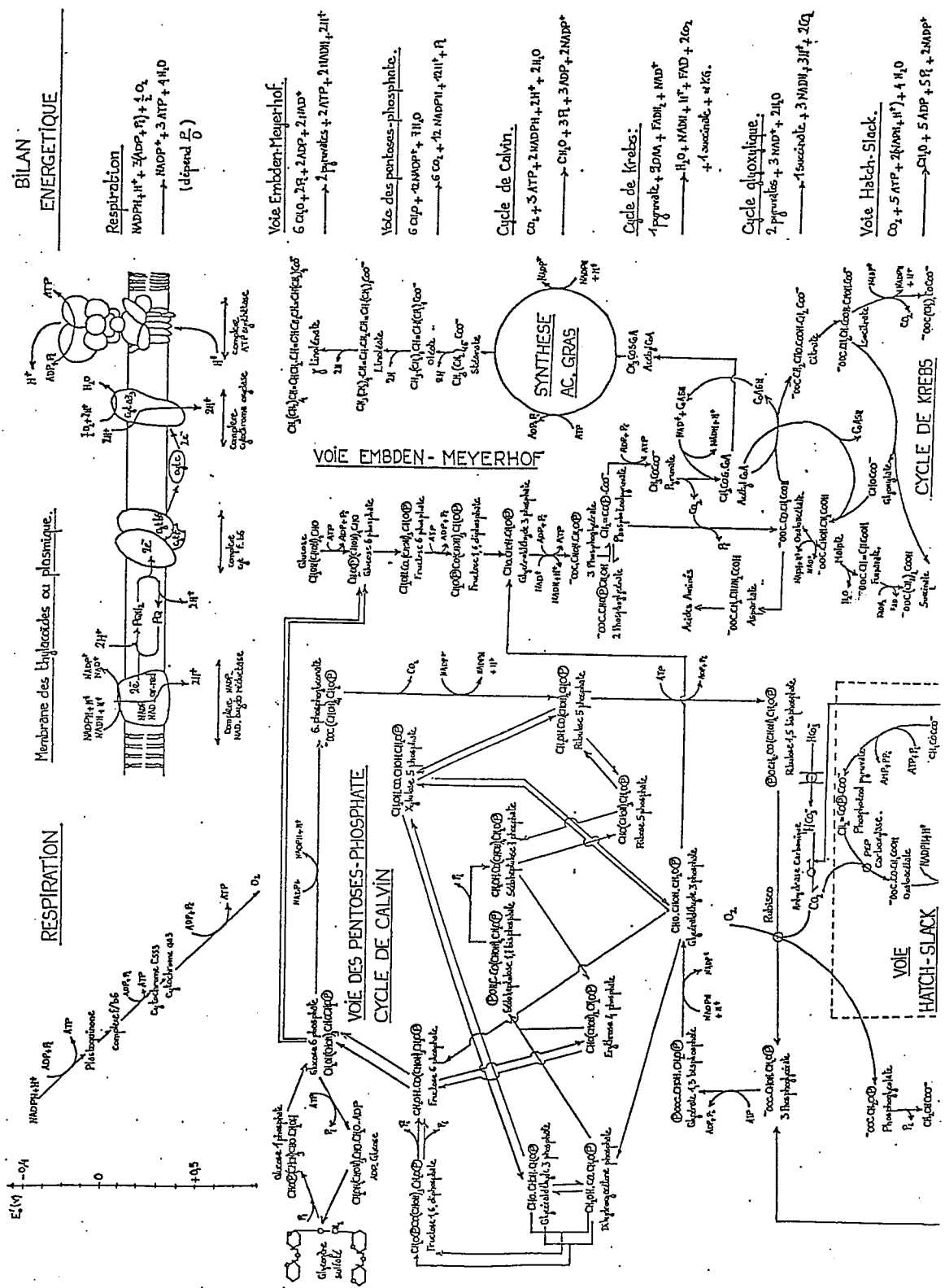


Figure 3.3a: Principales voies métaboliques chez les cyanobactéries et leur bilan énergétique (références voir texte).

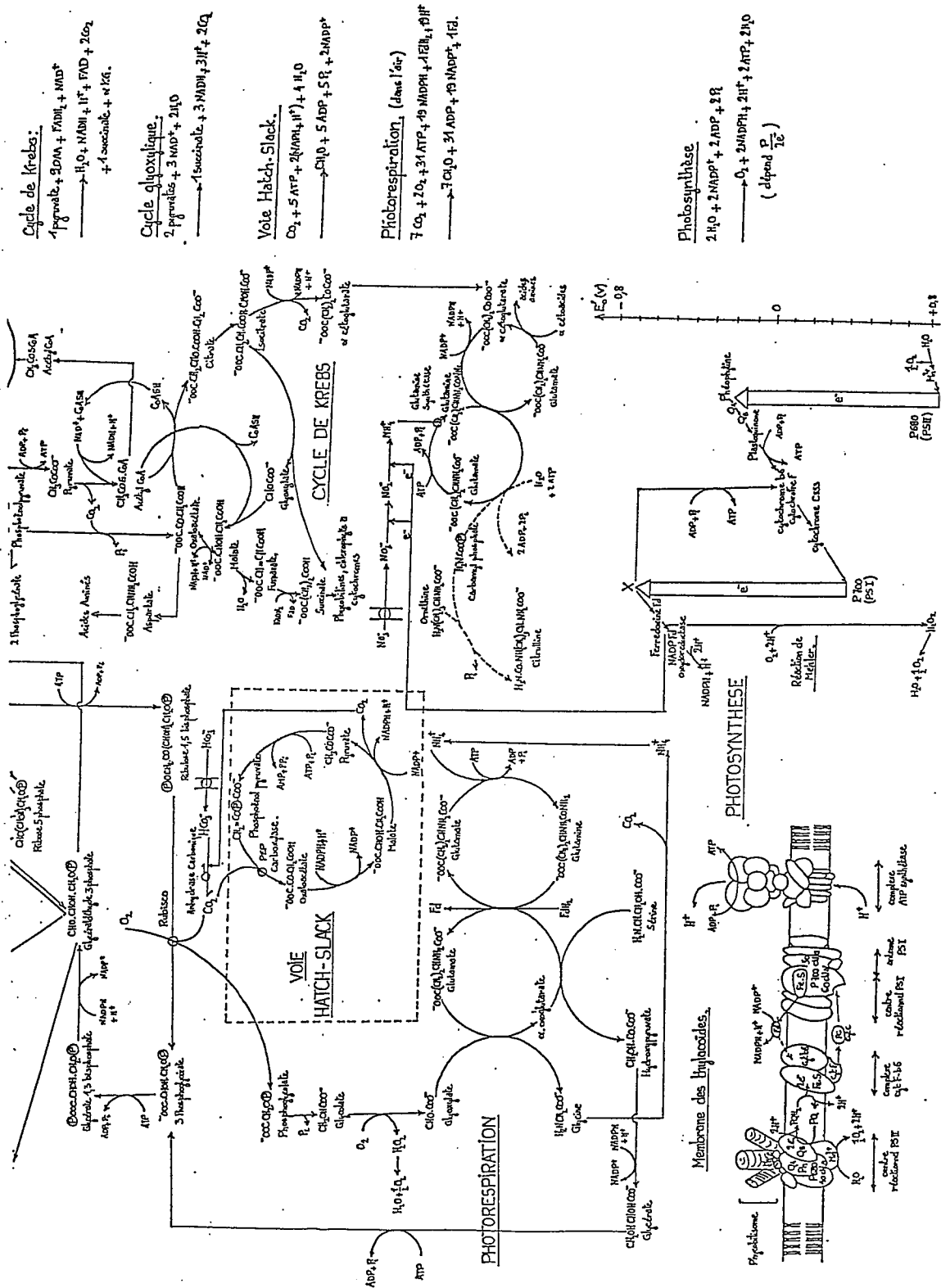


Figure 3.3b: Principales voies métaboliques chez les cyanobactéries et leur bilan énergétique (références voir texte).



### 3.1.2. Etude de la photosynthèse chez *Spirulina platensis*:

#### A - SATURATION ET INHIBITION DE LA PHOTOSYNTHESE. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA TENEUR EN PHYCOCYANINES:

Des mesures de photosynthèse ont été réalisées à l'électrode de Clark au moyen du dispositif décrit au chapitre 2.

Dans un premier temps, on a étudié l'effet de la température en réalisant des courbes de saturation de la photosynthèse entre 20 et 45°C. Ces courbes montrent que la valeur de la saturation de la photosynthèse dépend fortement de la température, ainsi que la constante de demie saturation. Par contre, on constate que les pentes à l'origine, qui sont proportionnelles au rendement quantique, sont identiques quelle que soit la température. Ceci montre que pour les faibles valeurs de flux lumineux, c'est bien la cadence d'arrivée des photons sur les photosystèmes qui limite la vitesse (rendement quantique maximum), et non une étape enzymatique qui serait sensible à la température.

La vitesse de photosynthèse maximale est atteinte pour une température optimale de 36°C. La figure 3.4 récapitule les résultats sous une forme adimensionnelle, en se ramenant à la vitesse maximale. Ils peuvent être modélisés par une courbe ayant la forme suivante (ROELS, 1983):

$$\frac{v_p}{v_{pmax}} = \frac{A \cdot e^{-(\Delta h^*/RT)}}{1 + B \cdot e^{-(\Delta h_d/RT)}} \quad (3.1)$$

$\Delta h^*$  et  $\Delta h_d$  sont respectivement l'enthalpie d'activation et de désactivation. Ces valeurs ont été déterminées à partir des résultats de ZARROUK (1966), LEE (1986), et de nos propres données:

$$\Delta h^* = 8,3 \cdot 10^7 \text{ J/kmol}$$

$$\Delta h_d = 2,16 \cdot 10^8 \text{ J/kmol}$$

Les valeurs des constantes A et B pour notre souche sont:

$$A = 1,95.10^{14}$$

$$B = 2,71.10^{36}$$

Elles sont en parfait accord avec celles que l'on peut identifier à partir des données de LEE (1986), obtenues sur le rendement de conversion de la photosynthèse chez *Spirulina platensis* en fonction de la température.

L'équation 3.1 permet donc de modéliser l'effet de la température sur les vitesses de croissance de *S. platensis*.

La deuxième partie de l'étude consistait à étudier les seuils de saturation et de photoinhibition de la photosynthèse en fonction de la teneur en phycocyanines dans les cellules. En effet, lors de limitations de la croissance (notamment par carences minérales), les teneurs en phycocyanines chez les cyanobactéries peuvent être fortement modifiées (se reporter au paragraphe 3.2). Il apparaît donc important de connaître les effets sur la photosynthèse qui pourraient en résulter; ceci pour bien appréhender les comportements lors de cultures en masse.

On a donc réalisé une série de mesures de vitesse de la photosynthèse à 36°C, pour différentes valeurs du flux lumineux, sur des cellules ayant leur contenu en phycocyanines altéré. Les cellules cultivées dans le milieu de base (MB) contiennent 15% en masse de phycocyanines, et servent donc de témoin. Les cellules ayant des pourcentages inférieurs ont été obtenues lors d'une culture en limitation par les nitrates. Les cellules ayant un pourcentage supérieur sont obtenues par culture dans un milieu à faible force ionique (MF, pour les détails, voir le paragraphe 3.1.4).

Les résultats obtenus sont présentés de façon différente sur les figures 3.5 a et b. Sur la courbe a, les vitesses sont rapportées à la concentration en phycocyanines, alors que sur la courbe b, elles sont rapportées à la concentration en biomasse.

La courbe témoin montre que la saturation est atteinte pour

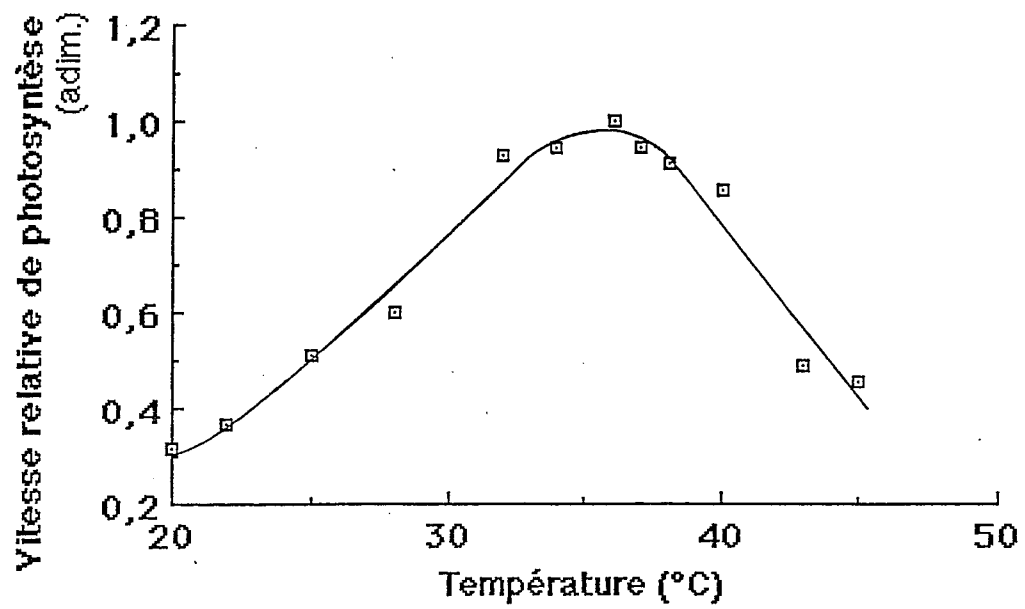
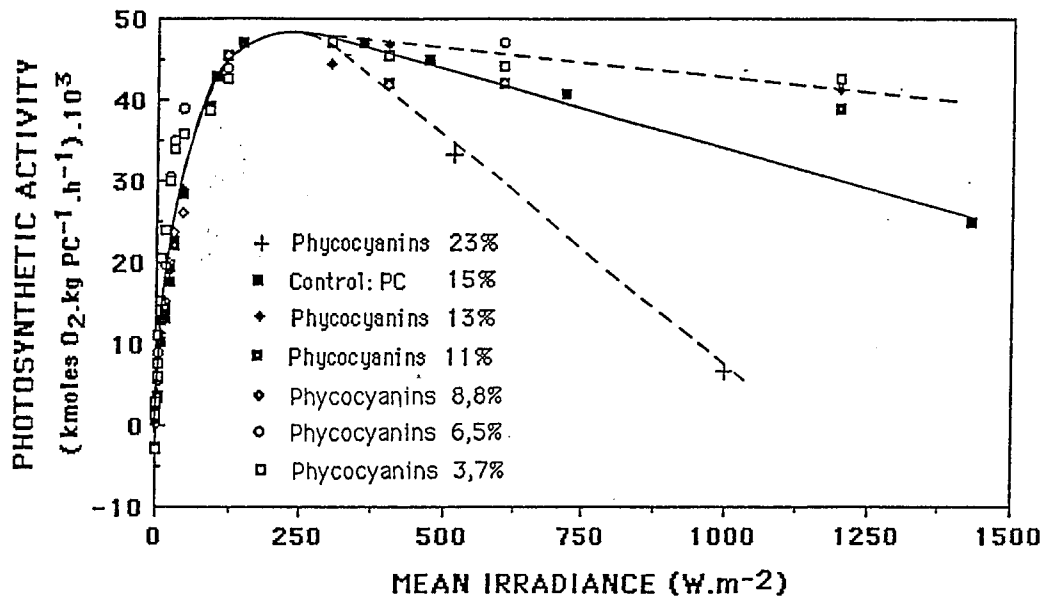
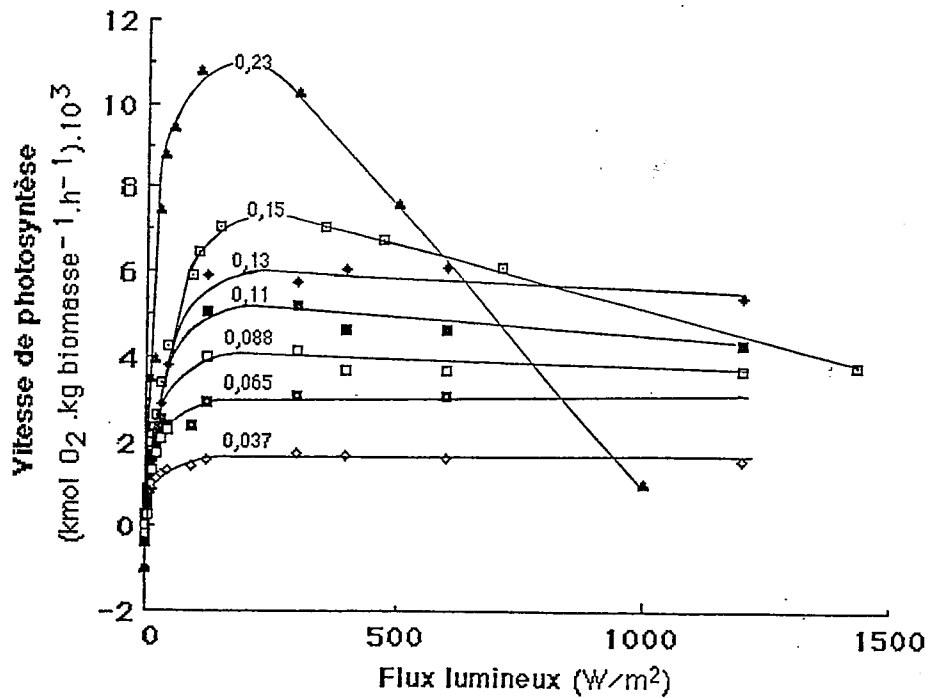


Figure 3.4: Effet de la température sur la vitesse de la photosynthèse chez *Spirulina platensis*.



(a)



(b)

Figure 3.5: Vitesse de la photosynthèse en fonction du flux lumineux chez *S. platensis*, pour différentes teneurs en phycocyanines dans les cellules.

a- Valeurs rapportées à la concentration en phycocyanines.

b- Valeurs rapportées à la concentration en biomasse.

un flux lumineux de  $130 \text{ W/m}^2$ , avec une constante de demie saturation de  $25 \text{ W/m}^2$ , et que la photoinhibition apparaît dès  $300 \text{ W/m}^2$ . Pour un flux de  $1250 \text{ W/m}^2$ , la vitesse de photosynthèse est diminuée d'un tiers. Il s'agit d'une photoinhibition correspondant à des éclairagements de courte durée (quelques minutes). Ces valeurs de saturation et d'inhibition sont en accord avec celles déterminées par VONSHAK *et al.* (1988). La photoinhibition serait due à la perte d'un polypeptide D1 du photosystème II, ou à des dommages causés au centre réactionnel P 680 (CRITCHLEY, 1988). Lorsqu'elle est de courte durée, elle n'est jamais irréversible (VONSHAK *et al.* 1988).

Les courbes pour les cellules ayant des teneurs en phycocyanines plus faibles que celles du témoin montrent toutes une moindre photoinhibition. Cette observation pourrait avoir pour origine une capacité de synthèse intacte de la protéine D1, qui permettrait son renouvellement plus rapide après photodestruction dans les centres réactionnels du photosystème II, présents en quantités réduites dans ces cellules.

Le mécanisme qui vient d'être décrit existe aussi, mais en sens inverse, sur les cellules plus riches en phycocyanines que le témoin. En effet, la courbe obtenue montre nettement une plus grande sensibilité à la photoinhibition chez ces cellules (90% d'inhibition à  $1000 \text{ W/m}^2$ ).

Dans tous les cas, la valeur maximale pour la vitesse de photosynthèse chez *Spirulina platensis* est d'environ  $0,05 \text{ kmol. O}_2 \cdot \text{kg PC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , ce qui correspond, chez le témoin à  $7,1 \cdot 10^{-3} \text{ kmol. O}_2 \cdot \text{kg biomasse}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . La figure 3.5a montre que cette valeur peut être maintenue dans tous les cas, si l'on ramène les résultats à la quantité de phycocyanines. Ce fait est intéressant à noter, en vue d'une transposition des résultats à l'étude de cultures en masse. Néanmoins, si les résultats sont ramenés à la masse cellulaire, il apparaît clairement que la vitesse maximale de photosynthèse est fortement diminuée si la teneur en phycocyanines diminue (figure 3.5b).

B - ETUDE DE L'INHIBITION DE RESPIRATION A LA LUMIERE:

Une monocouche de spirulines est déposée directement sur l'électrode de platine d'une électrode à oxygène de type Haxo-Blinks, de dynamique très rapide pour pouvoir mesurer des dégagements d'O<sub>2</sub> en lumière modulée (JOLIOT, 1966). Le montage est exposé au chapitre 2.

Lorsque les spirulines sont éclairées par une lumière modulée à 50 Hz, le signal global obtenu comporte une composante modulée à 50 Hz, superposée à une composante continue. Le signal global enregistré est proportionnel à la résultante de la photosynthèse et de la respiration. La composante modulée, extraite du signal global par un amplificateur à détection synchrone, est proportionnelle à la photosynthèse seule, parce que seule capable de répondre à une modulation de 50 Hz. La comparaison des deux courbes, photosynthèse plus respiration et photosynthèse, dans diverses conditions expérimentales permet de vérifier que la respiration des spirulines est inhibée par la lumière.

Cette inhibition est un phénomène connu chez les cyanobactéries (MYERS et KRATZ, 1955). Elle serait liée au fait que chez ces organismes, les chaînes de transporteurs d'électrons localisées sur les thylacoïdes, sont les mêmes pour la photosynthèse ou la respiration (GONZALEZ DE LA VARA et GOMEZ-LOJERO, 1986).

Les résultats obtenus sur *S. platensis* sont présentés sous forme de courbe de saturation sur la figure 3.6. Les dégagements d'oxygène sont donnés en unités arbitraires, car il est impossible de calibrer correctement ce type d'électrode. On peut néanmoins constater que la saturation de la photosynthèse se produit vers 130 W/m<sup>2</sup>, ce qui confirme les résultats obtenus avec l'électrode de Clark. En ce qui concerne l'inhibition de respiration, on constate, comme attendu, qu'elle est effective dès les faibles éclairagements, et totale pour un flux d'environ 5 W/m<sup>2</sup>.

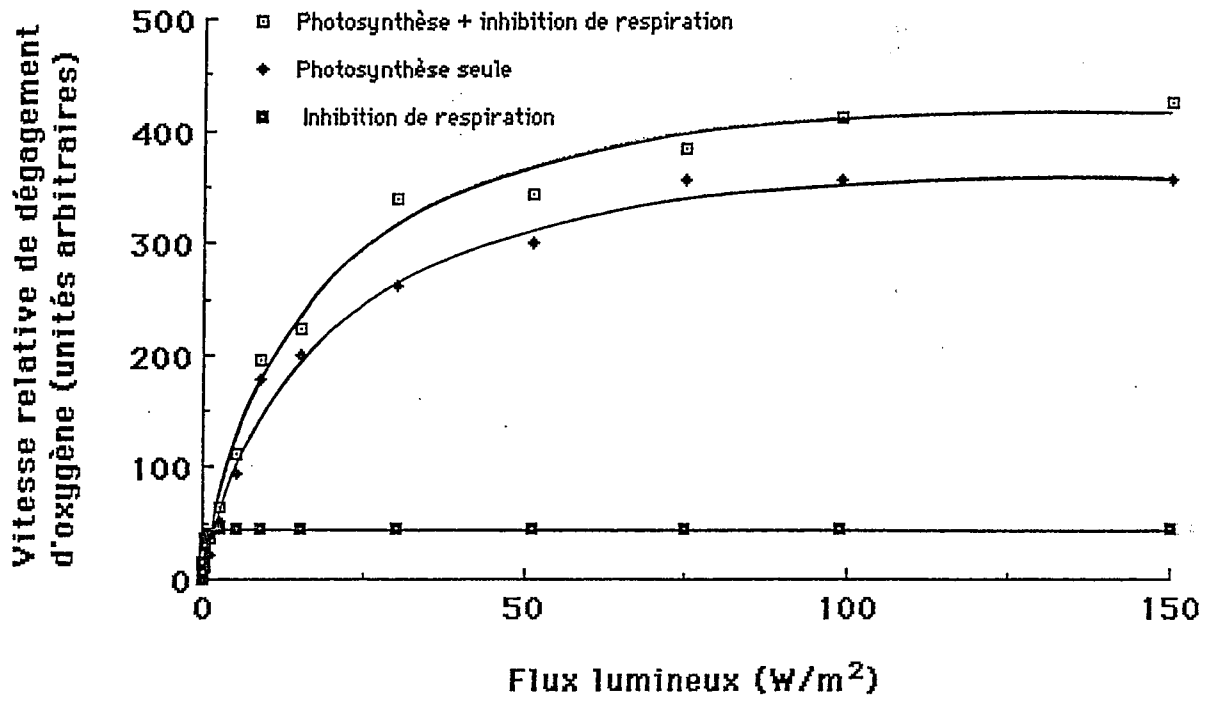


Figure 3.6: Courbe de saturation de la photosynthèse et de l'inhibition de la respiration à la lumière chez *S. platensis*, en fonction du flux lumineux.

Ce résultat permettra donc de négliger la respiration à la lumière, quand on modélisera les cultures en photobioréacteur.

Un examen détaillé des résultats dans la région des faibles flux lumineux entre 0 et 5 W/m<sup>2</sup> permet de déterminer que le flux au point de compensation, où la somme algébrique des échanges d'oxygène photosynthétique et respiratoire s'annule, est de 1 W/m<sup>2</sup>. Cette valeur de 1 W/m<sup>2</sup> sera à nouveau déterminée par un moyen différent, lors de la définition du volume utile dans les photobioréacteurs (chapitre 5).

### C - CARACTERISATION DES PIGMENTS CHEZ *S. platensis* ET ADAPTATION CHROMATIQUE:

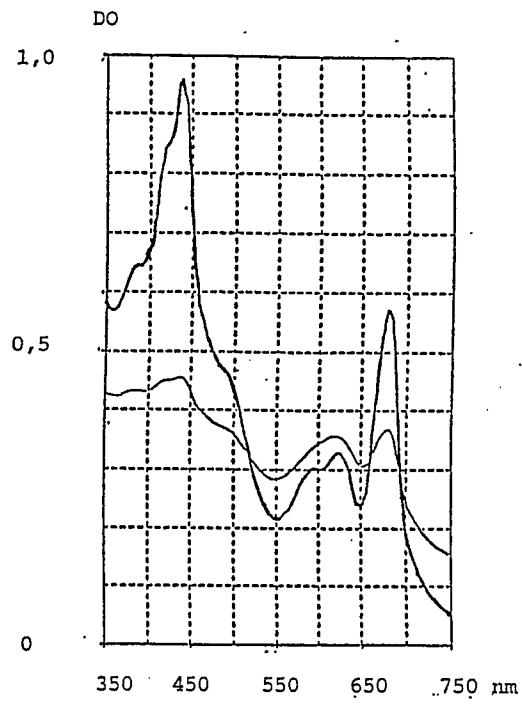
La figure 3.7 montre les spectres d'absorption d'une suspension de spirulines, ainsi que de ses pigments extraits et purifiés, chlorophylle a, et phycocyanines. On peut attribuer les trois principaux pics d'absorption à la chlorophylle a (678 et 440 nm), et aux phycocyanines (620 nm). Les caroténoïdes absorbent également dans la région comprise entre 350 et 500 nm.

Pour vérifier l'absence d'adaptation chromatique chez *S. platensis*, nous avons réalisé des spectres d'émission de fluorescence à 77 K, sur des cellules cultivées sous différentes lumières. Les quatre types d'éclairements réalisés sont détaillés dans le chapitre 2, il s'agissait de lumière bleue, magenta, orange, et blanche, cette dernière servant de témoin. Les résultats sont représentés sur la figure 3.8, et amènent aux conclusions suivantes:

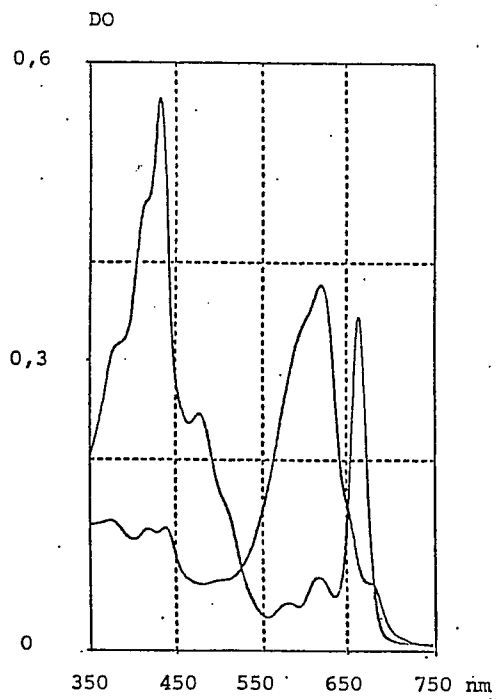
- les spectres montrent nettement les pics d'émission des chlorophylles, des phycocyanines, et des allophycocyanines, mais pas celui de la phycoérythrine qui est absente chez *S. platensis*.

- Il n'y a aucune modification des spectres d'absorption ou d'émission de fluorescence en fonction de la qualité de la lumière utilisée lors de la culture. Cette observation confirme qu'il n'existe pas d'adaptation chromatique chez *S. platensis*.





(a)



(b)

Figure 3.7: Spectres d'absorption de *S. platensis* dans le domaine des longueurs d'onde visibles (a) et de ses pigments purifiés, chlorophylle a et phycocyanines (b).

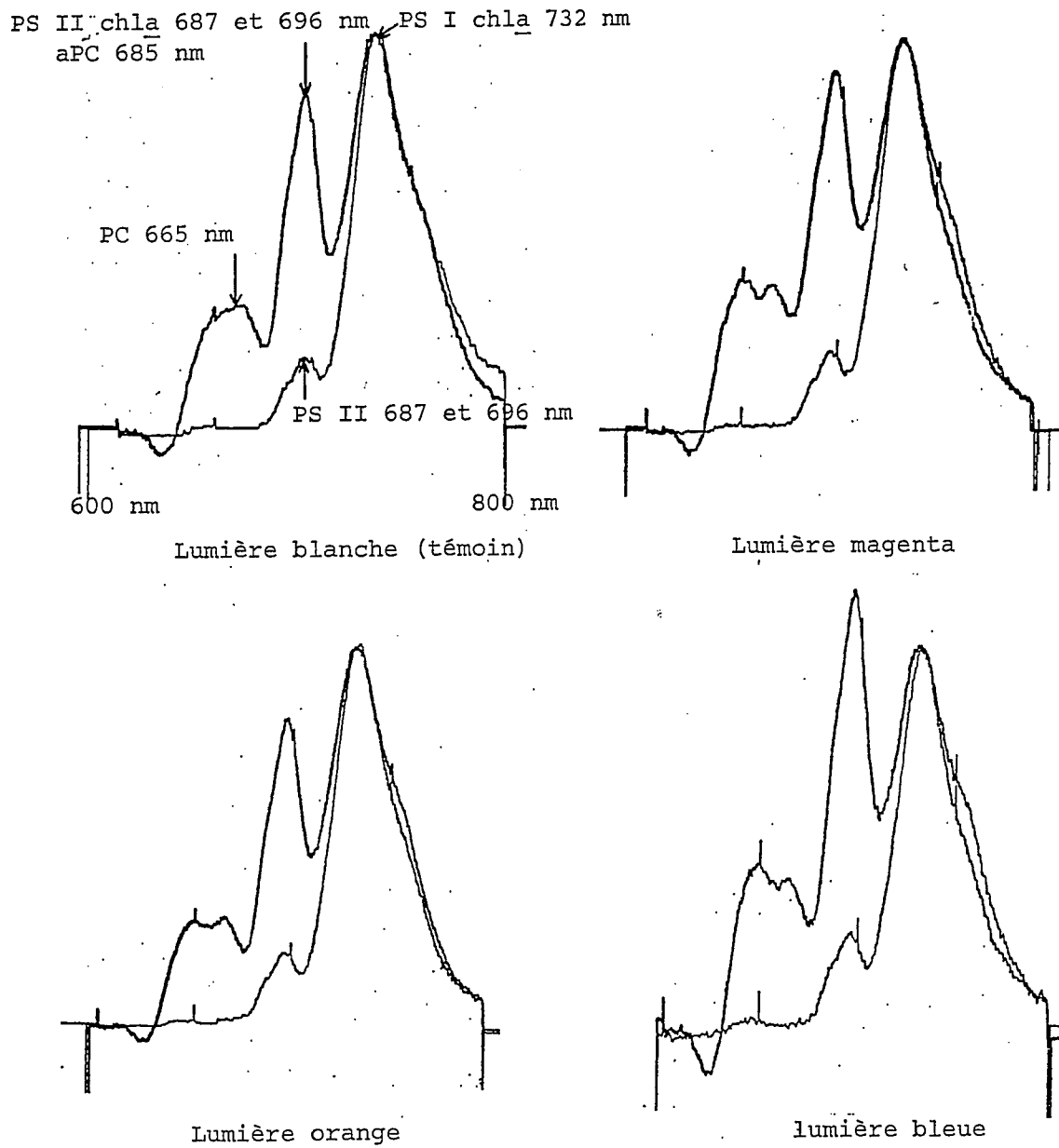
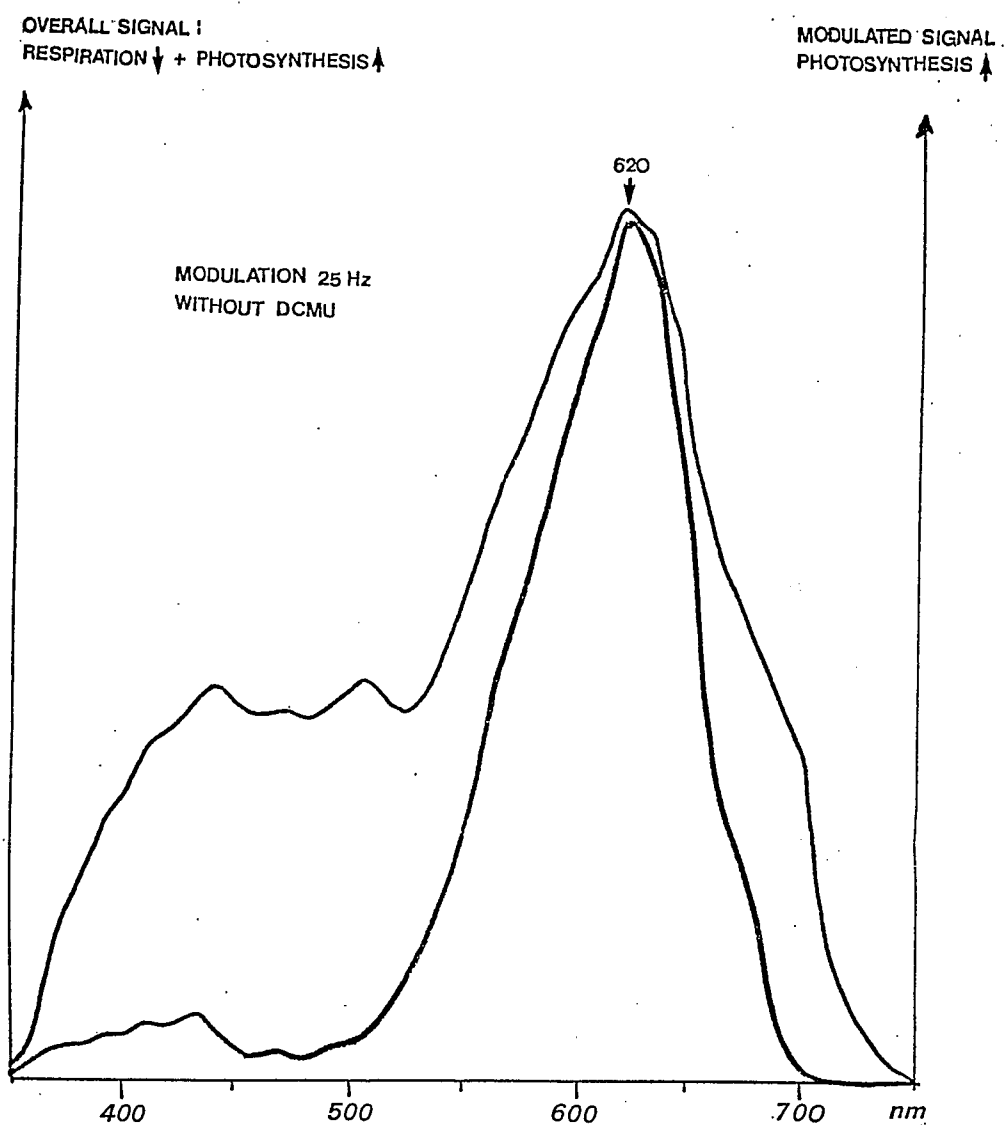


Figure 3.8: Spectres d'émission de fluorescence à 77 K pour des spirulines cultivées sous différentes lumières.

- Trait fin: excitation à 440 nm.
- Trait épais: excitation à 540 nm.



**Figure 3.9:** Spectre d'action de la photosynthèse et de l'inhibition de respiration chez *S. platensis*.

- Trait épais: photosynthèse seule.
- trait fin: inhibition de respiration.

D - SPECTRES D'ACTION DE LA PHOTOSYNTHESE ET DE  
L'INHIBITION DE LA RESPIRATION:

La mesure des dégagements d'oxygène au moyen d'une électrode de type Haxo-Blinks, associée à une source de lumière monochromatique, a permis de réaliser un spectre d'action de la photosynthèse, et de l'inhibition de respiration chez *S. platensis*.

Ces spectres montrent (figure 3.9) que la photosynthèse se produit essentiellement entre 550 et 650 nm, alors que l'inhibition de respiration existe sur tout le spectre visible.

Ce résultat s'explique par le fait que lorsqu'on éclaire dans les longueurs d'onde absorbées par la chlorophylle *a*, on excite essentiellement le photosystème I, composé de chlorophylle *a*. Le photosystème II, qui est constitué en majorité de phycocyanines, ne fonctionne plus. Or la photosynthèse est optimale lorsque les deux photosystèmes fonctionnent à la même vitesse, sinon le rendement quantique chute fortement (c'est ce que l'on appelle l'effet Emerson chez les plantes supérieures). Donc, si l'on éclaire en lumière bleue ou rouge, on a d'une part une forte diminution de la vitesse de photosynthèse et d'autre part, une forte inhibition de la respiration, commandée par le PS I, compétiteur de la cytochrome oxydase pour les électrons en provenance des chaînes de transporteurs communes.

Par contre, si l'on éclaire dans le domaine des radiations oranges, on excite les phycocyanines du photosystème II, qui absorbent à 620 nm. Il existe dans ce cas, un mécanisme de dérivation de l'énergie d'excitation vers le photosystème I (état 2), qui permet à la photosynthèse de fonctionner (toujours avec inhibition de la respiration). Ce mécanisme fait intervenir un polypeptide de 18,5 kd, et une phosphatase kinase (BENNETT, 1983; ALLEN et al. 1985; ALLEN et HOLMES, 1986).

Ces résultats montrent qu'il est possible de cultiver des

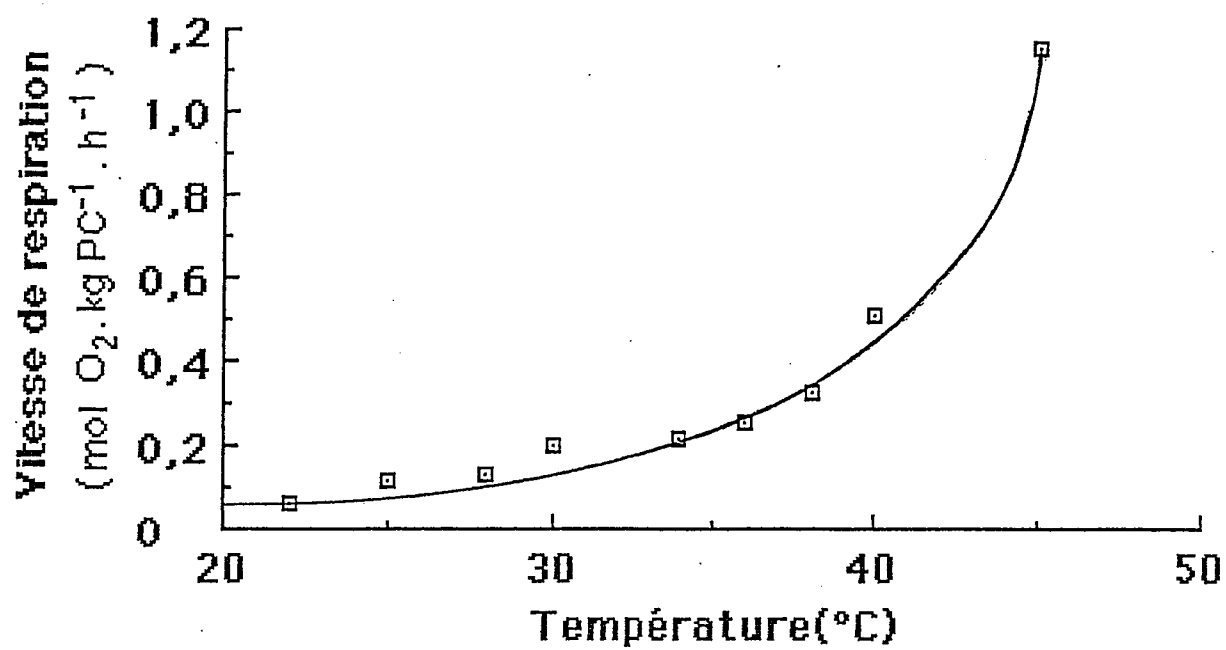


Figure 3.10: Effet de la température sur la vitesse de respiration de *S. platensis*.

cyanobactéries en lumière orange, avec un bon rendement de la photosynthèse. Ce procédé peut s'avérer intéressant en vue de l'optimisation énergétique d'une station spatiale. Des cultures en photoréacteur dans ces conditions ont été réalisées, pour vérifier ce comportement, et déterminer les rendements de conversion en biomasse dans ce cas (voir paragraphe 3.2.1).

### 3.1.3. Effet de la température sur la respiration de *Spirulina platensis*:

Chez les cyanobactéries, la respiration se produit uniquement à l'obscurité, et correspond à une perte de biomasse, puisqu'il y a consommation des réserves carbonées pour la maintenance du microorganisme (SMITH, 1983). Cette respiration est toujours très faible (PESCHEK, 1987), car elle correspond à des besoins énergétiques de maintenance.

Nous avons mesuré la respiration chez *S. platensis* en fonction de la température, au moyen d'une électrode de Clark. Les résultats montrent que la vitesse de respiration est une fonction exponentielle de la température (figure 3.10). Entre 20 et 45°C, on peut écrire la relation suivante, sous forme de loi d'Arrhénius:

$$v_r = v_o \cdot e^{-\Delta H/RT} \quad (3.2)$$

avec:

$$v_o = 1,705 \cdot 10^{11} \text{ kmol O}_2 \cdot \text{kg PC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$\Delta H = 8,72 \cdot 10^7 \text{ J/kmole}$$

A 36°C, la vitesse de respiration vaut  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ kmol O}_2 \cdot \text{kg PC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , ou  $3,8 \cdot 10^{-5} \text{ kmol O}_2 \cdot \text{kg biomasse}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Néanmoins, nos résultats montrent que lorsque les cellules sont fraîchement repiquées, cette vitesse peut être augmentée d'un facteur 10.

Ces valeurs devront être vérifiées lors de cultures en masse avec des périodes à l'obscurité, de façon à confirmer qu'elles sont cohérentes avec la perte de masse mesurée.

### 3.1.4. Effet de la force ionique sur la physiologie et la croissance de *Spirulina platensis*:

Pour mettre en évidence les effets de la force ionique sur la physiologie et la croissance de *S. platensis*, nous avons utilisé des milieux de culture dérivés du milieu de base, mais concentrés ou dilués par rapport à celui-ci, pour la totalité des ions qui le composent. Ces milieux sont détaillés dans le chapitre 2, ils ont permis de faire varier la force ionique entre 0,10 et 0,84 mol/l.

Les principales modifications obtenues alors sont d'ordre physiologique. En effet, on constate sur le tableau 3.3, qu'il y a une augmentation de la teneur en phycocyanines dans la biomasse active quand la force ionique diminue, alors que la teneur en chlorophylles reste constante. Parallèlement, on note une augmentation de la quantité d'exopolysaccharide dans la biomasse totale.

Force ionique (mol/l)	Teneur en phycocyanines (%)	Teneur en protéines (%)	Teneur en chlorophylles (%)	Fraction massique en polysaccharide
0,84	11	64	1	-
0,42	15	68	1	0,1
0,21	19	72	1	-
0,10	23	76	1	0,14

Tableau 3.3: Influence de la force ionique sur les teneurs en pigments et en protéines (exprimées en % de la biomasse active), et sur la fraction massique de l'exopolysaccharide chez *S. platensis*.

Cette augmentation de la teneur en pigments du photosystème II se traduit par une augmentation de la vitesse maximale de photosynthèse par unité de biomasse comme nous l'avons vu lors de l'étude de la saturation de la photosynthèse. Néanmoins, nous avons vu également que si l'on ramène les résultats à la quantité de phycocyanines, les vitesses de photosynthèse sont égales, quelle que soit la teneur en phycocyanines dans les cellules (il n'y a pas de modification du rendement de conversion de l'énergie lumineuse). Or, dans un photobioréacteur, c'est l'énergie lumineuse disponible qui limite la vitesse de la photosynthèse, et la croissance s'effectue très rapidement à quantité de phycocyanines éclairées constante (voir les explications détaillées dans le chapitre 5). Ceci explique pourquoi on ne constate aucune différence de vitesse de croissance lors de cultures en masse dans le milieu de base, et dans le milieu à faible force ionique, bien que dans ce dernier, les cellules soient plus riches en phycocyanines (figure 3.11).

Il est important de noter que la diminution de la teneur en phycocyanines pour les forces ioniques élevées se produit en quelques heures d'adaptation seulement, alors que le phénomène inverse demande plusieurs repiquages pour s'établir. Cela semble indiquer l'existence d'un mécanisme de dégradation dans le premier cas, et de régulation adaptatif dans le deuxième.

Un autre point important est que si l'on ramène les teneurs des composants cellulaires à la biomasse totale produite, on s'aperçoit que les pourcentages respectifs des protéines, sucres, et lipides restent constants, et égaux respectivement à 64%, 21%, et 9% lors des cultures réalisées à  $5 \text{ W/m}^2$ . Seules les teneurs en phycocyanines varient, de 20% dans le milieu de base, à 26% dans le milieu de faible force ionique. On en conclut donc que la force ionique modifie les proportions en pigments dans la biomasse, sans toutefois modifier les rapports entre les grandes classes de composants cellulaires. Il n'y a alors aucune modification du rapport  $P/2e^-$  *in vivo* dans la cellule. Cette remarque présente un



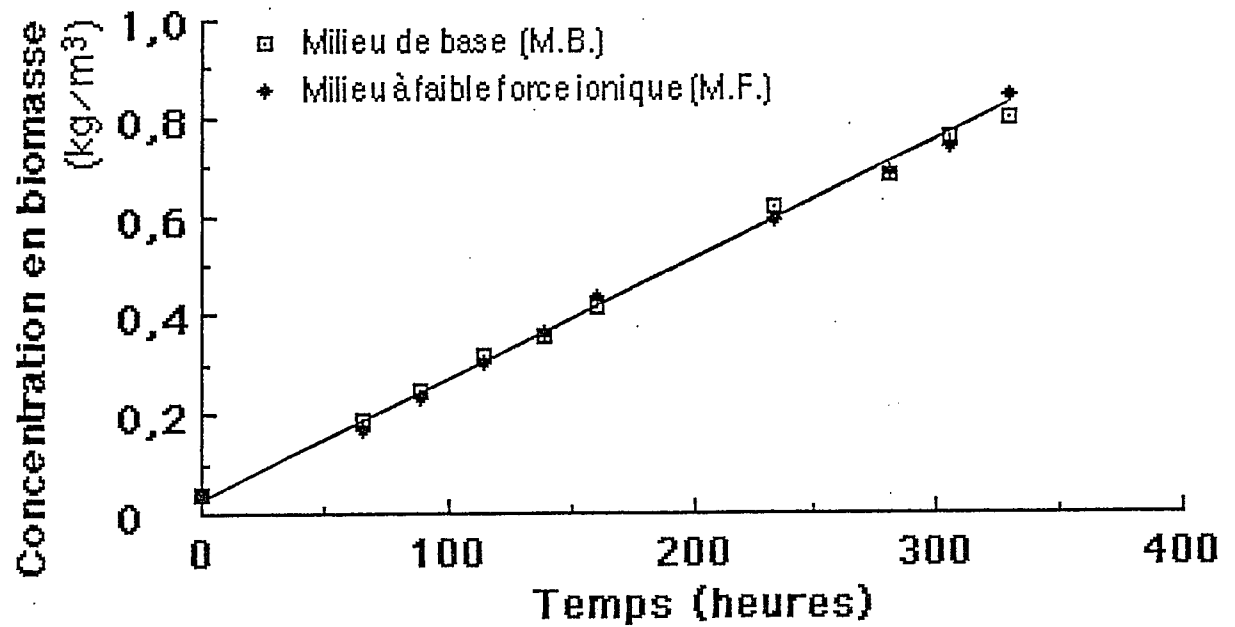


Figure 3.11: Effet de la force ionique sur la vitesse de croissance de *S. platensis*.

intérêt qui sera développé au chapitre 5, lors de la modélisation biochimiquement structurée. Précisons que cette invariance des proportions n'est vraie que pour des éclairagements identiques; si on fait varier l'énergie absorbée dans le réacteur, on observe des modifications qui seront décrites dans le paragraphe 3.2.5, et dans le chapitre 5.

Notons enfin, que lorsqu'on fait varier la force ionique avec le chlorure de sodium, les effets semblent différents, puisque certains auteurs rapportent une diminution de la vitesse de croissance ainsi que de l'activité de la Rubisco à partir de 0,4 kmol/m<sup>3</sup> en NaCl, accompagnée d'une augmentation de l'activité de la Phosphoénolpyruvate carboxylase, ce qui traduit une déviation du métabolisme vers la voie C<sub>4</sub>, dans ces conditions de stress (TEREKHOVA, 1986).

#### 3.1.5. Effet de l'agitation:

Les effets de l'agitation n'ont pas été étudiés systématiquement, néanmoins, l'établissement de corrélations pour déterminer la biomasse à partir de la mesure de la D.O.<sub>750</sub> a montré que la diffusion de la lumière par une suspension de cellules dépendait de l'agitation. Pour ces raisons, lors d'une culture en bioréacteur, nous avons fait varier la vitesse d'agitation des turbines Rushton. Cette expérience a permis d'établir les différentes corrélations données au chapitre 2, et de mesurer les coefficients de diffusion dans différentes conditions d'agitation (les résultats sont donnés au chapitre 5).

Nos résultats ont également montré qu'un arrêt de croissance se produisait à partir d'une vitesse d'agitation de 400 tours par minute, bien que la photosynthèse continue. *S. platensis* est donc sensible à la contrainte de cisaillement, le seuil se situant très approximativement entre 0,06 et 0,07 Pa. Cette valeur ne devra jamais être dépassée lors de cultures en cuves agitées par des mobiles. Entre 0 et 300 tours par minute, on ne constate aucune

modification métabolique ou cinétique en cours de croissance.

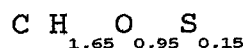
### 3.1.6. L'exopolysaccharide de *Spirulina platensis*:

#### A - COMPOSITION ET STRUCTURE:

Dès le début de nos études, nous avons mis en évidence l'existence d'un exopolysaccharide chez *S. platensis*. Aucune information n'étant disponible dans la littérature, bien que la paroi de ce microorganisme soit bien connue, nous avons entrepris la séparation et la purification de ce polysaccharide. Cette purification avait pour but, d'une part, de réaliser l'étude rhéologique du polymère de façon à pouvoir appréhender les problèmes liés au transfert de gaz dans les photobioréacteurs, fortement perturbé par les polysaccharides. D'autre part, comme nous le verrons au chapitre 5, l'exopolysaccharide, outre son rôle de protection biologique, apparaît comme étant un régulateur du rapport  $P/2e^-$  *in vivo*. En effet, lorsque la cellule possède un excès d'ATP, elle l'utilise à la synthèse d'exopolysaccharide, dont le pourcentage varie en fonction des conditions de culture. La modélisation biochimiquement structurée requiert la connaissance de la composition de l'exopolysaccharide, ainsi que le bilan énergétique de sa synthèse (ces aspects seront développés au paragraphe 5.2).

L'extraction et la purification du polysaccharide ont été réalisées par les méthodes présentées au chapitre 2, et détaillées dans le rapport de FILALI-MOUHIM (1991).

Les analyses élémentaires, et les dosages préliminaires ont permis d'établir qu'il s'agissait d'un polysaccharide sulfaté (5% d'ions sulfates en masse), et riche en acides uroniques. La formule brute moyenne obtenue est la suivante:



Des analyses plus poussées ont conduit à l'établissement de

la composition exacte du polysaccharide. Avec le glucose pris comme référence, les différents rapports molaires obtenus sont:

glucose:	2,0
galactose:	2,4
fucose:	0,7
rhamnose:	0,3
xylose:	1,3
acide glucuronique:	2,0
acide galacturonique:	1,0

Il existe également des traces de mannose, et deux oses non identifiés qui sont probablement un acide uronique, et un sucre O-méthylé, spécifique des polysides de procaryotes photosynthétiques. Ainsi la quantité totale d'acides uroniques dans le polysaccharide serait de 40%. On peut vérifier à l'aide des fractions molaires précédentes, et en prenant 5% de sulfate en poids, que l'on retrouve bien la formule brute expérimentale.

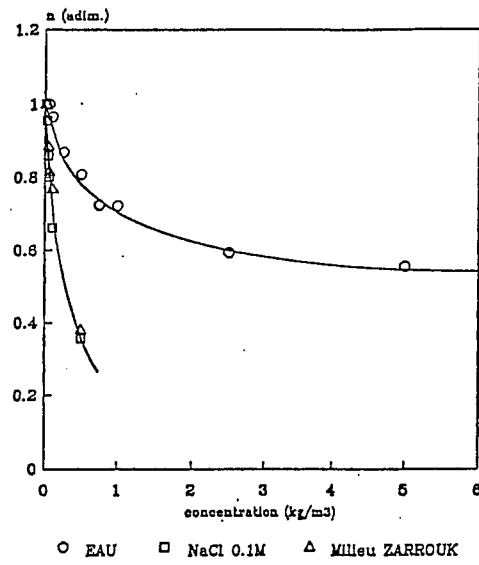
Des études préliminaires sur la structure du polysaccharide ont mis en évidence l'existence de liaisons 1-4 entre les glucoses. C'est probablement la principale liaison dans l'enchaînement du polysaccharide.

Notons que la présence de sulfates dans l'exopolysaccharide est seulement le deuxième exemple connu chez les cyanobactéries après *Synechocystis* (PANOFF et al. 1988). Jusqu'à présent, on pensait que c'était uniquement une caractéristique des algues eucaryotes.

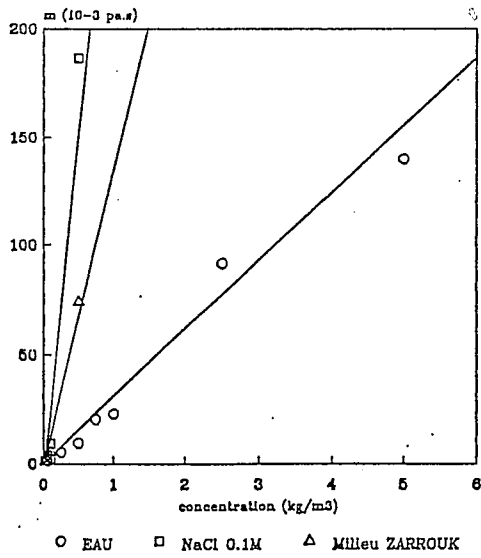
#### B - RHEOLOGIE:

L'étude rhéologique du polysaccharide purifié a été entreprise, en vue de connaître l'évolution de sa viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée. En effet, cette donnée est indispensable si l'on veut modéliser les problèmes d'agitation et de transfert de gaz dans les photobioréacteurs.

Indice de pseudoplasticité en fonction de la concentration en polysaccharide.



Indice de consistance en fonction de la concentration en polysaccharide.



Seuil d'écoulement en fonction de la concentration en polysaccharide.

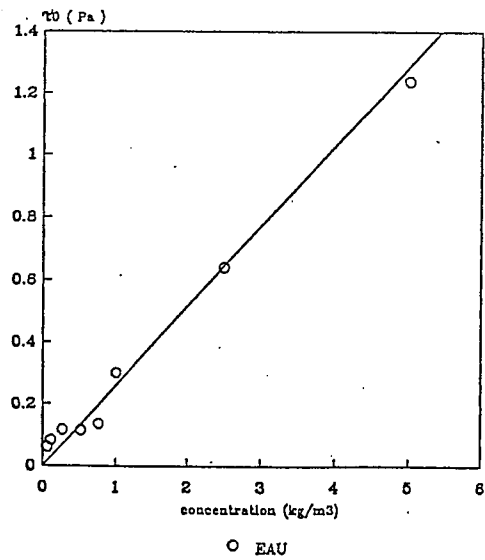


Figure 3.12: Caractéristiques rhéologiques de l'exopolysaccharide synthétisé par *S. platensis*.

Les résultats obtenus montrent un comportement non newtonien du polysaccharide de *S. platensis*, comme c'est le cas pour la plupart des polysaccharides bactériens. Néanmoins, il présente un caractère pseudoplastique extrêmement marqué dès les faibles concentrations, si on le compare par exemple au xanthane.

Le modèle théorique adopté pour rendre compte des propriétés pseudoplastiques de l'exopolysaccharide, est le modèle d'Herschel-Bulkley (MIDOUX, 1988), qui est un modèle en loi puissance avec un seuil d'écoulement. Il s'écrit de la façon suivante:

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3.3)$$

avec:

$$\eta = m \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$$

$\tau$  est la contrainte de cisaillement,  $\dot{\gamma}$  la vitesse de déformation, et  $\eta$  la viscosité.  $m$  et  $n$ , sont respectivement l'indice de consistance et l'indice de pseudoplasticité, caractéristiques du polysaccharide.  $\tau_0$  est le seuil d'écoulement.

La figure 3.12 a,b,c, montre l'évolution de ces 3 variables en fonction de la concentration en polysaccharide, dans différents milieux: eau, NaCl, milieu de culture. On constate que le caractère pseudoplastique est plus marqué en milieu salin ou dans le milieu de culture.

Pour des concentrations en polysaccharide inférieures à 1 kg/m<sup>3</sup>, on peut établir les corrélations suivantes pour les indices de consistance et de pseudoplasticité dans le milieu de culture:

$$m = 0,21 \cdot C_{PS}^{1,5} \quad (3.4)$$

$$n = 0,231 - 0,237 \cdot \ln(0,0217 + C_{PS}) \quad (3.5)$$

si  $C_{PS} > 0,02 \text{ kg/m}^3$

Ces équations permettent de calculer la viscosité moyenne si l'on connaît la vitesse de déformation, et par suite, la puissance dissipée dans les réacteurs, et les coefficients volumétriques de transfert, en fonction de l'agitation. La démarche est indiquée dans le paragraphe 4.4.1.

### C - CINÉTIQUE DE PRODUCTION DU POLYSACCHARIDE:

La cinétique de production de l'exopolysaccharide a été étudiée lors d'une culture en bioréacteur. Les résultats sont donnés et commentés au paragraphe 3.2.5. La suite de l'étude a montré que la fraction massique d'exopolysaccharide produite dans la masse totale était fonction des conditions de culture. D'une part, en conditions normales (uniquement en limitation par le transfert de lumière), la fraction massique varie en fonction de l'énergie absorbée dans le réacteur. D'autre part, lors de limitations minérales, *S. platensis* ne synthétise plus que des lipides et des sucres, notamment l'exopolysaccharide. Enfin, en limitation par la source de carbone, la synthèse de polysaccharide est totalement supprimée. Ces résultats seront explicités et détaillés lors de l'établissement d'un modèle biochimiquement structuré, au chapitre 5.

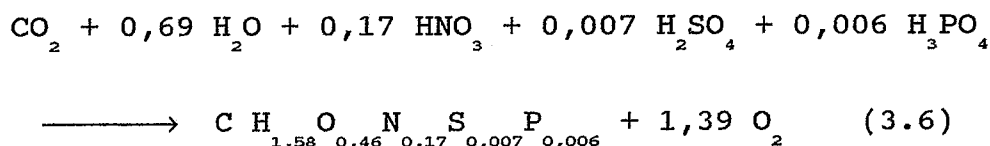
#### 3.1.7. Etablissement des stoechiométries:

Les équations stoechiométriques relatives à la croissance de la biomasse, sont à la base de la modélisation des procédés biologiques. Elles permettent de définir les rendements de transformation des substrats en biomasse et produits.

En ce qui concerne *S. platensis*, nous venons de voir que sa composition varie fortement en fonction des conditions de culture, même lorsque celles-ci sont optimales. C'est notamment le cas de la teneur en polysaccharide qui augmente en fonction de l'énergie lumineuse absorbée dans le réacteur.

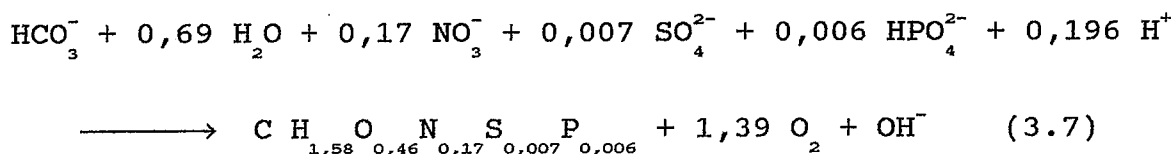
Il apparait donc impossible d'établir une équation stoechiométrique générale, valable lors de conditions optimales de culture. Nous allons néanmoins donner ici une équation, d'une part à titre d'exemple, et d'autre part, parce qu'elle est valable pour les faibles éclaircissements, qui sont des conditions souvent rencontrées dans nos expériences (c'est le cas de toutes les cultures en photobioréacteur parallélépipédique). Une étude stoechiométrique complète sera entreprise au chapitre 5, et nous reviendrons alors sur les données que nous allons proposer maintenant.

Sur l'ensemble des cultures réalisées à faible flux lumineux, c'est-à-dire entre 5 et 20 W/m<sup>2</sup>, nous avons pu obtenir expérimentalement, par des analyses élémentaires, une formule brute moyenne de la biomasse, cultivée dans ces conditions (on trouve alors 10% d'exopolysaccharide). Celle-ci a permis d'établir l'équation stoechiométrique suivante:



La masse C-molaire de la biomasse est égale à 23,73 kg/Ckmole.

Si l'on tient compte de l'état d'ionisation des espèces en solution, on peut obtenir une nouvelle équation au moyen d'un bilan d'oxydo-réduction:



On remarque que la réaction de photosynthèse a tendance à alcaliniser le milieu, en effet, il y a production de 1,196 mole d'ion OH<sup>-</sup> par mole de carbone incorporé.



Cette équation permet de définir les rendements de conversion pour chaque ion impliqué dans la photosynthèse. Ces rendements seront utiles pour la modélisation des cultures en limitation minérales. Toutes ces cultures ont en effet été réalisées dans des conditions d'éclairement telles, que l'équation 3.7 s'applique. Dans le paragraphe 3.2, nous nous attacherons à comparer les rendements de conversion expérimentaux obtenus, avec les rendements théoriques donnés par l'équation 3.7. Si X dénote la biomasse, ceux-ci sont égaux à:

- Rendement de conversion des bicarbonates en biomasse:

$$Y_{\text{HCO}_3^-/X} = 2,57 \text{ kg HCO}_3^- / \text{kg de biomasse.}$$

- Rendement de conversion des nitrates en biomasse:

$$Y_{\text{NO}_3^-/X} = 0,44 \text{ kg NO}_3^- / \text{kg de biomasse.}$$

- Rendement de conversion des sulfates en biomasse:

$$Y_{\text{SO}_4^{2-}/X} = 0,028 \text{ kg SO}_4^{2-} / \text{kg de biomasse.}$$

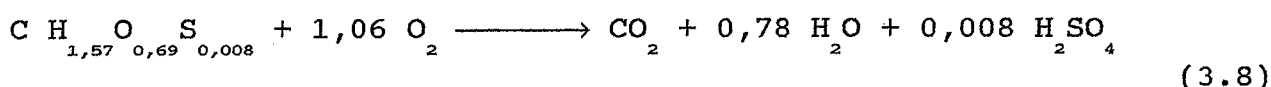
- Rendement de conversion des phosphates en biomasse:

$$Y_{\text{HPO}_4^{2-}/X} = 0,026 \text{ kg HPO}_4^{2-} / \text{kg de biomasse.}$$

Lors des cultures en bioréacteur cylindrique, les énergies mises en jeu étaient toujours plus importantes, ainsi, l'équation 3.7 n'est plus valable. Pour ces raisons, nous nous limiterons, au paragraphe 3.2, lors de la discussion des cultures en masse, à donner les formules brutes expérimentales lorsqu'elles ont été déterminées. Elles permettront de valider la modélisation biochimiquement structurée, qui est une façon de tenir compte des modifications de stoechiométries, et qui sera développée au chapitre 5.

En ce qui concerne la respiration à l'obscurité, on peut établir par contre, une équation stoechiométrique unique. Comme

nous l'avons déjà dit, les réserves carbonées chez *S. platensis* sont constituées d'une moitié de glycogène sulfaté, et d'une moitié de polyhydroxybutyrate (SEKHARAM *et al.* 1989; VINCENZINI *et al.* 1990). La formule brute de la biomasse consommée permet d'écrire l'équation stoechiométrique suivante:



A 36°C, si l'on reprend la vitesse de respiration donnée au paragraphe 3.1.3, l'équation 3.8 permet de calculer que la perte de masse par respiration à l'obscurité sera de  $9 \cdot 10^{-4}$  kg.kg biomasse<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Ainsi, si la concentration en biomasse dans le réacteur est de 1,1 kg/m<sup>3</sup>, la vitesse de décroissance de la biomasse sera  $v_R = 1 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>. Comme les réserves identifiés constituent environ 1% de la biomasse, les calculs précédents montrent que le temps théorique pour épuiser la totalité des réserves à 36°C, est d'environ 12 heures. Ces données devront être confrontées aux résultats expérimentaux discutés au paragraphe suivant.

### 3.2. RESULTATS CONCERNANT LA CULTURE EN MASSE DE SPIRULINA PLATENSIS.

Toutes les cultures en photobioréacteurs, dont nous allons maintenant discuter les résultats ont été réalisées dans les conditions optimales déterminées lors des expériences précédentes, c'est-à-dire à pH 9,5, et à 36°C. L'agitation dans les fioles de Roux était réalisée par un barbotage d'air enrichi en CO<sub>2</sub> (≈0,5%), au débit de  $1,5 \cdot 10^{-5}$  Nm<sup>3</sup>/s (0,2 v.v.m.), et par un barreau à entraînement magnétique.

Dans la cuve agitée, elle se faisait au moyen de deux turbines Rushton, à la vitesse de 300 t/mn, excepté pour certaines cultures pour lesquelles la vitesse d'agitation sera précisée. L'aération se faisait par un barbotage d'air au débit de  $1,8 \cdot 10^{-5}$

Nm<sup>3</sup>/s (0,2 v.v.m.).

### 3.2.1. Aspects liés à la limitation par la lumière et à la respiration à l'obscurité:

La transposition à l'étude des photobioréacteurs, des données obtenues sur la photosynthèse à l'échelle cellulaire, est relativement délicate. En effet, lors de cultures en masse, les cellules croissent dans un milieu anisotrope, puisque l'énergie lumineuse disponible est différente en chaque point du réacteur. Elles ont donc un temps de passage à la lumière et à l'obscurité dont la période dépend de l'agitation et de la concentration en biomasse. Les problèmes physiques et biologiques que soulèvent ces observations, notamment pour la modélisation mathématique, seront largement développés au chapitre 5. Nous nous limiterons donc, dans la suite de ce paragraphe, à discuter les aspects biologiques, les résultats étant repris plus loin en vue de leur modélisation, notamment pour la détermination des rendements de conversion de l'énergie en fonction de l'énergie absorbée dans le réacteur.

#### A - CULTURES EN PHOTOBIOREACTEUR. INFLUENCE DE LA VITESSE D'ABSORPTION DE L'ENERGIE LUMINEUSE:

Plusieurs cultures en cuve agitée aérée ont été réalisées en faisant varier uniquement l'énergie lumineuse incidente. Lors de ces expériences, les variables mesurées étaient la biomasse, la fraction massique en exopolysaccharide, et la consommation en bicarbonates.

Le but de ces expériences était de vérifier le comportement de *S. platensis* lorsqu'on la cultive en conditions optimales en photobioréacteur. Il était surtout de déterminer les rendements de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse, ainsi que la fraction massique d'exopolysaccharide synthétisé, dans des

conditions différentes de flux lumineux incident.

Précisons que dans la plupart des cas, les flux incidents n'étaient pas homogènes, et lorsque nous indiquerons des valeurs de flux dans la suite de ce paragraphe, il s'agira de valeurs moyennes indicatives. Lors de la modélisation, et du maillage des bioréacteurs en intensité lumineuse, les conditions aux limites concernant l'énergie lumineuse incidente sont données par 80 valeurs à la surface du réacteur. D'autre part, nous verrons au chapitre 5 qu'il est préférable de raisonner à partir de la vitesse volumétrique d'absorption de l'énergie dans le réacteur, plutôt qu'à partir des flux incidents.

Malgré ces restrictions, on peut considérer que nous avons fait varier le flux incident entre 20 et 200 W/m<sup>2</sup>, lors de ces cultures.

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 3.13-3.15, ils permettent de dégager un commentaire général sur la croissance des microorganismes photosynthétiques en bioréacteur. En effet, on constate nettement deux phases sur les courbes de croissance. Une première phase courte, où la croissance est exponentielle, et une deuxième phase où la croissance devient linéaire.

La phase exponentielle correspond à une croissance pour laquelle l'ensemble du réacteur est éclairé. Bien que cet éclairage ne soit pas homogène, toutes les cellules disposent de plus ou moins de lumière, et la vitesse de croissance exponentielle est la moyenne de toutes les vitesses exponentielles, en chaque point du réacteur. Lorsque la concentration cellulaire augmente, une partie du réacteur devient obscure, et bien que la croissance demeure exponentielle dans le volume éclairé, la croissance globale devient linéaire, car une partie du réacteur ne participe plus à la réaction. Autrement dit, la croissance linéaire traduit le fait que la quantité de pigments éclairés dans le réacteur devient constante au cours du temps.

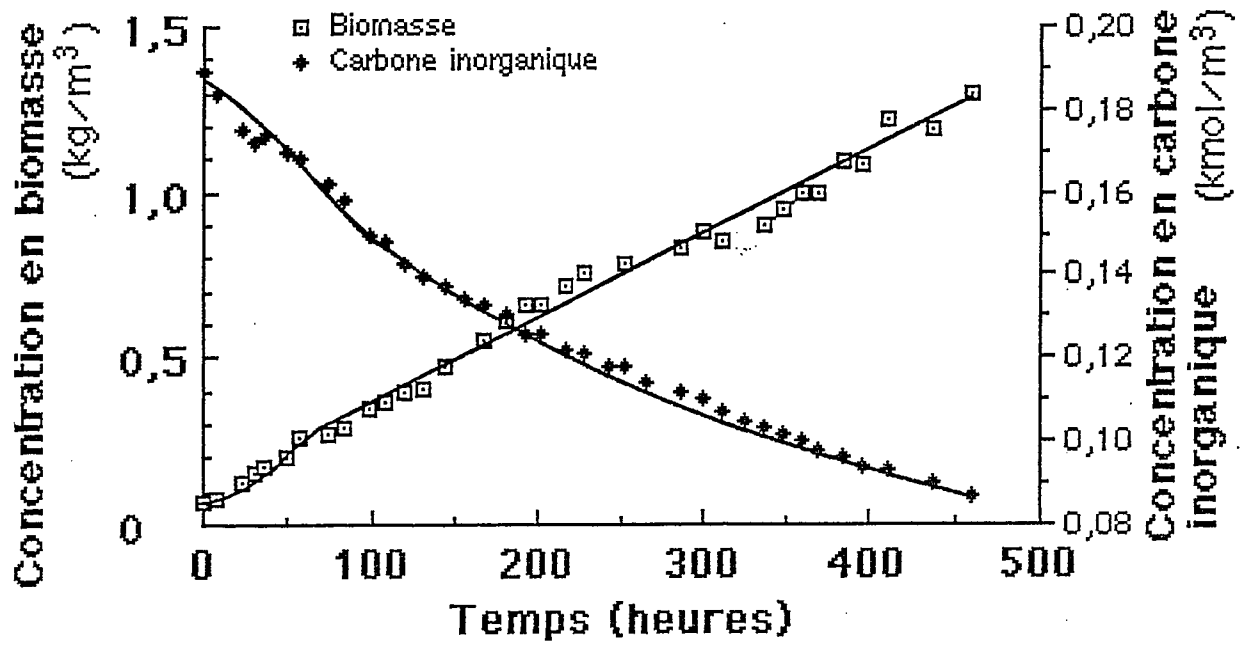


Figure 3.13: Culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique avec un flux lumineux de  $20 \text{ W}/\text{m}^2$ .

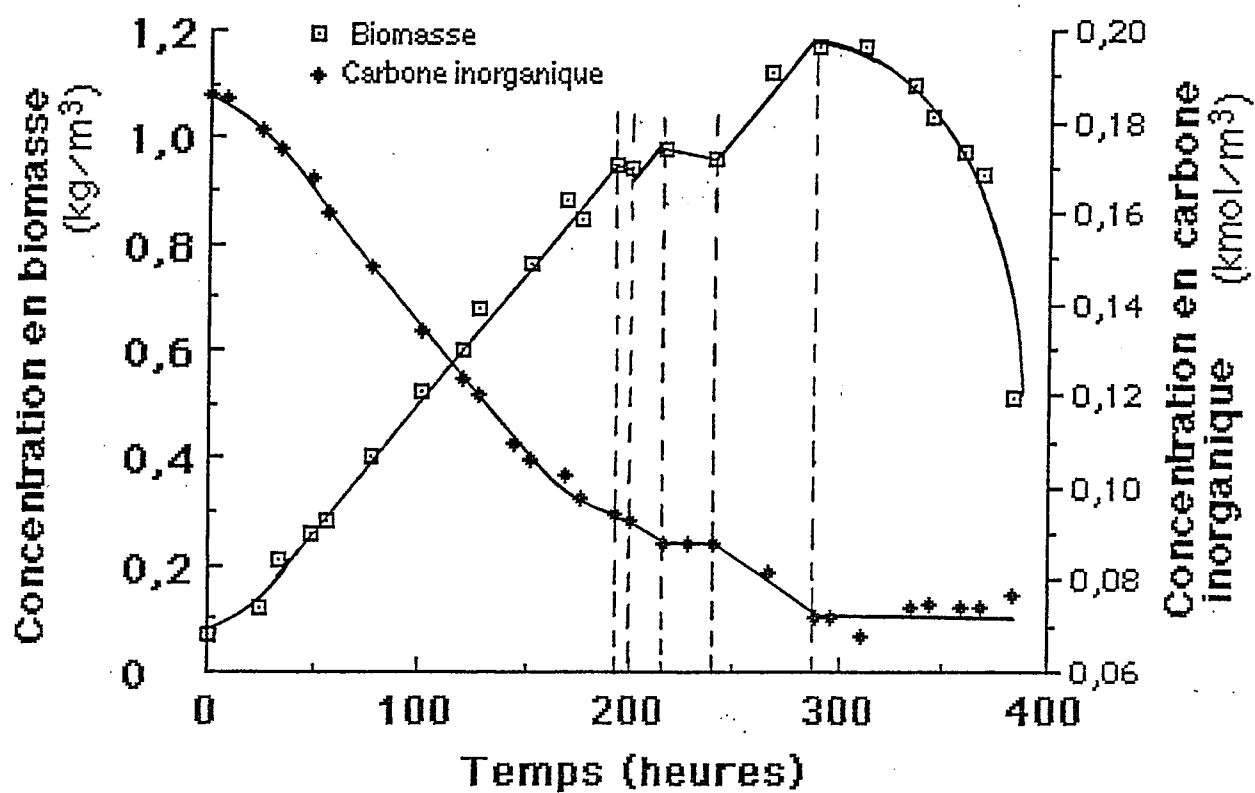
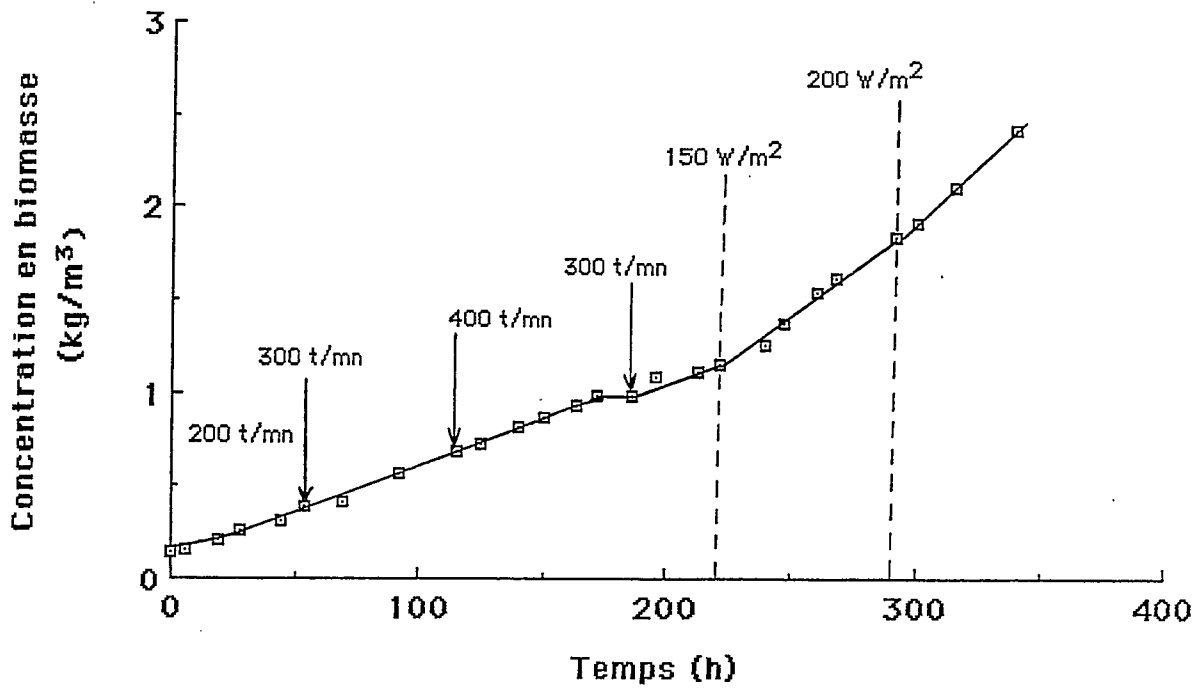


Figure 3.14: Culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique avec un flux lumineux de  $50 \text{ W/m}^2$ . Effet de périodes d'obscurité symbolisées par les traits pointillés.



**Figure 3.15:** Culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique. Les flux lumineux incidents ont été progressivement augmentés, de 70 à 150 puis 200 W/m<sup>2</sup>. Les augmentations sont figurées par les traits verticaux.

Lors de la première phase, l'agitation a été augmentée régulièrement de 200 à 400 t/mn, ce qui est représenté sur la courbe.

Ces remarques sont importantes car elles sont à la base de la démarche adoptée en modélisation, dans le chapitre 5. Elles permettront également de comprendre ce qui se passe lors de limitations minérales, où l'on voit se produire le mécanisme inverse, puisque le volume éclairé augmente par consommation des pigments.

La figure 3.13 montre une culture réalisée à environ  $20 \text{ W/m}^2$ , la vitesse linéaire de croissance est de  $2,57 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Pendant cette culture qui fut la première réalisée, la vitesse d'agitation était de  $150 \text{ t/mn}$ , mais cette valeur semble un peu faible car à forte concentration, des cellules stagnent à la lumière, et il apparaît de la lyse cellulaire. Par la suite, nous avons adopté une vitesse d'agitation de  $300 \text{ t/mn}$ .

La figure 3.14 montre une culture à  $50 \text{ W/m}^2$ . La vitesse de croissance linéaire est de  $4,9 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Nous avons par ailleurs vérifié le comportement de *S. platensis* à l'obscurité, sur des phases sombres de plus en plus longues. Les pertes de masse mesurées lors de phases obscures de 8 puis de 24 heures sont parfaitement conformes aux vitesses théoriques données dans le paragraphe 3.2.6. On peut donc en déduire que l'équation 3.8 s'applique et que les mesures de respiration faites au niveau cellulaire sont transposables à l'échelle du photoréacteur. Le fait nouveau est qu'il apparaît possible de maintenir *S. platensis* au moins 24 heures à l'obscurité et à  $36^\circ\text{C}$ , sans dommage apparent, puisqu'on retrouve ensuite la même vitesse de croissance linéaire. Par contre, comme on peut le constater sur la fin de la culture, une obscurité prolongée conduit à une destruction rapide et irréversible de la culture en 80 heures.

Sur la figure 3.15, on voit les résultats d'une culture au cours de laquelle on a fait varier la lumière incidente, ainsi que l'agitation. Lors de la première phase où le flux incident était de  $70 \text{ W/m}^2$ , l'agitation a été augmentée progressivement de  $150$  à



400 t/mn. Les mesures ont permis de confirmer que l'agitation n'avait aucun effet sur la vitesse de croissance jusqu'à 300 t/mn, mais qu'à partir de 400 t/mn, il se produit un arrêt de croissance après une cinquantaine d'heures. Ce fait avait déjà été constaté par ailleurs, sur une autre culture. Lorsque l'agitation est remise à 300 t/mn, la croissance reprend immédiatement. Le flux incident est alors augmenté à 150 puis 200 W/m<sup>2</sup>.

Les vitesses linéaires de croissance successivement obtenues sont  $5,0 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>,  $9,8 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>, et  $1,1 \cdot 10^{-2}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>.

La première remarque que l'on peut faire à la vue de l'ensemble des résultats est que les vitesses de croissance augmentent moins vite que le flux incident.

Ce résultat était prévisible car lorsque l'énergie lumineuse absorbée augmente, le rendement quantique moyen dans le réacteur diminue. Ces commentaires généraux seront quantifiés dans le chapitre 5.

#### B - CULTURES EN PHOTOBIOREACTEUR. INFLUENCE DE LA QUALITE DE LA LUMIERE:

Pour vérifier les informations obtenues avec le spectre d'action de la photosynthèse, il était intéressant de cultiver *S. platensis* sous différentes qualités de lumière, notamment en lumière orange. En effet, au regard des informations obtenues au paragraphe 3.1.2, il semble que la lumière orange permette la croissance de *S. platensis* avec un excellent rendement de conversion, puisque les photons bleus sont beaucoup trop énergétiques pour la photosynthèse, et voient les trois cinquièmes de leur énergie dissipée sous forme de chaleur. Mais il ne faut pas, dans cette perspective, que le rendement quantique soit diminué, un des photosystèmes étant favorisé par rapport à l'autre (le photosystème II).

Nous avons donc entrepris une expérience préliminaire dans

des petites fioles de Roux, en suivant la croissance de *S. platensis* sous 4 lumières différentes.

Il s'agissait de lumière bleue, orange, magenta, et blanche, dont les caractéristiques spectrales ont été données au chapitre 2. La lumière blanche servait de contrôle. Les fioles étaient disposées de telle façon que l'énergie envoyée dans chacun des domaines sélectionnés du spectre visible correspondait exactement à la fraction d'énergie de la lumière blanche témoin dans ce domaine (on a pour cela réglé les flux incidents en tenant compte du rendement de transmission des filtres utilisés).

Les valeurs des flux incidents étaient les suivantes:

lumière blanche: 6,6 W/m<sup>2</sup>

lumière magenta: 5,1 W/m<sup>2</sup>

lumière orange: 4,7 W/m<sup>2</sup>

lumière bleue: 1,5 W/m<sup>2</sup>.

La figure 3.16 montre les résultats obtenus. On observe toujours une courte phase exponentielle, puis une croissance linéaire pour les quatre types de lumière.

Comme nous l'avons déjà dit, la photosynthèse est basée sur l'énergie des photons rouges (680 nm), et lorsqu'on envoie des photons verts ou bleus, on diminue le rendement de conversion de l'énergie absorbée, puisque l'excédent d'énergie des photons se transforme en chaleur ou en fluorescence. Ainsi, à partir de l'analyse des caractéristiques spectrales des sources lumineuses, on peut déterminer les rendements uniquement dus à la qualité de la lumière. Ils sont respectivement de 0,75 pour la lumière blanche et magenta, 0,89 pour la lumière orange, et 0,59 pour la lumière bleue. Si l'on suppose que l'énergie absorbée est proportionnelle à l'énergie incidente et que les autres rendements qui interviennent dans le processus de photosynthèse restent constants, notamment le rendement quantique, on peut ramener les vitesses de croissance obtenues à énergie absorbée égale, puis à nombre de photons absorbés égal. Ces résultats sont donnés dans le tableau 3.4.

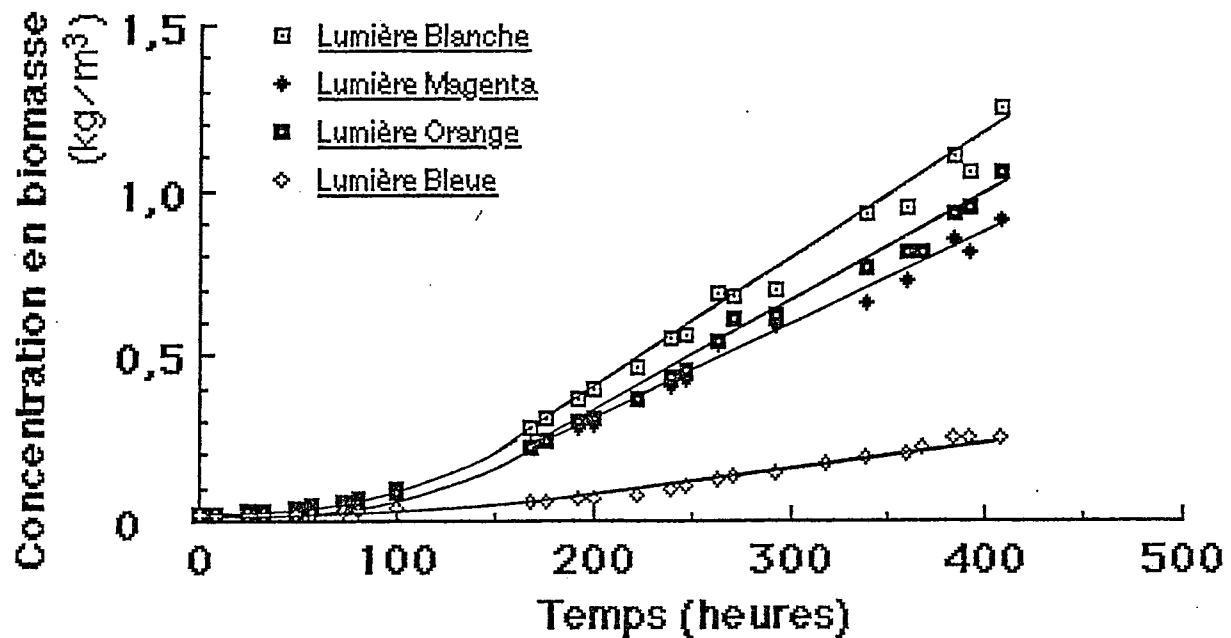


Figure 3.16: Courbes de croissance de *S. platensis* cultivée en fiole de Roux sous différentes qualités de lumières incidentes. Les valeurs des flux lumineux sont les suivantes:

- lumière blanche:  $6,6 \text{ W/m}^2$
- lumière magenta:  $5,1 \text{ W/m}^2$
- lumière orange:  $4,7 \text{ W/m}^2$
- lumière bleue:  $1,5 \text{ W/m}^2$ .

Vitesse de croissance observée (kg.m <sup>-3</sup> .h <sup>-1</sup> )	Vitesse rapportée à énergie absorbée égale.(kg.m <sup>-3</sup> .h <sup>-1</sup> )	Vitesse rapportée à nombre de photons égal.(kg.m <sup>-3</sup> .h <sup>-1</sup> )
Lumière blanche: 3,70.10 <sup>-3</sup>	3,70.10 <sup>-3</sup>	4,40.10 <sup>-3</sup>
Lumière magenta: 2,85.10 <sup>-3</sup>	3,70.10 <sup>-3</sup>	4,40.10 <sup>-3</sup>
Lumière orange: 3,20.10 <sup>-3</sup>	4,50.10 <sup>-3</sup>	4,50.10 <sup>-3</sup>
Lumière bleue: 8,0.10 <sup>-4</sup>	3,50.10 <sup>-3</sup>	5,30.10 <sup>-3</sup>

**Tableau 3.4:** Vitesses de croissance linéaires obtenues avec différentes qualités de lumière incidente. Résultats rapportés à quantité d'énergie ou de photons absorbés constants.

Les résultats rapportés à énergie absorbée égale montrent qu'il n'y a aucune différence entre les vitesses de croissance en lumière blanche ou magenta. Ce résultat est logique puisque la lumière magenta est de la lumière blanche de laquelle on a enlevé la radiation verte très peu absorbée. Ces deux lumières présentent d'autre part le même rendement vis à vis de la conversion des photons.

En ce qui concerne la lumière orange, le résultat est aussi attendu, puisque la vitesse corrigée est plus forte que celle du témoin en lumière blanche. Comme l'augmentation des vitesses de croissance est exactement dans le rapport 0,89 / 0,75, on en déduit qu'il n'y a eu aucune modification du rendement quantique en lumière orange, et que l'augmentation de vitesse est uniquement due à une moindre perte énergétique sur les photons absorbés.

La constance du rendement quantique est vérifiée quand on

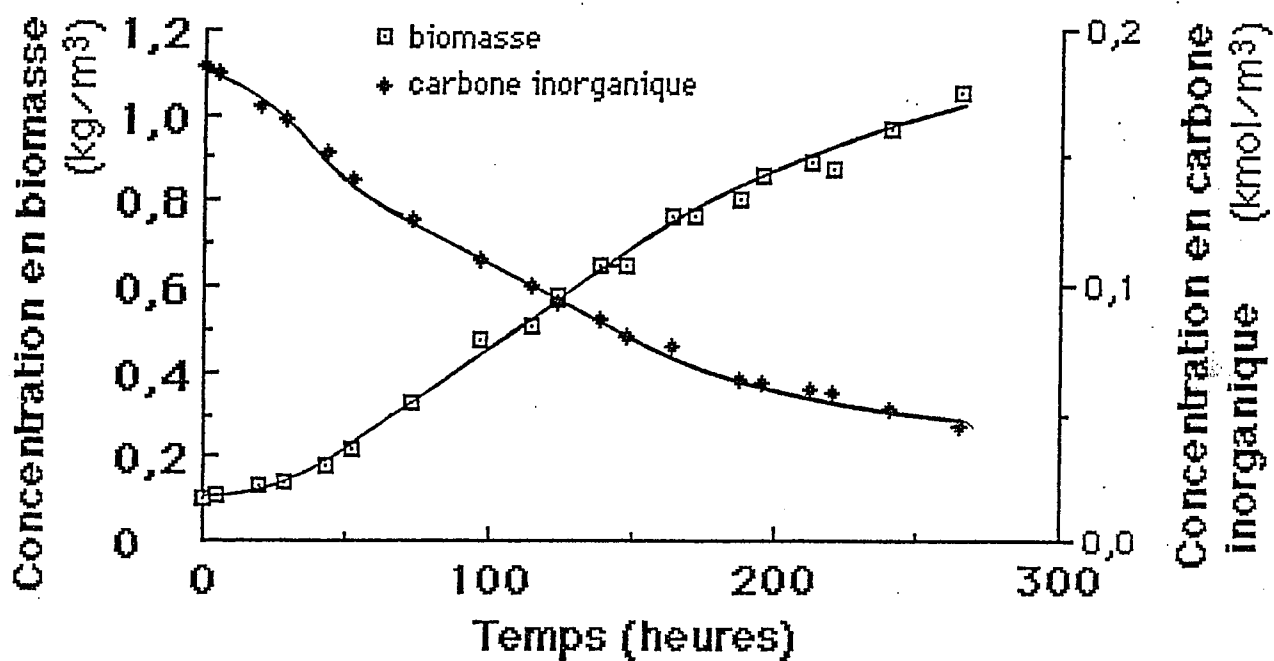


Figure 3.17: Culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique éclairé en lumière orange par un flux lumineux de  $50 \text{ W/m}^2$ .

ramène les vitesses au nombre de photons absorbés. On a alors les mêmes vitesses pour les trois lumières, blanche, magenta, et orange.

Le résultat surprenant vient de la croissance en lumière bleue puisqu'elle donne le meilleur résultat relatif, par rapport au nombre de photons absorbés. La vitesse obtenue est donc fortement surestimée, car on attendait là une diminution du rendement quantique puisqu'il n'existe pas de mécanisme pouvant dévier les excitons du photosystème I vers le photosystème II. L'écart de vitesse par rapport aux autres lumières est probablement dû à une évaporation plus forte du milieu, car le rendement du filtre bleu étant faible, la fiole était très proche de la source lumineuse. Néanmoins, il ne semble pas possible d'expliquer que la vitesse de croissance soit égale aux autres, c'est-à-dire que le rendement quantique ne soit pas modifié.

Après cette expérience préliminaire, nous avons réalisé une culture en cuve agitée, et en lumière orange, à plus fort éclairement. Le flux incident était de  $50 \text{ W/m}^2$  en lumière orange. Les résultats sont données sur la figure 3.17. On constate sur la courbe de croissance que l'on n'obtient jamais réellement une croissance linéaire, mais une courbe qui s'infléchit progressivement. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le rendement quantique moyen dans le bioréacteur diminue au cours du temps. Cela voudrait dire que si l'utilisation de la lumière orange est énergétiquement plus intéressante pendant les 150 premières heures où la vitesse maximale atteinte vaut  $4,8 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ , ce n'est plus le cas après. Le mécanisme de compensation décrit au paragraphe 3.1.2 ne serait donc pas fonctionnel sur une longue durée.

Ces données ne pourront être précisées que lors du calcul des rendements de conversion, au chapitre 5.

### 3.2.2. Limitation par la concentration en nitrates:

Les études déjà réalisées sur la cyanobactérie *Anacystis nidulans* (ALLEN et SMITH, 1969), montraient que la croissance stoppait lors d'une carence en nitrate, les phycocyanines (le pigment principal du photosystème II) étaient dégradées, alors que la teneur en chlorophylles semblait demeurer constante (LAU et al. 1977; YAMANAKA et GLAZER, 1980). Parallèlement, on constatait une accumulation de glycogène intracellulaire (LEHMAN et WOBBER, 1976).

Ces faits sont réversibles si l'on rajoute des nitrates dans le milieu des cellules stressées. Ces observations ont été confirmées chez *Synechocystis* (ALLEN et HUTCHISON, 1980), et *Agmenellum quadruplicatum* (STEVENS et al. 1981). ALLEN et al. (1990) ont récemment suggéré que la diminution de la vitesse de photosynthèse pourrait être due à une inactivation du photosystème II.

Il semble que *S. platensis* réagisse aussi de la même façon lorsqu'elle se trouve en limitation par la source d'azote (BOUSSIBA et RICHMOND, 1980), bien qu'une accumulation de glycogène n'ait jamais été démontrée.

Nous avons réalisé pour notre part deux cultures en photobioréacteur parallélépipédique, et une culture en cuve agitée, en limitation par les nitrates. Le but de ces expériences était de vérifier les comportements qui viennent d'être énoncés, de valider l'équation stoechiométrique 3.7, et d'obtenir les données de base pour la modélisation mathématique de la limitation par la source d'azote, notamment la détermination de constantes cinétiques propres à *S. platensis*.

Les conditions d'éclairement étaient différentes pour les 3 cultures. Le flux incident était de 19 W/m<sup>2</sup> pour la première culture en réacteur parallélépipédique, de 8 puis 12 W/m<sup>2</sup> après 144 heures pour la deuxième. Il était de 90 W/m<sup>2</sup> pour la culture en cuve agitée.

Les résultats obtenus avec CLUZEL (1990) sont représentés

respectivement sur les figures 3.18-3.20. Les vitesses linéaires de croissance sont respectivement de  $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  et de  $1,65 \cdot 10^{-3}$  puis  $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  pour les cultures en réacteur parallélépipédique, et de  $7,1 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  pour la culture en cuve agitée.

On constate que le comportement de *S. platensis* en limitation par les nitrates est similaire au cours des 3 cultures. Dès que les nitrates sont épuisés, la vitesse de croissance des protéines, ainsi que celle des chlorophylles a devient nulle et atteint un plateau. Les phycocyanines sont dégradées à une vitesse qui semble proche de leur vitesse de synthèse. Comme les protéines totales restent stables, cela veut dire que les phycocyanines servent de réserves d'azote pour la synthèse d'autres protéines. L'augmentation de biomasse après apparition de la limitation est probablement due à une accumulation de glycogène sulfaté intracellulaire, bien que les cellules ne se divisent plus (LEHMAN et WOBER, 1976; ALLEN et HUTCHISON, 1980; STEVENS et al. 1981; SEKHARAM et al. 1989; ALLEN et al. 1990). D'autre part, cette accumulation intracellulaire s'accompagne d'une excrétion importante d'exopolysaccharide (figure 3.20b).

Si l'on rajoute des nitrates dans le milieu, les phycocyanines sont très rapidement synthétisées jusqu'à retrouver leur teneur normale dans les cellules. Cette vitesse de synthèse rapide est possible car les cellules utilisent le glycogène accumulé comme source de carbone, la concentration de ce dernier décroissant rapidement.

Comme nous l'avons fait remarquer au paragraphe 3.1.2, le fait que la photosynthèse soit diminuée pour chaque cellule, n'implique pas que la vitesse linéaire de synthèse dans le réacteur soit également atteinte. En effet, la vitesse linéaire correspond à une quantité de pigments éclairés constante au cours du temps dans le réacteur. Ceci reste vrai même lorsque la concentration en phycocyanines décroît, simplement, le volume éclairé augmente alors. Comme la vitesse de photosynthèse ramenée



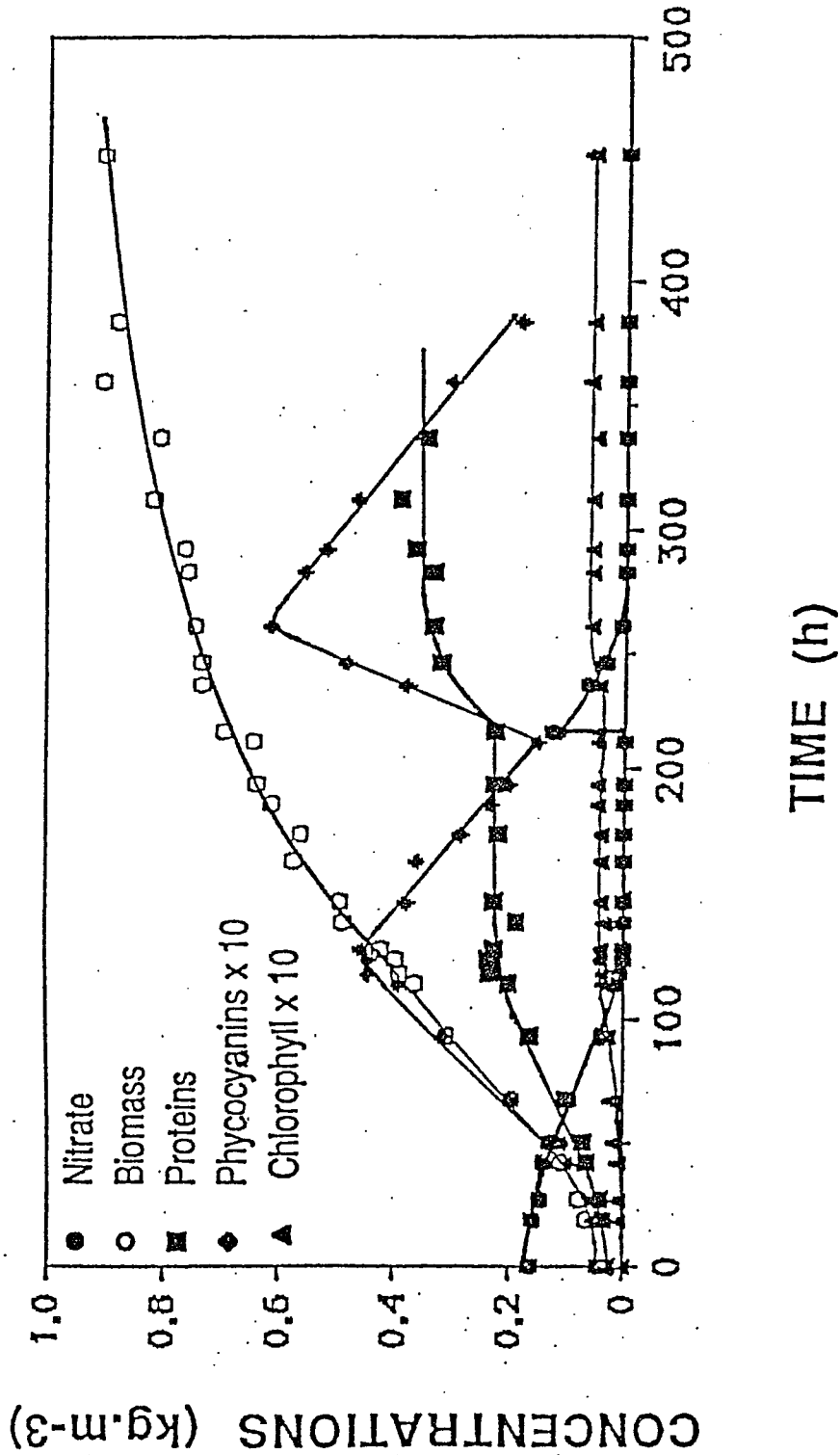


Figure 3.18: Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en nitrate (photobioréacteur parallélépipédique, flux lumineux de  $19 \text{ W/m}^2$ ). Des nitrates ont été rajoutés dans le milieu après 215 heures de culture.

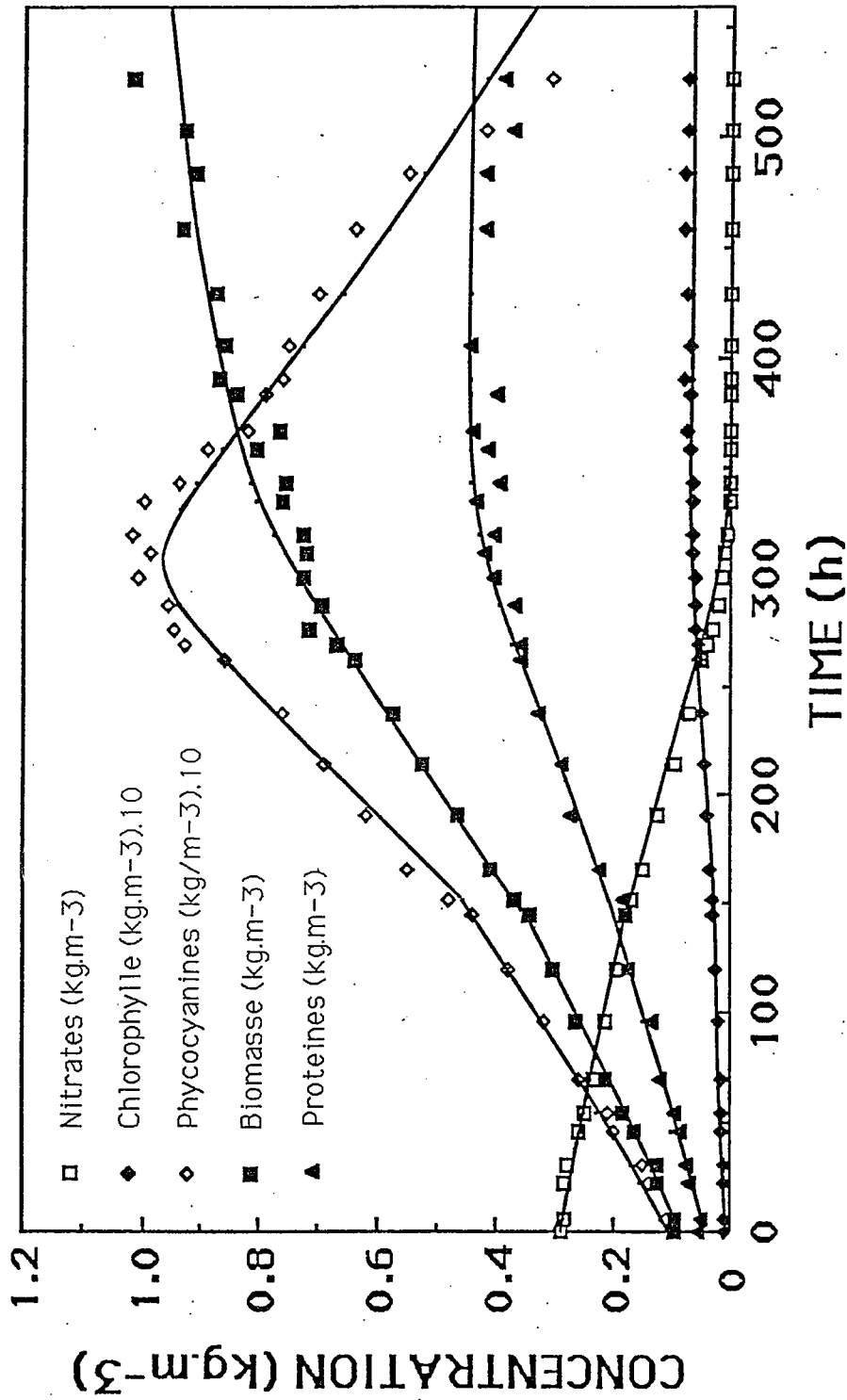


Figure 3.19: Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en nitrate (photobioréacteur parallélépipédique, flux lumineux de 8 W/m<sup>2</sup>, puis 12 W/m<sup>2</sup> après 144 heures).

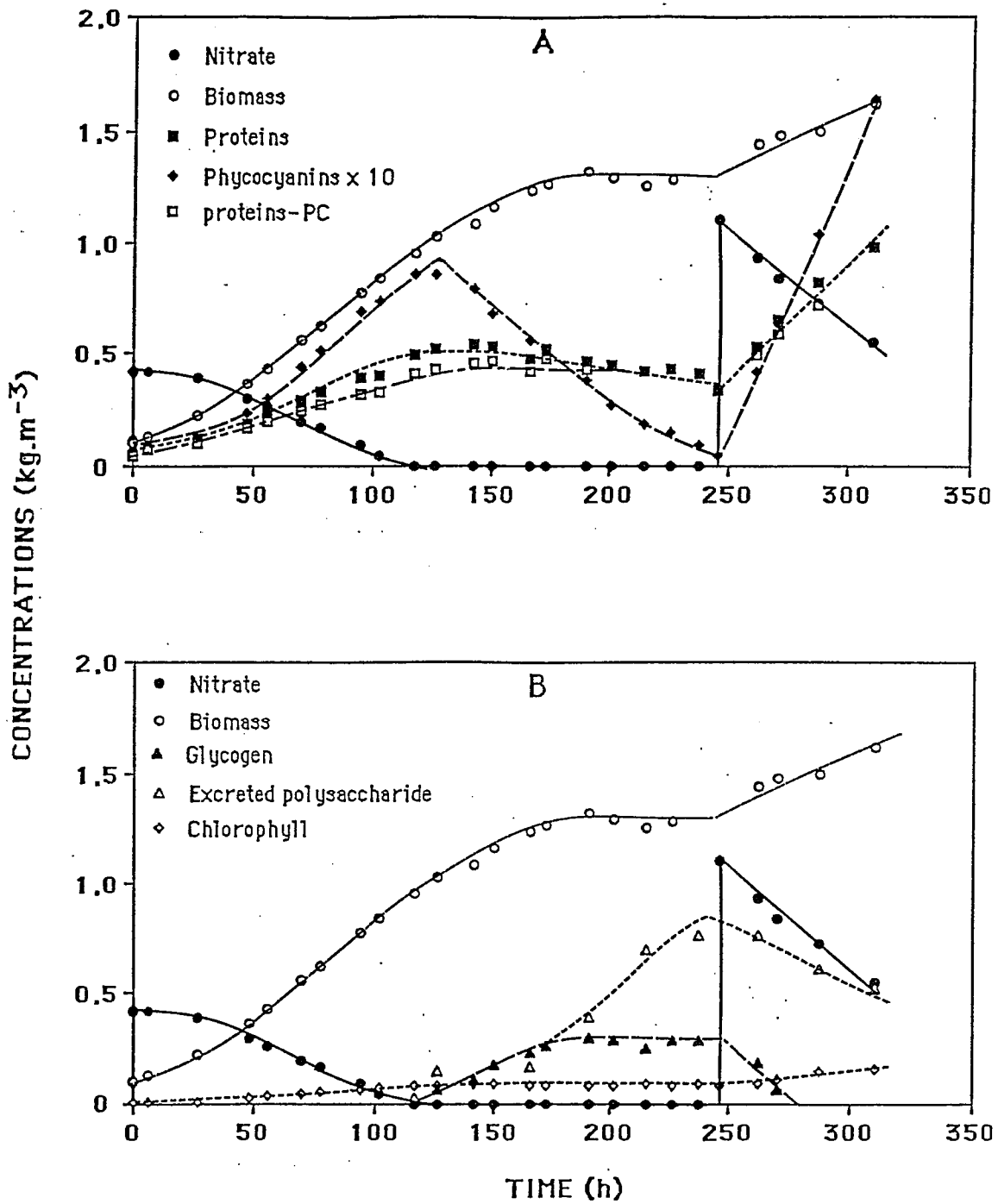
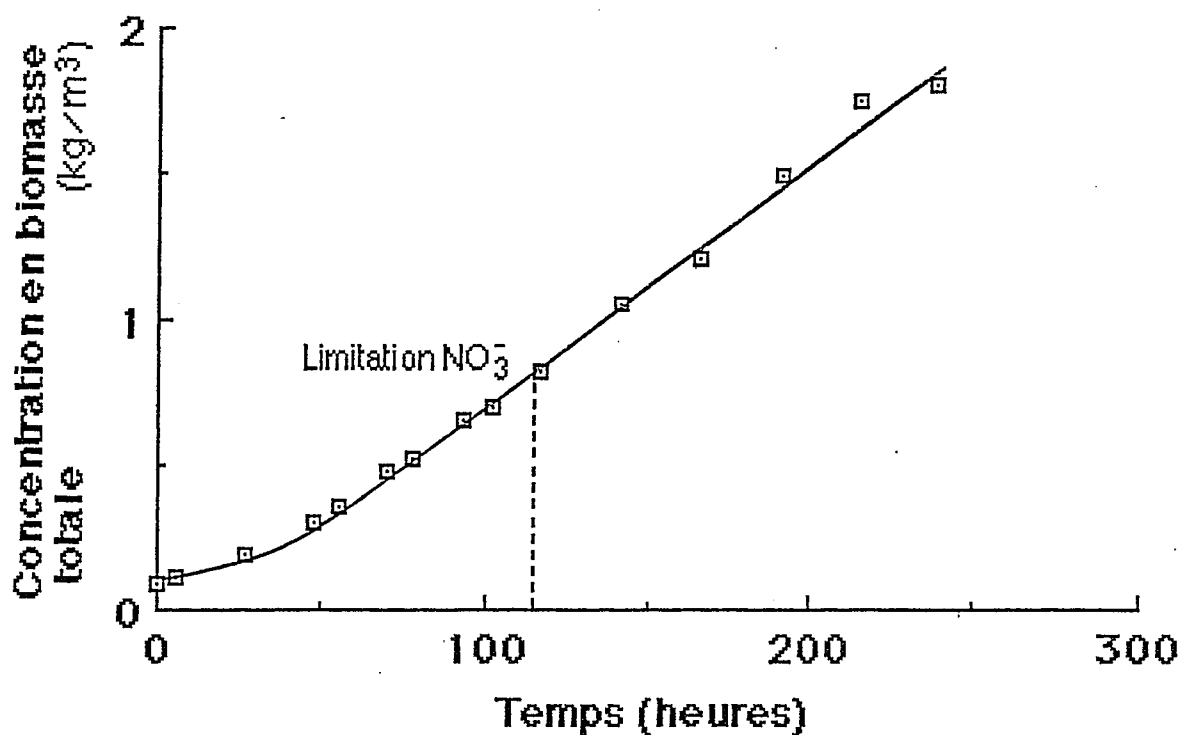


Figure 3.20a et b: Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en nitrate (photobioréacteur cylindrique, flux lumineux de 90 W/m<sup>2</sup>). Des nitrates ont été rajoutés dans le milieu après 245 heures de culture.



**Figure 3.20c:** Evolution de la concentration en biomasse totale (biomasse et polysaccharide excrété) lors d'une culture en discontinu en condition de limitation par la concentration en nitrate (photobioréacteur cylindrique, flux lumineux de 90 W/m<sup>2</sup>). Cette courbe correspond aux 245 premières heures, avant le rajout de nitrates dans le milieu.

à la quantité de phycocyanines demeure inchangée, quelles que soient les teneurs cellulaires, la vitesse linéaire de synthèse de la biomasse dans le réacteur n'est pas modifiée par la limitation en nitrates.

Cependant, la biomasse formée change singulièrement de nature: il y a production uniquement de lipides, de glycogène et d'exopolysaccharide, comme le montre la figure 3.20c où l'on observe la vitesse linéaire de synthèse de la masse totale dans le réacteur. On remarque bien qu'après la limitation, la synthèse de polysides se poursuit à la même vitesse.

La modélisation mathématique des procédés biologiques requiert que l'ensemble des molécules qui interviennent dans le processus étudié soient identifiées et suivies au cours de la croissance.

Pour vérifier cela, nous pouvons calculer le pourcentage de récupération de l'azote dans la biomasse (PRN) de deux façons. La première consiste à utiliser la formule brute de la biomasse donnée dans l'équation 3.7. La fraction massique en azote contenue dans cette biomasse est de 0,01. Comme la fraction d'azote contenue dans les nitrates est 0,226, le pourcentage de récupération se calcule pour chaque couple de points par:

$$\text{PRN} = \frac{0,01.C_x}{0,226.C_N}$$

où  $C_x$  et  $C_N$  sont les concentrations en biomasse et en nitrates.

On peut également procéder par classes de molécules. Sachant que la fraction d'azote est de 0,16 dans les protéines, 0,063 dans les chlorophylles a, et 0,168 dans les acides nucléiques, on a alors l'expression suivante:

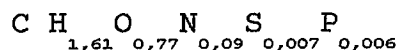
$$\text{PRN} = \frac{0,16.C_P + 0,063.C_{CH} + 0,007.C_x}{0,226.C_N}$$

où  $C_P$  et  $C_{CH}$  sont les concentrations en protéines et en chlorophylles a.

Ces deux formules conduisent dans notre cas à des résultats identiques. On obtient des pourcentages de récupération de 96% pour les deux cultures en réacteur parallélépipédique, et de 90% pour la culture en cuve agitée. Ces valeurs sont tout à fait satisfaisantes et montrent que toutes les molécules impliquées dans la limitation azotée ont été correctement identifiées et suivies.

Enfin, pour valider l'équation stoechiométrique 3.7 (p. 125), on peut déterminer le rendement de conversion expérimental des nitrates en biomasse. Ici encore, deux méthodes sont possibles: soit on calcule les rapports des différences de concentration entre deux points successifs, et on fait une moyenne, soit on effectue directement le rapport de la vitesse linéaire de décroissance des nitrates sur la vitesse linéaire de croissance de la biomasse. Dans les deux cas, on obtient des résultats voisins, et les valeurs déterminées sur l'ensemble des 3 cultures sont comprises entre 0,43 et 0,44 kg  $NO_3^-$ / kg de biomasse. On rappelle que la valeur théorique donnée par l'équation 3.7 est 0,44 kg  $NO_3^-$ / kg de biomasse. Il y a donc accord parfait entre les valeurs théoriques et expérimentales.

Une formule brute a été établie, à la fin de la culture en cuve agitée, alors que les phycocyanines avaient presque disparu. Le résultat obtenu est:



On constate que cette biomasse, très enrichie en sucres, a perdu la moitié de son azote par rapport à la formule de l'équation 3.7.

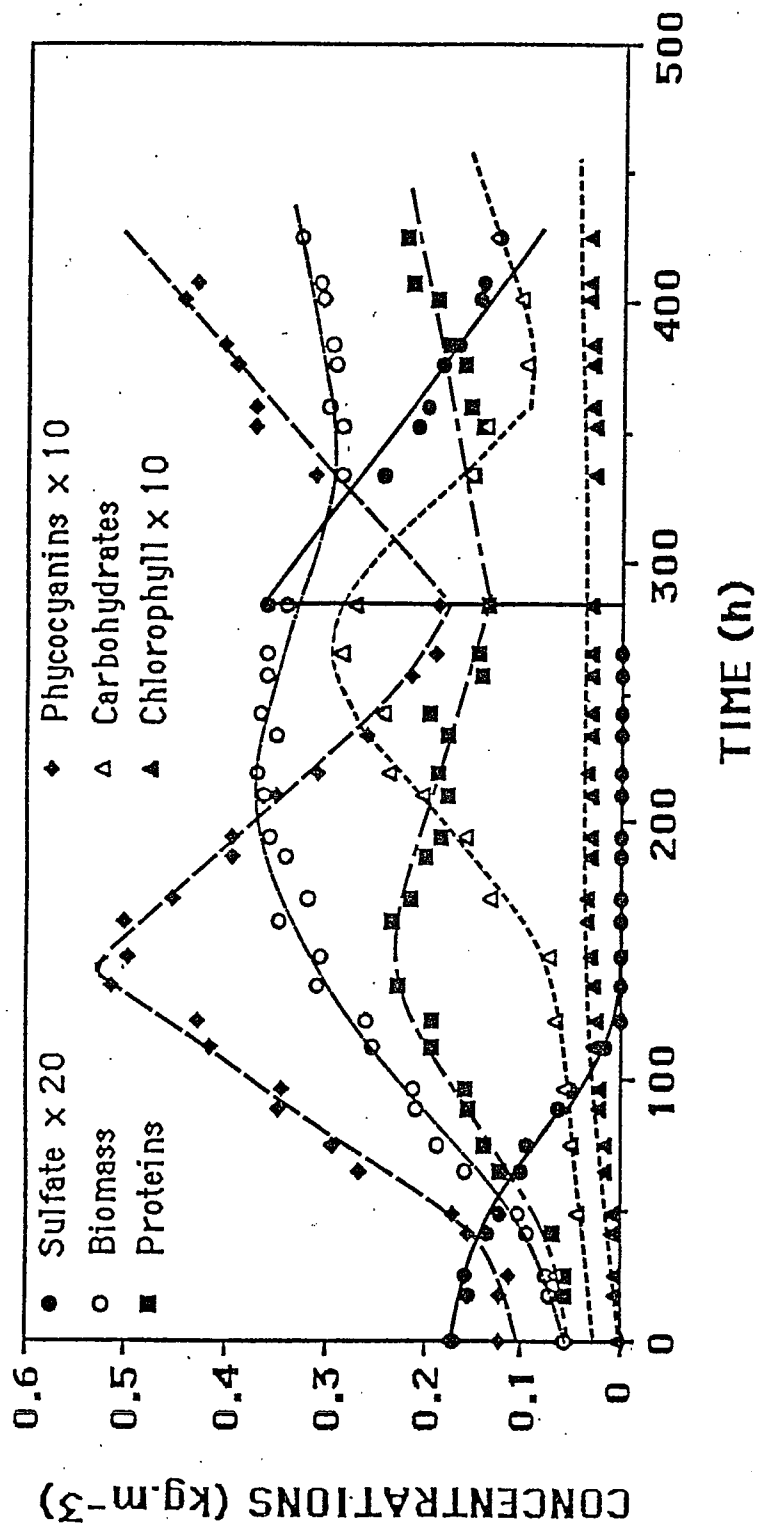


Figure 3.21a: Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en sulfate (photobioréacteur parallélépipédique, flux lumineux de 18 W/m<sup>2</sup>). Des sulfates ont été rajoutés dans le milieu après 280 heures de culture. Evolution des composants cellulaires au cours du temps.

### 3.2.3. Limitation par la concentration en sulfates:

Les résultats déjà obtenus chez diverses cyanobactéries ont montré que les effets de la limitation par les sulfates étaient très semblables à ceux occasionnés par la limitation en nitrates. Notamment, on observe aussi une diminution de la concentration en phycocyanines (COHEN-BAZIRE et BRYANT, 1982; SCHMIDT *et al.* 1982; WANNER *et al.* 1986) lorsqu'il n'y a plus de sulfate dans le milieu. Parallèlement, GREEN et GROSSMAN (1988) ont observé que la vitesse de consommation des sulfates était 10 fois supérieure à la normale chez des cellules qui ont été carencées en soufre. Ce fait ne semble pas se produire lors des carences en azote et en phosphore.

Comme nous l'avons précédemment signalé, ALLEN *et al.* (1980) ont également constaté une accumulation de cyanophycines dans les cellules limitées par le soufre et le phosphore.

Pour vérifier que *S. platensis* suivait bien ce comportement, nous avons réalisé une culture en bioréacteur parallélépipédique, en condition de limitation par les sulfates. Le flux incident était de  $18 \text{ W/m}^2$ . La figure 3.21a montre les résultats obtenus. Ceux-ci sont très semblables à ceux obtenus lors de la limitation par la source d'azote. La vitesse linéaire de croissance est de  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . Les phycocyanines sont dégradées à la même vitesse que celle à laquelle elles étaient synthétisées, et on constate une forte augmentation de la quantité de glycogène intracellulaire, ainsi que de l'exopolysaccharide. La principale différence réside dans le fait que la concentration en protéines totales décroît plus vite que la concentration en phycocyanines. Cela montre que d'autres protéines sont cette fois dégradées, ce qui n'était pas le cas lors de la carence en azote. Cette observation est confirmée quand on lève la carence en rajoutant des sulfates dans le milieu. La vitesse de synthèse des phycocyanines est alors bien inférieure à la vitesse de synthèse des protéines totales, ce qui suggère que des protéines



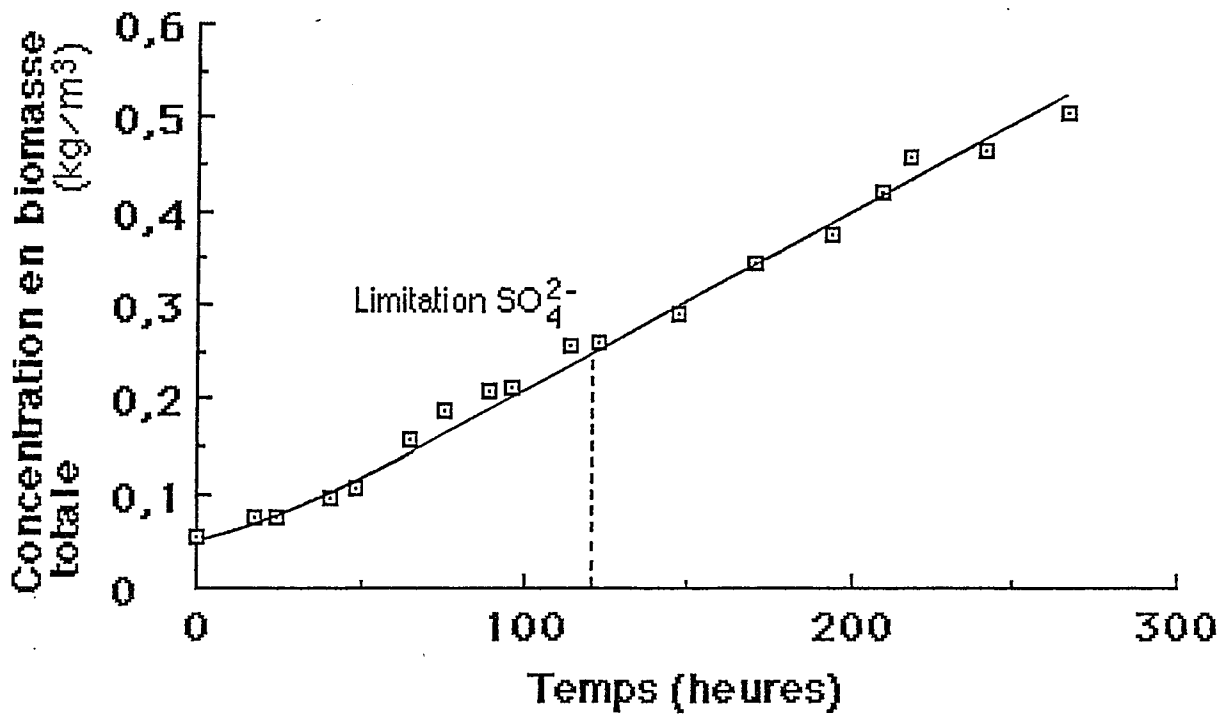


Figure 3.21b: Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en sulfate (photobioréacteur parallélépipédique, flux lumineux de  $18 \text{ W/m}^2$ ). Des sulfates ont été rajoutés dans le milieu après 280 heures de culture.

Evolution de la biomasse totale produite (biomasse et polysaccharides excrétés) jusqu'à la réaddition de sulfate dans le milieu.

essentielles sont reconstituées en priorité.

La figure 3.21b montre la vitesse de synthèse de la masse totale produite dans le réacteur. Elle permet de vérifier que cette vitesse se maintient après l'apparition de la limitation, et que le rendement quantique moyen n'est donc pas diminué.

Comme nous l'avons fait lors de l'étude de la limitation par les nitrates, on peut calculer le pourcentage de récupération du soufre dans la biomasse (PRS). Compte tenu de la fraction de soufre contenue dans les sulfates, et dans la biomasse (équation stoechiométrique 3.7, p. 125), ce rapport s'écrit:

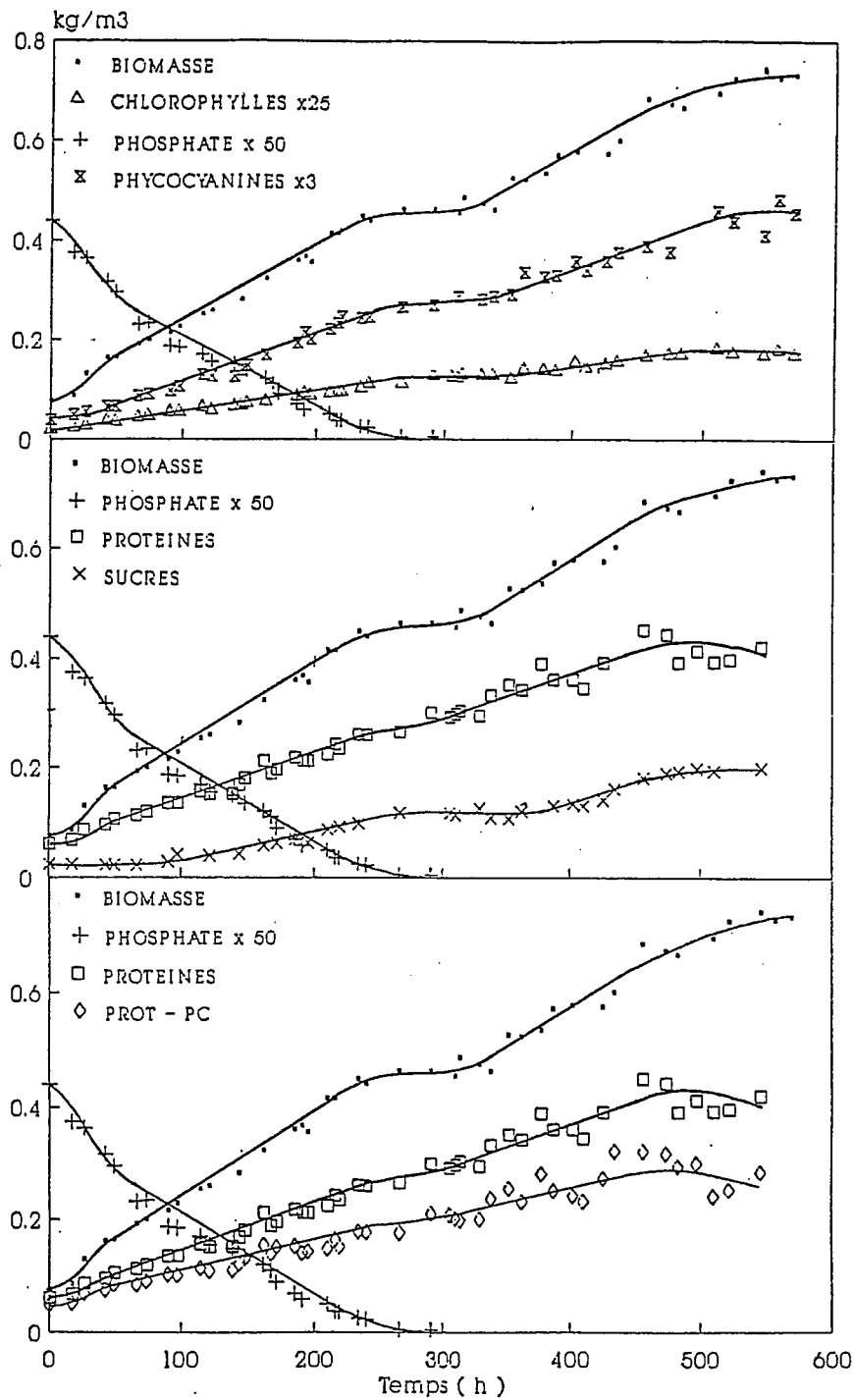
$$\text{PRS} = \frac{0,0094.C_x}{0,33.C_s}$$

si  $C_s$  est la concentration en sulfates.

Le résultat obtenu si l'on fait ce calcul pour tous les points est de 91%, ce qui prouve bien que la totalité des molécules contenant le soufre ont été identifiées et dosées. Le rendement de conversion des sulfates en biomasse, obtenu par le rapport des vitesses linéaires ou les rapports des écarts entre les points pris deux à deux, est parfaitement identique à la valeur théorique attendue, c'est-à-dire 0,028 kg  $\text{SO}_4^{2-}$  / kg de biomasse.

#### 3.2.4. Limitation par la concentration en phosphates:

La littérature est moins abondante sur les effets de la limitation par le phosphate chez les cyanobactéries. Néanmoins, HEALEY et HENDZEL (1973), ont rapporté que lors de l'étude en chimostat de cultures limitées par la concentration en phosphate, on observait une augmentation intracellulaire de la teneur en polyosides, alors que les teneurs en phosphate, azote, protéines, acides nucléiques, et chlorophylles diminuaient. Si la limitation devenait plus sévère, il y avait accumulation de lipides dans les



**Figure 3.22:** Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en phosphate (photobioréacteur parallélépipédique, flux lumineux de  $11 \text{ W/m}^2$ ). Cette culture a été conduite jusqu'à l'épuisement des réserves intracellulaires en polyphosphates.

cellules. OKADA *et al.* (1982) ont proposé un modèle pour la vitesse de consommation du phosphate en conditions limitantes, et précisent qu'il est nécessaire de prendre comme variables les réserves de phosphate intracellulaire, en plus de la concentration externe en phosphate.

Enfin, ALLEN *et al.* (1980) ont noté une augmentation de la teneur en cyanophycines.

Deux cultures ont été réalisées en photoréacteur parallélépipédique, en conditions de limitation par le phosphate. Les flux lumineux incidents étaient identiques et égaux à 11 W/m<sup>2</sup>.

La figure 3.22 montre les résultats de la première culture. On note que dès que le phosphate est épuisé dans le milieu, il y a un arrêt de croissance de la biomasse, ainsi que de tous les constituants cellulaires, y compris les polyosides.

Après une courte phase stationnaire, correspondant à un changement de métabolisme, la croissance reprend à la même vitesse que précédemment. Lors de cette deuxième phase, correspondant probablement à l'utilisation des réserves intracellulaires en phosphate, les teneurs en pigments et protéines, restent constantes. La teneur en exopolysaccharide augmente légèrement. Néanmoins, le métabolisme de la cellule ne semble pas être très perturbé, lorsque celle-ci utilise ses réserves en polyphosphates. Une deuxième phase stationnaire apparaît alors, quand les réserves intracellulaires semblent épuisées, au cours de laquelle la concentration en protéines autres que les phycocyanines commence à diminuer. Il semblerait donc que les cellules renouvellent leurs phycocyanines aux dépens d'autres protéines.

Ces résultats vont à l'encontre de ce qui était attendu au regard de la littérature. Nous avons alors réalisé une deuxième culture (figure 3.23), limitée à la première phase de croissance, qui confirme qu'aucune modification n'apparaît dans les teneurs en pigments, en protéines, ou en polyosides, lors de la limitation par le phosphate.

Le pourcentage de récupération du phosphore est dans ce cas

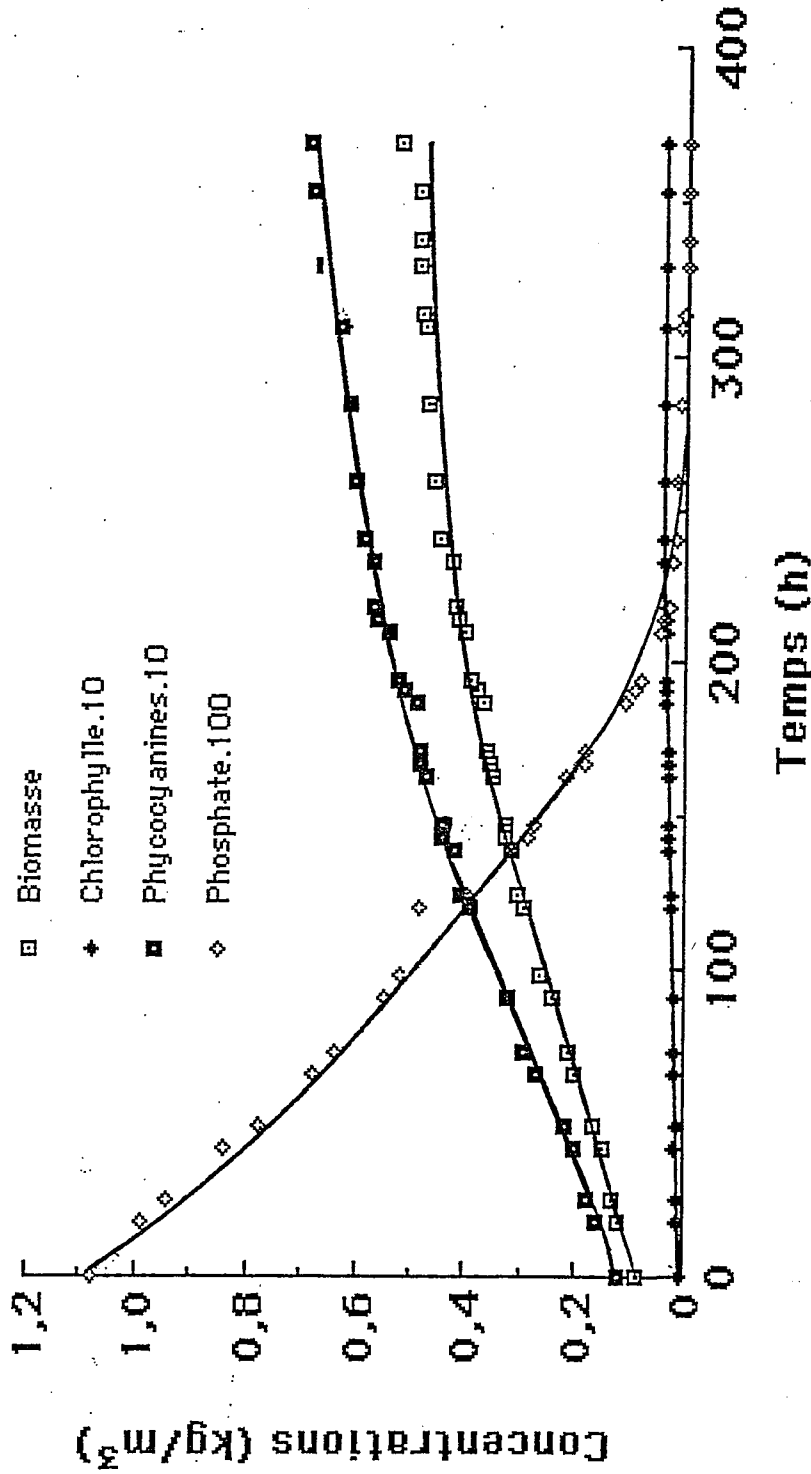


Figure 3.23: Culture en discontinu de *S. platensis* en condition de limitation par la concentration en phosphate (photobioréacteur parallélipédique, flux lumineux de 11 W/m<sup>2</sup>).

égal à :

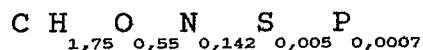
$$\text{PRP} = \frac{0,0078.C_x}{0,323.C_{\text{Ph}}}$$

où  $C_{\text{Ph}}$  est la concentration en phosphate.

Les valeurs expérimentales obtenues pour les deux cultures sont respectivement de 97 et 96%. Ce résultat montre que l'équation stoechiométrique 3.7 est valable, au moins au cours de la première phase de croissance. Ceci est d'ailleurs confirmé par la valeur obtenue du rendement de conversion, qui vaut, dans les deux cas 0,026 kg  $\text{HPO}_4^{2-}$ / kg de biomasse, ce qui est exactement la valeur théorique attendue.

Lors de ces deux cultures, les vitesses linéaires de croissance étaient égales et valaient  $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ .

La formule brute établie à la fin de la première culture, est la suivante :



Ce résultat traduit que la biomasse est enrichie en polysides, mais surtout qu'il ne reste plus dans les cellules, que l'ADN et 10% des ARN, ce qui semblerait indiquer que les cellules ont augmenté de volume sans se diviser durant la fin de la deuxième phase.

### 3.2.5. Etude cinétique de production de l'exopolysaccharide:

Une culture à été réalisée en cuve agitée, de façon à compléter les informations déjà obtenues sur l'exopolysaccharide (paragraphe 3.1.6). Une étude cinétique était en effet nécessaire pour déterminer notamment, si cet exopolysaccharide était un métabolite primaire (synthétisé en même temps que la biomasse), ou un métabolite secondaire (synthétisé avec un temps de retard sur la biomasse). Ces informations devaient permettre, au moment de la modélisation, de formuler des hypothèses sur la synthèse du

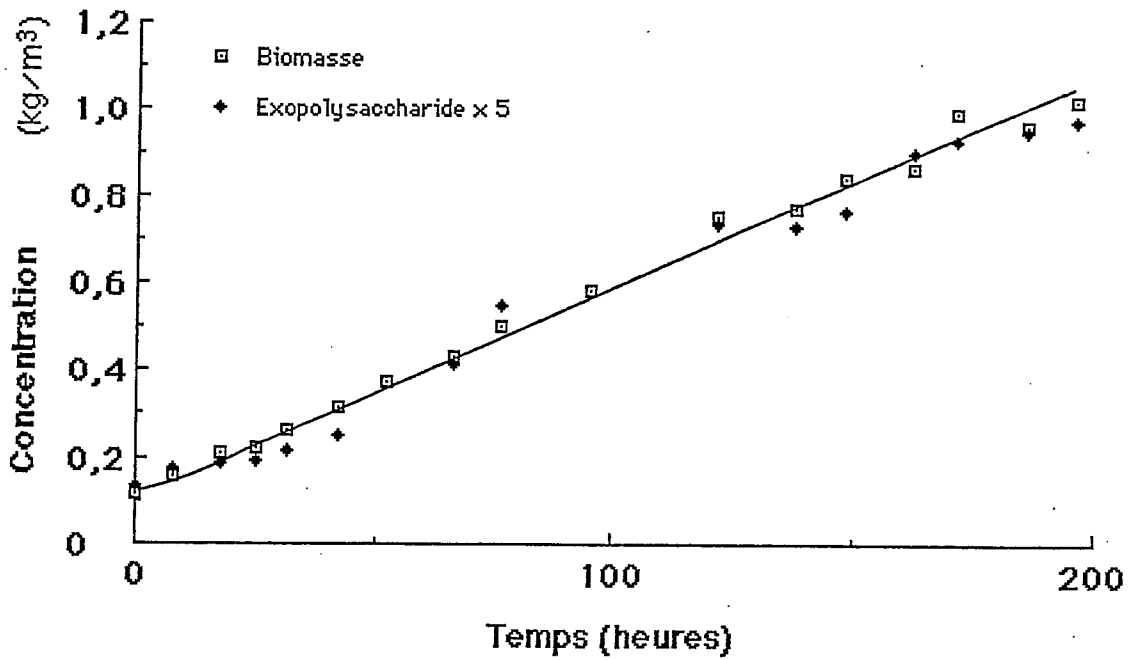


Figure 3.24: Culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique, avec un flux lumineux incident de  $80 \text{ W/m}^2$ . Cinétique de production de l'exopolysaccharide.

polysaccharide.

Les résultats obtenus (figure 3.24, flux lumineux incident de 80 W/m<sup>2</sup>) montrent très nettement que, dans des conditions d'éclairement définies, la vitesse de synthèse de l'exopolysaccharide est proportionnelle à la vitesse de synthèse de la biomasse (vitesse linéaire de croissance égale à 5,3.10<sup>-3</sup> kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>). Il s'agit donc d'un métabolite primaire dont la fraction massique est égale, dans ce cas, à 0,17. Cette constatation exclut une hypothèse précédemment envisagée qui reliait l'apparition du polysaccharide à celle de la limitation par l'énergie disponible dans le réacteur. D'autre part, le fait que la fraction massique augmente avec l'éclairement, donc avec la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de la lumière, confirme l'hypothèse déjà présentée que l'exopolysaccharide joue un rôle dans l'utilisation d'ATP en excédent, par rapport au pouvoir réducteur produit par la photosynthèse. Cette hypothèse sera largement discutée au chapitre 5.

Les résultats obtenus au cours de cette culture ont également permis de montrer que l'exopolysaccharide n'était pas consommé au cours d'une période d'obscurité de 15 heures (ces résultats n'apparaissent pas sur la figure 3.24).

### 3.2.6. Limitations par la source de carbone et par le transfert de gaz. Bilans gazeux sur le réacteur:

Les généralités concernant la consommation de carbone inorganique par les cyanobactéries ont été données au paragraphe 3.1.1. On rappelle que la source de carbone est le bicarbonate. Il pénètre par transport actif dans les cellules où il est en équilibre avec le CO<sub>2</sub>, forme sous laquelle il est assimilé dans le cycle de Calvin (VOLOKITA et al. 1984; BADGER et al. 1985; REINHOLD et al. 1989).

Lorsque les cellules sont en limitation, elles concentrent fortement le bicarbonate de façon à maintenir élevée l'activité



carboxylase de la Rubisco, qui est l'enzyme contrôlant l'incorporation du CO<sub>2</sub> dans le cycle de Calvin, et de réduire son activité oxygénase conduisant à la photorespiration. Cette concentration utilise beaucoup d'énergie, et elle se fait donc au dépens du rendement de conversion de l'énergie lumineuse absorbée (MILLER et COLMAN, 1980; COLEMAN et COLMAN, 1981; BADGER et ANDREWS, 1982; KAPLAN et al. 1982).

Ces données obtenues sur des échantillons cellulaires, ont été confirmées lors de cultures continues par LEHMAN (1978), et MILLER et al. (1984). Ces derniers rapportent également, que même en condition de limitation par la source de carbone, la photorespiration n'apparaît pas avec une pression partielle en oxygène  $1,92 \cdot 10^5$  fois plus élevée que celle en dioxyde de carbone.

L'étude et la compréhension de la limitation par la source de carbone se révèle donc plus complexe que l'étude des limitations minérales. Elle nécessite l'obtention d'informations à 3 niveaux.

Le premier niveau concerne ce qui se produit à l'interface gaz liquide lorsqu'on fournit le carbone sous forme de CO<sub>2</sub> gazeux. Cette étape peut devenir limitante, c'est ce qu'on appelle la limitation par la vitesse de transfert.

Le deuxième niveau implique la connaissance des équilibres liquide-liquide entre les différentes formes de carbone inorganique dissous, de façon à faire intervenir la concentration en bicarbonate comme variable d'état.

Le troisième niveau est représenté par le métabolisme et la physiologie des microorganismes, et notamment par les modifications qui peuvent apparaître dans la composition des cellules (pigments, protéines, sucres, lipides). En effet, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, ces informations sont représentatives de l'état énergétique des cellules.

Enfin, il est nécessaire d'effectuer un bilan gazeux sur le CO<sub>2</sub> et l'oxygène, pour confirmer les stoechiométries établies, ainsi que l'absence de photorespiration.

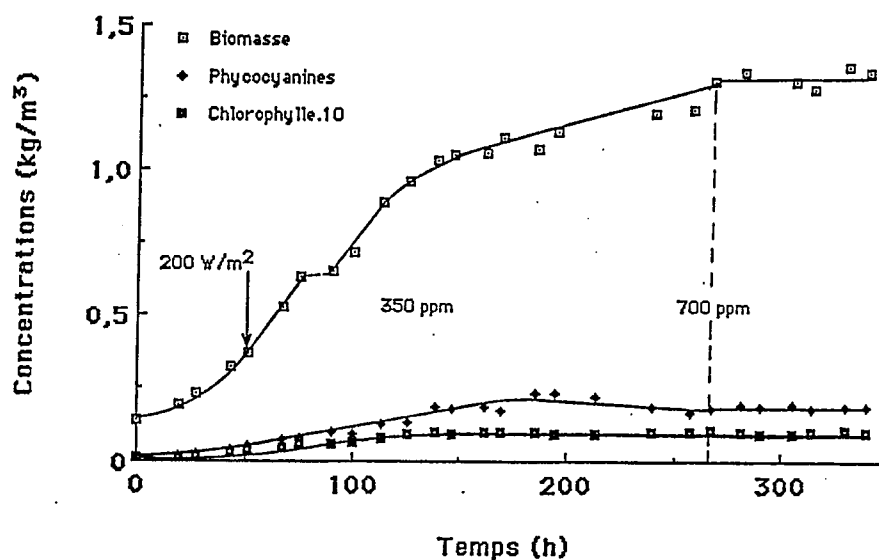
L'ensemble de ces étapes doit être pris en compte par un modèle mathématique. Les deux premiers points seront développés au chapitre suivant, quant aux deux derniers, ils seront discutés au chapitre 5.

Sur la base de ces observations, une expérience a été conçue pour fournir les données expérimentales nécessaires à l'étude de la limitation par la source de carbone. Il s'agissait d'une culture au cours de laquelle on a fait varier la teneur en CO<sub>2</sub> dans le gaz alimentant le réacteur. Le milieu avait été préalablement appauvri en bicarbonate et carbonate, pour permettre l'apparition d'une limitation par la source de carbone. Un schéma détaillé de l'expérience a été donné au chapitre 2 (MEUNIER, 1991). Le débit de gaz était alors plus faible que pour les autres cultures en cuve agitée ( $1,7 \cdot 10^{-6}$  Nm<sup>3</sup>/s, soit 0,02 v.v.m.), pour permettre d'obtenir la vitesse volumétrique de production d'oxygène à partir d'une sonde à oxygène dissous. Le flux lumineux était de 200 W/m<sup>2</sup>.

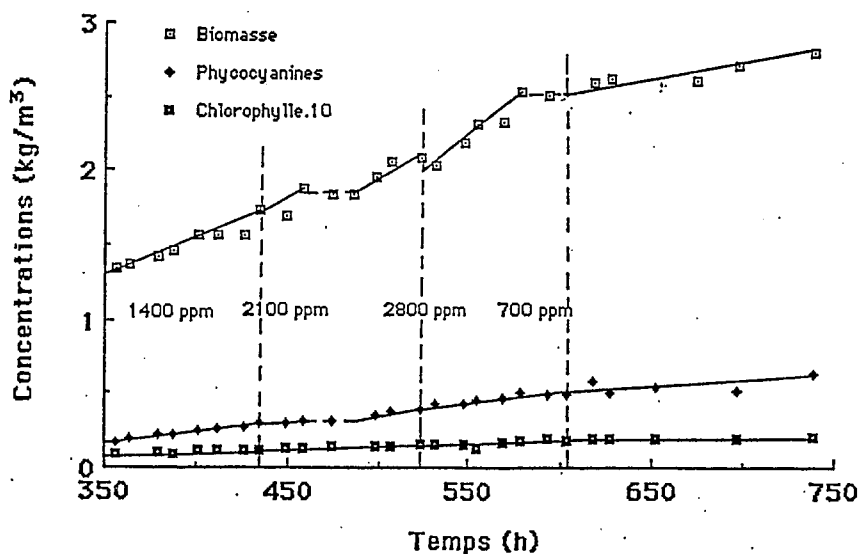
La figure 3.25 a et b montre les résultats obtenus sur le réacteur. On peut distinguer 8 phases, en fonction des différentes conditions de culture.

- Phase 1 (0 à 50 h): Le flux lumineux incident est égal à 70 W/m<sup>2</sup>, de façon à éviter la photoinhibition liée à la dilution lors du repiquage. La concentration en carbone inorganique dissous est faible et correspond à celle du milieu de faible force ionique (MF). La croissance est exponentielle. Le gaz alimentant le réacteur contient 350 ppm de CO<sub>2</sub>.

- Phase 2 (50 à 120 h): Le flux lumineux incident est augmenté à 200 W/m<sup>2</sup> pour obtenir une vitesse linéaire de croissance élevée. Cette vitesse servira de référence, puisque dans cette partie, c'est uniquement la vitesse d'absorption de l'énergie lumineuse qui limite la vitesse. Cette vitesse maximale est de  $11,0 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>. Les teneurs en phycocyanines et en



(a)



(b)

Figure 3.25: Culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique (flux lumineux incident de 70 W/m<sup>2</sup> puis de 200 W/m<sup>2</sup> après 50 heures de culture). Lors de cette culture, on a fait varier la fraction molaire en CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation. Les 8 phases obtenues sont représentées par les traits pointillés (explications voir texte):

- a- 4 premières phases;
- b- 4 dernières phases.

chlorophylle sont respectivement égales à 15% et 0,8% de la biomasse active.

- Phase 3 (120 à 265 h): Le carbone dissous est progressivement épuisé, et en présence de 350 ppm de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'entrée, le bicarbonate devient limitant, la vitesse de croissance diminue fortement et devient égale à  $1,95 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>. Parallèlement, on observe des modifications métaboliques, puisque la teneur en phycocyanines augmente de 13% à 19% de la biomasse active, alors que la teneur en chlorophylle a demeure égale à 0,8%. De plus, la concentration en exopolysaccharide devient constante, indiquant que sa synthèse est arrêtée.

- Phase 4 (265 à 360 h): La teneur en CO<sub>2</sub> dans le gaz d'entrée est augmentée à 700 ppm. La croissance s'annule alors, bien que les données sur la phase gazeuse montrent que la photosynthèse se poursuit. Les microorganismes ont probablement déviés leur métabolisme, notamment vers la production d'acides gras volatils, le pH ayant alors tendance à diminuer. D'autre part, on constate que le pourcentage de phycocyanines rechute à 14% de la biomasse.

- Phase 5 (360 à 430 h): La teneur en CO<sub>2</sub> est augmentée à 1400 ppm. La croissance reprend alors normalement, avec une vitesse de  $5,60 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>. Le pourcentage de phycocyanines dans la biomasse augmente à nouveau jusqu'à 17%.

- Phase 6 (430 à 520 h): On augmente encore la teneur en CO<sub>2</sub> dans le gaz d'entrée à 2100 ppm. La croissance linéaire devient égale à  $7,50 \cdot 10^{-3}$  kg.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>. La teneur en phycocyanines continue à augmenter jusqu'à 20% de la biomasse, alors que la teneur en chlorophylle a est toujours stable.

- Phase 7 (520 à 600 h): Le gaz d'entrée contient cette fois 2800 ppm de  $\text{CO}_2$ . La croissance linéaire vaut  $9,00 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . La teneur en phycocyanines atteint 21% de la biomasse. Remarquons que dans ce cas, la vitesse observée est égale à 80% de la vitesse maximale (phase 2).

- Phase 8 (600 à 740 h): La teneur en  $\text{CO}_2$  est cette fois diminuée à 700 ppm de façon à obtenir l'information que nous n'avions pas pu avoir au cours de la phase 4. La vitesse de croissance est alors égale à  $3,30 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . La teneur en phycocyanines est devenue stable à 21% de la biomasse, la teneur en chlorophylle a se maintient à 0,8% de la biomasse. La synthèse de l'exopolysaccharide est toujours arrêtée.

L'analyse des teneurs en  $\text{CO}_2$  fournit des informations complémentaires au niveau du bilan gazeux. Les résultats sous forme d'enregistrements ne sont pas donnés ici, néanmoins, on peut faire les observations suivantes.

Au cours des deux premières phases, le milieu est sursaturé par rapport au gaz d'alimentation. La teneur en  $\text{CO}_2$  dans le gaz à la sortie, est donc plus forte qu'à l'entrée. L'équilibre est réalisé au bout de 84 heures, puis la teneur en sortie devient plus faible qu'à l'entrée, puisque le  $\text{CO}_2$  est transféré dans le réacteur. La limitation apparait une vingtaine d'heures après.

On constate alors que l'on n'atteint jamais le régime permanent dans la teneur de sortie en  $\text{CO}_2$  du gaz au cours des différentes phases successives. Plus précisément, pour une teneur fixée à l'entrée, on a une teneur qui diminue au cours du temps en sortie. Ceci traduit simplement que l'on transfère de plus en plus de carbone dans le milieu. Ce premier élément sera confirmé lors de l'étude du pourcentage de récupération du carbone dans la biomasse, que nous allons maintenant aborder.

Comme nous l'avons déjà fait au cours de l'étude des limitations minérales, on peut déterminer la vitesse de production

du carbone pour les différentes phases, si l'on connaît la fraction massique de carbone dans la biomasse.

D'autre part, l'analyseur différentiel permet de calculer le carbone transféré dans le réacteur. Bien que la teneur de sortie varie au cours du temps, on peut prendre une valeur moyenne pour effectuer un bilan carbone. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.5.

Teneur en CO <sub>2</sub> en entrée. (ppm)	Carbone transféré. (10 <sup>-6</sup> kg/h)	Teneur en CO <sub>2</sub> en sortie. (ppm)	Carbone retrouvé dans la biomasse. (10 <sup>-6</sup> kg/h)	Bilan carbone. (Rapport)
350 (phase 3)	0,77	110	4,56	5,9
700 (phase 4)	1,67	180	non déterminé	non déterminé
1400 (phase 5)	3,36	340	13,1	3,9
2100 (phase 6)	5,26	440	17,5	3,3
2800 (phase 7)	7,39	500	21,0	2,7
700 (phase 8)	1,54	220	7,71	4,8

Tableau 3.5: Pourcentage moyen de récupération du carbone dans la biomasse, obtenu par le rapport de la vitesse d'apparition du carbone dans la biomasse sur la vitesse de transfert du carbone sous forme CO<sub>2</sub>.

On constate que dans tous les cas, la quantité de carbone produite est largement supérieure à la quantité transférée. Cela

signifie qu'il ne s'agit pas réellement d'une limitation par le transfert de  $\text{CO}_2$ , mais bien une limitation par la concentration en bicarbonates. D'autre part, ces résultats confirment qu'il existe une consommation de bicarbonate dans le milieu. Cette consommation est d'autant plus importante que la teneur est faible dans le gaz d'entrée. La dernière mesure à 700 ppm montre que ce phénomène n'est pas lié à une évolution générale des concentrations de la phase liquide au cours du temps.

Comme nous le laissons entendre précédemment, il existe un régime instationnaire dans la phase liquide, sur le carbone inorganique dissous. Les dynamiques en jeu semblent très lentes, comme nous le verrons dans le prochain chapitre. Il semble en effet que dans le cadre de cette expérience, nous n'avons jamais été en condition de limitation par le transfert de  $\text{CO}_2$ . Il aurait fallu pour cela maintenir plus longtemps des conditions à faible teneur en  $\text{CO}_2$  dans le gaz d'entrée, jusqu'à ce que les microorganismes épuisent entièrement le bicarbonate du milieu.

Les mécanismes en jeu au cours de cette expérience sont très probablement ceux relevés dans la bibliographie. C'est-à-dire que *S. platensis*, comme les autres cyanobactéries, concentre le bicarbonate dès que la concentration extracellulaire diminue au dessous d'un certain seuil. Ce mécanisme permet aux cellules de maintenir une vitesse de croissance supérieure à ce qu'elle serait en limitation par le transfert. Cette vitesse est alors déterminée par la diminution du rendement de conversion de l'énergie lumineuse, liée à une utilisation intensive d'ATP pour concentrer le bicarbonate contre son gradient de concentration.

En tout état de cause, le modèle mathématique élaboré devra être assez général pour tenir compte de tous les phénomènes discutés précédemment, et également d'une éventuelle limitation par le transfert de  $\text{CO}_2$ .

Une dernière information, extrêmement importante, peut être obtenue à partir de la détermination de la vitesse volumétrique de production de l'oxygène. Les données de la sonde à oxygène dissous

peuvent en effet être exploitées dans ce sens. Cela nécessite l'écriture de bilans matière qui seront détaillés dans le chapitre 4. Nous nous limiterons ici à commenter les résultats, notamment ceux concernant les valeurs du quotient photosynthétique, défini dans le prochain chapitre comme le rapport de la vitesse volumétrique de production de l'oxygène, sur la vitesse volumétrique de consommation des bicarbonates.

Les valeurs obtenues sont résumées par le tableau 3.6.

N° de phase. (fraction molaire en CO <sub>2</sub> dans le gaz <sup>2</sup> à l'entrée.)	Fraction molaire en O <sub>2</sub> à la sortie	Vitesse volumétrique de consommation du bicarbonate (kmol.m <sup>-3</sup> .h <sup>-1</sup> )	Vitesse volumétrique de production de l'oxygène. (kmol.m <sup>-3</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Q_p = \frac{r'_{O_2}}{r'_{HCO_3^-}}$
Phase 2. (vitesse maximale)	0,2630	4,66.10 <sup>-4</sup>	6,25.10 <sup>-4</sup>	1,34
Phase 3. (3,5.10 <sup>-4</sup> )	0,2202	8,44.10 <sup>-5</sup>	1,31.10 <sup>-4</sup>	1,48
Phase 8. (7,0.10 <sup>-4</sup> )	0,2275	1,43.10 <sup>-4</sup>	2,12.10 <sup>-4</sup>	1,47
Phase 5. (1,4.10 <sup>-3</sup> )	0,2386	2,42.10 <sup>-4</sup>	3,45.10 <sup>-4</sup>	1,43
Phase 6. (2,1.10 <sup>-4</sup> )	0,2491	3,25.10 <sup>-4</sup>	4,70.10 <sup>-4</sup>	1,45
Phase 7. (2,8.10 <sup>-4</sup> )	0,2562	3,89.10 <sup>-4</sup>	5,55.10 <sup>-4</sup>	1,43

**Tableau 3.6:** Détermination de la vitesse volumétrique de production de l'oxygène et du quotient photosynthétique, au cours des différentes phases de limitation de la culture.

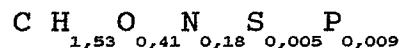
On remarque une différence importante dans les quotients photosynthétiques, entre celui de la phase 2, correspondant à la



vitesse maximale, et les autres, correspondant à des vitesses limitantes. Ce résultat est tout à fait normal au regard des stoechiométries attendues. En effet, lors de la croissance à vitesse maximale, les cellules synthétisent de l'exopolysaccharide en quantité importante, car l'énergie absorbée est ici élevée. La synthèse d'une biomasse plus riche en sucres conduit à une diminution du quotient photosynthétique, comme nous le verrons au chapitre 5.

D'autre part, on ne constate pas de différences importantes dans les quotients photosynthétiques obtenus lors des phases de limitation. Celles-ci sont plutôt du domaine de l'erreur expérimentale. Ce fait montre qu'il n'existe pas de photorespiration dans ces conditions de culture, car la photorespiration dans l'air conduit à une augmentation de 14% du quotient photosynthétique et de 3% du rapport  $P/2e^-$  *in vivo* (OGREN, 1984), ce qui n'est pas le cas ici. La valeur moyenne calculée pour le quotient photosynthétique est dans ce cas de 1,45, elle sera discutée au chapitre 5, lors de l'étude stoechiométrique.

La formule brute réalisée en fin de culture est:



Elle permet de vérifier qu'il ne reste plus beaucoup d'exopolysaccharide (si ce n'est celui synthétisé au cours des 100 premières heures), et qu'il y a probablement eu accumulation intracellulaire de polyphosphates, car la teneur en P est une fois et demi supérieure à la normale.

### CONCLUSION:

La modélisation mathématique envisagée nécessite la connaissance de données physiologiques chez les cyanobactéries, et notamment chez *Spirulina platensis*. Ces données peuvent s'obtenir

à deux niveaux:

- à l'échelle cellulaire où l'on doit étudier les phénomènes de photosynthèse et de respiration à la lumière et à l'obscurité;
- à l'échelle des cultures en masse pour obtenir des informations globales sur le métabolisme et les cinétiques de croissance des microorganismes.

Préalablement à toute étude de croissance en photobioréacteur, il faut déterminer les conditions optimales de culture ainsi que les facteurs pouvant interférer sur les résultats obtenus.

Nous avons donc étudié les effets du pH, de la température, de l'agitation, de la force ionique du milieu, et de la qualité de la lumière.

Ces résultats préliminaires ont permis d'envisager des cultures en masse dans différents photobioréacteurs, afin de vérifier le comportement de *S. platensis* soumise à des conditions de culture très variées. Il s'agissait de limitations de la croissance par le transfert de lumière, par les concentrations en minéraux (source d'azote, de soufre et de phosphore), et par la source de carbone.

Les informations obtenues permettent d'une part de recueillir des données cinétiques et stoechiométriques, et d'autre part, de valider les modèles mathématiques qui seront établis par la suite pour de nombreuses conditions opératoires.



CHAPITRE 4

LIMITATIONS PHYSIQUES

DANS LES PHOTOBIOREACTEURS.

#### 4.1. INTRODUCTION.

Les microorganismes photosynthétiques peuvent être soumis à deux types de limitations, physiques ou biologiques. On parle de limitation lorsque le microorganisme fonctionne sous contrainte, c'est-à-dire que le métabolisme ne travaille pas à vitesse maximale, ce qui induit toujours de nombreuses modifications, aussi bien au plan métabolique qu'au plan énergétique.

Lorsqu'une étape purement physique régit le processus, on parle de limitation physique.

Deux limitations de ce type peuvent apparaître dans un photobioréacteur, la limitation par le transfert de lumière à l'intérieur du réacteur, et la limitation par le transfert de CO<sub>2</sub> de la phase gazeuse à la phase liquide.

Le but de ce chapitre est de décrire au niveau théorique, ces deux problèmes physiques, de façon à essayer de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, en vue de l'intégration de ces résultats dans un modèle mathématique prenant en compte le couplage entre les phénomènes physiques et biologiques.

##### - Limitation physique par le transfert de lumière:

Ce phénomène est très important car les microorganismes photosynthétiques fonctionnent en permanence en limitation par leur source d'énergie, la lumière. Le problème se distingue nettement de celui des bactéries par le fait que la source d'énergie n'est pas disponible en quantité égale en chaque point du réacteur, le milieu est donc anisotrope. L'énergie radiante est en effet atténuée par l'absorption et la diffusion liées aux cellules, et l'on doit traiter un problème spatial.

Il est donc nécessaire de disposer à la fois d'informations locales comme l'énergie disponible en chaque point du réacteur conduisant aux cinétiques locales, et d'informations globales

comme l'énergie totale absorbée dans le réacteur, qui conduit à la cinétique globale et au bilan énergétique.

#### - Limitation physique par le transfert de CO<sub>2</sub>:

Lorsque la teneur en CO<sub>2</sub> dans le gaz alimentant le réacteur devient trop faible, ou lorsque le coefficient de transfert diminue, une limitation par le transfert de CO<sub>2</sub> entre la phase gaz et liquide peut survenir. La vitesse de croissance est alors régie, comme dans le cas précédent, par un phénomène purement physique. Le problème est rendu plus complexe que dans le cas de limitations par le transfert d'oxygène, par l'existence de l'accumulation dans la phase liquide d'autres formes de carbone inorganique que le CO<sub>2</sub>, comme les bicarbonates et les carbonates. Ce système n'étant pas généralement à l'équilibre, on est confronté, cette fois, à un problème temporel, et ceci que les microorganismes se trouvent en limitation ou non.

La connaissance d'une étape limitante par le transfert de gaz nécessite que l'on soit capable de calculer le coefficient volumétrique de transfert de la molécule considérée. Cette étape passe généralement par la détermination de la puissance dissipée dans les réacteurs, ce qui justifie, en fin de chapitre, la présence d'un court paragraphe à caractère technologique sur ces aspects.

### 4.2. LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE LUMIERE ET BILAN ENERGETIQUE.

#### 4.2.1. Revue bibliographique:

Comme nous le laissons entendre en introduction, la modélisation des cultures de microorganismes photosynthétiques nécessite l'utilisation de lois physiques pouvant rendre compte de l'hétérogénéité du milieu en énergie lumineuse radiante

disponible.

La plupart des modèles mathématiques déjà publiés traitant de cinétique des photobioréacteurs utilisent la loi de Lambert-Beer pour traduire l'atténuation du flux d'énergie radiante à l'intérieur d'une culture, et ceci indépendamment de l'approche choisie pour modéliser les cinétiques locales et globales (FREDRICKSON *et al.* 1961; OGAWA *et al.* 1971; SHETH *et al.* 1977; TEN HOOPEN *et al.* 1981; FROHLICH *et al.* 1983). Cette loi simple est très utilisée en spectrophotométrie, mais elle repose sur les deux hypothèses suivantes:

- elle s'applique suivant une direction privilégiée, donc pour une seule dimension d'espace avec une lumière parallèle comme condition aux limites.

- le milieu sur lequel on l'applique doit uniquement absorber la lumière sans la diffuser.

Dans ce cas, la loi de Lambert postule une décroissance exponentielle du flux d'énergie radiante en fonction du trajet optique  $z$ , pour la longueur d'onde  $\lambda$ :

$$F_{z\lambda} = F_{o\lambda} \cdot e^{-a_{\lambda} \cdot z} \quad (4.1)$$

La loi de Lambert-Beer fait intervenir la concentration d'une espèce en solution comme par exemple la concentration en biomasse:

$$F_{z\lambda} = F_{o\lambda} \cdot e^{-m_{a\lambda} \cdot C \cdot z} \quad (4.2)$$

Malheureusement, même dans un spectrophotomètre, les hypothèses précédentes ne sont pas toujours vérifiées. SHIBATA (1958) mettait déjà en garde contre l'utilisation abusive de la loi de Lambert pour du matériel biologique intact diffusant la lumière.

En ce qui concerne les photobioréacteurs, aucune des deux conditions précédentes n'est satisfaite, puisque le problème posé

est tridimensionnel et que la suspension de cellules diffuse fortement la lumière. La loi de Lambert-Beer ne permet donc pas de décrire correctement le phénomène physique de transfert de lumière dans les réacteurs pour des raisons géométriques, et parce que les milieux liquides diffusants ne se prêtent pas à son utilisation (AIBA, 1982).

Une nouvelle approche monodimensionnelle a été développée pour modéliser la croissance des microalgues dans les lacs et lagunes et leur capacité à convertir l'énergie solaire. Dans ce cas précis, on peut considérer que l'hétérogénéité du champ d'énergie radiante dans le milieu ne varie qu'avec la profondeur. La diffusion et la réflexion de la lumière étant importantes et la lumière incidente n'étant pas parallèle, les modèles proposés reposaient sur la forme monodimensionnelle simplifiée de l'équation des transferts radiatifs (DANIEL *et al.* 1979; INCROPERA et THOMAS, 1978). Cette équation prend en compte à la fois l'absorption et la diffusion de la lumière dans le milieu. Elle présente l'inconvénient d'être intégral-différentielle et son utilisation sous sa forme générale, en trois dimensions d'espace, est délicate.

Néanmoins, certains auteurs ont franchi le pas et ont proposé d'appliquer l'équation générale des transferts radiatifs en régime permanent à l'étude des photoréacteurs (SPADONI *et al.* 1978; AIBA 1982). Leur démarche restait malgré tout préliminaire puisqu'ils se limitaient à donner l'énergie totale absorbée dans le réacteur, dans un cas pour une lumière monochromatique, et dans l'autre cas pour un réacteur à géométrie parallélépipédique. Ce résultat était obtenu en maillant numériquement le réacteur en intensité lumineuse locale.

Dans tous les cas, cette approche novatrice semble seule pouvoir répondre aux objectifs définis dans l'introduction de ce chapitre, et permettre l'écriture d'équations théoriques rendant compte du phénomène physique, indépendamment de la géométrie ou du milieu considéré, ainsi que des conditions aux limites.



Le paragraphe suivant a donc pour objectif:

- de généraliser et systématiser cette démarche, en écrivant des bilans d'énergie sur un fluide absorbant et diffusant la lumière;

- d'appliquer les résultats obtenus à la détermination des vitesses spécifiques de consommation d'énergie lumineuse par les microorganismes photosynthétiques, ainsi qu'à la détermination du bilan enthalpique et entropique d'un photoréacteur.

#### 4.2.2. Bilans d'énergie sur un fluide absorbant et diffusant la lumière. Application aux photobioréacteurs:

Exposer ici l'ensemble des démonstrations, parfois longues, conduisant aux bilans d'énergie, ainsi que la totalité des résultats théoriques obtenus ou des méthodes de résolution, serait extrêmement fastidieux. Aussi, a-t-il été décidé d'adopter une présentation allégée.

Le lecteur intéressé pourra trouver dans le rapport de CORNET (1990), l'ensemble des résultats et démonstrations relatifs à ce paragraphe. Celui-ci regroupe le strict minimum nécessaire à la compréhension de concepts, destinés à être inclus dans un modèle mathématique plus complexe.

On se propose donc d'écrire les bilans d'énergie sur un fluide absorbant et diffusant la lumière. Pour cela, on distinguera deux phases. Une phase matérielle qui représente la masse dans le système, et une phase photonique traversant le milieu, représentée par une radiation électromagnétique sous la forme  $E_\nu = h\nu$  (BIRD et al. 1960). On réalise sur chaque phase un bilan d'énergie de façon à obtenir des équations locales prenant en compte l'énergie radiante. On fait donc intervenir un terme d'absorption  $A$  et d'émission  $\mathcal{E}$ , dont la différence est un terme de transfert entre les phases, mais qui peut être également assimilée au terme de réaction sur la phase matérielle.

L'explicitation des termes globaux  $\mathcal{A}$  et  $\mathcal{E}$  conduit à une équation de bilan d'intensité locale (équation de transfert radiatif), permettant de déterminer l'énergie absorbée et l'énergie diffusée.

Enfin, l'intégration de ces équations locales en équations spatiales conduit aux bilans enthalpique et entropique.

#### A - PHASE MATERIELLE:

Un bilan d'énergie totale sur l'élément de volume d'un fluide en écoulement laminaire permet d'écrire l'équation générale suivante:

$$\rho \cdot \frac{D}{Dt} (\dot{U} + \dot{\Phi} + \frac{1}{2} \cdot v^2) = -\text{div } \vec{q} - \text{div}(\vec{\tau} \cdot \vec{v}) - \text{div}(P \cdot \vec{v}) - (\mathcal{E} - \mathcal{A}) \quad (4.3)$$

dans laquelle  $\dot{U}$  et  $\dot{\Phi}$  sont respectivement l'énergie interne et potentielle par unité de masse,  $v$  la vitesse du fluide,  $q$  le flux de conduction,  $\tau$  la contrainte de cisaillement,  $P$  la pression,  $\mathcal{E}$  et  $\mathcal{A}$  représentent les vitesses d'émission locale et d'absorption locale par unité de volume.

La double flèche est la notation adoptée pour représenter un tenseur.

On rappelle que  $\frac{D}{Dt}$  est une dérivée particulière, et on a par définition, pour un scalaire  $A$ :

$$\frac{DA}{Dt} = \frac{\partial A}{\partial t} + \vec{v} \cdot \text{grad } A$$

Généralement, on néglige l'énergie potentielle, et l'on peut obtenir l'équation générale sous forme d'énergie interne en retranchant l'équation d'énergie cinétique:

$$\rho \cdot \frac{D\dot{U}}{Dt} = -\text{div } \vec{q} - P \cdot \text{div } \vec{v} - \vec{\tau} : \text{grad } \vec{v} - (\mathcal{E} - \mathcal{A}) \quad (4.4)$$

où l'opérateur : dénote un produit dyadique. Si on explicite la dérivée particulaire, en différenciant, on obtient:

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho \cdot \dot{U} = -\text{div}(\rho \dot{U} \cdot \vec{v}) - \text{div} \vec{q} - P \cdot \text{div} \vec{v} - \vec{\tau} : \text{grad} \vec{v} - (\mathcal{E} - \mathcal{A}) \quad (4.5)$$

Le terme  $-\text{div} \vec{q}$  représente le bilan net des flux de chaleur se propageant par conduction.

Le terme  $-\vec{\tau} : \text{grad} \vec{v}$  représente la vitesse de transformation irréversible de l'énergie visqueuse en énergie thermique; il est souvent négligeable.

Le terme  $-P \cdot \text{div} \vec{v}$  représente la vitesse de transformation réversible de l'énergie de pression en énergie thermique.

Enfin, le terme  $-(\mathcal{E} - \mathcal{A})$  représente le transfert d'énergie radiante de la phase photonique à la phase matérielle.

Dans le cas particulier d'un liquide à pression constante, le premier principe de la thermodynamique permet d'écrire:

$$d\dot{U} = -P \cdot d\dot{V} + \dot{C}_p \cdot dT \quad (4.6)$$

où  $\dot{V}$  est le volume spécifique,  $T$  la température, et  $\dot{C}_p$  la capacité calorifique à pression constante par unité de masse.

Au moyen de l'équation (4.6), on peut reformuler l'équation (4.5):

$$\rho \cdot \dot{C}_p \frac{DT}{Dt} = -\text{div} \vec{q} - \vec{\tau} : \text{grad} \vec{v} - (\mathcal{E} - \mathcal{A}) \quad (4.7)$$

Si l'on néglige le terme de dissipation visqueuse, et que l'on applique la loi de Fourier, on obtient alors:

$$\rho \cdot \dot{C}_p \frac{DT}{Dt} = \lambda \cdot \Delta T - (\mathcal{E} - \mathcal{A}) \quad (4.8)$$

Si l'écoulement est turbulent, les grandeurs sont soumises à des fluctuations aléatoires dans le temps et dans l'espace autour de valeurs moyennes notées avec une barre. L'équation précédente

devient, après lissage sur le temps:

$$\rho \cdot c_p \frac{D\bar{T}}{Dt} = \lambda \cdot \Delta \bar{T} - \text{div } \vec{q}^t - (\varepsilon - \mathcal{A}) \quad (4.9)$$

On peut trouver dans la littérature, des expressions semi-empiriques reliant  $\vec{q}^t$  à  $\bar{T}$  (PRANTL, VON KARMAN, DEISSLER).

Comme on a pu le constater, pour que ces équations soient solubles, il faut connaître le terme de transfert d'énergie radiante  $(\varepsilon - \mathcal{A})$ . Ceci est possible si l'on dispose d'une nouvelle équation sur la phase photonique, permettant d'explicitier ce terme.

#### B - PHASE PHOTONIQUE:

##### - Théorie:

Les considérations qui suivent ont en partie été exposées par CHANDRASEKHAR (1960), et SIEGEL et HOWELL (1981).

On appelle  $I_\nu$  l'intensité spécifique transportée sous forme de rayonnement d'énergie  $E_\nu = h\nu$ . Cette intensité spécifique dépend du point en lequel elle est définie, des cosinus directeurs de la direction d'observation, et du temps pour les phénomènes non stationnaires. L'énergie traversant un élément de surface  $dS$  est alors:

$$dE_\nu = I_\nu \cdot \cos \theta \cdot d\nu \cdot dS \cdot d\omega \cdot dt \quad (4.10)$$

$\cos \theta \cdot dS$  est la projection de la surface  $dS$  sur le plan perpendiculaire à la direction d'observation. L'angle solide  $\omega$  définit un faisceau de radiations.

Un champ de radiations est dit isotrope en un point, si l'intensité à ce point est indépendante de la direction d'observation. Si de plus, l'intensité est la même en tout point,

le champ est homogène et isotrope.

On définit l'intensité intégrale sur toutes les fréquences:

$$I = \int_0^{\infty} I_{\nu} \cdot d\nu \quad (4.11)$$

L'équation 4.10 permet d'exprimer l'énergie traversant la surface  $dS$  dans toutes les directions qui est égale à:

$$d\nu \cdot dS \cdot dt \cdot \iint_{4\pi} I_{\nu} \cdot \cos \theta \cdot d\omega$$

Par définition, on appelle flux, la quantité:

$$\vec{F}_{\nu} = \iint_{4\pi} I_{\nu} \cdot \cos \theta \cdot d\omega \quad (4.12)$$

C'est la puissance traversant l'unité de surface pour l'intervalle spectral unité, représentant l'énergie rayonnée. On notera la nature vectorielle du flux d'énergie radiante, ainsi, la puissance traversant une surface unité d'orientation quelconque est la projection du vecteur  $\vec{F}_{\nu}$  sur la direction de la normale à la surface.

Enfin, nous définirons l'intensité moyenne en un point par:

$$J_{\nu} = \frac{1}{4\pi} \iint_{4\pi} I_{\nu} \cdot d\omega \quad (4.13)$$

Cette grandeur représente l'énergie radiante disponible en un point. Elle est à la base de la définition de l'énergie locale absorbée ainsi que nous le verrons plus loin.

Si l'on étudie maintenant l'atténuation d'un faisceau de radiation traversant un milieu matériel absorbant et diffusant (on

néglige d'emblée l'émission du milieu dans le cas qui nous intéresse; le milieu est alors dit diffusant), on peut écrire, si  $z$  est la direction de propagation du rayonnement:

$$dI_{\nu} = -(Ea_{\nu} + Es_{\nu}) \cdot C_x \cdot I_{\nu} \cdot dz \quad (4.14)$$

$Ea$  et  $Es$  sont respectivement les coefficients massiques d'absorption et de diffusion de la lumière, et  $C_x$  est la concentration de l'espèce qui absorbe et diffuse dans le milieu, c'est-à-dire, dans notre cas, la biomasse.

L'énergie ne disparaît pas obligatoirement du rayonnement, du moins en totalité. Elle peut réapparaître dans d'autres directions sous forme d'énergie diffusée. La différence peut alimenter des transformations d'énergie (biologique par exemple), ou réapparaître dans un autre domaine du spectre (fluorescence). Il faut donc bien distinguer entre l'absorption vraie et la diffusion.

Intéressons nous dans un premier temps uniquement à la diffusion ( $Ea_{\nu} = 0$ ). La vitesse à laquelle l'énergie est diffusée de l'élément de volume  $\cos \theta \cdot dS \cdot dz = dV$  est, à partir de 4.14:

$$\frac{dE_{\nu}}{dt} = Es_{\nu} \cdot I_{\nu} \cdot dm \cdot dV \cdot d\omega \cdot p(\cos \theta) \frac{d\omega'}{4\pi} \quad (4.15)$$

$\theta$  est l'angle de la direction d'observation avec la direction incidente, et  $p(\cos \theta)$  est la fonction de phase traduisant la distribution angulaire de la diffusion. Dans ce cas, la diffusion totale pour toutes les directions est:

$$Es_{\nu} \cdot I_{\nu} \cdot dm \cdot dV \cdot d\omega \frac{1}{4\pi} \iint_{4\pi} p(\cos \theta) \cdot d\omega' \quad (4.16)$$

Par définition, on appelle albedo de diffusion simple, l'intégrale:

$$\bar{\omega}_0 = \frac{1}{4\pi} \iint_{4\pi} p(\cos \Theta) \cdot d\omega' \quad (4.17)$$

Dans ce cas précis, la diffusion étant totale,  $\bar{\omega}_0 = 1$ , ce qui définit la diffusion parfaite, ou cas conservatif (condition de normalisation de la fonction de phase).

Si maintenant, on considère un milieu qui absorbe et diffuse la lumière,  $\bar{\omega}_0 < 1$  et représente la fraction d'énergie perdue par diffusion, alors que  $(1-\bar{\omega}_0)$  est la fraction d'énergie absorbée.

D'une façon générale, la fonction de phase se présente sous la forme d'un développement en série orthogonale de polynômes de Legendre (CHANDRASEKHAR, 1960):

$$p(\cos \Theta) = \sum_{l=0}^{\infty} \bar{\omega}_l \cdot P_l(\cos \Theta)$$

mais si l'on fait l'hypothèse d'un champ de radiation isotrope, la diffusion est identique dans toutes les directions de l'élément de masse  $dm$  et:

$$\bar{\omega}_0 = p(\cos \Theta) = \frac{E_{s\nu}}{E_{a\nu} + E_{s\nu}} \quad (4.18)$$

On peut alors définir le coefficient d'émission  $j_\nu$  comme l'énergie émise par un élément de masse  $dm$ , dans l'angle solide  $d\omega$ , sur l'intervalle spectral  $d\nu$ :

$$\frac{dE_\nu}{dt} = j_\nu \cdot dm \cdot d\omega \cdot d\nu \quad (4.19)$$

En réalité, il s'agit d'une vitesse d'émission massique, qui peut être due, en partie ou en totalité, à un effet de diffusion de l'énergie rayonnante provenant d'une autre direction. Comme on

a fait l'hypothèse que le milieu n'émettait pas (milieu diffusant), la contribution de l'émission par diffusion  $j_{\nu}^S$ , à l'émission globale  $j_{\nu}$ , est totale, et  $j_{\nu} = j_{\nu}^S$ . Les relations 4.15, 4.16, et 4.19, permettent d'écrire:

$$j_{\nu}^S = \frac{E_{S_{\nu}}}{4\pi} I_{\nu} \iint_{4\pi} p(\cos \Theta) \cdot d\omega' \quad (4.20)$$

La fonction source est par définition le rapport du coefficient d'émission sur le coefficient d'atténuation défini par la relation 4.14:

$$f_{\nu} = \frac{j_{\nu}^S}{E_{a_{\nu}} + E_{S_{\nu}}} \quad (4.21)$$

ce qui conduit, à partir de la relation 4.20 à:

$$f_{\nu} = \frac{E_{S_{\nu}}}{E_{a_{\nu}} + E_{S_{\nu}}} \frac{1}{4\pi} I_{\nu} \cdot \iint_{4\pi} p(\cos \Theta) \cdot d\omega' \quad (4.22)$$

Après avoir étudié la contribution de chaque phénomène, on peut trouver, par bilan d'énergie, l'équation différentielle qui régit les variations d'intensité rayonnée dans un milieu, pour une direction donnée. Si  $u_{\nu}$  est la densité spectrale d'énergie radiante, celui-ci s'écrit (CHANDRASEKHAR, 1960):

$$\frac{\partial}{\partial t} u_{\nu} = - \frac{\partial I_{\nu}}{\partial u} + (E_{a_{\nu}} + E_{S_{\nu}}) \cdot C_X \cdot (f_{\nu} - I_{\nu}) \quad (4.23)$$

L'équation 4.23 est l'équation générale des transferts radiatifs pour la direction  $u$ . En explicitant la fonction source, il vient:

$$\frac{\partial}{\partial t} u_{\nu} = - \frac{\partial I_{\nu}}{\partial u} - (E_{a_{\nu}} + E_{S_{\nu}}) \cdot C_X \cdot I_{\nu} + \frac{E_{S_{\nu}}}{4\pi} \cdot C_X \cdot I_{\nu} \iint_{4\pi} p(\cos \Theta) \cdot d\omega' \quad (4.24)$$



Pour une direction constante  $u$ , on peut définir  $I_{\nu}$  comme une fonction scalaire des coordonnées:  $I_{\nu}(x,y,z)$ . Dans ce cas, sa différentielle est:

$$dI_{\nu} = \frac{\partial I_{\nu}}{\partial x} dx + \frac{\partial I_{\nu}}{\partial y} dy + \frac{\partial I_{\nu}}{\partial z} dz$$

et si  $l,m,n$ , sont les cosinus directeurs de  $d\vec{u}$ , on a:

$$dI_{\nu} = \left( l \cdot \frac{\partial I_{\nu}}{\partial x} + m \cdot \frac{\partial I_{\nu}}{\partial y} + n \cdot \frac{\partial I_{\nu}}{\partial z} \right) \cdot du = \vec{\text{grad}} I_{\nu} \cdot d\vec{u}$$

On peut donc écrire l'équation des transferts radiatifs sous sa forme définitive, pour un champ isotrope, et en régime permanent. En choisissant la longueur d'onde plutôt que la fréquence pour définir le rayonnement, on obtient (AIBA,1982):

$$\begin{aligned} - (\vec{u} \cdot \vec{\text{grad}}) I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) &= (E_a(\lambda) + E_s(\lambda)) \cdot C_x \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \\ &- E_s(\lambda) \cdot C_x \cdot \frac{1}{4\pi} \iint_{4\pi} \bar{\omega}_0 \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega' \quad (4.25) \end{aligned}$$

On remarquera que la fonction source étant une intégrale, l'équation des transferts radiatifs est toujours intégro-différentielle.

Il est impossible d'obtenir une solution analytique à l'équation 4.25, mais sa résolution numérique permet de mailler un photoréacteur en intensité spécifique, et par la suite, de déterminer l'énergie radiante absorbée dans le réacteur.

En effet, la vitesse locale d'absorption de l'énergie  $A$  intervenant dans les équations de la phase matérielle peut maintenant être explicitée. Si on néglige l'émission  $\mathcal{E}$ , on a:

$$A = \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} E_a(\lambda) \cdot C_X \cdot I(\vec{E}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda = 4\pi \cdot \int_0^{\infty} E_a(\lambda) \cdot C_X \cdot J(\vec{E}, \lambda) \cdot d\lambda \quad (4.26)$$

Pour obtenir la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie sur tout le réacteur, il faut écrire une intégrale moyenne spatiale (AIBA, 1982):

$$\langle A \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} E_a(\lambda) \cdot C_X \cdot I(\vec{E}, \vec{u}, \lambda) \cdot dV \cdot d\omega \cdot d\lambda \quad (4.27)$$

Si on ramène cette valeur à la biomasse présente dans le réacteur, on obtient la vitesse spécifique de consommation d'énergie lumineuse par les microorganismes photosynthétiques:

$$\langle r_i \rangle = \frac{\langle A \rangle}{C_X} = \frac{1}{V} \iiint_V \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} E_a(\lambda) \cdot I(\vec{E}, \vec{u}, \lambda) \cdot dV \cdot d\omega \cdot d\lambda \quad (4.28)$$

Nous verrons au chapitre 5, comment on peut exploiter les relations 4.25, et 4.27 pour en déduire des informations cinétiques nécessaires à la modélisation des photoréacteurs.

La relation 4.26 montre que le terme d'énergie absorbée locale, intervenant dans les équations de la phase matérielle doit être intégré sur toutes les directions, et sur toutes les fréquences. Dans ce cas, l'équation 4.25 conduit à un bilan d'énergie global sur la phase photonique:

$$\begin{aligned} - \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} (\vec{u} \cdot \vec{g} \cdot \vec{rad}) \cdot I(\vec{E}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda &= [E_a(\lambda) + E_s(\lambda)] C_X \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} I(\vec{E}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda \\ &- E_s(\lambda) \cdot C_X \cdot \frac{1}{4\pi} \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} \int_{4\pi} \bar{\omega} \cdot I(\vec{E}, \vec{u}', \lambda) \cdot d\omega' \cdot d\omega \cdot d\lambda \end{aligned}$$

Cette intégration donne, tous calculs faits:

$$-\operatorname{div} \vec{F} = 4\pi \cdot E_a \cdot C_x \cdot J \quad (4.29)$$

Ce résultat peut d'ailleurs être obtenu par un bilan global d'énergie radiante sur un élément de volume, à l'instant  $t$ . Ce bilan conduit à la relation suivante:

$$\frac{\partial}{\partial t} u = -\operatorname{div} \vec{F} + (\mathcal{E} - \mathcal{A})$$

Si le milieu est supposé ne pas émettre, on a en régime permanent:

$$-\operatorname{div} \vec{F} = \mathcal{A} \quad (4.30)$$

En comparant avec l'équation 4.29, on retrouve l'équation 4.26, intégrée sur toutes les fréquences:

$$\mathcal{A} = 4\pi \cdot E_a \cdot C_x \cdot J \quad (4.31)$$

Notons ici que si l'absorption est nulle, la relation 4.30 s'écrit:

$$\operatorname{div} \vec{F} = 0$$

ce qui traduit le cas conservatif. D'autre part, cette relation peut se simplifier en une dimension, suivant la direction  $z$ , et pour la longueur d'onde  $\lambda$ :

$$\frac{dF_{z\lambda}}{dz} = -\mathcal{A}_\lambda \quad (4.32)$$

Si l'émission est nulle, et si l'on néglige la réfraction et la diffusion, on peut établir la relation suivante entre la vitesse d'absorption et le flux:  $\mathcal{A}_\lambda = a_\lambda \cdot F_{z\lambda}$ . Ce résultat combiné

à l'équation 4.32 et intégré avec la condition limite  $z = 0$ ,  $F_{z\lambda} = F_{o\lambda}$ , redonne l'équation 4.1 qui est connue sous le nom de loi de Lambert.

### -Résolution numérique:

Généralement, la résolution numérique de l'équation des transferts radiatifs est réalisée par la méthode de Monte Carlo (HOWELL et PERLMUTTER, 1964a; HOWELL et PERLMUTTER, 1964b; BUSLENKO et al. 1966; CORLETT, 1966; TOOR et VISKANTA, 1968; SIEGEL et HOWELL, 1981; AIBA, 1982). Cette méthode présente néanmoins des inconvénients car elle est lente et peu précise. Aussi avons-nous développé une méthode de résolution par éléments finis, basée sur les récentes avancées du calcul numérique en mécanique des fluides (PIRONNEAU, 1988). Le maillage du réacteur en intensité spécifique est atteint par convergence progressive vers la solution de régime permanent de l'équation 4.25, dans laquelle on fait apparaître une dérivée particulière.

$\vec{u}$  étant un vecteur unitaire, on a:  $\|\vec{u}\| = 1$ .

Choisissons le repère suivant:

$$\vec{u} = \begin{cases} \sin \theta \cdot \cos \phi \\ \sin \theta \cdot \sin \phi \\ \cos \theta \end{cases} \quad \text{avec } \theta \in [0, \pi] \text{ et } \phi \in [0, 2\pi[.$$

Le problème considéré, stationnaire, pose pour la discrétisation deux problèmes distincts.

#### 1 - La discrétisation angulaire:

C'est la discrétisation des valeurs prises par  $\theta$  et  $\phi$ . Soit  $n$  un entier non nul, on subdivise l'intervalle  $[0, \pi]$  en  $n$  intervalles de longueur  $\frac{\pi}{n}$ , ce qui donne pour valeurs de  $\theta$ :  $\theta_0 = 0$ ,  $\theta_1 = \frac{\pi}{n}$ ,  $\theta_2 = \frac{2\pi}{n}$ , ...,  $\theta_{n-1} = \frac{(n-1)\pi}{n}$ ,  $\theta_n = \pi$ . Soit  $n+1$  valeurs discrètes de  $\theta$ . En prenant le même pas pour  $\phi$ , on trouve les valeurs discrètes suivantes:  $\phi_0 = 0$ ,  $\phi_1 = \frac{\pi}{n}$ , ...,  $\phi_n = \pi$ ,  $\phi_{n+1} =$

$\frac{(n+1)\pi}{n}, \dots, \phi_{2n-1} = 2\pi - \frac{\pi}{n}$ , ce qui donne  $2n$  valeurs de  $\phi$ .  
 En posant  $\vec{u}_{ij} = \vec{u}(\theta_i, \phi_j)$ , on a  $2n(n+1)$  valeurs de  $\vec{u}$ .

Le choix de la valeur de  $n$  est déterminé par un compromis entre deux conditions contradictoires:

- $n$  doit être suffisamment grand pour éviter l'effet de raies, c'est-à-dire des oscillations dans les valeurs de flux. En effet, si  $n$  est petit, on rendra mal compte de variations qui peuvent être brutales.

- $n$  doit être suffisamment petit pour manipuler un nombre de variables total pas trop important, de façon à avoir un temps de calcul raisonnable.

Un choix intermédiaire de  $n$  peut être pris à 8, ce qui permet d'avoir 144 directions dans lesquelles la valeur en un point sera calculée. Cette discrétisation angulaire permet de calculer l'intégrale de la façon suivante:

$$\begin{aligned} \iint_{4\pi} I(\vec{e}, \vec{u}', \lambda) \cdot d\omega' &= \int_{\theta=0}^{\pi} \int_{\phi=0}^{2\pi} I(\vec{e}, \vec{u}(\theta, \phi), \lambda) \cdot \sin \theta \cdot d\theta \cdot d\phi \\ &\approx \left(\frac{\pi}{n}\right)^2 \cdot \sum_{i=0}^n \sin \theta_i \cdot \sum_{j=0}^{2n-1} I(\vec{e}, \vec{u}_{ij}, \lambda) \\ &= \left(\frac{\pi}{n}\right)^2 \cdot \sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^{2n-1} \sin \theta_i \cdot I(\vec{e}, \vec{u}_{ij}, \lambda) \end{aligned}$$

## 2 - La discrétisation spatio-temporelle:

Les méthodes classiques (différences finies, éléments finis) de discrétisation des opérateurs, appliquées à l'opérateur  $(\vec{u} \cdot \vec{\text{grad}}) I(\vec{e}, \vec{u}, \lambda)$ , sont dans ce cas très peu adaptées. En effet, on serait alors amené à inverser des matrices énormes, bien que très creuses ( $144 \cdot n_x \cdot n_y \cdot n_z$ ). Ce schéma implicite doit donc être abandonné. On peut alors envisager un traitement explicite se

ramenant au problème instationnaire suivant:

$$\left(\frac{\partial}{\partial t} + \vec{u} \cdot \vec{\text{grad}}\right) I(\vec{\varepsilon}, \vec{u}, \lambda) + c_1 \cdot I(\vec{\varepsilon}, \vec{u}, \lambda) = c_2 \cdot \iint_{4\pi} I(\vec{\varepsilon}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega'$$

avec:

$$c_1 = (Ea(\lambda) + Es(\lambda)) \cdot C_x$$

$$c_2 = Es(\lambda) \cdot C_x \cdot \frac{\bar{\omega}}{4\pi}$$

Ceci conduit naturellement à choisir la méthode de la courbe caractéristique, en remarquant que  $\left(\frac{\partial}{\partial t} + \vec{u} \cdot \vec{\text{grad}}\right)$  est l'opérateur dérivée particulaire, c'est-à-dire la dérivée le long de la courbe caractéristique. Le principe est le suivant:

Soit  $\varepsilon^{n+1}$  un point du maillage, on fait l'approximation suivante:

$$\left(\frac{\partial}{\partial t} + \vec{u} \cdot \vec{\text{grad}}\right) I(\varepsilon^{n+1}, \vec{u}, \lambda) \approx \frac{I(\varepsilon^{n+1}, \vec{u}, \lambda) - I(\varepsilon^n, \vec{u}, \lambda)}{\Delta t}$$

où  $\varepsilon^n$  est un point se trouvant à l'intérieur du domaine, sa position étant déterminée par  $\varepsilon^{n+1} = \varepsilon^n + \Delta t \cdot \vec{u}$ , soit:

$$\varepsilon^n = \varepsilon^{n+1} - \Delta t \cdot \vec{u}$$

Le point  $\varepsilon^n$  n'est pas un point du maillage, car  $\Delta t$  est inférieur au plus petit pas du maillage. La valeur de  $I(\varepsilon^n, \vec{u}, \lambda)$  sera donc interpolée à partir des valeurs des noeuds avoisinants, ces valeurs étant celles de l'itération précédente.

En tenant compte des deux discrétisations, on obtient:

$$\frac{I_{ij}(\mathcal{E}^{n+1}, \lambda) - I_{ij}(\mathcal{E}^n, \lambda)}{\Delta t} + C_1 \cdot I_{ij}(\mathcal{E}^{n+1}, \lambda)$$

$$= C_2 \cdot \left(\frac{\pi}{n}\right)^2 \cdot \sum_{p=0}^n \sum_{q=0}^{2n-1} \sin \theta_p \cdot I_{pq}(\mathcal{E}^n, \lambda)$$

avec  $I_{ij}(\mathcal{E}, \lambda) = I(\mathcal{E}, \vec{u}(\theta_i, \phi_j), \lambda)$   
 $i = 0, \dots, n$   
 $j = 0, \dots, 2n-1$

On a donc:

$$I_{ij}(\mathcal{E}^{n+1}, \lambda) = \frac{1}{1+C_1 \cdot \Delta t} \left[ I_{ij}(\mathcal{E}^n, \lambda) + C_2 \frac{\pi^2}{n^2} \cdot \Delta t \cdot \sum_{p=0}^n \sum_{q=0}^{2n-1} \sin \theta_p \cdot I_{pq}(\mathcal{E}^n, \lambda) \right]$$

Le maillage réalisé permet de calculer la vitesse locale d'absorption de l'énergie, pour une longueur d'onde  $\lambda$ , d'après 4.26:

$$\mathcal{A} = \iint_{4\pi} Ea(\lambda) \cdot C_X \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega$$

que l'on peut obtenir numériquement, au sommet  $k$ :

$$\mathcal{A}_{2/3}(k) = Ea(\lambda) \cdot C_X \cdot \left(\frac{\pi}{n}\right)^2 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} \sin \frac{i\pi}{n} \cdot \sum_{j=1}^{2n} I(k, u_{ij})$$

En calculant les surfaces moyennes autour d'un point, on a alors:

$$\langle \mathcal{A} \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V \mathcal{A} \cdot dV = \frac{1}{V} \cdot \left[ \sum_{\substack{k \text{ intérieurs} \\ \text{au domaine}}} \mathcal{A}_{2/3}(k) \cdot \text{surface}(k) \cdot z_{2/3} \right]$$

On a remarqué dans ce paragraphe traitant de la résolution de l'équation des transferts radiatifs, que la longueur d'onde demeurait en paramètre. En effet, l'équation est valable pour une longueur d'onde donnée, et si on travaille en lumière blanche, on devra effectuer le calcul qui vient d'être exposé pour un grand nombre de longueurs d'ondes. Pour ces raisons, l'algorithme de maillage a été vectorisé, de façon à diminuer le temps de calcul. Le gain de temps ainsi obtenu sur un supercalculateur vectoriel est de l'ordre d'un facteur 10, pour une centaine de longueurs d'onde.

Cependant, la nature intégrro-différentielle, et surtout le nombre de dimensions élevé du problème impose des temps de calcul et des capacités de mémoire vive élevés (20 à 100 Mo). Cela est d'autant plus notable que, lors d'une simulation de culture discontinue, le maillage doit être réalisé à chaque pas sur le temps. Le traitement complet des équations est donc mal adapté à l'identification de paramètres du modèle, qui demande de nombreuses simulations successives pour atteindre la convergence. C'est pourquoi, il a été envisagé de simplifier le problème en une seule dimension d'espace, en essayant d'adapter le matériel expérimental à ces approximations.

#### - Simplification du problème en une dimension:

L'équation 4.23 peut se simplifier en une dimension d'espace, suivant l'axe  $z$ , et en régime permanent, elle devient:

$$-\cos \theta \cdot \frac{dI_{\nu}(z, \theta, \phi)}{(Ea_{\nu} + Es_{\nu})C_x \cdot dz} = I_{\nu}(z, \theta, \phi) - J_{\nu}(z, \theta, \phi) \quad (4.33)$$



où on rappelle que  $J_{\nu}$  est la fonction source définie par l'équation 4.22, qui s'écrit, en coordonnées sphériques:

$$J_{\nu} = \frac{Es_{\nu}}{Ea_{\nu} + Es_{\nu}} \cdot \frac{1}{4\pi} \int_{-1}^{+1} \int_0^{2\pi} p(\theta, \phi, \theta', \phi') \cdot I_{\nu}(z, \theta', \phi') \cdot \sin \theta' \cdot d\theta' \cdot d\phi'$$

$\theta$  est l'inclinaison par rapport à la normale, et  $\phi$  l'azimuth par rapport à l'axe  $z$ .

Si on applique ces équations sur un milieu limité par 2 plaques planes infinies parallèles, il existe une symétrie axiale par rapport à l'axe  $z$ , et l'intensité ainsi que la fonction source sont indépendantes de l'azimuth. L'équation 4.33 devient (CHANDRASEKHAR, 1960):

$$-\cos \theta \cdot \frac{dI_{\nu}(z, \theta)}{(Ea_{\nu} + Es_{\nu}) C_x \cdot dz} = I_{\nu}(z, \theta)$$

$$- \frac{Es_{\nu}}{2 \cdot (Ea_{\nu} + Es_{\nu})} \int_{-1}^{+1} p^{\circ}(\theta, \theta') \cdot I_{\nu}(z, \theta') \cdot \sin \theta' \cdot d\theta' \quad (4.34)$$

$$\text{avec } p^{\circ}(\theta, \theta') = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} p(\theta, \phi, \theta', \phi') \cdot d\phi'$$

Dans le cas d'un milieu diffusant, si le champ de radiation est isotrope,  $p^{\circ}(\theta, \theta') = \bar{\omega}_0$ , et l'équation à résoudre est, après simplifications et pour la longueur d'onde  $\lambda$ :

$$-\cos \theta \cdot \frac{dI(z, \theta, \lambda)}{dz} = (Ea(\lambda) + Es(\lambda)) \cdot C_x \cdot I(z, \theta, \lambda)$$

$$- \frac{1}{2} \cdot Es(\lambda) \cdot C_x \cdot \bar{\omega}_0 \cdot \int_{-1}^{+1} I(z, \theta', \lambda) \cdot \sin \theta' \cdot d\theta' \quad (4.35)$$

Cette équation est l'équation générale des transferts radiatifs en une dimension pour un champ isotrope. Elle est applicable, comme nous l'avons vu, entre deux plaques planes parallèles infinies. Contrairement à l'équation en trois dimensions, elle est facilement soluble numériquement. Plusieurs méthodes ont été utilisées et comparées (CHU et CHURCHILL, 1955; BOFFI et al. 1977; INCROPERA et THOMAS, 1978; DANIEL et al. 1979). Nous ne présenterons ici brièvement, que celle semblant donner les meilleurs résultats dans le plus grand nombre de cas.

L'équation 4.31 est transformée en un système de  $2n$  équations différentielles linéaires à coefficients constants, pour les directions  $\theta_1$ :

$$-\cos \theta_1 \cdot \frac{dI(z, \theta_1, \lambda)}{dz} = (E_a(\lambda) + E_s(\lambda)) \cdot C_x \cdot I(z, \theta_1, \lambda) - \frac{1}{2} \cdot E_s(\lambda) \cdot C_x \cdot \bar{\omega}_0 \cdot \sum_{j=1}^m a_j \cdot I(z, \theta_j, \lambda)$$

Les coefficients  $a_j$  sont des coefficients pondérateurs déterminés en fonction des divisions de l'intervalle  $[-1, +1]$ . Le problème est de déterminer quel est l'ordre d'approximation le plus faible donnant une solution suffisamment précise. Pratiquement, on prendra  $n = 3$  ou  $4$ , c'est pourquoi on parle souvent de méthode à 6 flux.

L'intégrale sera évaluée par la méthode de Gauss dans laquelle la fonction  $f(\mu)$  sur l'intervalle  $[-1, +1]$  est approximée suivant:

$$\int_{-1}^{+1} f(\mu) \cdot d\mu \approx \sum_{j=1}^m a_j \cdot f(\mu_j), \text{ avec } \mu = \cos \theta.$$

Les  $\mu_j$  sont les zéros des polynômes de Legendre  $P_m(\mu)$ , ce qui donne pour les coefficients pondérateurs:

$$a_j = \frac{1}{P'_m(\mu_j)} \cdot \int_{-1}^{+1} \frac{P_m(\mu)}{\mu - \mu_j} \cdot d\mu$$

L'équation 4.35 permet également de calculer la vitesse locale d'absorption de l'énergie radiante sur toutes les fréquences, en effet, on peut montrer que:

$$\mathcal{A} = - \int_0^\infty \int_0^{2\pi} \int_{-1}^{+1} \cos \theta \cdot \frac{dI(z, \theta, \phi, \lambda)}{dz} \sin \theta \cdot d\theta \cdot d\phi \cdot d\lambda \quad (4.36)$$

$$\text{et comme } F(z, \lambda) = \int_0^{2\pi} \int_{-1}^{+1} I(z, \theta, \phi, \lambda) \cdot \cos \theta \cdot \sin \theta \cdot d\theta \cdot d\phi$$

$$\text{on en déduit: } \mathcal{A} = - \int_0^\infty \frac{\partial}{\partial z} \cdot [F(z, \lambda)] \cdot d\lambda.$$

Malgré la simplification du problème spatial en une seule dimension, on a vu que l'obtention de l'intensité spécifique, du flux d'énergie radiante ou de la vitesse locale d'absorption de l'énergie nécessitait une résolution numérique.

On peut à nouveau réduire le problème en appliquant les hypothèses de SCHUSTER (1901). La démarche qui suit a été exposée dans les articles de CORNET *et al.* (1991), et CORNET *et al.* (1992a), elle permet d'obtenir une solution analytique pour l'évolution du flux d'énergie radiante ou pour l'énergie disponible en fonction de la distance  $z$ .

SCHUSTER (1901) considère la totalité de la radiation qui va être diffusée et absorbée, c'est-à-dire qu'il utilise des grandeurs moyennes intégrées sur toutes les fréquences. D'autre part, il néglige la distribution angulaire de la lumière à

l'entrée dans le milieu et divise alors le champ de radiation en deux flux opposés  $F_z^+$  et  $F_z^-$ . Autrement dit, il se place dans le cas d'une approximation à deux flux, telle qu'elle a été exposée précédemment, mais en considérant la lumière parallèle à l'entrée du milieu. Enfin, le champ de radiation est toujours considéré comme isotrope.

On peut alors écrire deux bilans d'énergie sur un volume élémentaire d'épaisseur  $\Delta z$ , pour les flux  $F_z^+$  et  $F_z^-$  séparément (figure 4.1):

$$F_z^+ - F_{z+\Delta z}^+ + \frac{1}{2} \cdot ES \cdot \Delta z \cdot F_z^- = EA \cdot \Delta z \cdot F_z^+ + \frac{1}{2} \cdot ES \cdot \Delta z \cdot F_z^+$$

$$F_{z+\Delta z}^- - F_z^- + \frac{1}{2} \cdot ES \cdot \Delta z \cdot F_z^+ = EA \cdot \Delta z \cdot F_z^- + \frac{1}{2} \cdot ES \cdot \Delta z \cdot F_z^-$$

On rappelle la définition des coefficients globaux d'absorption et de diffusion:  $EA = E_a \cdot C_x$ , et  $ES = E_s \cdot C_x$ . Le coefficient  $\frac{1}{2}$  rend compte de la diffusion. Sous cette forme, le bilan traduit que la moitié de l'énergie diffusée dans le sens de  $F_z^+$ ,  $\frac{1}{2} \cdot ES \cdot \Delta z \cdot F_z^+$  est réfléchi dans la direction opposée  $F_z^-$ , et doit être comptée comme un terme d'entrée dans le bilan en  $F_z^-$ , et réciproquement.

En divisant par  $\Delta z$ , et en prenant la limite quand  $\Delta z$  tend vers 0, on obtient le système différentiel suivant:

$$\frac{dF_z^+}{dz} = -EA \cdot F_z^+ + \frac{1}{2} \cdot ES \cdot (F_z^- - F_z^+) \quad (4.37)$$

$$\frac{dF_z^-}{dz} = EA \cdot F_z^- + \frac{1}{2} \cdot ES \cdot (F_z^- - F_z^+) \quad (4.38)$$

Ce système peut être intégré facilement, si on donne les conditions aux limites. Un cas de figure qui nous intéresse particulièrement, puisqu'il correspond à certaines conditions expérimentales, est celui où la lumière entre par un seul côté

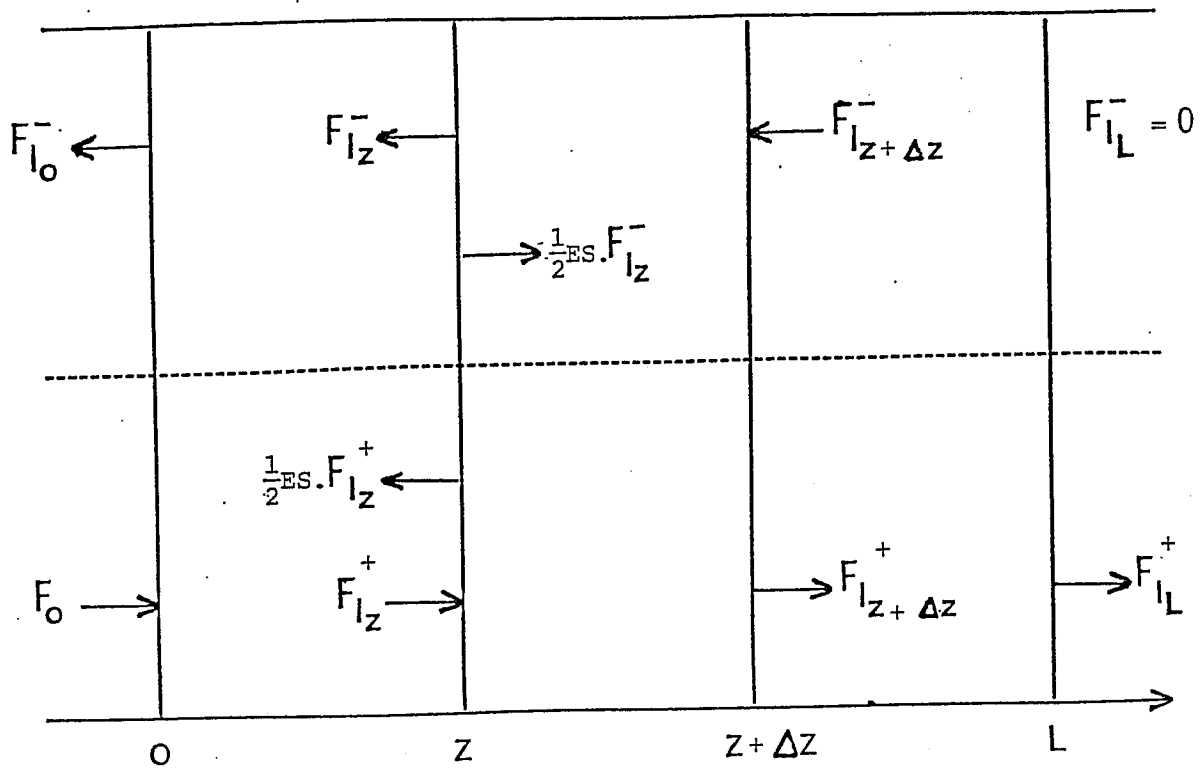


Figure 4.1: Bilan d'énergie radiante sur un volume élémentaire d'épaisseur  $\Delta z$ , pour les flux  $F_z^+$  et  $F_z^-$  (hypothèses de SCHUSTER, 1905).

dans le milieu. Si le trajet optique total est égal à  $L$ , les conditions aux limites sont alors les suivantes:

$$\begin{aligned} z = 0, & \quad F_z^+ = F_0 \\ z = L, & \quad F_z^- = 0 \end{aligned}$$

Dans ce cas, l'intégration du système conduit à:

$$\frac{F_z^+}{F_0} = \frac{(1+\alpha)^2 \cdot e^{-\delta(Z-1)} - (1-\alpha)^2 \cdot e^{\delta(Z-1)}}{(1+\alpha)^2 \cdot e^{\delta} - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (4.39)$$

$$\frac{F_z^-}{F_0} = \frac{(1-\alpha^2) \cdot [e^{-\delta(Z-1)} - e^{\delta(Z-1)}]}{(1+\alpha)^2 \cdot e^{\delta} - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (4.40)$$

Dans ces équations, on a posé:

$$\begin{aligned} \alpha &= [EA/(EA+ES)]^{1/2} \\ \delta &= L \cdot [EA \cdot (EA+ES)]^{1/2} \\ Z &= \frac{z}{L} \end{aligned}$$

On peut maintenant obtenir l'évolution du profil d'énergie radiante ou du profil d'énergie disponible. En effet, le flux

s'écrit:  $F_z = \vec{\parallel F_z \parallel} = F_z^+ - F_z^-$ , donc:

$$\frac{F_z}{F_0} = 2\alpha \cdot \frac{[(1+\alpha) \cdot e^{-\delta(Z-1)} + (1-\alpha) \cdot e^{\delta(Z-1)}]}{(1+\alpha)^2 \cdot e^{\delta} - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (4.41)$$

Nous avons également vu que la relation 4.26 permet de donner la vitesse locale d'absorption de l'énergie suivant:

$$A = 4\pi \cdot EA \cdot J$$

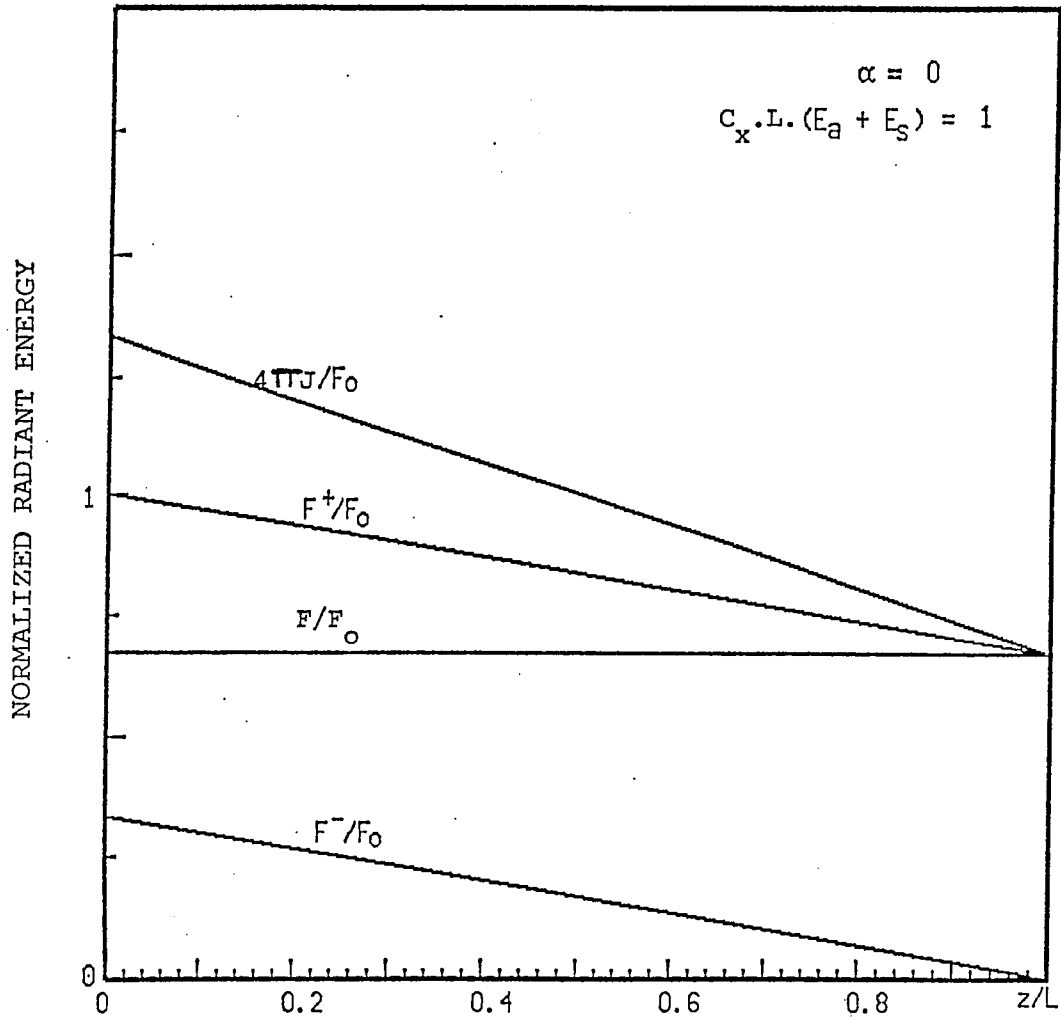


Figure 4.2a: Evolution des flux d'énergie radiante et de l'énergie lumineuse disponible en fonction de la longueur normalisée. Sur cette figure,  $E_a = \alpha = 0$ , le milieu n'absorbe pas la lumière mais la diffuse.

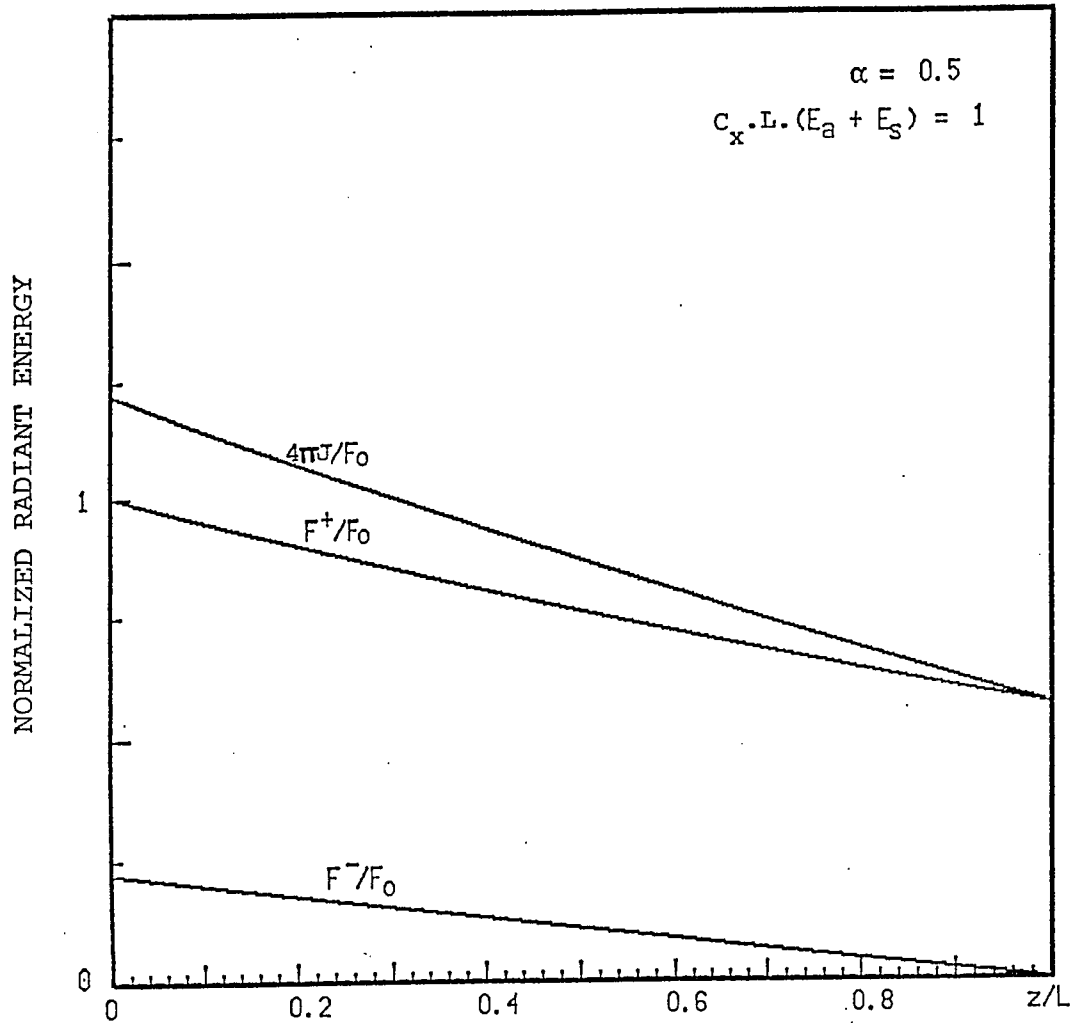


Figure 4.2b: Evolution des flux d'énergie radiante et de l'énergie lumineuse disponible en fonction de la longueur normalisée. Cette figure représente le cas général, c'est-à-dire que le milieu absorbe et diffuse la lumière.



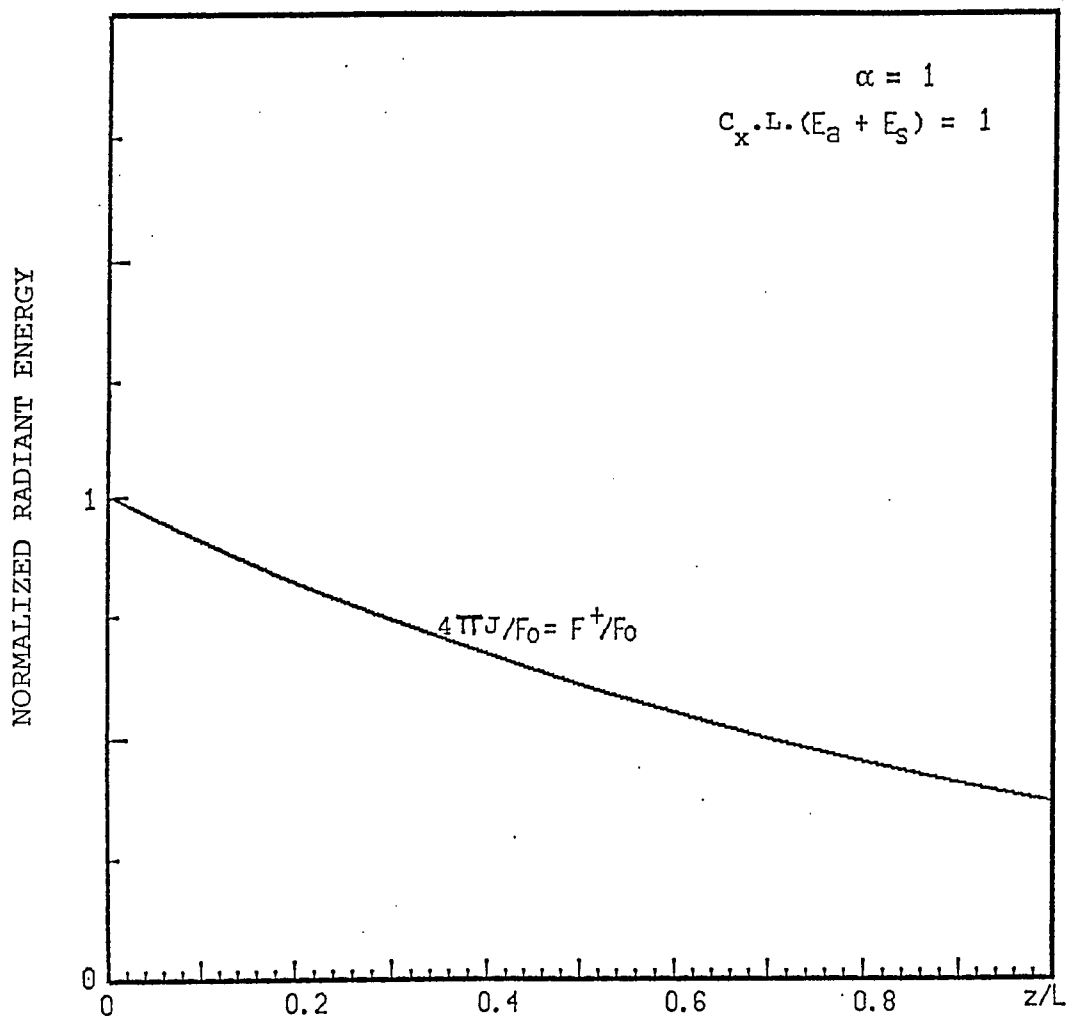


Figure 4.2c: Evolution des flux d'énergie radiante et de l'énergie lumineuse disponible en fonction de la longueur normalisée. Sur cette figure,  $E_s = 0$ , le milieu ne diffuse pas, tous les profils sont confondus.

en une dimension, le facteur  $4\pi.J_z$  représente bien l'énergie disponible à l'abscisse  $z$ , et comme on a  $F_z^+ + F_z^- = 4\pi.J_z$ , on en déduit:

$$\frac{4\pi J_z}{F_o} = 2 \cdot \frac{[(1+\alpha) \cdot e^{-\delta(Z-1)} - (1-\alpha) \cdot e^{\delta(Z-1)}]}{(1+\alpha)^2 \cdot e^{\delta} - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (4.42)$$

On remarquera que l'expression de la transmission à l'abscisse  $z=L$  est indépendante du choix des variables, flux  $F$  ou intensité moyenne  $J$ :

$$T = \frac{F_L}{F_o} = \frac{4\pi J_L}{F_o} = \frac{4\alpha}{(1+\alpha)^2 \cdot e^{\delta} - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \quad (4.43)$$

Les profils le long de l'axe  $z$  pour les rapports  $\frac{F_z^+}{F_o}$ ,  $\frac{F_z^-}{F_o}$ , et  $\frac{4\pi J_z}{F_o}$ , sont reportés sur les figures 4.2 a,b,c, pour  $\delta/\alpha = (EA+ES) \cdot L = 1$ , et pour trois valeurs de  $\alpha$ .

Pour  $\alpha = 0$  (figure 4.2a), il n'y a pas d'absorption et les profils sont linéaires: c'est le cas conservatif et toute l'énergie entrant dans le milieu en sort par transmission ou par réflexion.

Pour  $\alpha = 1$  (figure 4.2c), il n'y a pas de diffusion et les profils sont confondus en une exponentielle décroissante. On retrouve la loi de Lambert-Beer.

La figure 4.3 montre l'évolution suivant l'axe  $z$  de l'énergie disponible  $\frac{4\pi J_z}{F_o}$ , pour  $\alpha = 0,5$  et pour plusieurs valeurs du paramètre  $\delta$ , qui est proportionnel à la concentration en biomasse et à l'épaisseur du milieu.

La vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie dans le milieu, entre les deux plaques planes peut être obtenue

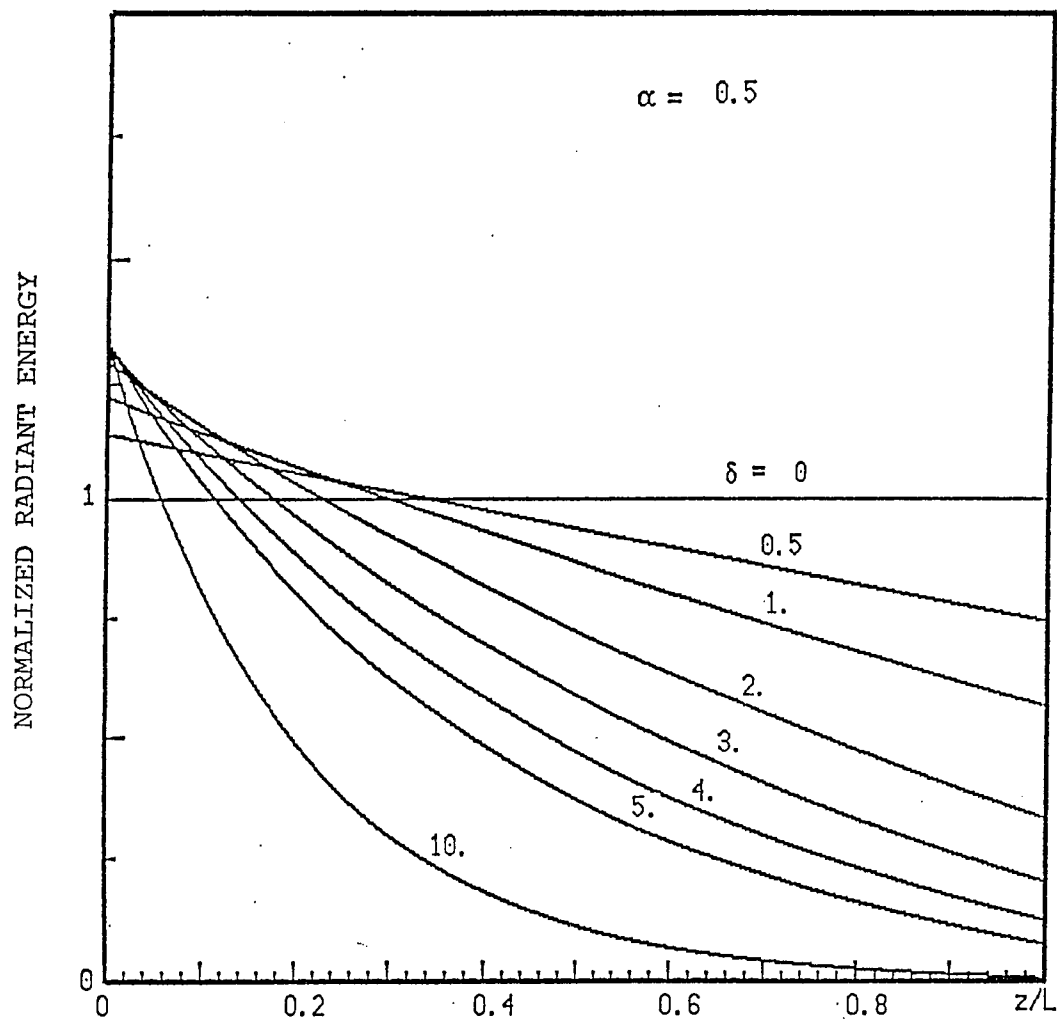


Figure 4.3: Profils d'énergie lumineuse disponible  $4\pi J/F_0$  en fonction de la longueur normalisée pour différentes valeurs du paramètre  $\delta$  qui est proportionnel à la concentration en biomasse dans le réacteur.

par plusieurs moyens. Conformément à l'équation 4.27, on peut écrire:

$$A = \frac{1}{L} \int_0^L A_z \cdot dz$$

et en combinant avec 4.26, on obtient la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie normalisée:

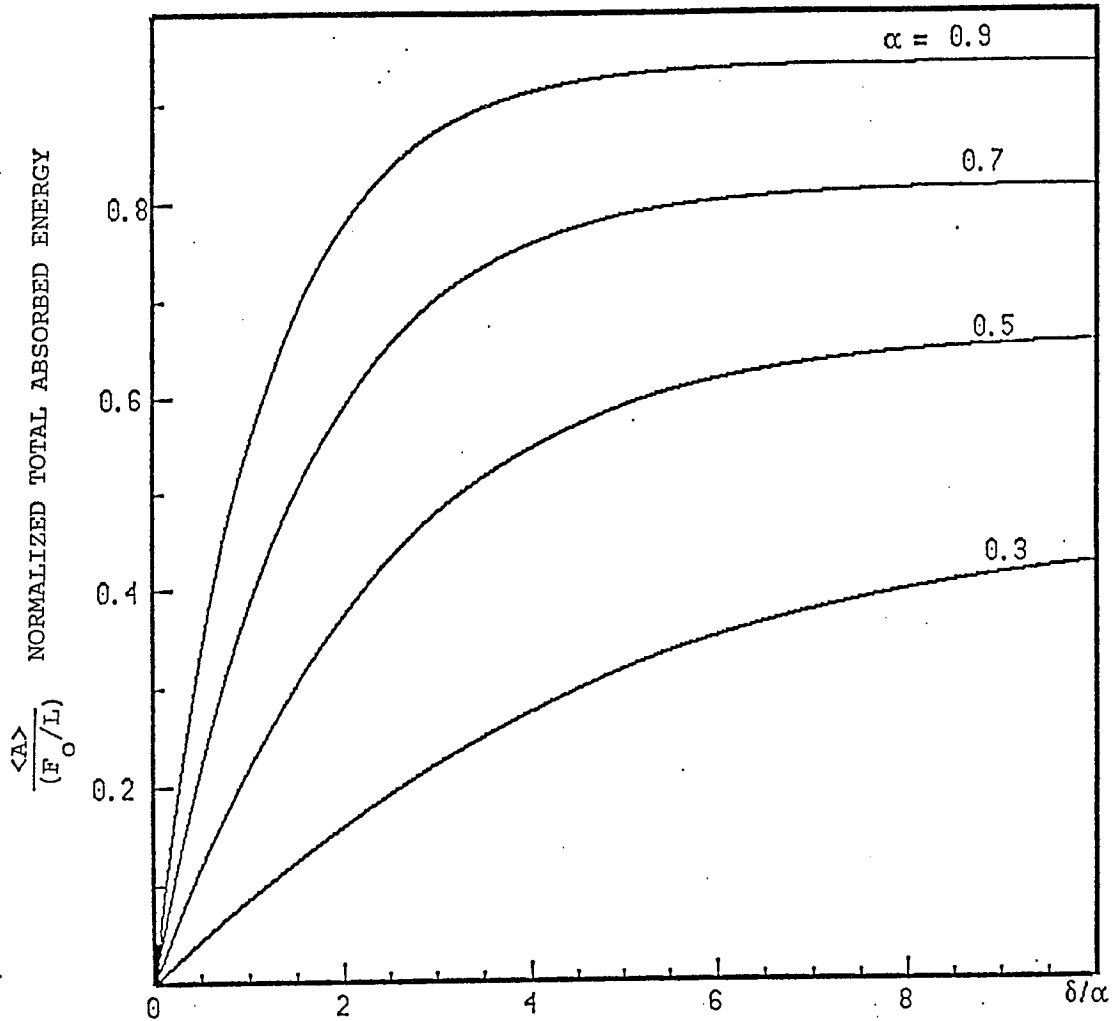
$$\frac{\langle A \rangle}{(F_0/L)} = \int_0^L 4\pi \cdot EA \cdot \frac{J_z}{F_0} \cdot dz \quad (4.44)$$

ce qui conduit à:

$$\frac{\langle A \rangle}{(F_0/L)} = 1 - \left[ \frac{4\alpha + (1-\alpha^2) \cdot (e^\delta - e^{-\delta})}{(1+\alpha)^2 \cdot e^\delta - (1-\alpha)^2 \cdot e^{-\delta}} \right] \quad (4.45)$$

Rappelons que la vitesse d'absorption de l'énergie est ici obtenue dans le cadre d'une approximation monodimensionnelle. La relation (4.45) prend en compte uniquement l'énergie perdue par réflexion, dans le sens opposé à l'axe z. L'approximation est donc d'autant meilleure que l'épaisseur L est faible.

La figure 4.4 présente l'évolution de l'énergie totale absorbée normalisée, en fonction du rapport  $\delta/\alpha$ , qui représente une quantité adimensionnelle proportionnelle à la biomasse. On remarque que la vitesse d'absorption de l'énergie atteint asymptotiquement un maximum quand la biomasse augmente, ce qui correspond à l'énergie totale disponible dans le réacteur, le reste ayant été diffusé vers l'extérieur. Ce résultat montre que les performances du réacteur sont rapidement limitées par l'énergie utilisable lorsque la concentration en biomasse augmente.



**Figure 4.4:** Evolution de la vitesse volumétrique d'absorption de l'énergie dans le réacteur en fonction de la quantité  $\delta/\alpha$ , qui est proportionnelle à la concentration en biomasse. Le paramètre  $\alpha$  décroissant indique des caractéristiques de plus en plus diffusantes du milieu.

On peut facilement établir que la valeur asymptotique est donnée par:

$$\lim_{c_x, L \rightarrow \infty} \left[ \frac{\langle A \rangle}{(F_o/L)} \right] = \frac{2\alpha}{1+\alpha}$$

De même, si on effectue un développement de Taylor au voisinage de 0, on trouve:

$$\lim_{c_x, L \rightarrow 0} \left[ \frac{\langle A \rangle}{(F_o/L)} \right] = EA.L$$

On peut donc conclure que les approximations de SCHUSTER (1901), permettent d'établir des expressions analytiques qui rendent compte à la fois et indépendamment, des phénomènes d'absorption et de diffusion. Ces approximations demeurent intéressantes, même si certaines hypothèses ne sont pas vérifiées sur un photoréacteur. Il reste néanmoins la possibilité d'adapter au mieux les conditions expérimentales de façon à travailler avec ces expressions simples à manipuler.

#### C - BILAN D'ENERGIE LOCAL SUR UN PHOTOBIOREACTEUR:

Les équations locales sur la phase photonique développées dans le paragraphe précédent permettent, comme on l'a vu, d'explicitier le terme de vitesse d'absorption locale  $A$ . Nous sommes donc en mesure, si l'on couple les équations sur les deux phases, d'écrire le bilan d'énergie complet sur le photobioréacteur.

Si, comme nous l'avons fait jusqu'à présent, on néglige l'émission du milieu, le bilan se résume aux deux équations suivantes:

$$\begin{aligned}
 \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} \frac{\partial}{\partial t} u(\lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda &= - \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} (\vec{u} \cdot \vec{g} \text{grad}) \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda \\
 &\quad - [Ea(\lambda) + Es(\lambda)] \cdot C_X \cdot \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda \\
 + \frac{Es(\lambda) \cdot C_X}{4\pi} \cdot \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} \iint_{4\pi} p(\vec{u}, \vec{u}') \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}', \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda \cdot d\omega' &\quad (4.46)
 \end{aligned}$$

et:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial}{\partial t} \rho \dot{U} &= - \text{div} (\rho \dot{U} \cdot \vec{v}) - \text{div} \vec{q} - P \cdot \text{div} \vec{v} - \vec{\tau} : \overrightarrow{\text{grad}} \vec{v} \\
 - \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} \frac{\partial}{\partial t} u(\lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda &- \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} (\vec{u} \cdot \vec{g} \text{grad}) \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda \quad (4.47)
 \end{aligned}$$

#### D - BILANS D'ENERGIE GLOBAUX SUR UN PHOTOBIOREACTEUR:

On peut obtenir les bilans globaux, ou bilans macroscopiques, sur le réacteur, à partir d'une intégrale spatiale portant sur les équations locales que nous venons d'exposer. Nous passerons à nouveau sous silence le détail des calculs qui sont développés en annexe 1, ainsi qu'une deuxième approche possible, par bilan direct.

##### - Bilan enthalpique:

L'intégration de l'équation 4.47 conduit au bilan macroscopique d'énergie totale sur le réacteur. Les énergies cinétique et potentielle sont souvent négligeables dans de nombreuses applications. Par soustraction, on obtient alors le bilan spatial d'énergie interne:

$$\frac{dU}{dt} = - \Delta[(\dot{U} + P\dot{V}).w] + Q - W + \iiint_V (\mathcal{A} - \mathcal{E}).dV \quad (4.48)$$

Les notations ont déjà été définies précédemment. Précisons que  $Q$  et  $W$  sont respectivement les débits de chaleur et de travail,  $\Delta$  est l'opérateur (sortie-entrée). Par ailleurs,  $U$  est l'énergie interne et on a posé:

$$U = \iiint_V \rho \dot{U}.dV$$

En régime stationnaire, toutes les grandeurs extensives du système sont constantes en tout point, et l'accumulation est nulle. Si d'autre part on remarque que le terme  $\dot{U} + P\dot{V}$  n'est autre que l'enthalpie par unité de masse  $\dot{H}$ , on obtient le bilan enthalpique:

$$\Delta[\dot{H}.w] = Q - W + \iiint_V (\mathcal{A} - \mathcal{E}).dV \quad (4.49)$$

Précisons que lorsqu'on a un mélange de corps, on définit l'enthalpie partielle massique de la substance  $i$ :

$$\dot{H}_i = \left( \frac{\partial H}{\partial m_i} \right)_{P, T, m_j}$$

L'enthalpie de la phase dépend alors de la pression, de la température, et de toutes les masses  $m_i$  des différents corps  $i$  qui la composent, ce qui s'écrit:

$$dH = \left( \frac{\partial H}{\partial P} \right)_{T, m_i}.dP + \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_{P, m_i}.dT + \sum_i \left[ \left( \frac{\partial H}{\partial m_i} \right)_{P, T, m_j}.dm_i \right]$$

Par suite, on définit l'enthalpie partielle de la substance  $i$ :

$$H_i = \dot{H}_i.m_i, \text{ on a donc, } H = \sum_i H_i = \sum_i \dot{H}_i.m_i.$$



Pour un milieu diffusant, si on néglige l'émission, on écrira donc le bilan enthalpique:

$$\Delta \left[ \sum_i \dot{H}_i \cdot w_i \right] = Q - W + \iiint_V \mathcal{A} \cdot dV \quad (4.50)$$

- Bilan entropique:

Le bilan entropique revêt un double intérêt. D'une part il intervient dans l'optimisation exergetique du procédé, et d'autre part, appliqué au métabolisme des microorganismes, il est à la base des modèles biochimiquement structurés qui seront développés au chapitre 5.

Le bilan local d'entropie peut s'écrire (BIRD et al. 1960):

$$\rho \cdot \frac{DS}{Dt} = - \operatorname{div} \vec{S} + \sigma' \quad (4.51)$$

où  $\vec{S}$  est le vecteur flux d'entropie, et  $\sigma'$  la vitesse de production d'entropie par unité de volume.  $\sigma'$  est un terme de source qui englobe plusieurs phénomènes comme l'entropie de dissipation, l'entropie de conduction, et l'entropie liée aux phénomènes irréversibles (réaction chimique). Si l'on tient compte de la dissipation visqueuse et de la dissipation de la puissance mécanique, on a:

$$\sigma' = - \frac{1}{T} (\vec{\tau} : \operatorname{grad} \vec{v}) - \rho \cdot \frac{\dot{W}}{T} + \vec{q} \cdot \operatorname{grad} \frac{1}{T} + \rho \frac{dS_r}{dt} + \frac{1}{T} (\mathcal{A} - \mathcal{E})$$

Par intégration de cette équation locale, et en appliquant le théorème d'Ostrogradsky, on obtient le bilan spatial d'entropie. En négligeant le terme de dissipation visqueuse et le terme de conduction entre phases, le bilan s'écrit, en régime permanent, avec les notations utilisées pour le bilan enthalpique:

$$\Delta \left[ \sum_i \dot{S}_i \cdot w_i \right] = \frac{Q}{T} + V \cdot \langle \sigma' \rangle \quad (4.52)$$

$$\text{avec } \langle \sigma' \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V \left[ \rho \cdot \frac{\dot{W}}{T} + \frac{1}{T} (\mathcal{A} - \varepsilon) \right] \cdot dV$$

Enfin, si on veut appliquer le bilan précédent au métabolisme des microorganismes (voir chapitre 5), on peut expliciter le terme source, car on se trouve avec un système isotherme, isochore, non dissipatif, avec réaction chimique et absorbant la lumière. On a alors:

$$\langle \sigma' \rangle = \frac{1}{VT} \cdot \iiint_V \mathcal{A} \cdot dV - \frac{1}{T} \cdot \sum_i \mu_i \cdot \frac{r_i}{M_i} \quad (4.53)$$

La vitesse d'absorption de l'énergie  $\mathcal{A}$  est ici obtenue à partir de l'équation 4.26. Les  $\mu_i$  sont les potentiels chimiques. L'obtention du terme de réaction chimique sera développée lors de l'étude cinétique. A cette occasion, les bilans enthalpique et entropique devront être écrits en utilisant la formulation phénoménologique linéaire.

### 4.3. LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE CO<sub>2</sub>. BILANS GAZEUX.

#### 4.3.1. Transfert de CO<sub>2</sub> dans les milieux de culture complexes à pH alcalin:

Comme c'est le cas pour l'oxygène lors de cultures aérobies de bactéries, la vitesse de transfert du CO<sub>2</sub> entre la phase gazeuse et la phase liquide, peut devenir l'étape limitante dans les photobioréacteurs. Ce peut être le cas, notamment si la proportion de CO<sub>2</sub> dans le gaz qui alimente le réacteur ou si le coefficient de transfert sont faibles.

Cependant, il existe 3 différences fondamentales entre le transfert d'oxygène et le transfert de CO<sub>2</sub> dans les milieux de culture à pH alcalin.

- Avec le  $\text{CO}_2$ , le régime permanent est très difficile à atteindre, et contrairement à l'oxygène, on ne pourra que très rarement faire l'hypothèse d'un régime pseudo-permanent, même lorsque les microorganismes sont en limitation par le transfert.

- Tant que l'équilibre n'est pas atteint, c'est-à-dire lorsque l'on se trouve en régime instationnaire, il peut y avoir accélération du transfert par réaction chimique, surtout lorsque le coefficient de transfert est faible.

- Comme il semble bien établi que la source de carbone chez les cyanobactéries soit le bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  (voir le chapitre 3), il faut être capable de connaître son évolution dans le milieu. Ceci est obligatoire si l'on cherche à modéliser les cinétiques, et notamment si l'on étudie la limitation par la source de carbone. Les milieux de culture des cyanobactéries ayant des forces ioniques élevées, ils sont très loin des solutions électrolytiques idéales. C'est pourquoi il apparaît inévitable d'utiliser dans les équations de bilans, de vitesse, ou d'équilibre, des activités et non pas des concentrations. Cela suppose que les coefficients d'activités soient connus.

#### A - DIFFERENTS REGIMES DE TRANSFERT POUR LE $\text{CO}_2$ :

Le calcul qui suit a pour but de donner un ordre d'idée sur les dynamiques en jeu pour le transfert de  $\text{CO}_2$ , dans un milieu à pH élevé. Dans le cas d'un pH de 9,5, pour atteindre l'équilibre thermodynamique, il faut transférer à peu près 2000 fois la valeur de la concentration en  $\text{CO}_2$  à l'équilibre avec le gaz. Si on néglige la consommation par les microorganismes et si on suppose que le coefficient de transfert est infini, c'est-à-dire que tout le  $\text{CO}_2$  est transféré, on peut calculer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans le réacteur. A  $35^\circ\text{C}$ , la constante de Henry pour le  $\text{CO}_2$  est égale à 37 l.atm/mole, et si on suppose une aération de 0,2 v.v.m. (12 v.v.h.), et une fraction molaire en  $\text{CO}_2$  dans le gaz à l'équilibre  $y^*$ , le calcul est le suivant:

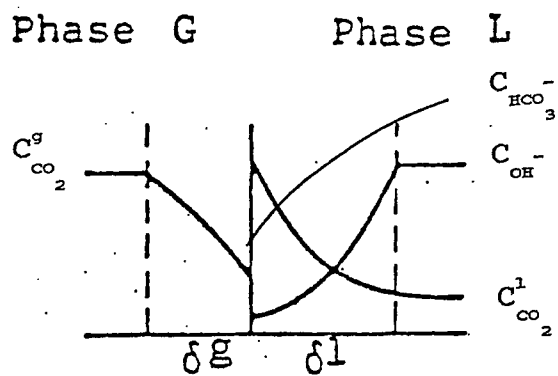
$$t = \frac{2000 \cdot y^*/37}{y^* \cdot 1,013 \cdot 10^5 \cdot 12/8,32/1000/308} \approx 120 \text{ heures}$$

Lors des cultures pour l'étude du transfert de  $\text{CO}_2$ , le débit était de 0,02 v.v.m. Le temps minimum pour atteindre l'équilibre est dans ce cas 1200 heures. Il apparait donc clairement que les dynamiques de mise à l'équilibre sont extrêmement lentes. Or un régime permanent sur le  $\text{CO}_2$  ne peut pas s'établir tant que l'équilibre n'est pas atteint.

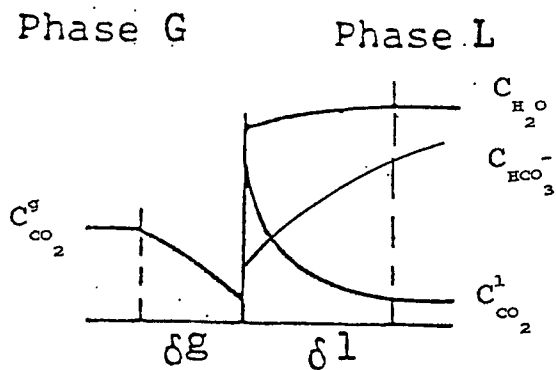
Ce résultat montre bien que le régime de transfert dominant est un régime instationnaire concernant les espèces  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ .

Dans la plupart des cas, la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu est très différente de la concentration à l'équilibre  $C^*$ . Elle peut être supérieure, de telle sorte que le transfert de  $\text{CO}_2$  se fait du liquide vers le gaz, ce qui exclut une possible limitation par le transfert pour les microorganismes, et l'accumulation en carbone total dissous est alors négative. Elle peut être très inférieure, soit que les microorganismes sont en limitation, soit que la réaction avec les bicarbonates accélère le transfert. Comme on le verra dans le paragraphe suivant, cette réaction a lieu à vitesse modérée, et se passe donc à la fois dans le film liquide et au sein de la phase liquide. Quoiqu'il en soit, les résultats ont montré (voir chapitre 3 et 5) que même lors d'une limitation par le transfert, le processus reste complexe et instationnaire et il est impossible de le simplifier comme dans le cas du transfert d'oxygène.

Un régime pseudo-permanent est néanmoins possible, soit parce que l'on maintient très longtemps les mêmes conditions d'aération et de vitesse de croissance (culture continue) - on atteint alors l'équilibre thermodynamique dans la phase liquide - soit parce que l'on adapte volontairement la teneur en  $\text{CO}_2$  dans le gaz pour



(a)



(b)

**Figure 4.5:** Schéma représentant la théorie du double film de Lewis pour l'étude du transfert gaz-liquide de  $\text{CO}_2$ , avec réaction chimique:

- a- faible concentration du réactif;
- b- concentration en réactif élevée.

établir un régime permanent. Ce dernier cas se réalise notamment lors du contrôle du pH dans les fioles de Roux par modification de la teneur en  $\text{CO}_2$ . Dans ce cas, la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous est proche de la concentration à saturation  $C^*$ , et on peut négliger l'accumulation sur la phase liquide. La vitesse de photosynthèse est alors donnée par:

$$r'_{\text{CO}_2} = k_1 \cdot a \cdot (C^*_{\text{CO}_2} - C_{\text{CO}_2})$$

Les microorganismes ajustent eux mêmes le potentiel  $(C^* - C)$  en fonction du coefficient volumétrique de transfert  $k_1 \cdot a$ . Le transfert se fait par diffusion physique simple dans le film où la réaction est instantanément équilibrée.

#### B - ACCELERATION DU TRANSFERT PAR REACTION CHIMIQUE:

La mise en évidence de la possible accélération du transfert par réaction dans des milieux de culture à pH alcalin nécessite, d'une part une étude théorique sur le transfert de gaz avec réaction, et d'autre part une étude sur les vitesses de réaction des espèces intervenant dans la transformation du  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCO}_3^-$ .

##### - Etude théorique du transfert avec réaction:

Le modèle théorique adopté pour rendre compte des phénomènes de transfert entre phases sera le modèle du double film de Lewis (BIRD et al. 1960. Figure 4.5).

D'une façon générale, l'équation de continuité sur le constituant  $i$  dans la phase liquide s'écrit:

$$\text{div } C_i \cdot \vec{v} - D_{ij} \cdot \Delta C_i \pm r'_i + \frac{\partial C_i}{\partial t} = 0 \quad (4.54)$$

Le terme  $\text{div } C_i \cdot \vec{v}$  est un terme de transport qui est le plus souvent négligeable. En régime stationnaire, l'équation devient:

$$D_{ij} \cdot \Delta C_i \pm r'_i = 0 \quad (4.55)$$

Cette équation est théoriquement à résoudre pour chaque constituant  $i$  intervenant dans la réaction, c'est-à-dire  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , mais un modèle réactionnel simplifié sera adopté. Par exemple, pour le  $\text{CO}_2$ , on écrira, suivant la direction  $z$ :

$$\frac{\partial^2 C_{\text{CO}_2}}{\partial z^2} = -r'_{\text{CO}_2} \quad (4.56)$$

Le terme de réaction  $r'_{\text{CO}_2}$  peut prendre des formes différentes suivant le schéma réactionnel envisagé. Si on pose:

$r'_{\text{CO}_2} = k \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot C_{\text{H}_2\text{O}} \approx k_1 \cdot C_{\text{CO}_2}$ , la réaction est dite du pseudo premier ordre. Si  $r'_{\text{CO}_2} = k_2 \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot C_{\text{OH}^-}$ , la réaction est du second ordre.

Le flux de matière est quant à lui défini par:

$$N_{\text{CO}_2} |_{z=0, \delta} = -D_{\text{CO}_2} \cdot \frac{\partial C_{\text{CO}_2}}{\partial z} |_{z=0, \delta} \quad (4.57)$$

Pour l'obtenir, on peut intégrer une fois l'équation de continuité sur le  $\text{CO}_2$ . Mais on ne peut avoir une solution analytique que dans le cas d'une réaction du pseudo premier ordre, en régime permanent, avec une phase parfaitement agitée. Sinon, il faut recourir à une intégration numérique. Celle ci devient extrêmement coûteuse en temps de calcul si le régime est instationnaire, ou si la phase est en écoulement piston, car on doit alors résoudre un système aux dérivées partielles (équation 4.54). C'est pourquoi on préférera utiliser l'approximation dite de Hatta. Celle ci consiste à utiliser le nombre de Hatta dont l'expression apparaît lors de la résolution analytique du cas simple d'une réaction du pseudo premier ordre:

$$\text{Ha} = \frac{1}{k_1} \cdot (k \cdot D_{\text{CO}_2})^{1/2} \quad (4.58)$$

Le flux à l'interface est alors donné par:

$$N_{\text{co}_2} |_{z=0} = \frac{p_{\text{co}_2} - \frac{H_{\text{co}_2} \cdot C_{\text{co}_2}^\phi}{\text{ch}(\text{Ha})}}{\left(\frac{1}{k_g} + \frac{H_{\text{co}_2}}{k_l}\right) \cdot \frac{\text{th}(\text{Ha})}{\text{Ha}}} \quad (4.59)$$

où  $H$  est la constante de Henry.  $\phi$  désigne la phase, c'est-à-dire les abscisses supérieures à  $z=\delta$  qui est l'épaisseur du film.  $k_g$ , et  $k_l$  sont respectivement les coefficients de transfert dans le gaz et le liquide. L'accélération au transfert est alors définie par:

$$E = \frac{N_{\text{co}_2}^i \text{ avec réaction}}{N_{\text{co}_2}^i \text{ sans réaction}} \quad (4.60)$$

où  $i$  désigne l'interface gaz liquide à  $z=0$ .

A partir de 4.59, on peut écrire le flux à l'interface:

$$N_{\text{co}_2}^i = k_l \cdot \frac{\text{Ha}}{\text{th}(\text{Ha})} \cdot \left[ C_{\text{co}_2}^i - \frac{C_{\text{co}_2}^\phi}{\text{ch}(\text{Ha})} \right] \quad (4.61)$$

ce qui donne pour l'expression de l'accélération, après simplifications:

$$E = \frac{\frac{\text{Ha}}{\text{th}(\text{Ha})} \cdot \left(1 - \frac{N_3}{\text{ch}(\text{Ha})}\right)}{(1 - N_3)} \quad (4.62)$$

$$\text{avec } N_3 = \frac{C_{\text{co}_2}^\phi}{C_{\text{co}_2}^i}$$

Si la concentration en  $\text{CO}_2$  dans la phase est très faible



devant la concentration à l'interface, ce qui est le cas lorsqu'il y a accélération,  $N_3$  tend vers zéro et on retrouve une expression connue de E:

$$E \approx \frac{Ha}{\text{th}(Ha)} \quad (4.63)$$

Cette relation se simplifie encore dans deux cas extrêmes.

- Si le nombre de Hatta est inférieur à 0,3, l'accélération est proche de 1, et la résistance au transfert est purement physique.

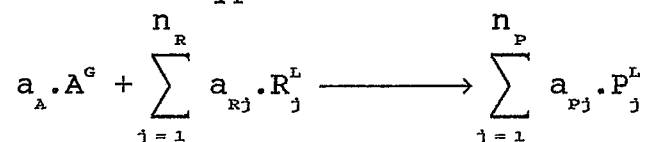
- Si le nombre de Hatta est supérieur à 3, le facteur d'accélération est à peu près égal au nombre de Hatta.

On considère qu'entre 0,3 et 3 pour le nombre de Hatta, la réaction a lieu dans le film et dans la phase, il y a accélération modérée. Entre 3 et 5, la réaction est rapide et a lieu uniquement dans le film, la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous est toujours voisine de zéro dans la phase. Enfin, au dessus de 5, la réaction est instantanée.

Pour les cinétiques plus complexes que les réactions du pseudo premier ordre, il n'existe plus de solution analytique à l'équation de continuité. On a alors recours à deux approches différentes conduisant à des solutions approchées, mais donnant des résultats sensiblement identiques.

DE LEYE et FROMENT (1986) proposent d'utiliser une expression généralisée du nombre de Hatta, en continuant à utiliser les expressions de l'accélération définies pour une réaction du pseudo premier ordre.

Pour une réaction du type:



avec une cinétique de la forme:  $r' = k \cdot C_A^{m_A} \cdot \prod_{j=1}^{n_R} C_{Rj}^{m_{Rj}}$ , le nombre de

Hatta généralisé s'écrit:

$$Ha = \frac{1}{k_{1,A}} \cdot \left[ \frac{2}{m_A + 1} \cdot a_A \cdot k_A \cdot C_A^{m_A - 1} \cdot \left[ \prod_{j=1}^n (C_{Rj}^\phi)^{m_{Rj}} \right] \cdot D_A \right]^{1/2} \quad (4.64)$$

A l'inverse, TRAMBOUZE et al. (1984), proposent une relation implicite pour l'accélération et un abaque correspondant, uniquement pour une réaction du deuxième ordre. Posons:

$$N_2 = \frac{D_{O_2} - C_{O_2}}{D_{CO_2} \cdot C_{CO_2}^*}$$

Si le rapport  $N_3$  est voisin de zéro, on obtient l'expression suivante pour l'accélération:

$$E \approx \frac{Ha \cdot \left[ 1 - \frac{(E-1)}{N_2} \right]^{1/2}}{\text{th} \left[ Ha \cdot \left[ 1 - \frac{(E-1)}{N_2} \right]^{1/2} \right]} \quad (4.65)$$

La figure 4.6 donne l'évolution de l'accélération en fonction du nombre de Hatta pour  $N_3 \approx 0$ , et  $N_2$  en paramètre. Notons que si  $N_3$  n'est pas voisin de zéro, ce qui est le cas pour les réactions lentes, l'accélération est égale à 1.

#### - Etude des vitesses de réaction et conclusions:

Les considérations précédentes permettent donc d'évaluer l'accélération du transfert par réaction, si l'on s'est fixé un schéma réactionnel sur le film et la phase côté liquide.

Entre pH 8 et 11, qui est la zone qui nous intéresse, il peut se produire 2 réactions de consommation du  $CO_2$ , susceptibles si elles sont assez rapides, d'accélérer le transfert. Rappelons tout d'abord que le  $CO_2$  dissous existe sous deux formes, le  $CO_2$  aqueux, et l'acide carbonique  $H_2CO_3$ , mais moins de 1% du  $CO_2$  dissous se

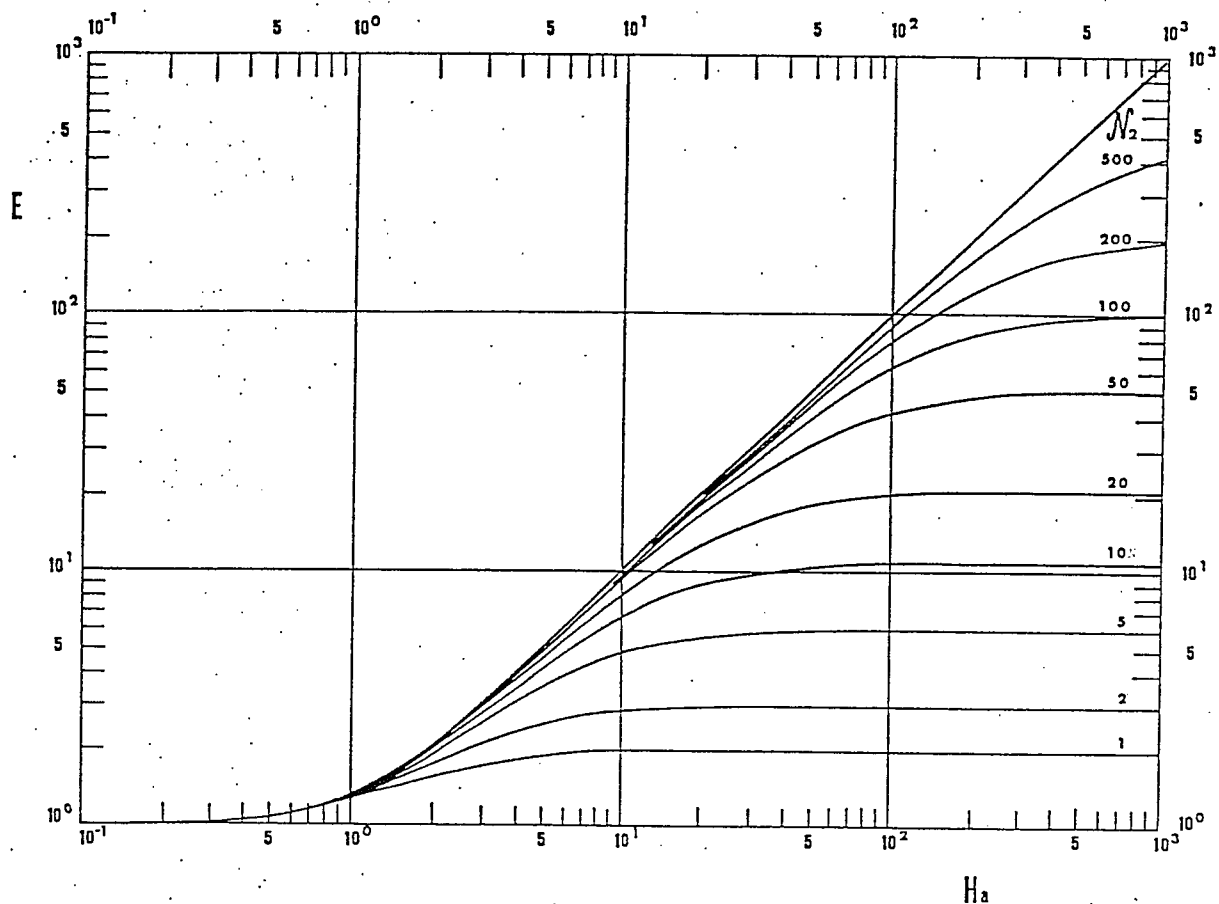
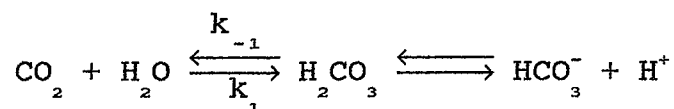


Figure 4.6: Valeurs du facteur d'accélération du transfert par réaction chimique en fonction du nombre de Hatta (d'après TRAMBOUZE et al. 1984).

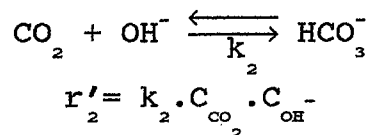
trouve sous la forme  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (SHERWOOD *et al.* 1975).

La première réaction qui intervient est la suivante (réaction 1):



la dissociation de l'acide carbonique en bicarbonate étant instantanée, la réaction globale est considérée comme du pseudo premier ordre:  $r'_1 = k_1 \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot C_{\text{H}_2\text{O}} \approx k_1 \cdot C_{\text{CO}_2}$ .

La deuxième réaction est une réaction du deuxième ordre (réaction 2):



Il apparait clairement que la première réaction ne dépend pas du pH, alors que la deuxième en dépend. L'importance relative des 2 réactions est donc fonction du pH. En réalité, la réaction 2 est beaucoup plus rapide, mais elle ne devient prépondérante qu'à pH élevé. Notons que si la phase liquide est voisine de la saturation, c'est-à-dire que la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous est proche de l'équilibre, les réactions deviennent équilibrées dans le film, et le transfert est alors purement physique.

Si l'on examine la vitesse totale de disparition du  $\text{CO}_2$ , qui est la somme des deux vitesses  $r'_1$  et  $r'_2$ , on s'aperçoit qu'à pH 8, la réaction 1 domine, mais à pH 10, la réaction 2 est prépondérante, et la réaction 1 devient négligeable.

Pour tenir un raisonnement valable entre pH 8 et 11, il faudra cependant tenir compte des deux réactions. Une analyse de la valeur des nombres de Hatta doit permettre de quantifier le phénomène d'accélération du transfert comme nous l'avons vu précédemment, bien que les calculs qui suivent ne soient qu'approchés, car ils ne tiennent pas compte de la force ionique.

		T = 25°C						T = 35°C					
		réaction 1			réaction 2			réaction 1			réaction 2		
		faible k <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> normaux	pH	faible k <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> normaux	pH	faible k <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> normaux	pH	faible k <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> normaux	
Accélération B Nombre de Hatta	0,16		0,015 - 0,04	8 9 9,5 10 11	0,08 0,28 0,48 0,8 2,6	0,008 - 0,02 0,03 - 0,07 0,05 - 0,12 0,08 - 0,2 0,26 - 0,65				8 9 9,5 10 11	0,12 0,4 0,7 1,2 3,7	0,01 - 0,03 0,04 - 0,1 0,07 - 0,17 0,12 - 0,3 0,37 - 0,93	
	1			8 9 9,5 10 11	1 1,08 1,2 2,63	1 1 1 1,1				8 9 9,5 10 11	1 1,05 1,16 1,44 3,7	1 1 1 1 1,3	
			1					0,2	0,02 - 0,05				

Tableau 4.1.1: Valeurs du nombre de Hatta et du facteur d'accélération du transfert pour les deux réactions considérées (voir texte), en fonction de la température et du pH.

Pour la réaction 1, le nombre de Hatta vaut:

$$Ha = \frac{1}{K_1} \cdot (k_1 \cdot D_{CO_2})^{1/2} \quad (4.66)$$

alors que pour la réaction 2, il est égal à:

$$Ha = \frac{1}{K_1} \cdot (k_2 \cdot C_{OH^-} \cdot D_{CO_2})^{1/2} \quad (4.67)$$

On remarque que le calcul du nombre de Hatta nécessite la connaissance du coefficient de transfert  $k_1$ . Le plus souvent, on accède expérimentalement au coefficient volumétrique de transfert  $k_1 \cdot a$ . Néanmoins, on considère que la diminution du produit  $k_1 \cdot a$  est surtout due à une diminution de la surface d'échange par unité de volume  $a$  (TRAMBOUZE *et al.* 1984). Notons également que plus le coefficient de transfert sera faible, plus grande sera l'accélération.

La surface d'échange par unité de volume  $a$  est généralement comprise entre 100 et 1000  $m^{-1}$ , les ordres de grandeur du coefficient de transfert sont  $2 \cdot 10^{-4}$  à  $5 \cdot 10^{-4}$   $m \cdot s^{-1}$  (TRAMBOUZE *et al.* 1984). Toutefois, dans certains cas où le transfert se fait mal (polysaccharides dans le milieu, faible aération), on peut avoir des valeurs n'excédant pas  $5 \cdot 10^{-5}$   $m \cdot s^{-1}$ .

Le tableau 4.1 donne les valeurs du nombre de Hatta et du facteur d'accélération calculé comme énoncé au paragraphe précédent, pour les valeurs de  $k_1$  discutées ci dessus, et en fonction du pH.

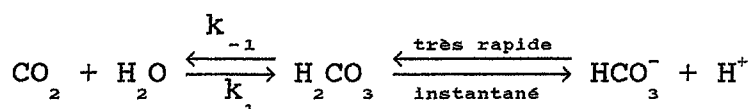
On constate qu'entre pH 8 et 10, la réaction est trop lente pour accélérer le transfert dans la plupart des cas. L'accélération est manifeste uniquement pour les faibles coefficients de transfert que l'on rencontrera seulement en situations extrêmes. A pH 11, l'accélération serait sensible, même pour des coefficients normaux, mais elle reste faible.

C - MODELE REACTIONNEL PROPOSE POUR L'ECRITURE DES BILANS  
MASSIOUES SUR LA PHASE LIQUIDE:

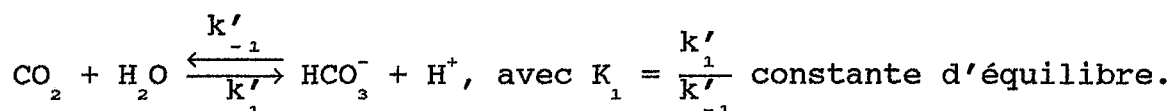
Le modèle réactionnel complet, traitant des équilibres en phase liquide relatifs aux 4 formes de carbone inorganique dissous, apparait relativement complexe. Comme il est à la base de l'établissement des équations de bilan matière en régime instationnaire, il semble donc légitime de chercher à le simplifier. En effet, une simplification à bon escient peut conduire à la réduction du système de 4 équations différentielles, à 2 équations différentielles et une équation algébrique, ceci sans porter atteinte à la précision avec laquelle on obtiendra les concentrations des différentes espèces.

Le modèle réactionnel que nous allons proposer s'appuie sur une abondante littérature concernant les cinétiques et les équilibres des espèces intervenant dans le carbone total dissous (KERN, 1960; GIBBONS et EDSALL, 1963; MAGID et TURBECK, 1968; DANCKWERT, 1970; GOLDMAN *et al.* 1974; GAVIS et FERGUSON, 1975; SCHNEIDER et FRISCHKNECHT, 1977; LEHMAN, 1978; HO *et al.* 1987).

La première simplification du modèle concerne l'acide carbonique. Considérons les équilibres suivants:

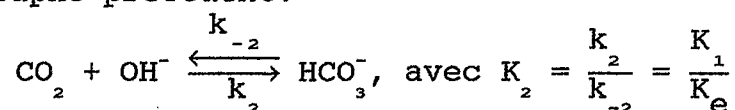


Nous avons déjà discuté de ces réactions dans le paragraphe traitant de l'accélération du transfert par réaction. En toute rigueur, on devrait écrire une équation de bilan sur  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , mais de nombreux auteurs considèrent que l'équilibre entre l'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$  et le bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  est instantané car la vitesse de réaction n'est pas mesurable (KERN, 1960; MAGID et TURBECK, 1968; GOLDMAN *et al.* 1974; SCHNEIDER et FRISCHKNECHT, 1977). On peut donc condenser cette première réaction de la façon suivante:

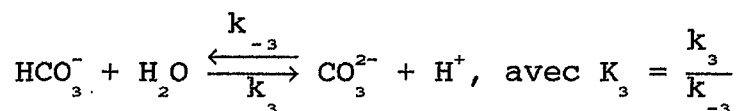


Comme la dissociation de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  est instantanée, on prendra comme valeur de  $k'_1$  celle de  $k_1$ . On a ensuite  $k'_{-1} = \frac{k'_1}{K_1}$ .

La deuxième réaction à considérer a également été abordée dans le paragraphe précédent:

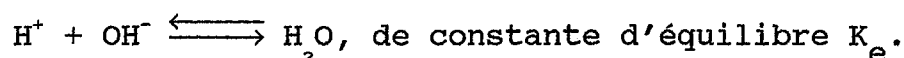


La troisième réaction est celle des carbonates et des bicarbonates:

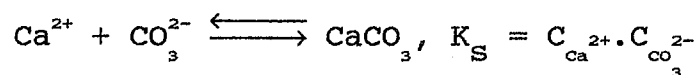


Cette réaction est souvent considérée comme instantanée, notamment par DANCKWERT (1970). Il ne sera donc pas nécessaire d'écrire une équation de bilan sur le carbonate, celui ci sera considéré comme étant toujours à l'équilibre par l'intermédiaire d'une équation algébrique.

Enfin, la quatrième réaction est triviale, et également instantanée; il s'agit de l'équilibre de dissociation de l'eau:



Précisons que si l'on ne travaille pas en milieu synthétique contenant des complexants ioniques, il faut tenir compte d'un cinquième équilibre, faisant intervenir le produit de solubilité du carbonate de calcium:





Pour pouvoir exploiter ce modèle réactionnel, il faut connaître les constantes de vitesse et d'équilibre qui interviennent, en fonction de la température. Toutes ces constantes sont fortement influencées par la force ionique du milieu qui peut être très élevée dans un photobioréacteur. En effet, ces constantes sont définies rigoureusement en activités et non en concentrations. Les milieux de culture sont toujours très loin des solutions idéales ou parfaitement diluées, aussi les équations de bilan devront faire intervenir les coefficients d'activité  $\gamma_i$ . L'écriture de ces équations fait l'objet du paragraphe suivant; nous donnons ici pour terminer les valeurs des constantes en fonction de la température.

SHERWOOD et al. (1975) fournissent les corrélations suivantes:

$$\log k_1 = 329,8 - 110,541 \cdot \log T - \frac{17265,4}{T}, \text{ avec } k_1 = k'_1.$$

$$\log k_2 = 13,635 - \frac{2895}{T}, \text{ avec } k_{-2} = \frac{k}{K_2^2}, \text{ et } K_2 = K_1 \cdot K_e.$$

EDWARDS et al. (1978) donnent les constantes d'équilibre en mole/kg:

$$\ln K_1 = \frac{-12092,1}{T} - 36,7816 \cdot \ln T + 235,482, \text{ et } k'_{-1} = \frac{k'}{K_1}.$$

$$\ln K_e = \frac{-13445,9}{T} - 22,4773 \cdot \ln T + 140,932.$$

$$\ln K_3 = \frac{-12431,7}{T} - 35,4819 \cdot \ln T + 220,067.$$

Dans ces corrélations, T est la température en Kelvin.

D - MODELE DIFFERENTIEL SUR LES PHASES GAZ ET LIQUIDE  
POUR LE SYSTEME  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-\text{-CO}_3^{2-}$ :

Comme nous l'avons déjà dit, les bilans différentiels sur chaque espèce doivent faire intervenir des activités par l'intermédiaire des constantes d'équilibre. Néanmoins, pour des raisons de clarté de présentation, nous allons d'abord établir puis discuter ces bilans en concentrations. Ces équations ont déjà été établies pour le modèle réactionnel complet, notamment par CURLESS (1986), et par ERICKSON *et al.* (1987).

Si l'on ne tient pas compte de l'instantanéité de la réaction 3, on peut écrire dans le cas général, c'est-à-dire sans faire d'hypothèse sur un procédé discontinu ou continu, les équations de bilan pour les espèces mises en jeu. A partir de notre modèle réactionnel, on a:

$$\frac{dC_{\text{CO}_2}}{dt} = E \cdot k_1 \cdot a \cdot (\text{He}_{\text{CO}_2} \cdot y_{\text{CO}_2}^* - C_{\text{CO}_2}) + (D \cdot C_{\text{CO}_2}^E - DC_{\text{CO}_2}^S) - k'_1 \cdot C_{\text{CO}_2} - k_2 \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot C_{\text{OH}^-} + k'_1 \cdot C_{\text{HCO}_3^-} \cdot C_{\text{H}^+} + k_{-2} \cdot C_{\text{HCO}_3^-} \quad (4.68)$$

$$\frac{dC_{\text{HCO}_3^-}}{dt} = (D \cdot C_{\text{HCO}_3^-}^E - DC_{\text{HCO}_3^-}^S) + k'_1 \cdot C_{\text{CO}_2} + k_2 \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot C_{\text{OH}^-} + k_{-3} \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}} \cdot C_{\text{H}^+} - k'_{-1} \cdot C_{\text{HCO}_3^-} \cdot C_{\text{H}^+} - k_3 \cdot C_{\text{HCO}_3^-} - k_{-2} \cdot C_{\text{HCO}_3^-} - \frac{Y_{\text{HCO}_3^-/X}}{M_{\text{HCO}_3^-}} \langle r_x \rangle \quad (4.69)$$

$$\frac{dC_{\text{CO}_3^{2-}}}{dt} = (D \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}}^E - D \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}}^S) + k_3 \cdot C_{\text{HCO}_3^-} - k_{-3} \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}} \cdot C_{\text{H}^+} \quad (4.70)$$

D est le taux de dilution du réacteur, et les exposants E et S indiquent les concentrations qui entrent et sortent du réacteur, y représente une fraction molaire.

Supposons maintenant l'équilibre 3 instantané,  $k_3$  et  $k_{-3}$  tendent vers l'infini; le rapport tend vers une limite finie  $K_3 = k_3/k_{-3}$ . Pour simplifier le système d'équations différentielles ci dessus, il faut exprimer la différence  $\Delta = k_3 \cdot C_{\text{HCO}_3^-} - k_{-3} \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}} \cdot C_{\text{H}^+}$ . C'est une différence entre deux termes infinis qui n'est pas nulle. Par ailleurs, on peut montrer que le rapport  $\frac{\Delta}{k_{-3}}$  vaut zéro, et comme  $k_{-3}$  tend vers l'infini,  $\Delta$  tend donc vers une limite finie. On peut alors ajouter les deux équations différentielles sur  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  et éliminer  $\Delta$ .

$$\frac{dC_{\text{HCO}_3^-}}{dt} + \frac{dC_{\text{CO}_3^{2-}}}{dt} = (D \cdot C_{\text{HCO}_3^-}^E - D \cdot C_{\text{HCO}_3^-}^S) + (D \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}}^E - D \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}}^S) + k'_1 \cdot C_{\text{CO}_2} - k'_{-1} \cdot C_{\text{HCO}_3^-} \cdot C_{\text{H}^+} + k_2 \cdot C_{\text{CO}_2} \cdot C_{\text{H}^+} - k_{-2} \cdot C_{\text{HCO}_3^-} - \frac{Y_{\text{HCO}_3^-/X}}{M_{\text{HCO}_3^-}} \langle r_X \rangle$$

Les termes en  $k_3$  et  $k_{-3}$  sont éliminés. En utilisant la relation d'équilibre  $K_3 \cdot C_{\text{HCO}_3^-} = C_{\text{CO}_3^{2-}} \cdot C_{\text{H}^+}$  et en la différenciant, on obtient:

$$\frac{dC_{\text{CO}_3^{2-}}}{dt} = \frac{K_3}{C_{\text{H}^+}} \cdot \frac{dC_{\text{HCO}_3^-}}{dt}, \text{ si } C_{\text{H}^+} \text{ est constante}$$

sinon:

$$\frac{dC_{\text{CO}_3^{2-}}}{dt} \cdot C_{\text{H}^+} + \frac{dC_{\text{H}^+}}{dt} \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}} = K_3 \cdot \frac{dC_{\text{HCO}_3^-}}{dt}$$

Il faudra alors une équation différentielle sur  $\text{H}^+$ . Quoiqu'il en soit, l'équation en  $\frac{dC_{\text{CO}_3^{2-}}}{dt} + \frac{dC_{\text{HCO}_3^-}}{dt}$  doit être ramenée à une équation sur  $\frac{dC_{\text{HCO}_3^-}}{dt}$ , l'évolution de  $C_{\text{CO}_3^{2-}}$  est alors calculée par la relation d'équilibre.

Dans le cas où  $C_H^+$  est constant, on a :

$$\frac{dC_{HCO_3^-}}{dt} + \frac{dC_{CO_3^{2-}}}{dt} = \left(1 + \frac{K_3}{C_H^+}\right) \cdot \frac{dC_{HCO_3^-}}{dt}$$

Les deux dernières équations du système deviennent dans ce cas :

$$\begin{aligned} \frac{dC_{HCO_3^-}}{dt} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_3}{C_H^+}\right)} & \left[ (D \cdot C_{HCO_3^-}^E - D \cdot C_{HCO_3^-}^S) + (D \cdot C_{CO_3^{2-}}^E - D \cdot C_{CO_3^{2-}}^S) \right. \\ & \left. + k'_1 \cdot C_{CO_2} - k'_{-1} \cdot C_{HCO_3^-} \cdot C_H^+ + k_2 \cdot C_{CO_2} \cdot C_H^+ - k_{-2} \cdot C_{HCO_3^-} - \frac{Y_{HCO_3^-/X}}{M_{HCO_3^-}} \langle r_X \rangle \right] \end{aligned} \quad (4.71)$$

$$C_{CO_3^{2-}} = \frac{K_3}{C_H^+} \cdot C_{HCO_3^-} \quad (4.72)$$

On peut alors calculer *a posteriori* la différence  $\Delta$ . Tous calculs faits, on obtient :

$$\begin{aligned} \Delta = \frac{-K_3/C_H^+}{1 + K_3/C_H^+} & \left[ k'_1 \cdot C_{CO_2} - k'_{-1} \cdot C_{HCO_3^-} \cdot C_H^+ + k_2 \cdot C_{CO_2} \cdot C_H^+ \right. \\ & \left. - k_{-2} \cdot C_{HCO_3^-} - \frac{Y_{HCO_3^-/X}}{M_{HCO_3^-}} \langle r_X \rangle \right] \end{aligned} \quad (4.73)$$

expression qui ne dépend pas des termes d'entrée-sortie.

Nous pouvons maintenant exprimer les équations 4.68-4.70 en activités pour obtenir un système exploitable. Néanmoins, dans le domaine des procédés biologiques, il est plus courant de travailler en concentrations, notamment lorsqu'on considère l'effet de molécules sur des vitesses de croissance. Pour cela, les résultats seront convertis en concentrations après avoir été

calculés en activités.

On rappelle que l'activité du corps  $i$  s'écrit:

$$a_i = \gamma_i \cdot C_i \quad (4.74)$$

Les équations 4.68, 4.71, 4.72, s'écrivent donc en calculant les concentrations à partir des constantes d'équilibre écrites en activités:

$$C_{CO_2} = \frac{1}{\gamma_{CO_2}} \left[ \frac{a_{HCO_3^-} \cdot a_{H^+}}{K_1} \right] \quad (4.75)$$

$$C_{HCO_3^-} = \frac{1}{\gamma_{HCO_3^-}} \left[ \frac{K_e}{K_1} \cdot a_{CO_2} \cdot a_{OH^-} \right] \quad (4.76)$$

$$C_{CO_3^{2-}} = \frac{1}{\gamma_{CO_3^{2-}}} \left[ \frac{K_3}{a_{H^+}} \cdot a_{HCO_3^-} \right] \quad (4.77)$$

Le système général obtenu peut se simplifier encore pour certaines applications. Si on l'applique sur un réacteur discontinu, le taux de dilution  $D$  est égal à zéro. De plus, si on atteint un régime pseudo permanent, le terme d'accumulation en  $\frac{d}{dt}$  tend vers zéro, et peut être négligé. Notons cependant que l'alternance entre un régime différentiel et un régime pseudo permanent, est de nature à poser des problèmes numériques au solveur, lorsque les dérivées deviennent petites.

L'obtention des coefficients d'activité sera détaillée dans le paragraphe 4.3.3.

Pour compléter le modèle mathématique, il faut écrire le bilan sur le  $CO_2$  en phase gazeuse. Aux concentrations utilisées dans le gaz, le coefficient de fugacité vaut 1, et l'équation s'écrit:

$$\frac{P.V}{R.T} \frac{dy_{CO_2}}{dt} = - E.k_1.a.V.(He_{CO_2} \cdot \gamma_{CO_2} \cdot y_{CO_2}^* - a_{CO_2}) + y_{CO_2}^E \cdot G^E - y_{CO_2}^S \cdot G^S \quad (4.78)$$

où G est le débit molaire total du gaz.

#### 4.3.2. Détermination de la vitesse volumétrique de production d'oxygène. Obtention du quotient photosynthétique par bilans gazeux:

La vitesse volumétrique de consommation du bicarbonate,  $r'_{\text{HCO}_3}$ , peut être déterminée expérimentalement si l'on dispose d'un analyseur différentiel à  $\text{CO}_2$ . En effet, cet appareil permet de réaliser un bilan gazeux entre l'entrée et la sortie du réacteur, et d'autre part, il permet de mesurer la concentration en  $\text{CO}_2$  à l'équilibre avec la phase gazeuse,  $C_{\text{CO}_2}^*$  ou la fraction  $y_{\text{CO}_2}^*$ . Ces données expérimentales sont nécessaires pour la résolution des équations 4.75-4.78.

La détermination de la vitesse volumétrique de production d'oxygène, nécessite de la même façon, l'utilisation d'un analyseur différentiel à oxygène. Cependant, si on ne dispose pas d'un tel appareil, on peut atteindre la vitesse  $r_{\text{O}_2}$  avec une sonde à pression partielle d'oxygène dissous, placée dans la phase liquide du réacteur. Pour cela, il faut que le signal de la sonde soit important pour diminuer l'erreur relative, ce qui implique un débit gazeux très faible.

Dans ce cas, les données de la sonde peuvent être exploitées pour conduire à la vitesse volumétrique de production d'oxygène, en écrivant les 3 bilans suivant:

##### - Bilan en oxygène sur la phase liquide:

$$\frac{dC_{\text{O}_2}}{dt} = k_1 \cdot a \cdot (C_{\text{O}_2}^* - C_{\text{O}_2}) + r'_{\text{O}_2} \quad (4.79)$$

En régime pseudo-permanent, on a:

$$k_1 \cdot a \cdot (C_{\text{O}_2}^* - C_{\text{O}_2}) = - r'_{\text{O}_2} \quad (4.80)$$

Notons que dans ce cas,  $r'_{O_2}$  est positive, et le potentiel  $(C^* - C)$  est négatif.

- Bilan en oxygène sur le gaz:

Il s'écrit:

$$\frac{P.V_g}{RT.V_1} \cdot \frac{dy_{O_2}}{dt} = \frac{G^E}{V_1} \cdot y_{O_2}^E - \frac{G^S}{V_1} \cdot y_{O_2}^S - k_1 \cdot a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (4.81)$$

et si le gaz est parfaitement agité:  $C_{O_2}^* = He_{O_2} \cdot y_{O_2}^S$ .

- Bilan global sur le gaz:

$$G^E - G^S = (r'_{CO_2} - r'_{O_2}) \cdot V_1 \quad (4.82)$$

ou encore:

$$\frac{G^S}{V_1} = \frac{G^E}{V_1} + (r_{O_2} - r_{CO_2}) \quad (4.83)$$

Le cas général demande la résolution des équations 4.79, 4.81, 4.83, qui ne présentent pas de solution analytique. Néanmoins, si on néglige l'accumulation en oxygène sur le liquide et sur le gaz, on peut obtenir une solution analytique dans deux cas particuliers.

La première hypothèse consiste à supposer que la concentration en oxygène dissous est égale à la concentration en équilibre avec le gaz, ou autrement dit, que le coefficient volumétrique de transfert est infini. Dans ce cas,  $C_{O_2} \approx He_{O_2} \cdot y_{O_2}^S$ , et l'équation 4.81 permet d'écrire:

$$r'_{O_2} = \frac{G^S}{V_1} \cdot \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} - \frac{G^E}{V_1} \cdot y_{O_2}^E$$



Le bilan global 4.83 conduit à:

$$r'_{O_2} = \frac{G^E}{V_1} \cdot \left( \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} - y_{O_2}^E \right) - (r_{CO_2} - r_{O_2}) \cdot \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} \quad (4.84)$$

et par suite:

$$r'_{O_2} = \frac{1}{\left(1 - \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}}\right)} \left[ \frac{G^E}{V_1} \cdot \left( \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} - y_{O_2}^E \right) - r_{CO_2} \cdot \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} \right] \quad (4.85)$$

La deuxième approche permet de déterminer la vitesse volumétrique de production d'oxygène sans approximation autre que le régime pseudo-permanent, mais il faut connaître le coefficient volumétrique de transfert avec une bonne précision.

L'équation 4.79 conduit alors à:

$$y_{O_2}^S = \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} - \frac{r'_{O_2}}{He_{O_2} \cdot k_1 \cdot a}$$

De plus, l'équation 4.84, prise dans le cas général, devient, avec l'équation ci dessus, et après avoir rassemblé les termes:

$$\frac{r_{O_2}'^2}{k_1 \cdot a \cdot He_{O_2}} + r'_{O_2} \cdot \left( 1 + \frac{G^E}{V_1} \cdot \frac{1}{k_1 \cdot a \cdot He_{O_2}} - \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} - \frac{r'_{CO_2}}{He_{O_2} \cdot k_1 \cdot a} \right) - \frac{G^E}{V_1} \cdot \left( \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} - y_{O_2}^E \right) + r'_{CO_2} \cdot \frac{C_{O_2}}{He_{O_2}} = 0 \quad (4.86)$$

Il s'agit d'une équation du deuxième degré en  $r'_{O_2}$  qui nécessite la connaissance de la vitesse  $r'_{CO_2}$ . Notons que si la vitesse de disparition du  $CO_2$  n'est pas égale à la vitesse de

consommation du bicarbonate, ce qui est le cas général en raison des accumulations en phase liquide, l'équation 4.86 reste valable en remplaçant la vitesse  $r'_{\text{CO}_2}$  par  $r'_{\text{HCO}_3^-}$ .

Compte tenu de ce qui vient d'être dit, on peut maintenant définir le quotient photosynthétique. Pour des microorganismes dont la source de carbone est le bicarbonate, ce quotient est défini par:

$$Q_p = \frac{r'_{\text{O}_2}}{r'_{\text{HCO}_3^-}} \quad (4.87)$$

Les valeurs expérimentales obtenues seront à comparer avec celles prévues par les stoechiométries. Il est important de noter que puisque la production d'oxygène est stoechiométrique avec la production de pouvoir réducteur, le quotient  $Q_p$  est aussi égal à:

$$Q_p = \frac{1}{2} \frac{r_{\text{NADPH+H}^+}}{r_{\text{HCO}_3^-}}$$

Cette remarque est à la base de la validation des bilans stoechiométriques en cofacteurs qui seront écrits lors de l'étude des modèles biochimiquement structurés (chapitre 5).

#### 4.3.3. Propriétés physico-chimiques relatives à l'oxygène et au système $\text{CO}_2$ - $\text{HCO}_3^-$ - $\text{CO}_3^{2-}$ dans les milieux de culture à force ionique élevée:

Les considérations théoriques développées dans le paragraphe 4.3, ont mis en évidence la nécessité de connaître un certain nombre de propriétés physico-chimiques et de données thermodynamiques, qui interviennent dans la modélisation mathématique. Il s'agit principalement des coefficients

volumétriques de transfert qui seront étudiés au paragraphe 4.4, des solubilités, et des coefficients d'activités.

Ces données sont en général bien connues quand le solvant est l'eau pure, mais deviennent très difficiles à obtenir dans les milieux de cultures complexes. Nous présentons ici, une façon de calculer les solubilités et les coefficients d'activité dans des milieux de cultures minéraux, propres aux microorganismes photosynthétiques, c'est-à-dire concentrés en électrolytes.

#### A - SOLUBILITE DE L'OXYGENE:

La solubilité de l'oxygène dans les milieux à force ionique élevée peut être obtenue au moyen d'une corrélation proposée par SCHUMPE *et al.* (1982). La concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture, en équilibre avec un gaz de concentration  $C^g$ , s'écrit:

$$C_{O_2}^* = \frac{C^g}{He_{O_2}} \quad (4.88)$$

où He est la constante de Henry.

Pour de faibles solubilités, ce qui est le cas de l'oxygène, le coefficient de Bunsen vaut:

$$\alpha = \frac{273,15}{T} \cdot \frac{1}{He} \quad (4.89)$$

Le coefficient de Bunsen de l'oxygène dans l'eau pure est donné, entre 0 et 50°C par:

$$\alpha_o = 4,9 \cdot 10^{-2} - 1,335 \cdot 10^{-3} \cdot t + 2,759 \cdot 10^{-5} \cdot t^2 - 3,235 \cdot 10^{-7} \cdot t^3 + 1,614 \cdot 10^{-9} \cdot t^4$$

où t est la température en degrés Celsius.

La corrélation proposée permet de calculer le coefficient de Bunsen  $\alpha$  dans une solution d'électrolytes par la relation:

$$\log \frac{\alpha^0}{\alpha} = \sum_i h_i \cdot I_i \quad (4.90)$$

où  $I_i$  est la contribution de l'ion  $i$  à la force ionique de la solution,  $I_i = \frac{1}{2} \cdot C_i \cdot Z_i^2$ .  $C_i$  est la concentration en kmoles par  $m^3$ . Les coefficients  $h_i$  sont donnés par la littérature en fonction de la température.

Un programme de calcul a été écrit sur le principe de cette corrélation, il permet d'évaluer la solubilité de l'oxygène dans le milieu de culture lorsque les concentrations ioniques varient.

#### B - SOLUBILITE DU CO<sub>2</sub> ET DETERMINATION DES COEFFICIENTS D'ACTIVITE DU SYSTEME CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>:

Les coefficients d'activité des espèces CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O, s'écartent fortement de 1 dans les milieux utilisés à force ionique élevée (la limite d'application de la théorie de Debye et Hückel nécessite une force ionique inférieure à 0,1 mole par litre). Il peuvent être estimés à partir d'une extension de la théorie de Pitzer pour des forces ioniques allant jusqu'à 6 moles par kilogramme, et entre 0 et 100°C.

Cette démarche a été proposée par EDWARDS et al. (1978). L'équilibre entre la phase gazeuse et liquide pour le CO<sub>2</sub> s'écrit:

$$Y_{CO_2} \cdot \Phi_{CO_2} \cdot P = m_{CO_2} \cdot \gamma_{CO_2} \cdot He_{CO_2} \quad (4.91)$$

$\Phi$  est le coefficient de fugacité. Pour nos applications celui ci vaut 1.  $\gamma$  est le coefficient d'activité, et  $m$  est la molalité en mole par kilogramme.

Hormis pour l'eau, les coefficients d'activité de chaque espèce s'obtiennent par:

$$\begin{aligned} \ln \gamma_i = & - A_\phi \cdot z_i^2 \left[ \frac{\sqrt{I}}{1 + 1,2 \cdot \sqrt{I}} + \frac{2}{1,2} \cdot \ln (1 + 1,2 \cdot \sqrt{I}) \right] \\ & + 2 \cdot \sum_{j \neq w} m_j \cdot \left\{ \beta_{ij}^0 + \frac{\beta_{ij}^1}{2I} \left[ 1 - (1 + 2 \cdot \sqrt{I}) \cdot \exp (-2 \cdot \sqrt{I}) \right] \right\} \\ & - \frac{z_i^2}{4I^2} \cdot \sum_{j \neq w} \sum_{k \neq w} m_j \cdot m_k \cdot \beta_{jk}^1 \cdot \left\{ 1 - (1 + 2 \cdot \sqrt{I} + 2I) \cdot \exp (-2 \cdot \sqrt{I}) \right\} \end{aligned} \quad (4.92)$$

où  $I = \frac{1}{2} \cdot \sum_j z_j^2 \cdot m_j$ , est la force ionique. Les coefficients  $\beta_{ij}^0$ , et  $\beta_{ij}^1$ , sont des coefficients d'interaction molécule-molécule, molécule-ion, ou ion-ion, qui sont donnés par la littérature pour le système qui nous intéresse (EDWARDS et al. 1978).

$A_\phi$  est donné, entre 0 et 100°C, par la relation:

$$A_\phi = \frac{1}{3} \left( \frac{2\pi \cdot N_o \cdot d}{1000} \right)^{1/2} \cdot e^3 \cdot (D \cdot k \cdot T)^{-1,5} \quad (4.93)$$

avec  $k = 1,38 \cdot 10^{-16}$ , et  $e = 4,802654 \cdot 10^{-10}$  eU.

L'activité de l'eau s'obtient quant à elle par l'équation de Gibbs-Duhem:

$$\begin{aligned} \ln a_w = & M_w \cdot \left\{ \frac{2 \cdot A_\phi \cdot I^{3/2}}{1 + 1,2 \cdot \sqrt{I}} \right. \\ & \left. - \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} m_i \cdot m_j \cdot \left[ \beta_{ij}^0 + \beta_{ij}^1 \cdot \exp (-2 \cdot \sqrt{I}) \right] \right\} - M_w \cdot \sum_{i \neq w} m_i \end{aligned} \quad (4.94)$$

Notons que généralement, la force ionique est une inconnue du système puisqu'elle se calcule à partir des molalités des espèces. On doit donc résoudre un système non linéaire. Un programme de calcul a été développé sur la base de ces équations. Il permet

d'obtenir la solubilité du  $\text{CO}_2$  et les coefficients d'activité de toutes les espèces impliquées, et ce, quelle que soit la force ionique du milieu de culture.

#### 4.4. HYDRODYNAMIQUE, PUISSANCE DISSIPÉE ET OBTENTION DES COEFFICIENTS VOLUMÉTRIQUES DE TRANSFERT DANS LES MILIEUX DE CULTURE NON NEWTONIENS.

Jusqu'à présent, nous avons abordé dans ce chapitre des aspects théoriques physiques qui sont destinés, comme nous l'avons dit, à être intégrés dans un modèle mathématique plus complexe, prenant en compte les phénomènes d'interactions physiques et biologiques.

Pour ces raisons essentiellement, et aussi parce que les aspects discutés ici seront repris dans le chapitre 5, ce chapitre ne contient que des résultats théoriques.

Néanmoins, ce paragraphe va aborder une partie plus technologique propre à l'hydrodynamique des cuves agitées aérées. Cette partie trouve sa justification dans le fait que, comme nous l'avons déjà dit, il est nécessaire de connaître avec une bonne précision les coefficients volumétriques de transfert, si l'on veut modéliser correctement les problèmes de transfert de gaz et de bilans gazeux. Cette détermination repose sur la connaissance des puissances dissipées par les mobiles d'agitation dans les réacteurs, en fonction des caractéristiques rhéologiques du milieu. Cette connaissance est également à la base du calcul des temps de mélange et de circulation du fluide dans le réacteur, ce qui présente un intérêt certain pour discuter les temps de passage des microorganismes à la lumière ou à l'obscurité.

On l'aura compris, cette partie quoique plus technologique, s'inscrit bien dans le chapitre traitant des problèmes physiques des photobioréacteurs, cependant, les aspects qui vont être développés ne seront pas repris plus loin, aussi avons nous décidé de donner ici les résultats expérimentaux relatifs aux

coefficients de transfert et aux temps de mélange.

**4.4.1. Puissance dissipée dans les cuves agitées aérées:**

La détermination de la puissance dissipée par les mobiles d'agitation est à la base du calcul des coefficients volumétriques de transfert et des temps de mélange dans le réacteur. Ces données peuvent être fortement modifiées si le milieu de culture est rendu pseudoplastique par la présence de polysaccharides. La première étape consiste donc à calculer le nombre de Reynolds d'agitation qui tient compte de ces phénomènes.

Si le milieu de culture est newtonien, le nombre de Reynolds d'agitation est donné par:

$$Re_a = \frac{N \cdot d^2 \cdot \rho}{\eta} \quad (4.95)$$

où  $N$  est la vitesse d'agitation,  $d$  le diamètre total du mobile d'agitation,  $\rho$  la masse volumique du fluide, et  $\eta$  sa viscosité.

Si le milieu est non newtonien, on utilise la relation donnée par SCHÜGERL (1981) et MOO-YOUNG et BLANCH (1981), pour obtenir la vitesse moyenne de déformation. Cela nécessite que l'on connaisse l'indice de consistance  $m$  et de pseudoplasticité  $n$  du polysaccharide en fonction de sa concentration (voir chapitre 3). On a alors:

$$\dot{\gamma} = 11 \cdot N \cdot \left[ \frac{3n + 1}{4n} \right]^{(\frac{n}{n-1})} \quad (4.96)$$

La viscosité apparente est alors donnée par:

$$\bar{\eta} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = m \cdot \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad (4.97)$$

et par suite, le nombre de Reynolds est:

$$Re_a = \frac{N \cdot d^2 \cdot \rho}{\bar{\eta}} \quad (4.98)$$

La deuxième étape réside dans le calcul de la puissance dissipée par un mobile d'agitation sans aération.

Dans tout le domaine des nombres de Reynolds, on peut utiliser la corrélation de NAGATA (1975) qui est très générale et s'établit pour chaque appareillage.

- Pour un réacteur sans chicane:

Le nombre de puissance est donné par:

$$N_p = \frac{P_o}{\rho \cdot N^3 \cdot d^5} = \frac{A}{Re_a} + B \cdot \left[ \frac{10^3 + 1,2 \cdot Re_a^{0,66}}{10^3 + 3,2 \cdot Re_a^{0,66}} \right]^p \quad (4.99)$$

avec pour notre appareillage:

$$A = 63,26$$

$$B = 3,715$$

$$p = 1,943$$

- Pour un réacteur avec chicanes:

Si le produit  $\frac{1}{D} \cdot n_b \geq 0,5$  (1 est la largeur d'une chicane, et  $n_b$  le nombre de chicanes), la puissance dissipée est maximale, et le nombre de puissance vaut:

$$N_{pmax} = \frac{A}{Re_a} + B \cdot \left( \frac{H}{D} \right)^{(0,35 + \frac{b}{D})} \quad (4.100)$$

où H est la hauteur utile de milieu dans le réacteur, et b est la hauteur d'une pale.

Sinon, on applique:

$$\frac{N_{pmax} - N_p}{N_{pmax} - N_{p\infty}} = \left[ 1 - 2,9 \cdot \left( \frac{1}{D} \right)^{1,2} \cdot n_b \right]^2 \quad (4.101)$$

$$\text{avec } N_{p\infty} = B \cdot \left( \frac{0,6}{1,6} \right)^p$$

Cette corrélation s'établit quel que soit le type de mobile



d'agitation. Elle présente néanmoins un inconvénient pour les turbines de type Rushton dans la zone de transition et en régime turbulent (à partir de  $Re_a = 100$ ), car elle ne prend pas en compte l'augmentation du nombre de puissance dans ces zones, spécifique des turbines. On préférera donc utiliser deux corrélations différentes dans la zone de transition et dans la zone turbulente.

- Pour  $30 \leq Re_a < 10^4$ :

On utilisera une corrélation déduite des résultats de SCHÜGERL (1981):

$$\ln N_p = 0,0895 \cdot \ln \frac{Re_a}{30} + 1,163 \quad (4.102)$$

Cette corrélation prend en compte l'écart de puissance dissipée constaté dans la zone de  $30 < Re_a < 100$ , entre des fluides newtoniens et pseudoplastiques.

- Pour  $Re_a$  turbulent  $\geq 10^4$ :

On applique la corrélation de Richards modifiée par MIDOUX (1978):

$$N_p = 340 \cdot \left(\frac{b}{D}\right) \cdot \left(\frac{C}{D}\right)^{1,5} \cdot \left(\frac{1}{D}\right)^{0,3} \cdot \left(\frac{n}{6}\right)^{0,8} \cdot \left(\frac{n}{4}\right)^{0,4} \quad (4.103)$$

$c$  est la largeur d'une pale, et  $n_p$ , le nombre de pâles.

Enfin, on peut calculer le nombre de puissance en milieu aéré. Pour cela, la corrélation de Miller et Mitchell modifiée par MIDOUX (1978) semble très mal adaptée pour les faibles débits. On préférera la corrélation de NAGATA (1975) modifiée:

$$\log \frac{P_g}{P_o} = - 260 \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{4,38} \cdot (Re_a)^{0,115} \cdot \left(\frac{N^2 \cdot d}{g}\right)^{1,96 \left(\frac{d}{D}\right)} \cdot \left(\frac{G}{N \cdot d^3}\right) \quad (4.104)$$

ou la corrélation proposée par ROUSTAN (1978), qui donne d'ailleurs les mêmes résultats:

$$1 - \left(\frac{P}{P_0}\right) = 133,2 \cdot \frac{v_s}{\sqrt{g \cdot D}} \quad (4.105)$$

La puissance totale dissipée par deux mobiles est facile à obtenir, car les puissances sont additives:  $P_{TOT} = 2 \cdot P_g$ .

#### 4.4.2. Temps de mélange et de circulation dans les cuves agitées:

La connaissance du nombre de puissance permet de calculer le temps de mélange dans le réacteur, et par suite, le temps de circulation pour chaque turbine. NAGATA (1975), propose une corrélation pour un régime turbulent, à partir du nombre de pompage  $N_q$ . Si on connaît le nombre de puissance, on peut obtenir le nombre de pompage par:

$$\frac{N_p}{N_q} = 1,83 \cdot \sqrt{n_p} \cdot \left(\frac{d}{D} + 0,6\right)^3 \cdot \left[0,55 + 5 \cdot \left(\frac{d}{D}\right)\right]^{0,4} \quad (4.106)$$

Le temps de mélange se calcule ensuite par la relation:

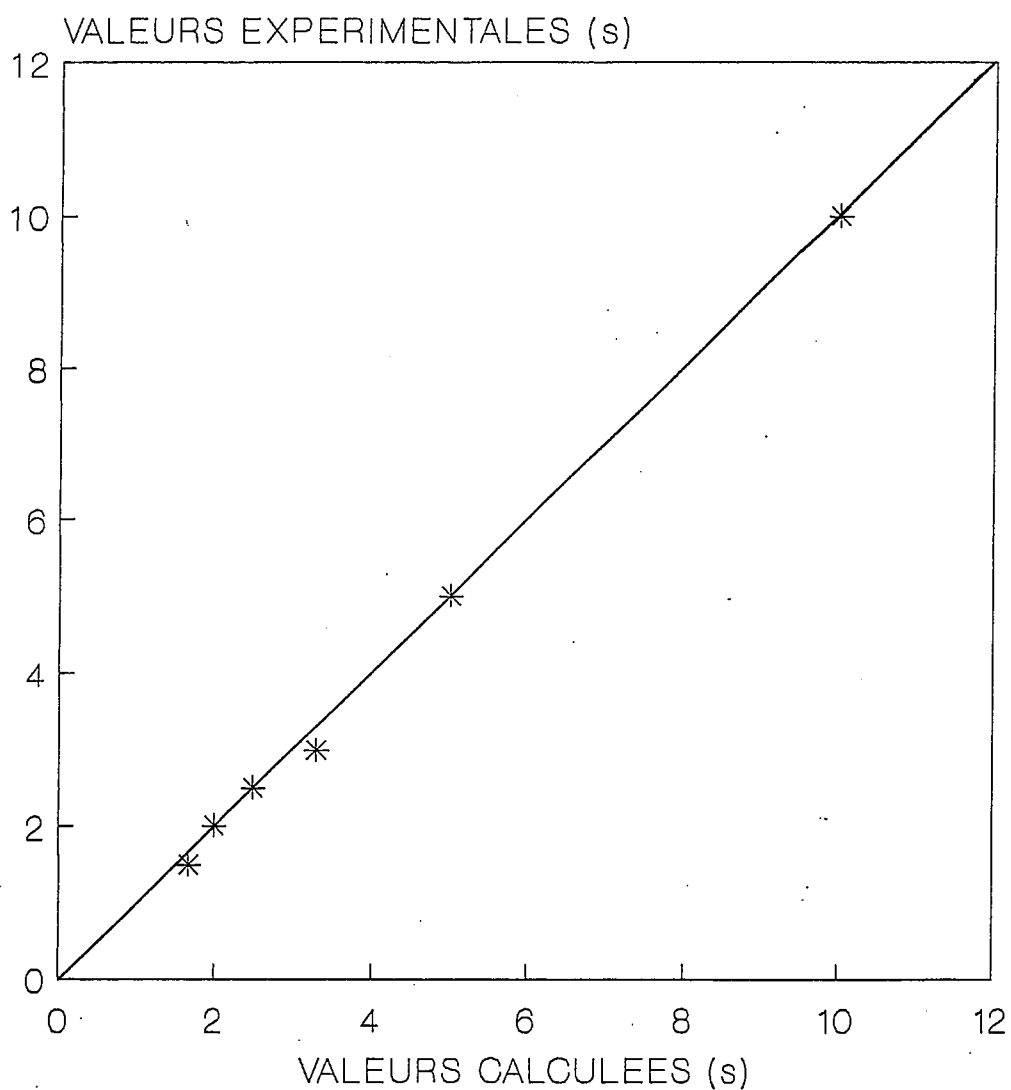
$$\frac{1}{t_m} = 0,1 \cdot \left[ N \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^3 \cdot N_q + 0,21 \cdot N \cdot \left(\frac{d}{D}\right) \cdot \left(\frac{N_p}{N_q}\right)^{0,5} \right] \cdot \left(1 - e^{-13 \left(\frac{d}{D}\right)^2}\right) \quad (4.107)$$

On considère, en régime turbulent, que le temps de mélange est inversement proportionnel à la vitesse d'agitation. Les deux corrélations précédentes, appliquées à notre appareillage, conduisent au résultat suivant:

$$N \cdot t_m = 25 \quad (4.108)$$

La figure 4.7 permet de comparer les résultats expérimentaux obtenus, avec ceux prédits par l'équation 4.108. On notera qu'ils

## TEMPS DE MELANGE DANS LE REACTEUR A CUVE AGITEE.



**Figure 4.7:** Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées par la corrélation de NAGATA (1975) pour les temps de mélange dans le réacteur à cuve agitée.

sont en très bon accord.

On peut donc considérer que pour une agitation de 300 tours/min, qui a été la plus couramment utilisée, le temps de mélange dans le réacteur, pour les deux turbines, est d'environ 5 secondes (10 secondes pour une turbine). Si l'on considère que le temps de circulation est égal au tiers du temps de mélange pour une turbine (NAGATA, 1975), on obtient une valeur d'environ 3 secondes, ce qui donne une idée des temps de passage des cellules à la lumière et à l'obscurité, si on sait estimer la part de volume qui est éclairé.

#### 4.4.3. Obtention des coefficients volumétriques de transfert:

Il existe un nombre important de corrélations dans la littérature, pour calculer le coefficient volumétrique de transfert à partir de la puissance dissipée dans le réacteur. Elles se présentent en général sous la forme suivante (MOO-YOUNG et BLANCH, 1981):

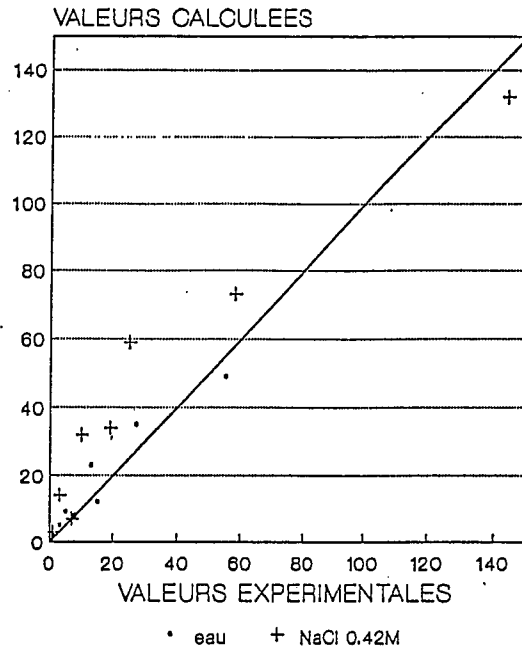
$$k_1 \cdot a = \alpha \cdot \left( \frac{P_{\text{TOT}}}{V} \right)^{\beta} \cdot v_s^{\gamma} \quad (4.108)$$

où  $v_s$  est la vitesse superficielle du gaz.

Malheureusement, les valeurs des constantes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , proposées par MOO-YOUNG et BLANCH (1981) sont valables pour des vitesses superficielles bien supérieures à celles que nous avons utilisées lors de nos expérimentations, et les résultats obtenus, comparés à nos valeurs expérimentales, n'étaient pas satisfaisants. Nous avons donc dû déterminer nos propres valeurs, pour rendre compte des résultats expérimentaux dans la gamme de débits utilisés.

Les corrélations établies dans nos conditions sont les suivantes, pour des débits compris entre 3 et 60 Nl/h (0,01 à 0,2 v.v.m.):

CORRELATION DE CALDERBANK ET MOO-YOUNG



CORRELATION PROPOSEE

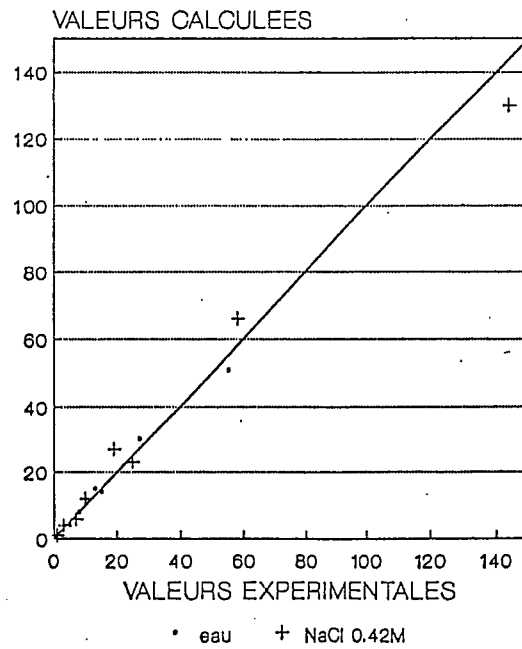


Figure 4.8: Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées pour le coefficient volumétrique de transfert dans le réacteur à cuve agitée. Corrélation de Calderbank et Moo-Young (MOO-YOUNG et BLANCH, 1981), et corrélation proposée.

- Pour des dispersions air-eau coalescentes:

$$k_1 \cdot a = 0,0042 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{0,6} \cdot v_s^{0,45} \quad (4.109)$$

- Pour des dispersions air-électrolyte non coalescentes:

$$k_1 \cdot a = 0,01 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{0,75} \cdot v_s^{0,6} \quad (4.110)$$

La figure 4.8 permet de comparer les résultats des corrélations avec les résultats expérimentaux obtenus. Tout d'abord pour la corrélation de Calderbank et Moo-Young (MOO-YOUNG et BLANCH, 1981) qui pourra être utilisée pour des débits supérieurs à 60 Nl/h, et ensuite, pour la corrélation proposée par les relations 4.109 et 4.110.

**CONCLUSION:**

Contrairement à l'étude des limitations biologiques qui nécessite un support expérimental important, l'étude des limitations physiques demeure essentiellement théorique.

Dans les photobioréacteurs, les étapes physiques pouvant limiter la croissance sont au nombre de deux. Il s'agit des limitations par le transfert de lumière et par le transfert de CO<sub>2</sub>.

La limitation par le transfert de lumière est quasi permanente lors de la culture en masse de microorganismes photosynthétiques, puisque c'est la vitesse d'absorption de l'énergie lumineuse qui fixe la vitesse de croissance. La théorie des transferts radiatifs semble particulièrement bien adaptée pour rendre compte de ces phénomènes. Elle permet d'établir des équations sur la phase photonique du réacteur, qui sont à la base

de la détermination des vitesses de croissance et de l'établissement des bilans enthalpique et entropique.

Néanmoins, leur mise en oeuvre nécessite des moyens de calcul importants, et lorsqu'on cherchera à étudier les interactions entre la limitation physique par la lumière et des limitations biologiques comme les limitations minérales, il sera intéressant d'utiliser des équations approchées simplifiées. Dans ce contexte, la simplification monodimensionnelle de SCHUSTER qui fournit une solution algébrique semble la plus adéquate. Elle présente cependant le paradoxe méthodologique de conduire à l'adaptation du matériel expérimental aux hypothèses du modèle.

Le transfert de  $\text{CO}_2$  dans les milieux de culture à pH élevé est plus complexe à analyser que le transfert d'oxygène car il présente des caractéristiques différentes.

- Le carbone dissous est composé de plusieurs espèces. Celles-ci ne sont généralement pas à l'équilibre thermodynamique car les dynamiques en jeu sont très lentes lorsque le pH est élevé. Aussi doit-on traiter des phénomènes souvent instationnaires.

- Le transfert peut être accéléré par réaction chimique lorsque le coefficient de transfert est faible.

Enfin, notons que la résolution des équations traitant des limitations physiques nécessite le calcul d'un certain nombre de données physico-chimiques. Parmi celles-ci, on peut citer les solubilités et les coefficients d'activité, dans des milieux de culture très éloignés des solutions idéales, ainsi que les coefficients volumétriques de transfert.

CHAPITRE 5

MODELISATION MATHEMATIQUE DE LA CULTURE  
DE SPIRULINA PLATENSIS EN PHOTOBIOREACTEUR.



## 5.1. MODELES MATHEMATIQUES NON STRUCTURES.

### 5.1.1. Interactions entre le transfert de lumière et le métabolisme des microorganismes photosynthétiques:

#### A - INTRODUCTION:

La culture de microorganismes photosynthétiques en photoréacteur s'effectue toujours dans un milieu où la distribution d'énergie est anisotrope. Ceci résulte du fait que la disponibilité en énergie lumineuse radiante est différente en chaque point de l'espace du réacteur, par suite de son absorption et de sa diffusion par les cellules en suspension.

La courbe de saturation de la vitesse de photosynthèse en fonction de l'intensité du flux d'énergie radiante disponible donnée au chapitre 3 (figure 3.5), met en évidence une première zone où l'énergie lumineuse est limitante (le rendement quantique est cependant élevé), puis une zone de saturation et une zone d'inhibition. On conçoit donc que, selon la localisation dans le réacteur déterminant l'énergie radiante disponible, il existe des vitesses locales différentes. Les vitesses de croissance seront fondamentalement différentes dans quatre zones principales du photoréacteur, telles qu'elles peuvent être définies par l'analyse de la figure 3.5.

- Une zone proche de la source lumineuse où l'intensité, trop forte, inhibe le métabolisme des microorganismes.

- Une zone où l'énergie lumineuse est saturante, et induit une vitesse maximale.

- Une zone intermédiaire où l'énergie disponible est faible, et où la cadence d'arrivée des photons limite la vitesse de croissance des microorganismes.

- Une zone éloignée de la source, où l'absence d'énergie lumineuse ne permet plus le métabolisme de synthèse.

Il apparait donc que la détermination de la vitesse moyenne de croissance de la biomasse nécessite que l'importance relative de chacune de ces zones soit évaluée. Les énergies inhibantes ou saturantes sont rarement atteintes lors de cultures en photobioréacteurs, ce qui limite le problème à deux zones, définies par la disponibilité de l'énergie lumineuse dans tout ou seulement une partie du réacteur. En réalité, en raison de l'agitation du réacteur, les cellules sont continuellement soumises à des éclairagements différents, lors de leur passage dans les zones que nous venons de définir.

Pour éviter une étude statistique reposant sur une probabilité de présence des microorganismes dans chaque zone, et pour ramener le problème à la seule étude des vitesses locales, il faut s'assurer que des phénomènes transitoires, liés à la dynamique de circulation des cellules, ne modifieront pas ces vitesses, ou pourront au moins être pris en compte par des modifications de rendement de conversion.

Or ceci ne peut être le cas que lors des alternances lumière-obscurité. D'une façon générale, on considère qu'en éclairage modulé, la fréquence minimale ne diminuant pas la vitesse de la photosynthèse est de 4 à 8 Hz, soit un temps maximum de passage à l'obscurité compris entre 100 et 300 millisecondes (TERRY, 1986). D'autre part, nous avons vérifié que le temps de séjour minimum à l'obscurité pour l'apparition de la respiration est d'environ 1 minute. Comme le temps de circulation dans le réacteur est d'environ 3 secondes, on pourra négliger la respiration dans la zone sombre du réacteur.

Lorsque tout le réacteur est éclairé, la vitesse de croissance globale est la moyenne spatiale de toutes les vitesses locales. Elle est exponentielle, bien qu'inférieure à la vitesse maximale.

Dans le cas où une partie du réacteur ne reçoit plus de lumière, la vitesse est limitée par la quantité totale d'énergie

absorbée dans le réacteur. Si les conditions d'éclairement ne sont pas modifiées, cette énergie absorbée reste constante, et la croissance devient linéaire. Il apparaît donc que la détermination du volume utile éclairé, dans lequel se déroule la réaction, est déterminante pour l'écriture des lois cinétiques et l'identification de leurs paramètres.

De nombreuses lois cinétiques ont été utilisées pour rendre compte de l'allure générale des courbes de saturation de la photosynthèse. On peut les trouver dans les articles de SMITH (1980), et de COSBY et HORNBERGER (1984). Néanmoins, dans les modèles mathématiques publiés, l'énergie lumineuse disponible dans le réacteur est souvent obtenue en utilisant l'équation de Lambert-Beer (FREDRICKSON *et al.* 1961; OGAWA *et al.* 1971; SHETH *et al.* 1977; TEN HOOPEN *et al.* 1981; FROHLICH *et al.* 1983).

Nous avons déjà discuté des limites de l'utilisation de cette loi au chapitre 4, et notamment son incapacité à traduire des phénomènes tridimensionnels, ainsi qu'à tenir compte de la part d'énergie diffusée par les cellules.

Aussi la démarche que nous proposons, pour l'obtention des vitesses locales et globales, est basée sur l'équation plus générale des transferts radiatifs (SPADONI *et al.* 1978; AIBA, 1982), telle qu'elle a été développée dans le chapitre précédent.

#### B - OBTENTION DES VITESSES LOCALES DE CROISSANCE DANS LES PHOTOBIOREACTEURS:

Si le réacteur a été maillé numériquement en intensité lumineuse spécifique, au moyen de l'équation des transferts radiatifs (équation 4.25), la vitesse volumétrique locale d'absorption de l'énergie lumineuse est donnée par l'équation 4.26:

$$\mathcal{A} = \iint_{4\pi} \int_0^{\infty} E_a(\lambda) \cdot C_x \cdot I(\vec{e}, \vec{u}, \lambda) \cdot d\omega \cdot d\lambda = 4\pi \cdot \int_0^{\infty} E_a(\lambda) \cdot C_x \cdot J(\vec{e}, \lambda) \cdot d\lambda$$

De même, la vitesse spécifique locale de consommation de l'énergie lumineuse est donnée par l'équation 4.28:

$$r_x = \frac{\mathcal{A}}{C_x}$$

Pour une culture en discontinu, on vérifie toujours le bilan matière suivant, conduisant à la vitesse volumétrique de croissance de la biomasse:

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (5.1)$$

Cette vitesse de croissance peut alors être directement obtenue à partir de l'équation 4.26, par l'intermédiaire d'un rendement de conversion de l'énergie en biomasse  $Y_{I/x}$ . On a en effet:

$$r_x = Y_{I/x} \cdot \mathcal{A} \quad (5.2)$$

Si l'on veut expliciter le taux de croissance  $\mu$ , on combine les équations 5.1 et 5.2, et on obtient:

$$\mu = Y_{I/x} \cdot \frac{\mathcal{A}}{C_x} = Y_{I/x} \cdot r_x \quad (5.3)$$

Certains auteurs (AIBA, 1982) introduisent également un coefficient de maintenance dans l'équation cinétique, ainsi on a:

$$r_x = \frac{\mu}{Y_{I/x}} + m \quad (5.4)$$

Notons que lors de cultures en discontinu, l'équation 5.2 est une équation différentielle. Néanmoins, en raison des différences

PRINCIPAUX FLUX ENERGETIQUES LORS DE LA SYNTHÈSE DE BIOMASSE CHEZ LES CYANOBACTÉRIES - ETAPES SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LES RENDEMENTS - (S. platensis)

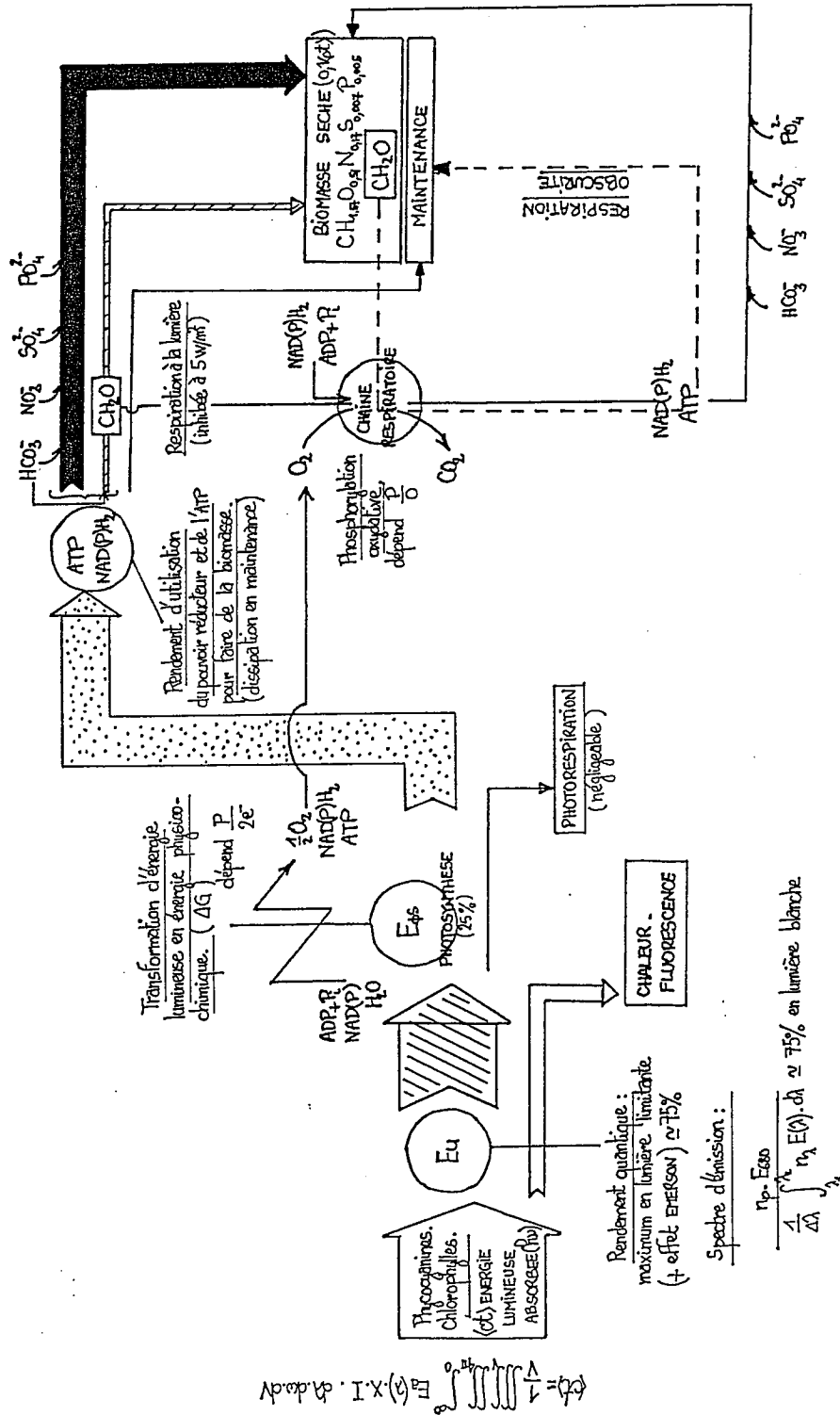


Figure 5.1: Schéma des différents rendements impliqués dans la conversion de l'énergie lumineuse en biomasse.

de dynamiques entre les phénomènes radiatifs et les phénomènes liés à la croissance des microorganismes, les équations peuvent être découplées, et l'équation des transferts radiatifs sera résolue en régime stationnaire sur chaque intervalle de temps.

Dans le cas de cultures en continu, le problème ne se pose plus, car l'équation 5.2 devient algébrique.

Le rendement de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse  $Y_{I/X}$ , est en réalité le produit de plusieurs rendements. En effet, si l'on ne tient pas compte de la maintenance en terme de rendement, ou si l'on considère que la relation 5.4 suffit à traduire ce phénomène, on peut écrire:

$$Y_{I/X} = Y_q \cdot Y_E \cdot Y_{\phi_s} \quad (5.5)$$

$Y_q$  est le rendement quantique déjà défini, et égal au nombre de photons utilisés divisé par le nombre de photons absorbés par les antennes collectrices. Ce rendement est maximum en lumière limitante (pour des valeurs de flux inférieures à 10 W/m<sup>2</sup> chez *S. platensis*), et vaut alors environ 0,75.

$Y_E$  est un rendement d'utilisation de l'énergie absorbée qui tient compte du fait que les photons de référence pour la photosynthèse sont les photons rouges, d'une longueur d'onde de 680 nm. Tous les photons de longueur d'onde plus courte voient leur énergie excédentaire dissipée, essentiellement sous forme de chaleur. Ainsi, ce rendement est d'environ 0,75 pour de la lumière blanche. Il vaut respectivement 0,89 et 0,59 pour les lumières orange et bleue qui ont été utilisées lors de l'étude des effets de la qualité de la lumière (chapitre 3).

$Y_{\phi_s}$  est le rendement de la photosynthèse, c'est-à-dire le rendement de transformation de l'énergie lumineuse utilisable en biomasse. Il peut être obtenu si l'on connaît le rendement global  $Y_{I/X}$  et les deux rendements précédents.

La figure 5.1 résume les différentes étapes qui viennent

d'être décrites.

C - OBTENTION DE LA VITESSE GLOBALE DE CROISSANCE DANS  
LES PHOTOBIOREACTEURS:

Les équations 4.27 et 4.28 du chapitre 4 permettent respectivement d'obtenir la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse et la vitesse spécifique moyenne de consommation de l'énergie lumineuse dans le réacteur. On rappelle que ces vitesses sont obtenues par une intégration spatiale:

$$\langle A \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V A \cdot dV$$

Il en va de même pour toutes les grandeurs définies par les relations 5.1-5.5, et notamment pour le taux de croissance  $\mu$ :

$$\langle \mu \rangle = \frac{1}{C_x} \cdot \langle Y_{x/x} \rangle \cdot \langle A \rangle \quad (5.6)$$

Lorsque la concentration en pigments devient élevée, une partie du réacteur ne dispose plus d'énergie lumineuse. La partie du réacteur où l'énergie lumineuse est encore disponible définit le volume utile éclairé, dans lequel se produit la réaction de croissance. La détermination de paramètres cinétiques du modèle impose que ce volume utile soit déterminé pour réaliser l'intégration spatiale sur la partie du réacteur participant à la réaction, et non pas sur le volume total.

Cette détermination peut se faire en utilisant l'équation des transferts radiatifs (équation 4.25) intégrée sur toutes les fréquences, avec les coefficients d'absorption et de diffusion globaux définis au chapitre 2. Le volume utile est alors défini en termes d'énergie locale disponible, c'est-à-dire, par rapport à la grandeur  $4\pi J$  (équation 4.13).

La vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse s'écrit alors:

$$\langle r_x \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V r_x \cdot dV = (1-\gamma) \cdot \frac{1}{V_1} \iiint_{V_1} r_{x1} \cdot dV + \gamma \cdot \frac{1}{V_2} \iiint_{V_2} r_{x2} \cdot dV \quad (5.7)$$

$r_x$  est la vitesse volumétrique locale de croissance de la biomasse définie par l'équation 5.2,  $\gamma$  représente la fraction du volume éclairé, l'indice 1 représente la partie du réacteur qui est à l'obscurité, l'indice 2 représente le volume utile éclairé du réacteur.

Comme le temps de séjour des cellules à l'obscurité est inférieur à la minute nécessaire pour la mise en place de la respiration, on peut considérer que le volume  $V_1$  est un volume mort et donc:

$$r_{x1} = 0$$

On est alors amené, à partir des équations 4.26, 5.2, et 5.7, à résoudre l'équation suivante donnant la vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse:

$$\langle r_x \rangle = \gamma \cdot \frac{1}{V_2} \iiint_{V_2} Y_{I/X} \cdot \iiint_{4\pi} \int_0^{\infty} Ea(\lambda) \cdot C_x \cdot I(\vec{\mathcal{E}}, \vec{u}, \lambda) \cdot dV \cdot d\omega \cdot d\lambda \quad (5.8)$$

Pour pouvoir déterminer le paramètre  $\langle Y_{I/X} \rangle$ , il faut supposer que celui-ci ne varie pas dans le réacteur, c'est-à-dire que le rendement quantique moyen  $\langle Y_q \rangle$  reste constant lorsque le volume utile varie, avec une vitesse volumétrique d'absorption constante.

Notons toutefois que le rendement de conversion moyen  $\langle Y_{I/X} \rangle$  diminue lorsque la vitesse volumétrique moyenne d'absorption  $\langle \mathcal{A} \rangle$  augmente dans le réacteur, puisque le rendement quantique moyen  $\langle Y_q \rangle$  diminue. Cela nécessitera donc de disposer d'une relation du type  $\langle Y_q \rangle = f(\langle \mathcal{A} \rangle)$ .

Enfin, précisons qu'une généralisation à  $n$  zones de



l'équation 5.7 est possible, pour tenir compte de phénomènes comme la respiration des microorganismes, ou la saturation et l'inhibition de la photosynthèse par l'énergie lumineuse disponible.

Pour traduire l'effet des limitations minérales ainsi que leurs interactions avec la limitation physique par la lumière, on doit connaître l'évolution du taux de croissance en fonction de la concentration en éléments limitants.

Lors d'une double limitation de ce type, on peut être amené à partager à nouveau le volume utile éclairé en 2 parties de comportements cinétiques différents. En effet, on observe alors une fraction du volume éclairé dans laquelle la vitesse de croissance est constante et indépendante de l'espace (partie du réacteur où l'intensité de la lumière est la plus forte), parce que limitée par un élément minéral. L'autre partie éclairée du réacteur demeure en limitation par le transfert de lumière, avec l'existence de vitesses locales. Le problème complexe consiste donc à déterminer le volume du réacteur dans lequel la vitesse est limitée par la concentration en minéraux, et le volume dans lequel la lumière reste limitante parce que les vitesses locales sont déjà inférieures à celle fixée par la limitation minérale.

Cette démarche rigoureuse a été utilisée par CURLESS (1986), pour étudier les interactions entre les limitations par la lumière et par la source de carbone, à partir d'un modèle simple monodimensionnel utilisant la loi de Lambert-Beer. Néanmoins, cette démarche demande des calculs importants, et nécessite de définir un taux de croissance maximum, indépendant de l'espace dans le réacteur.

La diminution du rendement de conversion occasionnée par une limitation minérale peut être traduite de façon simple à partir du taux de croissance moyen dans le réacteur, sans partitionner à nouveau le volume utile éclairé. On suppose pour cela que le rendement moyen de conversion de l'énergie lumineuse est

globalement diminué, indépendamment des considérations spatiales que nous venons d'évoquer. Si l'on choisit une loi de Monod pour rendre compte de cette diminution, le taux de croissance moyen dans le réacteur, pour  $n$  éléments limitants, est donné à partir de l'équation 5.6 par:

$$\langle \mu \rangle = \frac{1}{C_x} \cdot \langle A \rangle \cdot \langle Y_{I/X} \rangle \cdot \prod_{i=1}^n \frac{C_{s_i}}{K_{s_i} + C_{s_i}} \quad (5.9)$$

où  $C_{s_i}$  est la concentration du substrat limitant  $i$ .

L'identification numérique des constantes  $K_{s_i}$  pose un problème de temps de calcul, dans la mesure où les algorithmes utilisés pour cela convergent vers la solution en réalisant plusieurs simulations successives de la cinétique de croissance. Un gain considérable de temps de calcul peut être réalisé si l'on est capable de calculer le taux de croissance moyen lié à la limitation par la lumière, autrement que par le maillage du réacteur en intensité spécifique. Cela est possible dans le cadre des approximations monodimensionnelles qui ont été développées au chapitre 4. Pour ces raisons, les paramètres cinétiques relatifs aux limitations minérales ont tous été déterminés lors de cultures en bioréacteurs parallélépipédiques.

L'équation 5.7 simplifiée en une seule dimension s'écrit alors:

$$\langle r_x \rangle = \langle \mu \rangle \cdot \gamma \cdot C_x \quad (5.10)$$

Si l'on suppose que le taux de croissance local dans le réacteur suit une loi de Monod en fonction de l'énergie disponible  $4\pi J$ , on a:

$$\langle \mu \rangle = \frac{1}{L_2} \int_0^{L_2} \mu_m \cdot \frac{4\pi J_z}{K_J + 4\pi J_z} \cdot dz \quad (5.11)$$

L'énergie lumineuse disponible  $4\pi J$  en fonction de l'abscisse

z dans le réacteur est déterminée par les équations algébriques de SCHUSTER (1905) qui ont été exposées au chapitre 4 et dans l'article de CORNET et al. (1992a).  $K_J$  et  $\mu_M$  sont des paramètres du modèle qui permettent de déterminer le taux de croissance moyen fixé par la limitation physique de la lumière. On peut alors déterminer facilement les paramètres cinétiques relatifs aux limitations minérales puisque dans ce cas, à partir des équations 5.10 et 5.11, on obtient l'expression de la vitesse volumétrique moyenne de croissance:

$$\langle r_x \rangle = \gamma \cdot C_x \cdot \frac{1}{L_2} \int_0^{L_2} \mu_M \frac{4\pi J_z}{K_J + 4\pi J_z} \cdot dz \cdot \prod_{i=1}^n \frac{C_{s_i}}{K_{s_i} + C_{s_i}} \quad (5.12)$$

Remarquons que l'intégrale spatiale porte toujours sur le volume utile éclairé  $L_2$ . Celui-ci peut être déterminé, lors de l'apparition de la linéarité sur les courbes de croissance, à partir de l'équation 4.43, donnant l'expression de la transmission. La valeur limite de l'énergie disponible  $4\pi J$  qui a été déterminée sur l'ensemble des cultures est  $1 \text{ W/m}^2$ . Cette valeur correspond au point de compensation de la photosynthèse chez *S. platensis* (chapitre 3).

Il sera parfois nécessaire d'utiliser des équations cinétiques plus complexes que l'équation 5.12, pour traduire les effets métaboliques occasionnés par des limitations minérales. Ce sera notamment le cas pour les limitations par les sources d'azote et de soufre. Les équations seront alors explicitées dans le paragraphe suivant, lors de la présentation des résultats du modèle proposé.

#### D - BILAN ENTHALPIQUE:

L'obtention du bilan d'énergie interne sur le réacteur a été développée au chapitre 4. Nous rappelons simplement qu'en régime

stationnaire, le bilan enthalpique est donné par l'équation 4.50 et s'écrit, à partir des notations précédemment définies, de la façon suivante:

$$\Delta \left[ \sum_i \dot{H}_i \cdot w_i \right] = Q - W + V. \langle 4 \rangle$$

La détermination des enthalpies partielles massiques  $\dot{H}_i$  nécessite la connaissance de données physico-chimiques relatives à chaque corps  $i$  (pouvant être obtenues dans une banque de données).

### 5.1.2. Résultats:

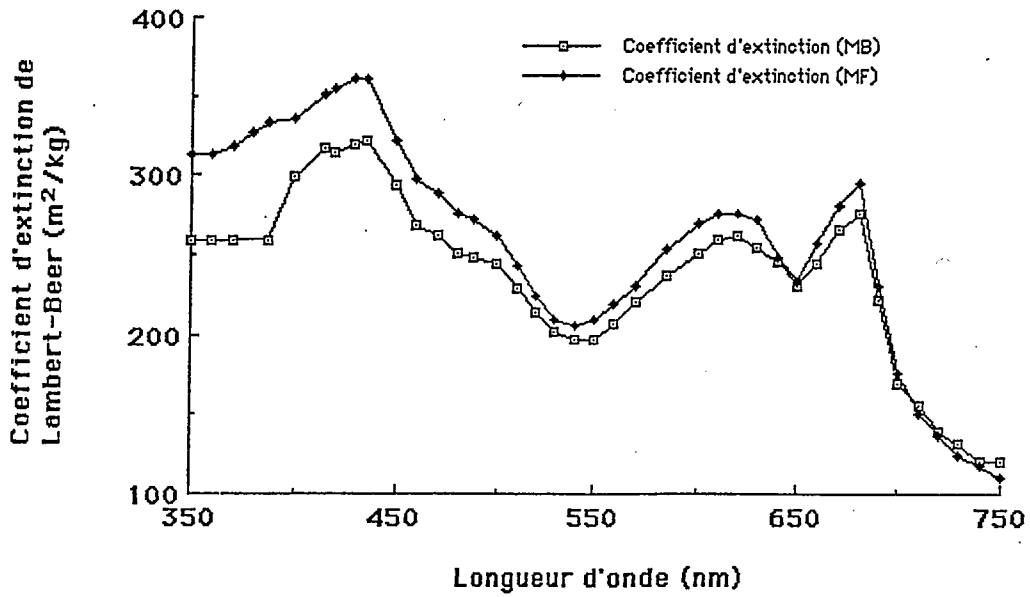
#### A - LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE LUMIERE:

Les coefficients d'extinction de Lambert-Beer, ainsi que les coefficients d'absorption et de diffusion qui interviennent dans les équations du chapitre 4 ont été déterminés. Les méthodes d'obtention ont été données au chapitre 2, aussi bien pour les coefficients relatifs à chaque longueur d'onde que pour les coefficients globaux.

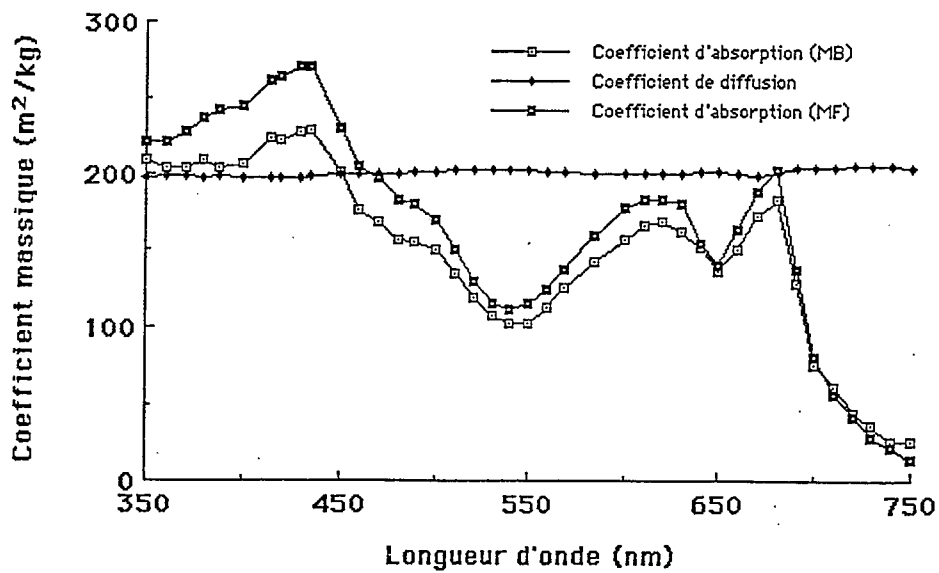
Les coefficients ont été déterminés pour l'espèce *S. platensis* cultivée dans deux milieux différents: le milieu de base (MB), et le milieu de faible force ionique (MF), dans lequel la teneur en phycocyanines de la biomasse active est plus élevée.

La figure 5.2a montre les valeurs du coefficient d'extinction de Lambert-Beer  $m_{a\lambda}$ , pour 40 longueurs d'onde du spectre visible.

De même, la figure 5.2b donne les valeurs des coefficients d'absorption  $E_a(\lambda)$  et des coefficients de diffusion  $E_s(\lambda)$ , pour 40 longueurs d'onde entre 350 et 750 nm. Ces résultats ont été obtenus pour des cellules cultivées avec une agitation orbitale, ou pour des vitesses d'agitation par turbines inférieures à 150 t/mn. On remarque que le coefficient de diffusion est bien indépendant de la longueur d'onde conformément à nos hypothèses. D'autre part, l'évolution du coefficient d'absorption en fonction



(a)



(b)

Figure 5.2: Valeurs des coefficients d'extinction de Lambert-Beer (a), et des coefficients massiques d'absorption et de diffusion de la lumière (b) sur l'ensemble du spectre visible. Les résultats sont donnés pour des suspensions de *S. platensis* cultivée dans le milieu de base (MB) et dans le milieu de faible force ionique (MF).

de la longueur d'onde est très voisine du spectre d'absorption donné au chapitre 3.

La détermination des coefficients globaux peut être réalisée directement par méthode globale, ou par méthode intégrale, à partir des résultats précédents. Aux erreurs de mesures près, les deux méthodes donnent des résultats identiques. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 5.1.

Milieu de culture.	Coefficient d'extinction de Lambert. ( $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Coefficient d'absorption. ( $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Coefficient de diffusion. ( $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ )
Milieu de base.	240	150	200
Milieu de faible force ionique.	260	165	200

Tableau 5.1: Valeurs des coefficients globaux d'extinction, d'absorption, et de diffusion de la lumière par *S. platensis*, en fonction du milieu de culture utilisé, et pour une agitation faible.

Sur la base de ces coefficients, on peut calculer que dans le cadre d'une approximation monodimensionnelle, l'équation de Lambert-Beer (4.1) et l'équation de Schuster (4.43) donnent la même valeur de la transmission, pour une culture de concentration définie. Néanmoins, les profils d'énergie disponible obtenus dans le réacteur sont différents.

Des expériences identiques ont été réalisées à partir de cultures agitées par turbines Rushton, notamment à 300 t/mn, qui est la vitesse d'agitation utilisée dans le réacteur. Les résultats montrent que le coefficient d'absorption n'est pas modifié, mais que le coefficient de diffusion devient égal à 240

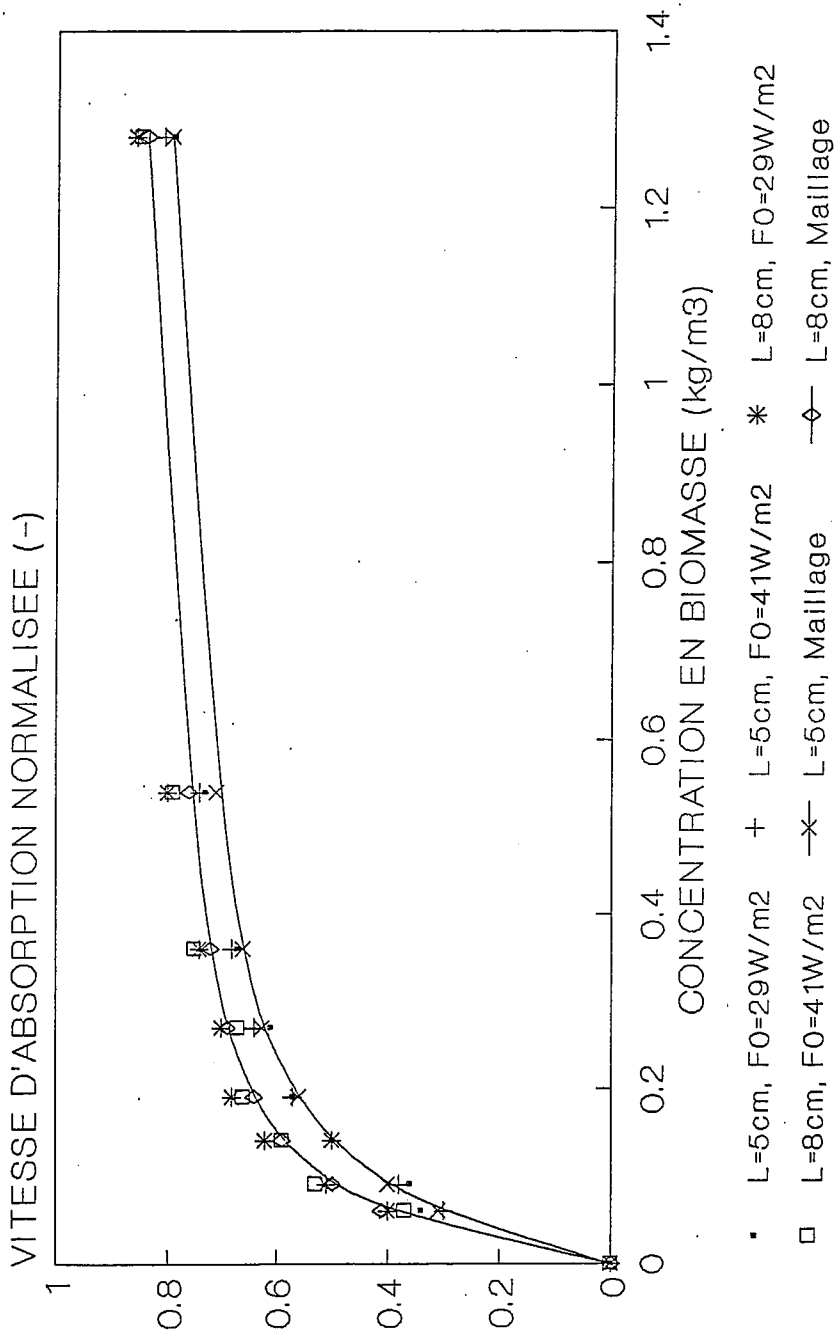


Figure 5.3: Comparaison entre les valeurs expérimentales et calculées par maillage numérique pour la vitesse volumétrique d'absorption de l'énergie lumineuse normalisée en fonction de la concentration en biomasse. Les résultats ont été obtenus sur deux types de réacteurs parallélépipédiques d'épaisseur respective 5 et 8 cm, et pour des flux incidents de 29 et 41 W/m².

$\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ . Cette augmentation du coefficient de diffusion de 20%, liée à l'agitation des cellules, est en parfait accord avec la diminution de 20% du coefficient de corrélation donnant la concentration en biomasse à partir de la D.O.<sub>750</sub>, introduite au chapitre 2, et correspond probablement à une légère modification de la morphologie des cellules.

La connaissance des coefficients d'absorption et de diffusion permet d'utiliser l'équation des transferts radiatifs (équation 4.25) pour mailler numériquement en intensité spécifique les réacteurs que nous avons utilisés au cours de cette étude. Ce maillage permet notamment de calculer la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse dans le réacteur, au moyen de l'équation 4.27. Pour valider les résultats obtenus numériquement, nous avons réalisé des déterminations expérimentales de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse, et ceci sur les deux types de réacteurs parallélépipédiques utilisés, de volumes respectivement égaux à 1 et 4 litres. Deux valeurs différentes du flux d'énergie radiante incident ont été utilisées, mais ces valeurs étant assez proches, il semble difficile de montrer des différences significatives entre les vitesses d'absorption obtenues.

Les résultats sont détaillés sur la figure 5.3, et montrent un accord excellent entre les mesures expérimentales et les valeurs prédites numériquement. On constate également, comme attendu, que les valeurs normalisées des vitesses d'absorption de l'énergie tendent vers une asymptote inférieure à 1, en raison de la partie d'énergie diffusée hors du réacteur. La valeur de l'asymptote est d'environ 0,85 pour les réacteurs parallélépipédiques, alors qu'elle n'est que de 0,60 pour le réacteur cylindrique (résultat non montré).

Des comparaisons entre les valeurs de vitesses volumétriques d'absorption de l'énergie calculées pour les 40 longueurs d'onde, ou à partir des coefficients globaux ont été réalisées. Les



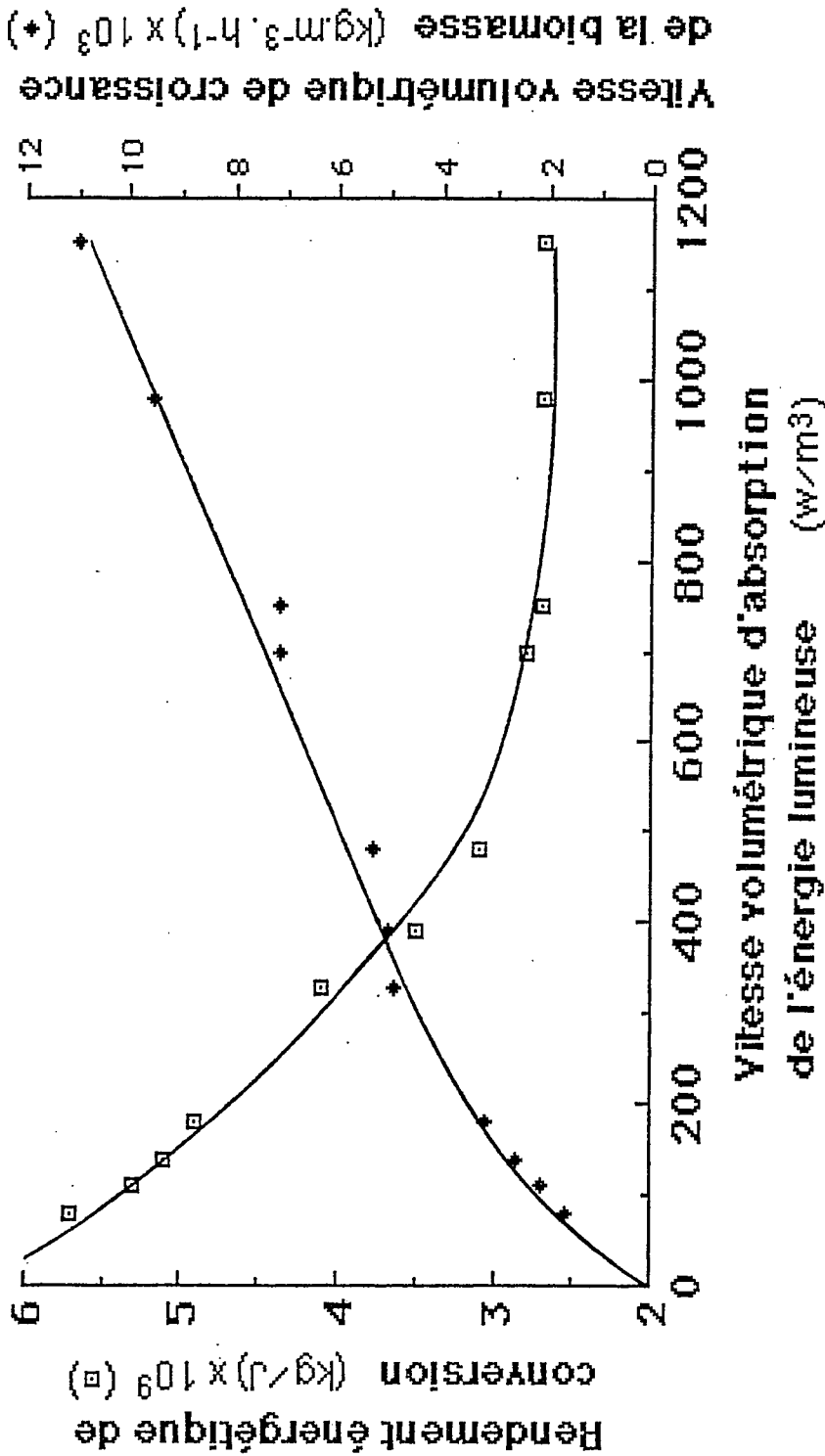


Figure 5.4: Valeurs du rendement énergétique de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse et de la vitesse volumétrique de croissance de la biomasse en fonction de la vitesse volumétrique d'absorption de l'énergie lumineuse dans les réacteurs (valeur obtenue par maillage numérique des réacteurs).

résultats montrent que les écarts entre les deux méthodes sont significatifs, de l'ordre de 15%, lorsque l'on utilise des lampes halogènes comme source lumineuse (spectre d'émission décalé dans l'orange, donné au chapitre 2), alors que pour des tubes fluorescents, la méthode globale fournit une approximation tout-à-fait correcte. L'utilisation d'un modèle à plusieurs longueurs d'onde est donc nécessaire si l'on veut tenir compte de spectres d'émission des lampes non réguliers dans le domaine visible.

L'adéquation du modèle mathématique, ainsi que la précision de la méthode numérique utilisée ayant été démontrées, nous avons déterminé la vitesse volumétrique moyenne de l'absorption de la lumière à l'asymptote, pour toutes les cultures en photobioréacteurs réalisées dans ce travail. La comparaison de ces résultats avec les vitesses volumétriques moyennes de croissance de la biomasse obtenues expérimentalement ont permis de calculer les rendements énergétiques de conversion  $Y_{I/X}$ , au moyen de l'équation 5.8.

Si l'on se base sur la valeur donnée par AIBA (1982) pour l'enthalpie de combustion de *S. platensis*, c'est-à-dire  $\Delta H_c = 2,09 \cdot 10^7$  J/kg, on peut également calculer le rendement total de la photosynthèse  $Y_T$ , chez *S. platensis*. Celui-ci s'écrit:

$$Y_T = \Delta H_c \cdot Y_{I/X} \quad (5.13)$$

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 5.2, et représentés sur la figure 5.4.

Vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse. ( $W \cdot m^{-3}$ )	Vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse. ( $kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$ )	Rendement de conversion de l'énergie en biomasse. ( $kg \cdot J^{-1}$ ) $\cdot 10^9$	Rendement énergétique total de la photosynthèse. (adim.)
80	$4,6 \cdot 10^{-7}$	5,7	0,12
110	$5,8 \cdot 10^{-7}$	5,3	0,11
140	$7,1 \cdot 10^{-7}$	5,1	0,11
180	$8,9 \cdot 10^{-7}$	4,9	0,10
330	$1,3 \cdot 10^{-6}$	4,1	0,09
390	$1,4 \cdot 10^{-6}$	3,5	0,07
480	$1,5 \cdot 10^{-6}$	3,1	0,065
700	$2,0 \cdot 10^{-6}$	2,8	0,06
750	$2,0 \cdot 10^{-6}$	2,7	0,06
980	$2,6 \cdot 10^{-6}$	2,7	0,06
1150	$3,1 \cdot 10^{-6}$	2,7	0,06

**Tableau 5.2:** Rendement de conversion de l'énergie en biomasse  $Y_{I/X}$ , et rendement énergétique total de la photosynthèse  $Y_p$ , en fonction de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse.

Comme nous l'avons annoncé précédemment, on constate que le rendement énergétique diminue en fonction de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption dans le réacteur. Cette diminution est due à une baisse du rendement quantique moyen  $\langle Y \rangle$  dans le réacteur. Le rendement maximum obtenu est de  $5,7 \cdot 10^{-9}$  kg/J, ce qui correspond à un rendement total de la photosynthèse de 0,12. Ce résultat est en accord parfait avec la valeur déterminée par AIBA sur des cultures en continu de *Spirulina platensis* (AIBA et OGAWA, 1977; OGAWA et AIBA, 1978; AIBA, 1982).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que lorsque la

vitesse volumétrique d'absorption atteint environ  $750 \text{ W/m}^3$ , le rendement énergétique de conversion devient constant, et égal à la valeur minimale de  $2,7 \cdot 10^{-9} \text{ kg/J}$ . Ce seuil de vitesse correspond à l'apparition, dans le réacteur, d'énergies saturantes supérieures ou égales à  $130 \text{ W/m}^2$ . La constance observée du rendement de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse peut alors s'expliquer par une augmentation progressive des seuils de saturation déterminés à l'échelle de la cellule seule (chapitre 3). Cette augmentation se ferait bien sûr de façon continue, en même temps qu'augmentent les intensités spécifiques locales dans le réacteur. En effet, les courbes de saturation de la photosynthèse en fonction du flux lumineux s'expliquent par l'apparition, à la saturation, d'une étape limitante au niveau du cycle de Calvin. A haute densité en pigments, le temps de passage des cellules devant ces mêmes énergies saturantes dans le réacteur est très bref. D'autre part, on a vu que si le temps de passage à l'obscurité est supérieur à 300 ms, le cycle de Calvin a le temps d'évacuer le pouvoir réducteur formé. Ainsi, on peut constater dans le réacteur, en raison des alternances lumière-obscurité, une augmentation de la vitesse maximale de la photosynthèse aux fortes intensités locales. Ceci explique probablement que le rendement apparent de conversion de l'énergie lumineuse devienne constant, puisque cela se traduit par une augmentation constante de la vitesse volumétrique de la biomasse, qui devient alors directement proportionnelle à la vitesse volumétrique d'absorption de l'énergie lumineuse (équation 5.8, figure 5.4). Ce phénomène se produit vraisemblablement jusqu'à l'apparition d'énergies inhibitrices dans le réacteur, c'est-à-dire que la valeur minimale du rendement de conversion déterminée serait valable jusqu'à environ  $2000 \text{ W/m}^3$ .

Les résultats obtenus sur le rendement de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse permettent d'établir la relation suivante qui sera utilisée dans le modèle mathématique:

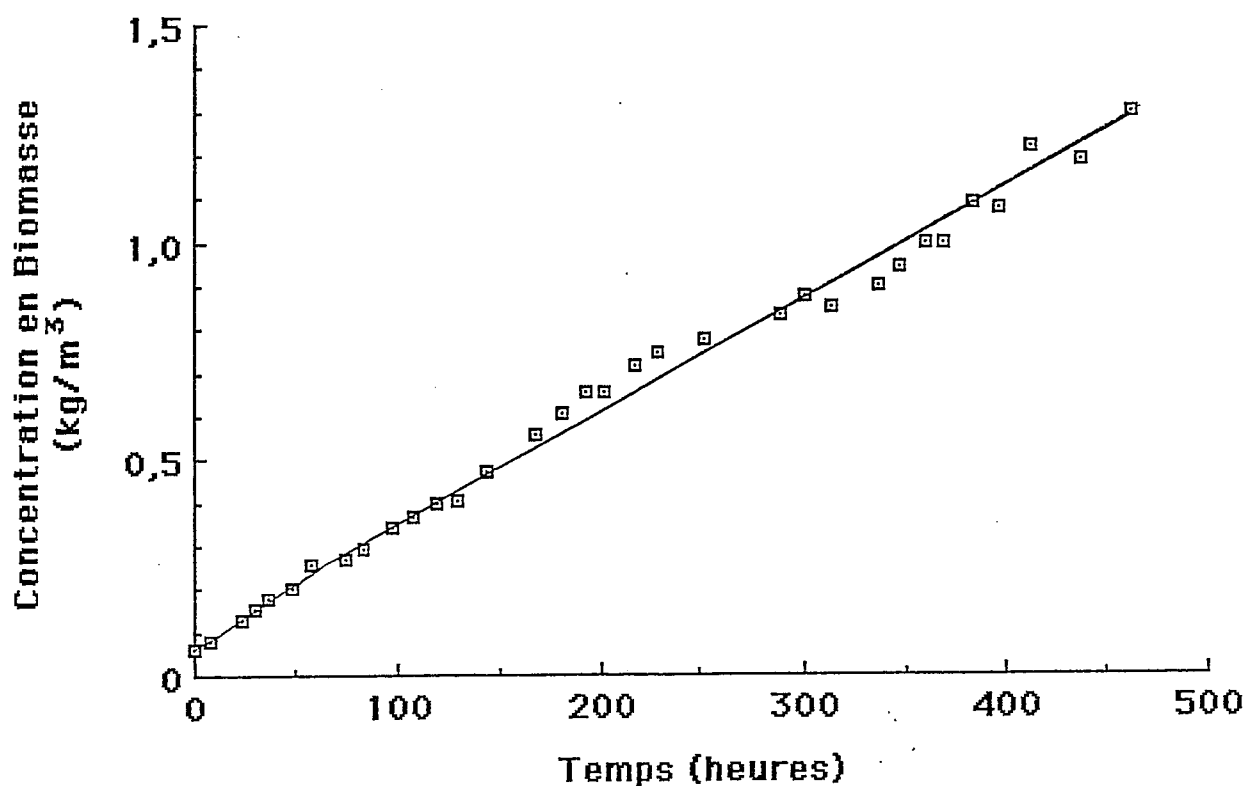
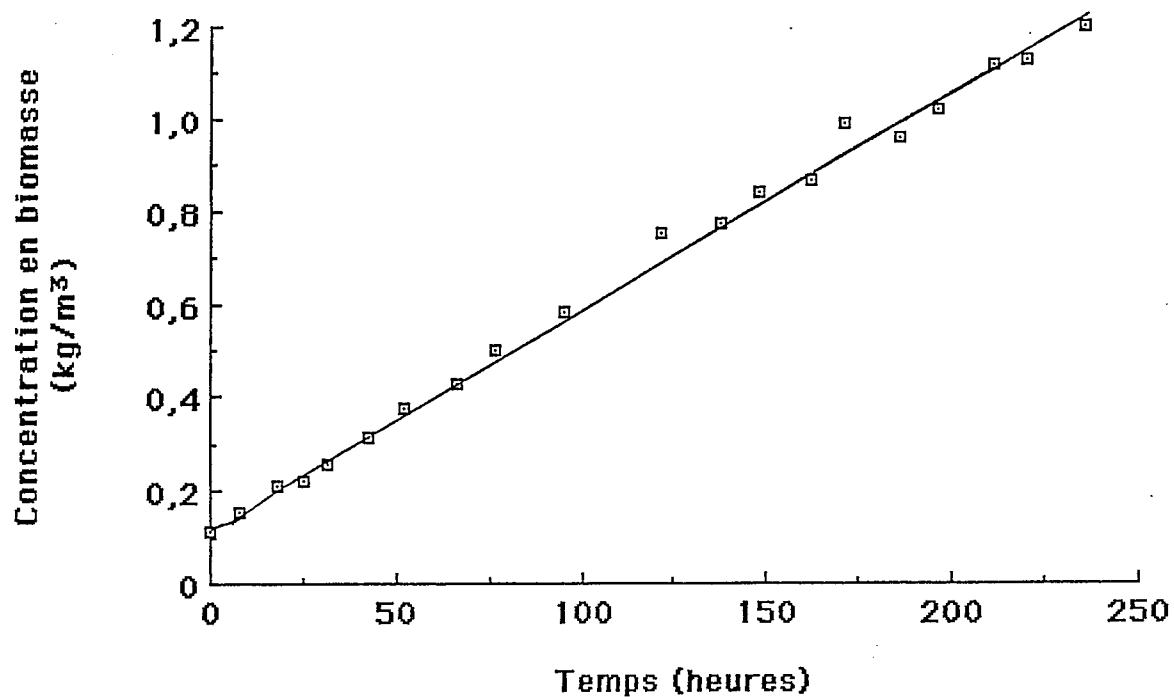


Figure 5.5: Comparaison entre les valeurs expérimentales et le résultat d'une simulation de culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique (trait continu). Flux lumineux incident de  $20 \text{ W/m}^2$ .



**Figure 5.6:** Comparaison entre les valeurs expérimentales et le résultat d'une simulation de culture en discontinu de *S. platensis* en photobioréacteur cylindrique (trait continu). Flux lumineux incident de  $50 \text{ W/m}^2$ .

$$\frac{Y_{I/X} - (Y_{I/X})_{\min}}{(Y_{I/X})_{\max} - (Y_{I/X})_{\min}} = e^{-k \cdot \langle d \rangle} \quad (5.14)$$

avec :

$$\begin{aligned} (Y_{I/X})_{\max} &= 6,95 \cdot 10^{-9} \text{ kg/J} \\ (Y_{I/X})_{\min} &= 2,7 \cdot 10^{-9} \text{ kg/J} \\ k &= 4,1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{W} \end{aligned}$$

Cette relation, associée aux équations 4.25, 4.27, et 5.1, permet de réaliser des simulations de cultures en photobioréacteur cylindrique. Deux simulations ont été réalisées, pour des énergies incidentes différentes. Les résultats sont donnés sur les figures 5.5 et 5.6. On constate qu'il existe un très bon accord entre le modèle mathématique et les points expérimentaux.

#### B - LIMITATIONS BIOLOGIQUES PAR LES MINÉRAUX:

Au chapitre 3, nous avons donné les effets physiologiques observés lors de l'étude des limitations minérales en nitrate, sulfate et phosphate. L'existence d'un modèle robuste vis à vis de la limitation par le transfert de lumière, capable de conduire à la détermination du volume utile éclairé, permet d'envisager la modélisation des limitations minérales et la détermination des paramètres cinétiques du modèle proposé. La démarche que nous allons présenter dans ce paragraphe est un résumé de l'article de CORNET et al. (1992b) qui traite des limitations minérales azote et soufre. Nous avons rajouté les résultats obtenus sur la limitation par le phosphore.

Dans ce paragraphe, et pour des raisons de minimisation du temps de calcul lors de l'identification des paramètres, le modèle utilisé prenant en compte la limitation par le transfert d'énergie lumineuse est le modèle monodimensionnel de SCHUSTER (1905). Les raisons de ce choix ont été données au paragraphe précédent, mais cela n'enlève rien à la généralité des équations cinétiques qui

seront discutées, ni à la validité des valeurs de paramètres déterminées. Ce choix implique par contre l'utilisation de coefficients d'absorption et de diffusion globaux.

Les modifications métaboliques et physiologiques qui surviennent lors des limitations minérales, notamment la diminution de la concentration en phycocyanines et l'augmentation de la teneur intracellulaire en glycogène, obligent à faire jouer un rôle privilégié à certains composants cellulaires (voir chapitre 3).

La biomasse est divisée en trois catégories.

- La biomasse totale (XT) qui contient 10% d'exopolysaccharide, cette fraction massique correspondant aux faibles flux lumineux utilisés lors de l'étude des limitations minérales (flux inférieur à 20 W/m<sup>2</sup>). La biomasse active est alors égale à 0,9 fois la biomasse totale.

- La biomasse végétative (XV) qui résulte de l'augmentation intracellulaire de la teneur en glycogène (G) alors que la biomasse ne se divise plus.

- La masse organique totale (MO) qui prend en compte les deux premières et l'exopolysaccharide excrété en fin de limitation minérale (PS).

Si C est une concentration, on a :

$$\begin{aligned} C_{XV} &= C_{XT} + C_G \\ C_{MO} &= C_{XV} + C_{PS} \end{aligned}$$

Il apparait clairement qu'en conditions optimales de croissance, la concentration en glycogène  $C_G$  est négligeable, et la concentration en exopolysaccharide excrété est nulle. On a donc :

$$C_{XT} = C_{XV} = C_{MO}$$

La fraction massique biotique du composé i est alors définie par (ROELS, 1983) :

$$z_i = \frac{C_i}{C_{XT}}$$



On peut donc définir les fractions massiques biotiques en protéines ( $z_p$ ), phycocyanines ( $z_{pc}$ ), et chlorophylles ( $z_{ch}$ ). Les valeurs expérimentales sont celles données au chapitre 3. En conditions optimales de culture, sans limitation minérale, ces fractions sont constantes, et valent avec 10% d'exopolysaccharide:

$$\begin{aligned} z_p &= 0,61 \\ z_{pc} &= 0,135 \\ z_{ch} &= 0,009 \end{aligned}$$

Les coefficients d'absorption et de diffusion introduits au chapitre 4 peuvent être redéfinis, à partir des composés du modèle. En effet, le coefficient d'absorption est relié directement à la concentration en pigments, il peut donc s'écrire:

$$EA = E_a.(C_{pc} + C_{ch}) \quad (5.15)$$

Le coefficient de diffusion est relié à la taille des cellules, c'est-à-dire à la concentration en biomasse végétative:

$$ES = E_s.C_{xv} \quad (5.16)$$

Ces nouvelles définition des coefficients d'absorption et de diffusion permettent de redéfinir également les paramètres  $\alpha$  et  $\delta$  introduits au chapitre 4. La fraction massique biotique des antennes collectrices de la lumière est facile à définir:

$$z_a = z_{pc} + z_{ch}$$

De même, la fraction massique biotique en glycogène vaut:

$$z_g = \frac{C_g}{C_{xt}}$$

Ainsi, on obtient pour  $\alpha$  et  $\delta$  les valeurs suivantes:

$$\alpha = \left[ z_a \cdot Ea / (z_a \cdot Ea + (1+z_e) \cdot Es) \right]^{1/2} \quad (5.17)$$

$$\delta = \left[ z_a \cdot Ea + (1+z_e) \cdot Es \right] \cdot C_{xt} \cdot \alpha \cdot L \quad (5.18)$$

On remarquera à partir de ces définitions que les équations de transfert radiatif dépendent à la fois de la concentration en biomasse et de la teneur en pigments des cellules, ce qui justifie *a posteriori* l'utilisation de coefficients indépendants pour traduire l'absorption et la diffusion de la lumière dans les photobioréacteurs. A partir des valeurs données au paragraphe précédent, on obtient pour la nouvelle définition de ces coefficients:

$$Ea = 940 \text{ m}^2/\text{kg d'antenne}$$

$$Es = 180 \text{ m}^2/\text{kg de biomasse végétative}$$

Les résultats physiologiques détaillés au chapitre 3 permettent de formuler les hypothèses suivantes, qui vont être utilisées pour l'écriture du modèle.

- La composition élémentaire de la biomasse totale C,H,O,N,S,P reste constante au cours de la croissance, même en condition de limitation minérale.

- La fraction massique biotique en protéines reste constante en limitation N et P, mais décroît en limitation S.

- La fraction massique biotique en phycocyanines décroît en limitation N et S, mais reste constante en limitation P.

- La fraction massique biotique en chlorophylles reste constante, quelle que soit la limitation minérale.

- Lors d'une limitation minérale en azote ou en soufre, la vitesse volumétrique moyenne de décroissance des phycocyanines et des protéines, ainsi que la vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse végétative sont proportionnelles à la vitesse volumétrique moyenne de synthèse de la masse organique

totale. Cette dernière n'est pas affectée par la limitation N ou S, puisque la synthèse de glycogène et d'exopolysaccharide excrété se poursuit, et le rendement quantique moyen dans le réacteur n'est pas diminué.

- Lors d'une limitation en phosphore, la vitesse volumétrique moyenne de la biomasse totale est affectée. Comme il n'y a pas accumulation de glycogène, ni excrétion d'exopolysaccharide, et d'après les définitions adoptées, les concentrations des trois catégories de biomasse restent confondues.

- Enfin, nous supposerons que le taux de croissance moyen  $\langle \mu \rangle$  suit des lois de limitation de type Monod pour les concentrations en minéraux.

La vitesse volumétrique de synthèse de la masse organique totale est alors donnée par l'équation 5.12, en appelant  $C_{Ph}$  la concentration en phosphate:

$$\langle r_{MO} \rangle = \langle \mu \rangle \cdot \gamma \cdot C_x \cdot \frac{C_{Ph}}{K_{Ph} + C_{Ph}} \quad (5.19)$$

où  $K_{Ph}$  est la constante de Monod pour le phosphate.

A partir de nos hypothèses, cette équation permet d'écrire toutes les autres équations du modèle.

En effet, compte tenu de ce que nous avons dit, si l'on néglige la maintenance, la vitesse volumétrique moyenne de la biomasse totale est égale à:

$$\langle r_{XT} \rangle = \langle r_{MO} \rangle \cdot \frac{C_N}{K_N + C_N} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (5.20)$$

où  $C_N$  et  $C_S$  sont respectivement les concentrations en nitrate et en sulfate, et  $K_N$  et  $K_S$  les constantes de Monod pour N et S.

Quelle que soit la limitation minérale, la teneur en chlorophylle  $a$  dans la biomasse totale reste constante, aussi pouvons nous écrire la vitesse volumétrique moyenne de synthèse de

la chlorophylle a :

$$\langle r_{CH} \rangle = z_{CH} \cdot \langle r_{XT} \rangle \quad (5.21)$$

La vitesse volumétrique moyenne de synthèse des phycocyanines est proportionnelle à la vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse totale en conditions non limitantes par les minéraux. Elle est proportionnelle à la vitesse volumétrique moyenne de synthèse de la masse organique lors des limitations N ou S :

$$\langle r_{PC} \rangle = z_{PC} \cdot \langle r_{MO} \rangle \cdot \left[ \frac{C_N}{K_N + C_N} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} - \left( \frac{K_N}{K_N + C_N} + \frac{K_S}{K_S + C_S} \right) \right] \quad (5.22)$$

Le terme de droite permet de rendre compte de la décroissance de la teneur en phycocyanines qui apparaît quand les concentrations en nitrate ou en sulfate sont faibles.

La vitesse volumétrique moyenne relative aux protéines décroît seulement en limitation sulfate. Aussi, avec les mêmes notations que précédemment, on a :

$$\langle r_P \rangle = z_P \cdot \langle r_{MO} \rangle \cdot \left[ \frac{C_N}{K_N + C_N} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} - k_P \cdot \frac{K_S}{K_S + C_S} \right] \quad (5.23)$$

$k_P$  est un coefficient de proportionnalité traduisant la décroissance de la teneur en protéines en limitation S.

Les vitesses volumétriques moyennes de décroissance des concentrations en minéraux dans le milieu sont obtenues à partir de rendements massiques de conversion. Ces rendements sont donnés par l'équation stoechiométrique traduisant la croissance de la biomasse totale, avec 10% d'exopolysaccharide. Une telle équation a été établie et validée au chapitre 3 (équation 3.7). Pour les nitrates, les sulfates et les phosphates, on peut écrire respectivement :

$$\langle r_N \rangle = - Y_{N/XT} \cdot \langle r_{XT} \rangle \quad (5.24)$$

$$\langle r_s \rangle = - Y_{S/XT} \cdot \langle r_{XT} \rangle \quad (5.25)$$

$$\langle r_{Ph} \rangle = - Y_{Ph/XT} \cdot \langle r_{Ph} \rangle \quad (5.26)$$

Après une limitation N ou S, la croissance de la biomasse végétative se poursuit par accumulation intracellulaire de glycogène. Comme les cellules ne se divisent plus, cette accumulation s'arrête et la concentration en biomasse atteint un plateau. Ceci est traduit par un terme  $C_{PC}/(K_{PC} + C_{PC}^2)$  qui relie l'apparition du plateau à la diminution de la concentration en phycocyanines. D'autre part, si l'on exprime la vitesse  $\langle r_{MO} \rangle$  en fonction de la concentration en phycocyanines, on remarque que ce terme représente une loi de Moser dans laquelle  $n = 2$ . La vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse végétative est donc:

$$\langle r_{XV} \rangle = \langle r_{MO} \rangle \cdot \left[ \frac{C_N}{K_N + C_N} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} + \frac{C_{PC}}{K_{PC} + C_{PC}^2} \cdot \left( \frac{K_N}{K_N + C_N} + \frac{K_S}{K_S + C_S} \right) \right] \quad (5.27)$$

L'ensemble du modèle est donc constitué des équations 4.42, 4.43, 5.10, 5.11, 5.17-5.27. Il utilise seulement 7 paramètres  $\mu_M$ ,  $K_J$ ,  $K_N$ ,  $K_S$ ,  $K_{Ph}$ ,  $K_{PC}$  et  $k_p$ , pour traduire les effets de la limitation par le transfert de lumière, et les limitations par  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ . En effet, les coefficients  $E_a$  et  $E_s$  sont obtenus par une expérience indépendante. Les valeurs des paramètres cinétiques obtenues étant déterminées à partir du volume utile éclairé, elles sont transposables à des modèles plus évolués pour traduire la limitation physique par la lumière. C'est le cas du modèle utilisant les équations des transferts radiatifs qui pourra être utilisé pour réaliser des simulations du comportement du photoréacteur, en discontinu ou en continu. Le nombre de paramètre est alors réduit à 6, car on remplace les paramètres  $\mu_M$  et  $K_J$  par  $Y_{I/X}$ .

Les paramètres cinétiques ont été identifiés sur des cultures

réalisées dans différentes conditions de flux lumineux et de concentrations initiales en minéraux. Les valeurs obtenues sont les suivantes:

$$\mu_M = 0,07 \text{ h}^{-1}$$

$$K_J = 20 \text{ W.m}^{-2}$$

$$K_N = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ kg NO}_3^- \cdot \text{m}^{-3}$$

$$K_S = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ kg SO}_4^{2-} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$K_{Ph} = 2,7 \cdot 10^{-4} \text{ kg HPO}_4^{2-} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$K_{PC} = 0,15 \text{ kg}^2 \cdot \text{m}^{-6}$$

$$k_P = 0,55$$

Les traits pleins sur les figures 5.7, 5.8, et 5.9 montrent des simulations réalisées avec le modèle qui vient d'être décrit, respectivement pour des limitations  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , et  $\text{HPO}_4^{2-}$ . On remarque la bonne adéquation entre le modèle et les points expérimentaux.

C - LIMITATION BIOLOGIQUE PAR LA SOURCE DE CARBONE,  
LIMITATION PHYSIQUE PAR LE TRANSFERT DE CO<sub>2</sub>:

Les résultats obtenus au chapitre 3, à propos de la limitation par la source de carbone  $\text{HCO}_3^-$  permettent de donner deux conclusions importantes:

- la limitation par le transfert de gaz semble très longue à atteindre dans les cultures de cyanobactéries, car celles-ci concentrent le bicarbonate, ce qui maintient l'activité de la Rubisco;

- le régime demeure instationnaire pour toutes les espèces du carbone inorganique dissous dans la phase liquide, notamment pour le bicarbonate.

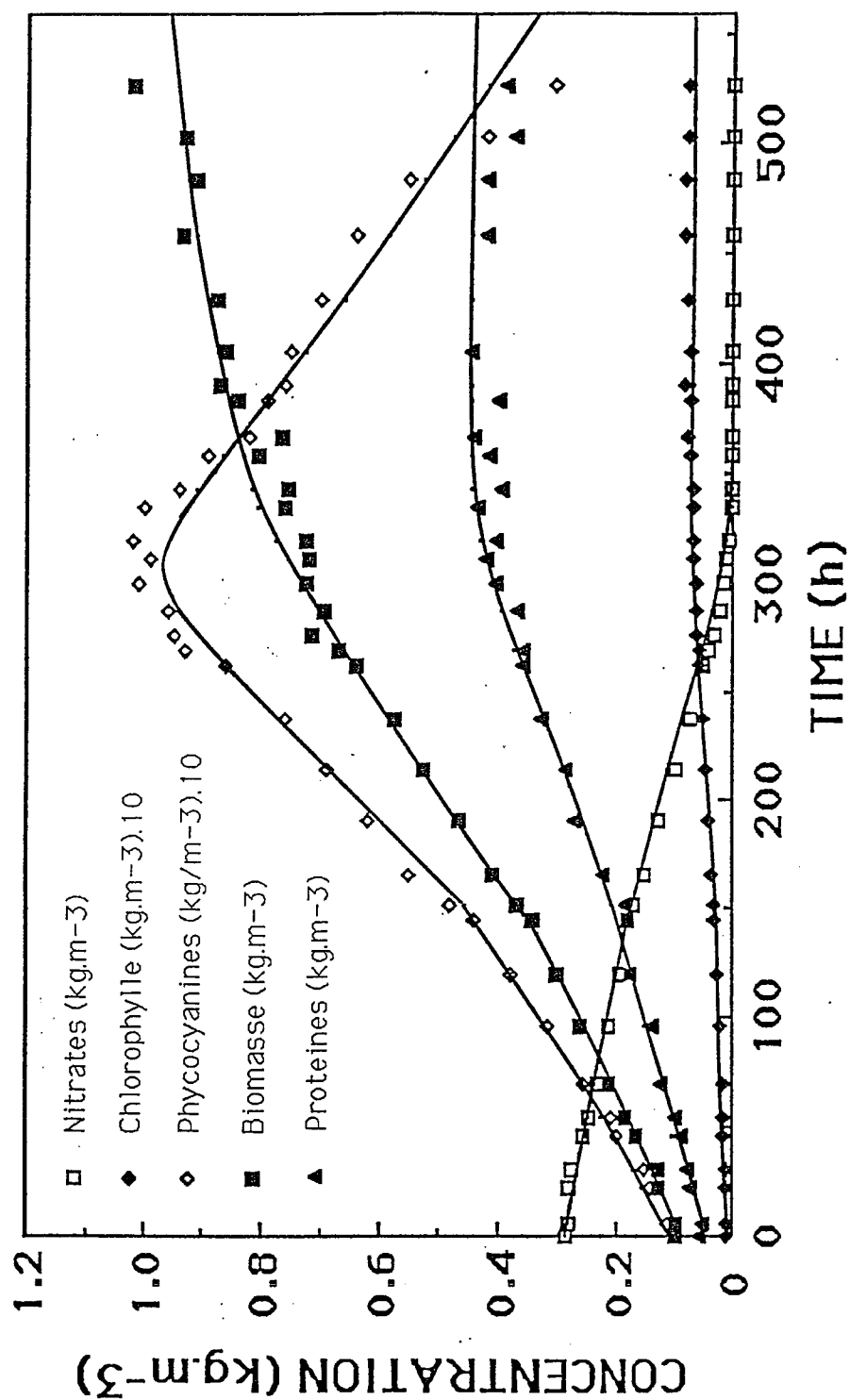


Figure 5.7: Comparaison entre les valeurs expérimentales et le résultat d'une simulation (traits continus) de culture en discontinu de *S. platensis* en limitation par la concentration en nitrate. Il s'agit d'un réacteur parallélépipédique et le flux lumineux incident est de 8 W/m<sup>2</sup>, puis 12 W/m<sup>2</sup> après 144 heures.

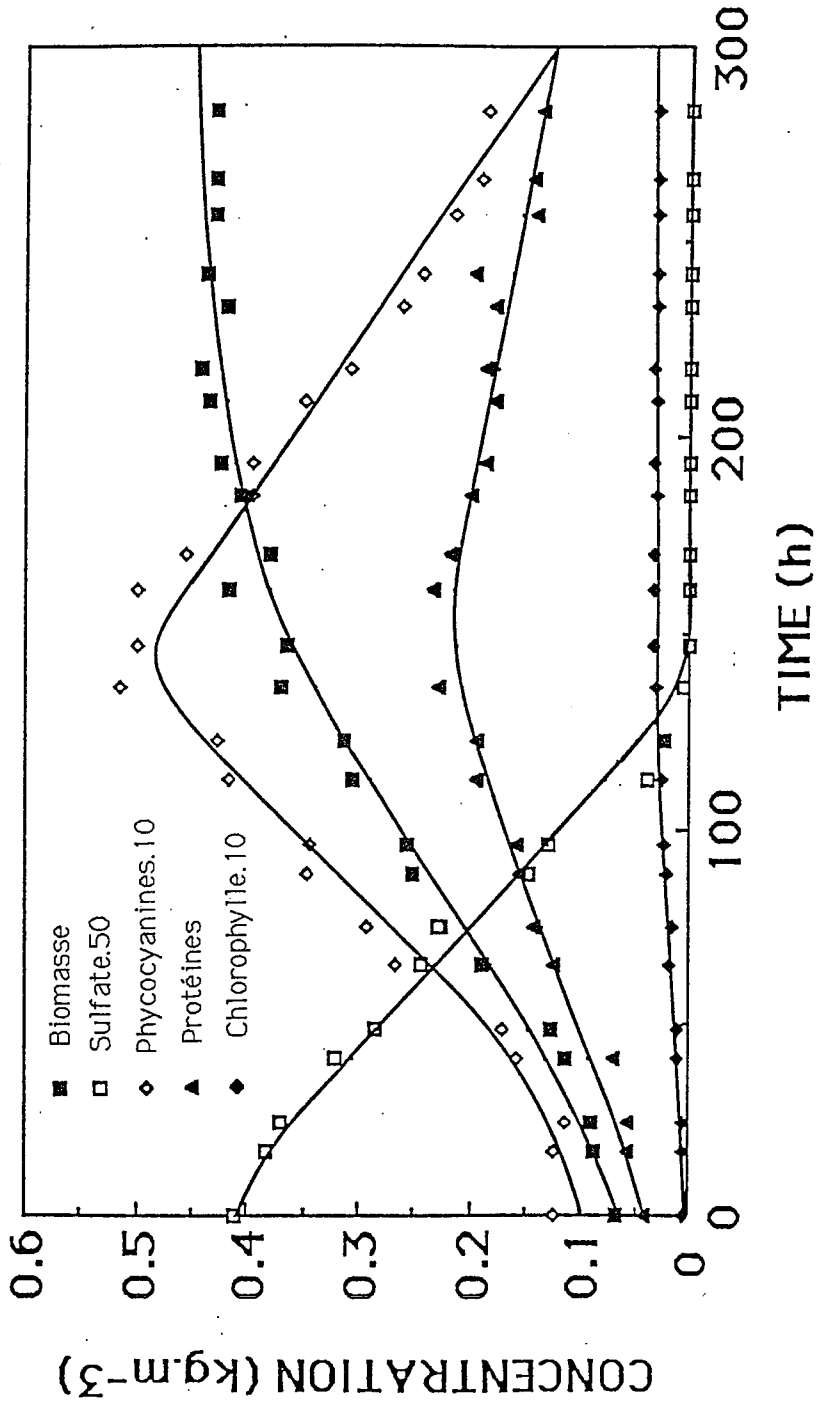


Figure 5.8: Comparaison entre les valeurs expérimentales et le résultat d'une simulation (traits continus) de culture en discontinu de *S. platensis* en limitation par la concentration en sulfate. Il s'agit d'un réacteur parallélépipédique et le flux lumineux incident est de 18 W/m<sup>2</sup>.



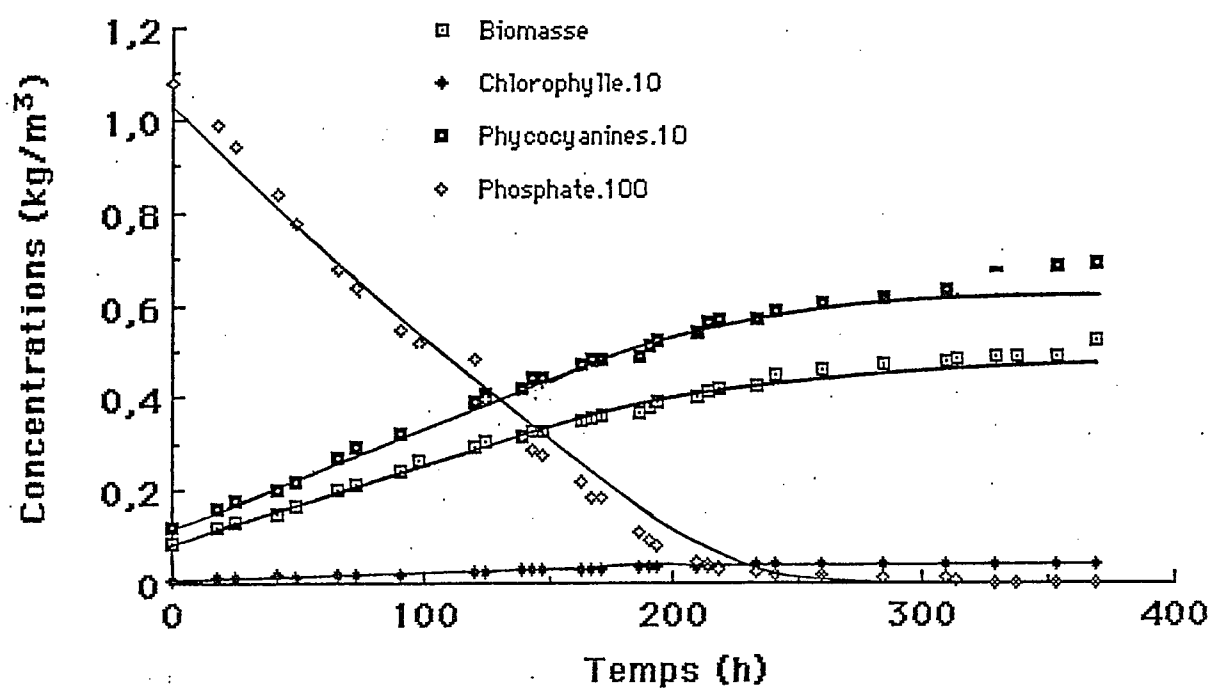


Figure 5.9: Comparaison entre les valeurs expérimentales et le résultat d'une simulation (traits continus) de culture en discontinu de *S. platensis* en limitation par la concentration en phosphate. Il s'agit d'un réacteur parallélépipédique et le flux lumineux incident est de  $11 \text{ W/m}^2$ .

Dans tous les cas, les équations différentielles 4.68, 4.71, 4.72, et 4.75-4.77 développées au chapitre 4, permettent de traduire tous les phénomènes instationnaires qui apparaissent dans la phase liquide. Elles permettent également de prendre en compte une limitation par le transfert de  $\text{CO}_2$ , car les dérivées deviennent alors négligeables et le système tend vers un régime stationnaire.

A partir de ces équations, il semble néanmoins difficile de modéliser de façon simple l'effet de la limitation par la source de carbone sur les vitesses volumétriques moyennes de croissance de la biomasse. En effet, la diminution de ces vitesses est probablement due à une diminution du rendement énergétique de conversion, puisque les cellules doivent utiliser de grandes quantités d'ATP pour concentrer le bicarbonate contre son gradient. Cependant, nos résultats montrent qu'il est difficile de relier la diminution du rendement énergétique de conversion à la concentration extracellulaire en bicarbonate.

En effet, la vitesse volumétrique de croissance de la biomasse demeure linéaire pour une fraction molaire donnée en  $\text{CO}_2$  dans le gaz, alors que la concentration en bicarbonate décroît en permanence.

Il est donc impossible d'utiliser une équation de Monod, comme le font la plupart des auteurs (CURLISS, 1986; ERICKSON et al. 1987), avec un terme  $C_{\text{HCO}_3^-} / (K_{\text{HCO}_3^-} + C_{\text{HCO}_3^-})$  pour traduire la diminution du rendement énergétique de conversion.

A titre de résultat préliminaire, nous donnons, dans le tableau 5.3, les valeurs du rendement de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse, lors des différentes fractions molaires en  $\text{CO}_2$  utilisées dans le gaz d'alimentation.

Fraction molaire dans le gaz d'alimentation. (ppm)	Rendement de conversion de l'énergie en biomasse. (kg.J <sup>-1</sup> ).10 <sup>9</sup>
Vitesse maximale	2,70
350	0,47
700	0,80
1400	1,35
2100	1,80
2800	2,20

Tableau 5.3: Valeurs du rendement de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse, en fonction de la fraction molaire en CO<sub>2</sub> dans la gaz d'alimentation.

## 5.2. MODELES MATHEMATIQUES BIOCHIMIQUEMENT STRUCTURES DE LA PHOTOSYNTHESE.

### 5.2.1. Intérêt de ces modèles:

Les principales critiques que l'on peut faire aux modèles non structurés tels qu'ils viennent d'être développés sont de deux ordres.

- La transformation des substrats en biomasse et produits est traduite par une ou plusieurs équations stoechiométriques servant à définir les rendements massiques de conversion. En général, ces équations de bilan de masse sont établies lorsque le microorganisme croît à vitesse maximale, dans un environnement favorable n'imposant pas de contrainte. Or dès qu'une pression de l'environnement existe, telle une limitation physique ou biologique, le microorganisme fonctionne sous contrainte, à vitesse réduite.

Dans ce cas, les stoechiométries peuvent être fortement

modifiées, et il devient très difficile de connaître leur évolution, ainsi que celle des rendements de conversion.

Ceci est particulièrement important pour les microorganismes photosynthétiques qui fonctionnent quasiment en permanence sous contrainte physique par le transfert d'énergie lumineuse (les rendements massiques de conversion varient dans ce cas en fonction de l'énergie absorbée dans le réacteur).

- Le nombre de paramètres du modèle à identifier devient très vite important, si l'on prend en compte un certain nombre de limitations. Ceci confère au modèle un manque de cohésion et de robustesse.

Ces problèmes peuvent être résolus par une approche complémentaire introduisant les modèles biochimiquement structurés (ROELS, 1983; DUSSAP, 1988), établie sur l'analyse du métabolisme respiratoire, et susceptible d'être généralisée à la photosynthèse.

La démarche consiste à écrire les bilans en ATP et cofacteurs et à analyser leur couplage. Il devient alors possible de prédire la valeur des rapports de vitesses  $P/2e^-$  *in vivo*. Ces rapports vont déterminer l'établissement des rendements de conversion, en fonction des contraintes extérieures appliquées aux microorganismes. L'analyse du couplage des réactions introduit bien sûr de nouvelles variables qui augmentent donc le nombre de degrés de liberté du modèle. Le système peut cependant être résolu par l'introduction de nouvelles équations qui découlent de l'application, au métabolisme bactérien, de la thermodynamique phénoménologique linéaire des processus irréversibles.

Ainsi, les modèles biochimiquement structurés sont capables de prévoir les rapports des vitesses entre les différentes classes de macromolécules cellulaires, quelles que soient les contraintes appliquées au métabolisme. Il n'est donc plus nécessaire de passer par la détermination des rendements massiques de conversion.

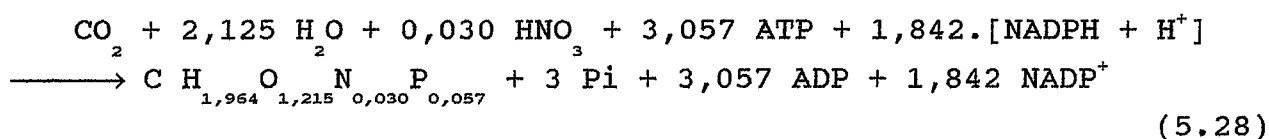
5.2.2. Etablissement des stoechiométries:

L'analyse des voies métaboliques des cyanobactéries données au chapitre 3, la connaissance exacte des compositions des macromolécules cellulaires en molécules élémentaires ainsi que celle des proportions en macromolécules dans la biomasse, permettent d'établir des équations stoechiométriques de synthèse des macromolécules (voir ces données chapitre 3). Ces équations font intervenir la demande en moles d'ATP et cofacteurs réduits pour la synthèse d'une C-mole de macromolécule.

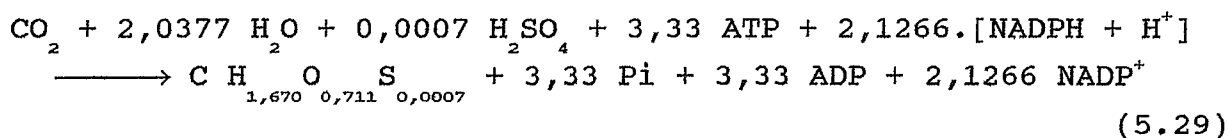
Nous avons réalisé ce travail pour *Spirulina platensis*, et nous allons ici exposer les résultats obtenus. Notons que les cofacteurs sont assimilés au NADP<sup>+</sup>, les connaissances actuelles ne permettant pas de définir les rôles joués par le NAD<sup>+</sup>.

- Synthèse des sucres simples et polyosides:

Pour la synthèse des sucres simples et des polyosides, la demande en ATP a été estimée à partir des données de OURA (1983). L'équation obtenue pour les sucres simples de *S. platensis* (voir chapitre 3) est la suivante:

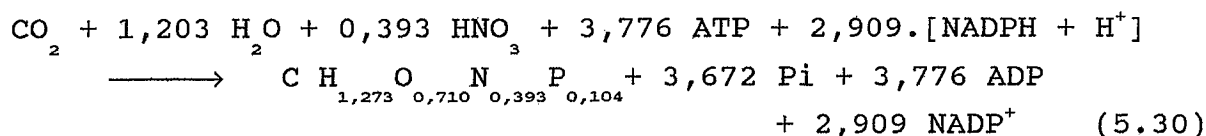


Si l'on considère qu'il faut 2 moles d'ATP pour réaliser une liaison osidique, on obtient l'équation de synthèse des polyosides:



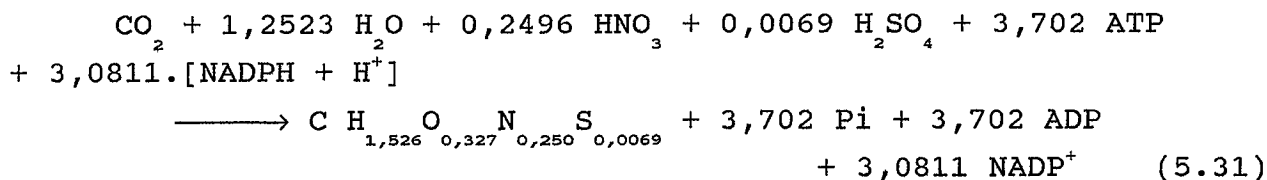
- Synthèse des acides nucléiques:

La demande en ATP a également été estimée à partir des données de OURA (1983). L'équation stoechiométrique obtenue pour les acides nucléiques est alors:

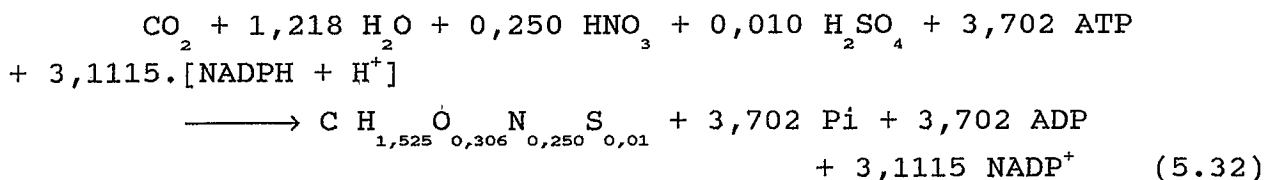


- Synthèse des protéines:

La demande en ATP a été estimée, pour chaque acide aminé, à partir des données de STOUTHAMER (1973). La composition en acides aminés des protéines de *S. platensis* est celle donnée par CLEMENT (1975). Si l'on considère qu'il faut 4 moles d'ATP pour une liaison peptidique, on a alors l'équation stoechiométrique suivante:

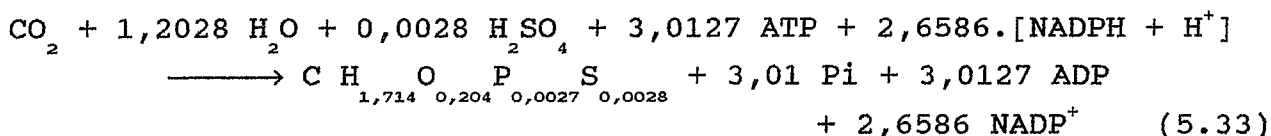


Il est également possible d'obtenir l'équation stoechiométrique des phycocyanines. Ce sont des complexes protéiques qui jouent le rôle de pigment récepteur du photosystème II. L'équation est donc très proche de la précédente:

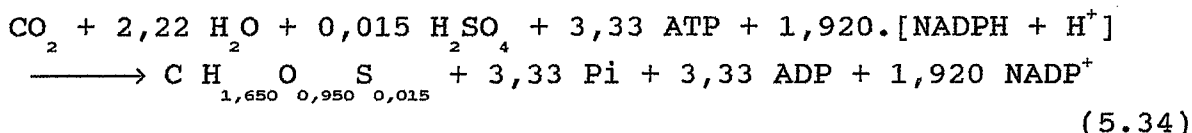


- Synthèse des lipides:

Les lipides des cyanobactéries sont bien particuliers, aussi est-il impossible d'utiliser des données établies sur d'autres bactéries. L'équation qui suit a été écrite à partir des informations données par TREMOLIERES (1990):

- Synthèse de l'exopolysaccharide:

A partir des données que nous avons établies sur la composition et la formule brute du polysaccharide, nous pouvons en déduire l'équation stoechiométrique de synthèse. En comptant toujours 2 moles d'ATP par liaison osidique, et à partir des données de OURA (1983) sur les sucres simples, on a:



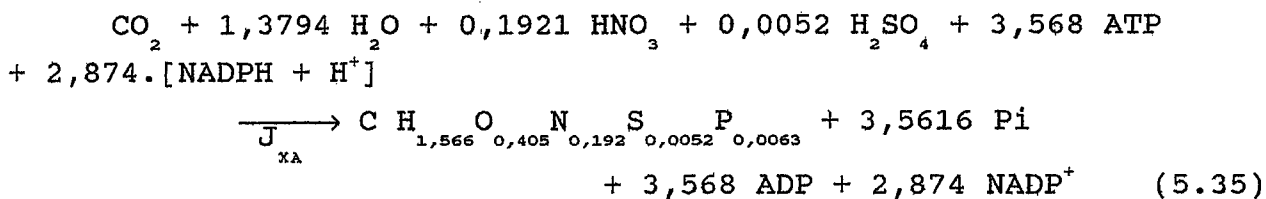
Les équations stoechiométriques 5.28-5.34 peuvent être combinées à volonté pour obtenir l'équation de la biomasse, en fonction des différentes conditions de culture. La détermination des vitesses de synthèse associées à chacune des équations est à la base des modèles biochimiquement structurés de la photosynthèse.

Dans ce qui suit, nous allons traiter, à titre d'exemple, le cas de la limitation physique par le transfert de lumière. Cette restriction n'enlève rien à la généralité du modèle proposé, mais permet une approche simple basée sur une seule équation stoechiométrique pour la biomasse active. D'autre part, le cas de

limitation par la lumière est permanent lors de la croissance des microorganismes photosynthétiques, ce qui leur impose une vitesse et un rapport  $P/2e^-$  *in vivo*.

Dans le cas particulier de *S. platensis*, mais probablement dans le cas de toutes les cyanobactéries, on sait que le déséquilibre éventuel du rapport  $P/2e^-$  conduit à la synthèse de plus ou moins d'exopolysaccharide. Celui-ci joue donc un rôle clé dans le métabolisme du microorganisme, et on doit le prendre en compte dans l'écriture du modèle structuré.

En ce qui concerne la limitation par la lumière seule, le modèle peut s'écrire avec 5 équations stoechiométriques seulement (lors des limitations minérales, les modifications intracellulaires obligent à considérer un nombre d'équations plus élevé). La première équation est celle de la synthèse des constituants cellulaires de la biomasse active. Celle-ci peut s'écrire à partir des équations stoechiométriques de chaque constituant cellulaire que nous avons donné plus haut. Si l'on prend les proportions données au chapitre 3, on obtient l'équation suivante pour la biomasse active, avec une vitesse spécifique molaire  $J_{XA}$  :



La deuxième équation est celle de la synthèse de l'exopolysaccharide, c'est-à-dire l'équation 5.34 précédemment écrite. La vitesse spécifique molaire de cette réaction est  $J_{PS}$ .

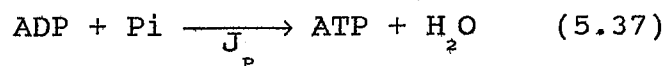
On doit ensuite rajouter les trois équations suivantes:



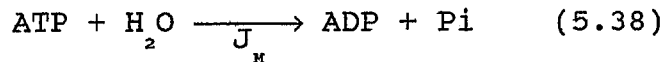
- réduction des cofacteurs par la photosynthèse:



- production d'ATP par la photosynthèse:



- maintenance du microorganisme:



On a donc 5 vitesses spécifiques molaires  $J_{XA}$ ,  $J_{PS}$ ,  $J_N$ ,  $J_P$ ,  $J_M$ , à déterminer, ce qui demande l'écriture de 5 équations supplémentaires.

Deux équations structurantes sont données par le bilan en ATP et en cofacteur qui stipulent que l'ATP et les cofacteurs ne sont globalement ni produits ni consommés par le métabolisme. Cette hypothèse d'accumulation nulle est donc une hypothèse de régime pseudo-permanent.

- Bilan ATP:

$$3,568 J_{XA} + 3,33 J_{PS} + J_M = J_P \quad (5.39)$$

- Bilan cofacteur:

$$2,874 J_{XA} + 1,920 J_{PS} = J_N \quad (5.40)$$

Il reste alors 3 degrés de liberté à fixer, dont deux correspondent aux hypothèses cinétiques du modèle. Les équations 4.28, 5.2, et 5.3 permettent de déterminer la vitesse spécifique molaire de réduction des cofacteurs:

$$J_N = 2 \cdot \frac{Y_{I/O}}{M_{O_2}} \cdot \langle r_I \rangle \quad (5.41)$$

L'hypothèse la plus simple pour la maintenance est alors:

$$\frac{J_H}{J_{XA}} = \text{constante} \quad (5.42)$$

Ces deux relations impliquent l'identification de deux paramètres du modèle.

Le degré de liberté restant pourra être obtenu par l'analyse du couplage phosphorylation-photosynthèse, que nous allons discuter dans la suite.

### 5.2.3. Analyse thermodynamique du couplage phosphorylation-photosynthèse:

Dans les deux paragraphes qui suivent, nous allons abandonner le cadre restreint de la limitation physique par le transfert de lumière pour présenter l'approche thermodynamique générale permettant de prédire l'évolution des rapports  $P/2e^-$  dans les microorganismes photosynthétiques. Nous supposerons d'autre part que le lecteur est familiarisé avec les notions de base de la thermodynamique linéaire des processus irréversibles. Si tel n'est pas le cas, il pourra trouver les définitions nécessaires dans les ouvrages de PRIGOGINE (1968), ROELS (1983), et DUSSAP (1988).

L'application de la thermodynamique des processus irréversibles à la modélisation des systèmes biologiques représente une avancée récente (ROELS, 1983; DUSSAP, 1988; WALZ, 1990) dans le domaine du génie des procédés. Rappelons que la thermodynamique du non équilibre est basée sur le théorème du minimum de production d'entropie (PRIGOGINE, 1968), qui présente un intérêt certain pour la description des états stationnaires chez les microorganismes. Les trois conditions nécessaires à

l'application de ce théorème sont les suivantes (JURETIC, 1984):

- le système doit obéir à des lois phénoménologiques linéaires;

- les coefficients phénoménologiques doivent être indépendants des forces;

- les relations de réciprocité d'Onsager doivent s'appliquer.

Le champ d'application de la thermodynamique phénoménologique linéaire est donc normalement restreint aux systèmes homogènes proche de l'équilibre, ou aux systèmes pulsatoires loin de l'équilibre (DUSSAP, 1988).

Elle semble avoir été appliquée avec succès par DUSSAP (1988) pour des systèmes hétérogènes loin de l'équilibre, en vue de déterminer les rapports P/O *in vivo* lors de la respiration des microorganismes fonctionnant sous contrainte.

Il apparait donc possible d'envisager une application à la détermination du rapport P/2e<sup>-</sup> chez les microorganismes photosynthétiques.

L'équation du couplage phosphorylation-photosynthèse est donnée par:

$$\frac{J_P}{J_N} = P/2e^- \quad (5.43)$$

Lorsque deux réactions sont couplées, leurs vitesses sont dépendantes et les lois de la thermodynamique linéaire des processus irréversibles permettent d'écrire:

$$J_N = L_{NN} \cdot A_N + L_{PN} \cdot A_P \quad (5.44)$$

$$J_P = L_{PN} \cdot A_N + L_{PP} \cdot A_P \quad (5.45)$$

Les coefficients  $L_{ij}$  sont les coefficients phénoménologiques, et  $A_j$  est l'affinité de la réaction:

$$A_j = - \sum_i \nu_{ij} \cdot \mu_i$$

où  $\mu_i$  est le potentiel chimique du constituant i.

Les deux relations 5.44-45 peuvent être normalisées en posant:

$$q = \frac{L_{PN}}{(L_{PP} \cdot L_{NN})^{1/2}} \quad (5.46)$$

$$Z = \left(\frac{L_{PP}}{L_{NN}}\right)^{1/2} \quad (5.47)$$

$$x = Z \cdot \frac{A_P}{A_N} \quad (5.48)$$

Elles deviennent alors:

$$J_N = L_{NN} \cdot A_N \cdot (1 + q \cdot x) \quad (5.49)$$

$$J_P = Z \cdot L_{NN} \cdot A_N \cdot (q + x) \quad (5.50)$$

Seule la détermination *a priori* du rapport est nécessaire:

$$\frac{J_P}{J_N} = \frac{Z \cdot (q + x)}{(1 + q \cdot x)} \quad (5.51)$$

Les 3 variables du système Z, q, x, sont calculées en exprimant analytiquement que le couplage entre les deux réactions est optimal.

Celui-ci est défini par:

$$\frac{Z}{q} = \nu \quad (5.52)$$

$$\frac{d(J_N \cdot A_N)}{dq} = 0 \quad (5.53)$$

Le théorème du minimum d'entropie permet alors d'écrire:

$$d\sigma = 0 \quad (5.54)$$

Pour exprimer la fonction de dissipation  $\sigma$ , il faut reformuler le bilan d'entropie établi au chapitre 4 dans les termes de la thermodynamique phénoménologique linéaire.

Introduisons la fonction de dissipation:

$$\sigma = \langle \sigma' \rangle \cdot T \cdot \frac{1}{C_x} \quad (5.55)$$

et explicitons l'équation 4.52 qui donnait le bilan entropique en régime stationnaire, en négligeant l'émission:

$$\Delta \left[ \frac{T}{C_x} \cdot \sum_i \dot{S}_i \cdot w_i \right] = \frac{Q}{C_x} + \iiint_V \left[ - \rho \cdot \frac{\dot{W}}{C_x} + r_I \right] \cdot dV \quad (5.56)$$

Pour pouvoir écrire le bilan entropique sur le métabolisme des microorganismes, il faut le partitionner:

$$\Delta \left[ \frac{T}{C_x} \cdot \sum_i \dot{S}_i \cdot w_i \right] = \frac{Q}{C_x} + \iiint_V \left[ - \rho \cdot \frac{\dot{W}}{C_x} + (1 - Y_q \cdot Y_E) \cdot r_I + Y_q \cdot Y_E \cdot r_I \right] \cdot dV \quad (5.57)$$

En faisant apparaître l'énergie utilisable par les microorganismes  $Y_q \cdot Y_E \cdot r_I$ , on s'affranchit de la réserve émise par JURETIC (1984), qui fait remarquer avec raison que lorsqu'on approche de la saturation lumineuse, les photons ne sont pas conservés dans les réactions primaires de la photosynthèse.

Si l'on applique l'équation 5.57 au métabolisme des microorganismes, on peut alors considérer qu'il s'agit d'un système isotherme, isochore et non dissipatif, avec réaction chimique. Le bilan se simplifie alors:

$$\Delta \left[ \frac{T}{C_x} \cdot \sum_i S_i \cdot w_i \right] = V \cdot \sigma \quad (5.58)$$

avec:

$$\sigma = \langle Y_q \rangle \cdot Y_E \cdot \langle r_I \rangle - \frac{1}{C_x} \cdot \sum_i \mu_i \cdot \frac{r_i}{M_i}$$

On rappelle que le rendement  $Y_E$  est une caractéristique

physique de l'émission de la source, et que l'évolution du rendement quantique moyen  $\langle Y_q \rangle$  en fonction de la vitesse spécifique d'absorption de l'énergie lumineuse est donné par l'équation 5.14.

La formulation phénoménologique linéaire amène à l'écriture suivante de la fonction source:

$$\sigma = \langle Y_q \rangle \cdot Y_E \cdot \sum_{\nu} A_{\nu} \cdot J_{\nu} + \sum_i A_i \cdot J_i \quad (5.59)$$

Les 3 relations 5.52-5.54 permettent de calculer  $Z$ ,  $q$ ,  $x$ , pour autant que la relation différentielle 5.54 soit résolue en prenant en compte les contraintes externes qui s'exercent sur le système métabolique.

Nous pouvons maintenant calculer les rapports  $P/2e^-$  dans un certain nombre de cas particuliers. Pour cela, il faut détailler l'écriture des équations 5.36 et 5.37, en leur associant une production d'énergie libre. Cette production d'énergie est associée à un gradient de protons de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes et de la membrane plasmique (NITSCHMANN, 1986). A l'équilibre, on a une relation entre le gradient électrochimique de protons et l'énergie libre de Gibbs:

$$n \cdot \Delta\mu_H^+ = \Delta G_P \quad (5.60)$$

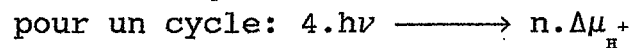
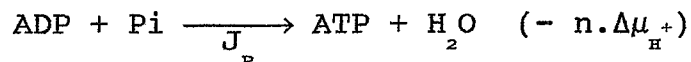
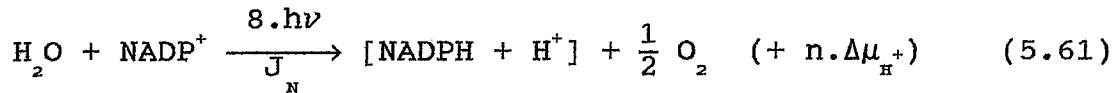
$\Delta\mu_H^+$  et  $\Delta G_P$  sont respectivement définis par:

$$\Delta\mu_H^+ = 2,3 \cdot RT \cdot \Delta pH - \mathcal{F} \cdot \Delta\psi$$

$$\Delta G_P = \Delta G_P^0 + RT \cdot \ln \frac{C_{ATP}}{C_{ADP} + C_{Pi}}$$

où  $\Delta pH$  et  $\Delta\psi$  sont les différences de pH et de potentiel électrique de part et d'autre des membranes. Les vitesses spécifiques de réduction des cofacteurs et de production de l'ATP s'écrivent

alors, à partir des équations 5.36 et 5.37:



(5.62)

Ainsi, on a fait apparaitre la phosphorylation cyclique et non cyclique, et la vitesse spécifique de phosphorylation globale  $J_P$  peut s'écrire comme la somme de deux composantes: la vitesse spécifique de phosphorylation non cyclique  $J_{P1}$  et la vitesse spécifique de phosphorylation cyclique  $J_{Pc}$ . Il en est de même pour  $J_\mu$  qui est la vitesse spécifique de création de  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ , c'est-à-dire la puissance chimique induite par le transport des protons.

$$J_P = J_{P1} + J_{Pc} \quad (5.63)$$

$$J_\mu = J_{\mu 1} + J_{\mu c} \quad (5.64)$$

Nous avons également les définitions suivantes pour les rendements de conversion.

- Rendement de conversion du  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  en ATP:

$$Y'_{\mu P} = \frac{J_{P1}}{J_{\mu 1}} \quad (5.65)$$

$$Y'_{\mu P} = \frac{J_{Pc}}{J_{\mu c}} \quad (5.66)$$

- Rendement de conversion de l'énergie lumineuse en  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ :

$$\frac{Y'_{\nu}}{8} = \frac{J_{\mu 1}}{J_{\nu}} \quad (5.67)$$

$$\frac{Y'_{\nu}}{4} = \frac{J_{\mu c}}{J_{\nu}} \quad (5.68)$$

Ces définitions permettent d'expliciter les vitesses spécifiques de réduction des cofacteurs et de production de l'ATP, en écrivant les bilans pour  $n \cdot \Delta\mu_H$ . Notons que d'après NITSCHMANN (1986), n serait égal à 3 chez les cyanobactéries.

Pour la vitesse de réduction des cofacteurs, on a :

$$J_N = J_{\mu_1} \quad (5.69)$$

D'après l'équation 5.63, la vitesse de production de l'ATP est :

$$J_P = Y'_{\mu_P} \cdot J_{\mu_C} + Y'_{\mu_P} \cdot J_{\mu_1} \quad (5.70)$$

A partir des relations 5.67-5.69, on obtient :

$$J_P = Y'_{\mu_P} \cdot J_N \cdot (2c + 1) \quad (5.71)$$

où c est le nombre de cycles. Si l'on suppose un seul cycle, on a :

$$J_P = 3 \cdot Y'_{\mu_P} \cdot J_N \quad (5.72)$$

Dans le cas général, le rapport  $P/2e^-$  est donné par :

$$\frac{J_P}{J_N} = (2c + 1) \cdot Y'_{\mu_P} \quad (5.73)$$

La détermination de ce rapport passe par le calcul du rendement  $Y'_{\mu_P}$ . Les variables réduites définies par les relations 5.46-5.48 permettent d'écrire :

$$Y'_{\mu_P} = x \cdot q \quad (5.74)$$

Le problème du calcul du rendement semble a priori identique pour la respiration (DUSSAP, 1988) et pour les autres types de



phosphorylations induites par un gradient de protons  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ . On peut alors formuler plusieurs hypothèses sur le couplage entre la phosphorylation et le gradient de potentiel.

- HYPOTHESE 1:

Le couplage entre les deux processus s'effectue avec les mêmes caractéristiques que pour la respiration, c'est-à-dire, avec le même coefficient de couplage et le même rapport d'affinités. On a donc (DUSSAP, 1988):

$$|x| = Z \cdot \frac{A_P}{A_N} = 0,644$$

et  $q = 0,91$

$Y'_{\mu_P}$  varie alors entre 0,586 à l'optimum, sans limitation sur aucune des 2 réactions, à 0,828 avec une limitation sur la vitesse de synthèse du [NADPH + H<sup>+</sup>]. Soit à l'optimum, à partir de l'équation 5.72:

$$P/2e^- = 1,758 \quad (5.75)$$

- HYPOTHESE 2:

Le couplage des 2 processus ne s'effectue pas tout à fait de la même façon que pour la respiration. En remarquant que  $J_N$  résulte déjà d'un couplage avec un processus de transport d'énergie lumineuse, le coefficient de couplage entre  $J_N$  et  $J_P$  s'établit à une valeur inférieure de façon analogue aux couplages de processus anaboliques avec la consommation d'ATP chez les microorganismes non photosynthétiques.

On trouve alors (DUSSAP, 1988):

$$|x| = 0,518$$

$$q = 0,816$$

$$Y'_{\mu_P} = 0,422$$

et par conséquent:

$$\frac{J_P}{J_N} = P/2e^- = 1,268 \quad (5.76)$$

- HYPOTHESE 3:

On raisonne de manière plus globale en dissociant les processus de phosphorylation et de photolyse. On considère que les photosystèmes engendrent la création de tout le gradient de protons. Celui-ci couple la synthèse de l'ATP, qui est elle même couplée à la photolyse. Le processus endergonique reste la photolyse, qui globalement apparait être couplée à la synthèse d'ATP. Lorsque  $J_p$  est imposé par la limitation lumière d'une part, et lorsque la demande est imposée par la limitation carbone, on écrit directement:

$$\frac{J_N}{J_P} = q^2 = 0,91^2$$

d'où:

$$\frac{J_P}{J_N} = P/2e^- = 1,208 \quad (5.77)$$

Sans aucune limitation sur  $J_N$  ou  $J_P$ , on a:

$$\frac{J_N}{J_P} = q \cdot x = 0,644 \cdot 0,91 = 0,586$$

et par conséquent:

$$\frac{J_P}{J_N} = P/2e^- = 1,706 \quad (5.78)$$

C'est le cas où la limitation lumineuse est levée par d'autres carences dans le milieu, ce qui supprime le caractère imposé de  $J_p$ . Ceci a pour effet de diminuer la demande en ATP et de lever l'effet de la limitation par le transfert de lumière.

L'avantage de l'hypothèse 3 que nous venons de développer est d'éviter une hypothèse sur le nombre de tours de cycles pour la phosphorylation cyclique. Elle est cependant plus éloignée du mécanisme réel.

Quelle que soit l'hypothèse retenue, le modèle est capable de prévoir l'évolution théorique continue des rapports  $P/2e^-$  entre

les limites maximales et minimales fixées par le choix de l'hypothèse. On remarquera par ailleurs que les valeurs théoriques maximales et minimales diffèrent peu, quelle que soit l'hypothèse formulée.

Enfin, notons que l'hypothèse 2 permet de calculer le rendement de conversion de l'énergie lumineuse en énergie physico-chimique. Ce rendement s'exprime avec nos notations  $Y_{\phi_s} \cdot \Delta H_c$  et il est égal, à l'optimum à 0,21. Si l'on prend également les valeurs optimales en lumière blanche pour  $Y_q$  et  $Y_E$  qui sont égales à 0,75, on obtient un rendement total de la photosynthèse  $Y_T$  égal à  $0,75^2 \cdot 0,21$  soit 0,12. Cette valeur est rigoureusement identique à la valeur expérimentale déterminée au paragraphe 5.1.2 (tableau 5.2).

#### 5.2.4 Résultats préliminaires:

Les travaux ne sont pas suffisamment avancés pour donner dans ce paragraphe des résultats de simulations à partir du modèle qui vient d'être exposé. Néanmoins, nous sommes en mesure de donner un certain nombre de résultats expérimentaux qui valident les valeurs théoriques obtenues précédemment.

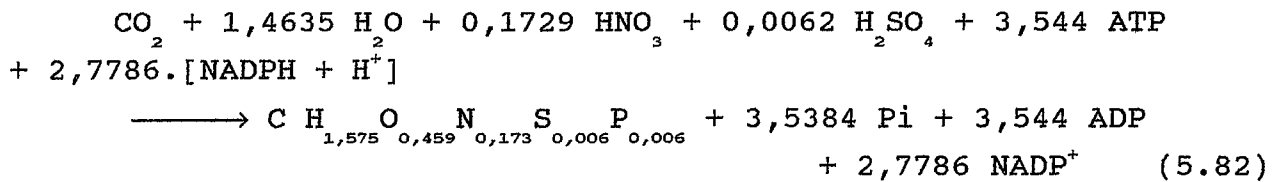
#### A - VALIDATION DES STOECHIOMETRIES:

Pour valider les stoechiométries, et notamment les valeurs des coefficients stoechiométriques attribués à la formation du pouvoir réducteur, il faut être capable de relier ces coefficients à une valeur expérimentale mesurable. Comme nous l'avons présenté au chapitre 4, il est facile de relier la valeur du quotient photosynthétique  $Q_p$  à la valeur du coefficient stoechiométrique du pouvoir réducteur. En effet, à partir des coefficients stoechiométriques de la réaction de production des cofacteurs réduits (équation 5.36), et de la définition du quotient photosynthétique  $Q_p$  (équation 4.87), on a :





uniquement, et à très faible énergie lumineuse. C'est-à-dire que la biomasse se trouve dans des conditions où le rendement énergétique de conversion est maximum ( $Y_{I/X} = 5,7 \cdot 10^{-9}$  J/kg et  $Y_T = 0,12$ ). La biomasse totale obtenue est alors constituée de 90% de biomasse active et 10% d'exopolysaccharide. L'équation stoechiométrique est donc:



On remarquera en premier lieu que la formule C-molaire de la biomasse est identique à la formule expérimentale donnée au chapitre 3, et obtenue dans les mêmes conditions de culture (équation 3.7).

La valeur du rapport  $P/2e^-$  est ici donnée par:

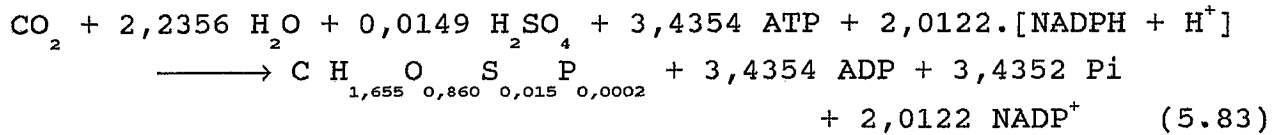
$$P/2e^- = \frac{3,544}{2,7786} = 1,275$$

ce qui est très proche de la valeur calculée donnée par la relation 5.76, égale à 1,268.

- Limitation minérale par la source d'azote:

Les résultats physiologiques et les dosages donnés au chapitre 3 ont permis d'établir qu'en limitation par les nitrates, la biomasse produite était formée de 92% de polysides (glycogène sulfaté et exopolysaccharide), et de 8% de lipides. Pour établir l'équation stoechiométrique de synthèse de cette biomasse, il faut tenir compte de la quantité nécessaire d'ATP pour synthétiser les nouvelles protéines à partir des acides aminés issus de la dégradation des phycocyanines (voir les résultats physiologiques sur la limitation N au chapitre 3). Tous calculs faits, on

obtient:



Le rapport  $\text{P}/2\text{e}^-$  vaut alors:

$$\text{P}/2\text{e}^- = \frac{3,4354}{2,0122} = 1,707$$

valeur identique à la valeur théorique donnée par la relation 5.78 et égale à 1,706.

- Limitation par la source de carbone:

L'équation stoechiométrique obtenue dans ce cas a déjà été donnée au paragraphe précédent pour calculer le quotient photosynthétique  $Q_p$ . Il s'agit de l'équation 5.81. Celle-ci permet de calculer la valeur du rapport  $\text{P}/2\text{e}^-$ :

$$\text{P}/2\text{e}^- = \frac{3,591}{2,9331} = 1,224$$

La valeur théorique est donnée par la relation 5.77 et égale à 1,208. La comparaison entre les deux valeurs apparaît donc satisfaisante.

Les résultats obtenus avec le modèle biochimiquement structuré semblent donc encourageants, puisque dans les 3 cas de limitation étudiés, il y a accord entre la théorie et l'expérience. Le tableau 5.4 résume les différentes valeurs obtenues.

Limitation.	Rapport P/2e <sup>-</sup> théorique.	Rapport P/2e <sup>-</sup> observé.
Transfert de lumière.	1,27	1,27
Source d'azote NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,71-1,76	1,71
Source de carbone HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,21	1,22

**Tableau 5.4:** Comparaison entre les valeurs théoriques et les valeurs observées du rapport P/2e<sup>-</sup> *in vivo*, dans différents cas de limitations possibles.

La validation complète du modèle devra être obtenue à partir de simulations qui devront rendre compte, au cours de cultures sous différentes limitations, des modifications métaboliques observées et de l'évolution des vitesses de synthèse des composants cellulaires. Cette démarche doit permettre de connaître de façon continue l'évolution des stoechiométries sur le photobioréacteur, et notamment de déterminer, dans le cas le plus simple, quelle est la proportion d'exopolysaccharide synthétisé en fonction de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de la lumière dans le réacteur.

### 5.3 APPLICATIONS DES MODELES DEVELOPPES AUX CULTURES EN CONTINU.

Les modèles qui viennent d'être développés au cours de ce chapitre permettent de prévoir le comportement d'un photobioréacteur dans une large gamme de conditions différentes, optimales ou limitantes. Ils assurent notamment un certain nombre de tâches qui avaient été définies au chapitre 1.

- Il est possible de calculer les vitesses d'évolution des



constituants cellulaires ainsi que les vitesses de consommation des différents substrats et de l'énergie lumineuse. Ces vitesses sont reliées par des équations stoechiométriques dont on connaît les modifications de rendement, en conditions de limitation par le transfert de lumière, la source de carbone, le transfert de gaz, ou les concentrations en minéraux. On est donc capable de calculer les productivités du réacteur, ainsi que de réaliser les bilans matières sur le photoréacteur.

- La détermination de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse dans le réacteur est non seulement à la base des calculs de vitesses de croissance, mais permet également de réaliser les bilans enthalpique et entropique. Si ces bilans énergétiques sont combinés, ils débouchent sur l'analyse exergetique du compartiment photosynthétique qui est à la base de son optimisation énergétique.

- L'ensemble de ces calculs est possible car on dispose d'une banque de données thermodynamiques et cinétiques impliquées dans le procédé.

En ce sens, les modèles présentés permettent d'envisager la conception et le dimensionnement de photobioréacteurs, ainsi que la simulation du comportement de cultures en continu.

Dans ce dernier cas, la vitesse de croissance des microorganismes est fixée par les débits d'alimentation et de soutirage du réacteur. Le taux de dilution est égal au taux de croissance des microorganismes. On a donc:

$$D = \langle \mu \rangle \quad (5.84)$$

Il est alors classique de chercher à prévoir la productivité du réacteur, en fonction du taux de dilution. Cette productivité est égale au produit  $D.C_x$ , où  $C_x$  est la concentration en biomasse dans le courant de sortie. Le modèle traitant des limitations minérales, et notamment de la limitation par les nitrates, permet de calculer le taux de croissance moyen  $\langle \mu \rangle$  pour un flux lumineux

incident donné (équations 5.10-5.12)

Il est donc possible de calculer une courbe donnant la productivité en fonction du taux de dilution. Cette courbe tient compte soit de la limitation par la lumière seule, soit à la fois des limitations par le transfert de lumière et des limitations minérales. Pour mieux comprendre les interactions entre ces limitations physiques et biologiques, il sera intéressant de comparer les résultats avec une courbe fictive traduisant uniquement la limitation par les minéraux. Cette courbe peut s'obtenir en calculant le taux de croissance de la façon suivante, dans le cas de la limitation nitrate:

$$\mu = \langle \mu \rangle_{\max} \cdot \frac{C_N}{K_N + C_N}$$

Le taux de croissance moyen maximum  $\langle \mu \rangle_{\max}$  est le taux de croissance le plus élevé que l'on puisse obtenir avec un flux incident donné.

La figure 5.10 montre les résultats obtenus pour les productivités en fonction du taux de dilution, dans le cas où la limitation minérale est la limitation azotée.

On constate qu'en limitation lumière seule, la productivité maximale peut être choisie dans une très large gamme de taux de dilution, ce qui traduit simplement que l'énergie absorbée reste égale, mais que le volume utile éclairé varie.

En limitation lumière et nitrates, la gamme optimale est plus réduite car la courbe à considérer est la résultante des courbes en limitation lumière seule et en limitation nitrate seule.

Enfin on constate qu'il est possible de calculer une valeur critique de la concentration en nitrates dans l'alimentation, pour laquelle la limitation par la lumière dans le réacteur n'influe plus sur la productivité globale.

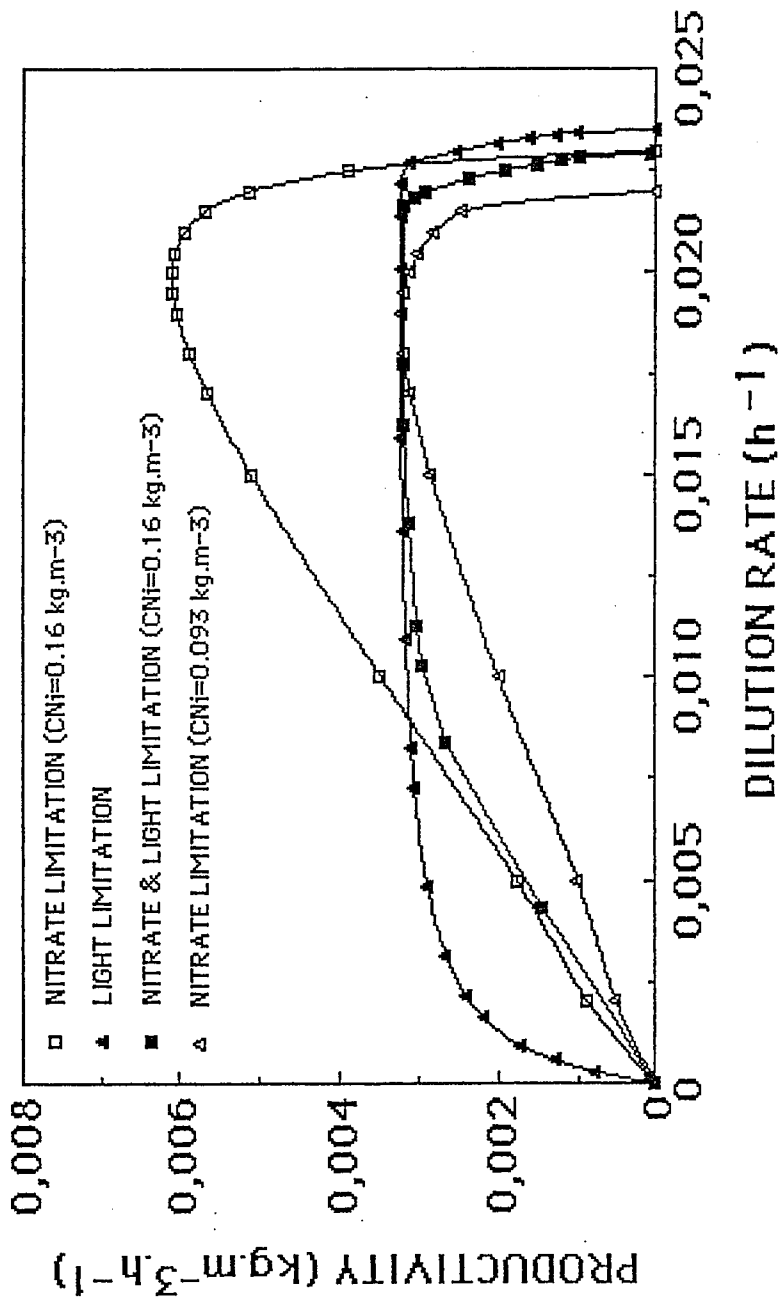


Figure 5.10: Productivité en biomasse en fonction du taux de dilution dans un photobioréacteur fonctionnant en continu. Influence des limitations lumière et nitrate et de la concentration en nitrate dans l'alimentation. Ces résultats sont obtenus numériquement à partir des modèles proposés, pour un flux lumineux incident de 19 W/m<sup>2</sup>.

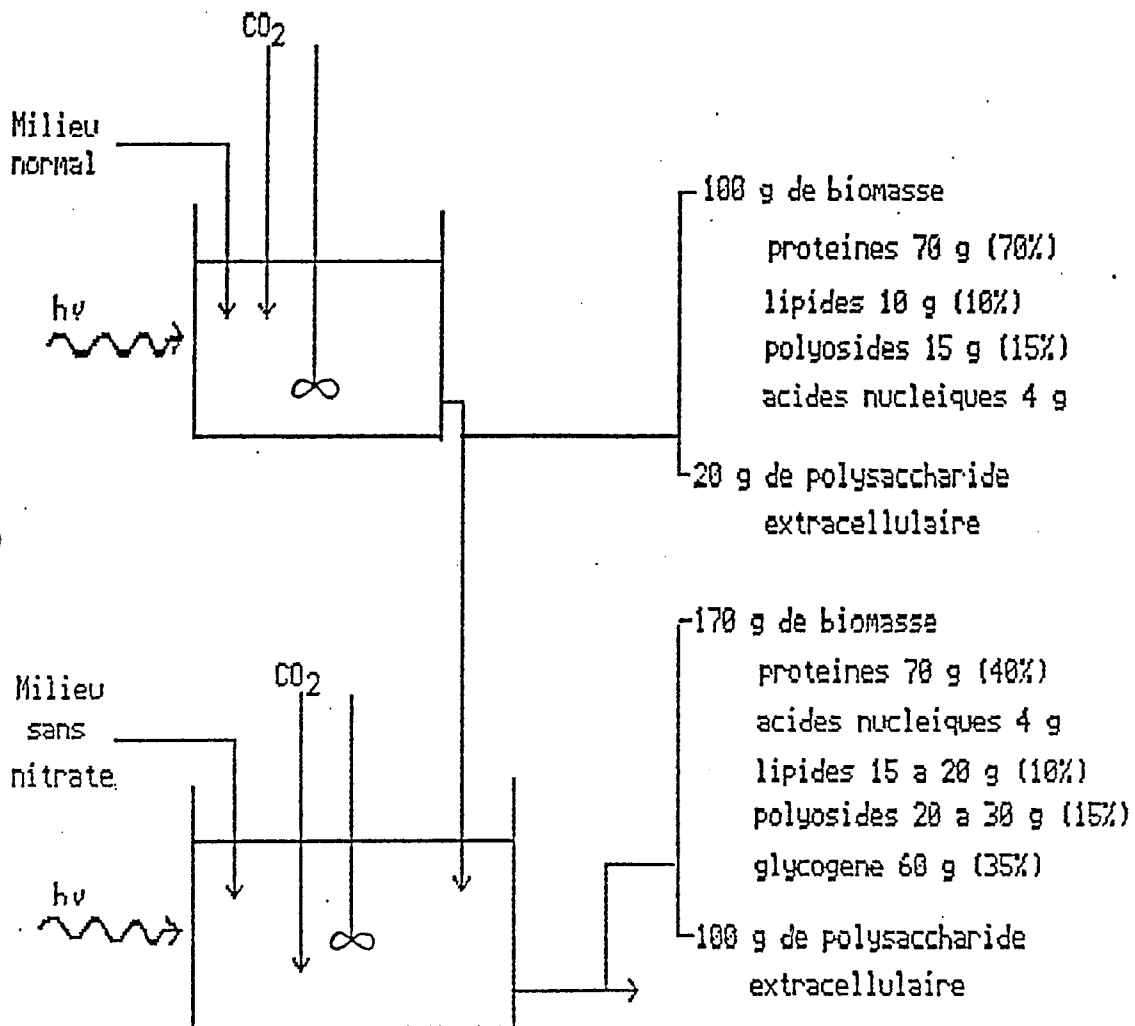
Un autre aspect de l'application de ce modèle est celui qui a été développé dans l'article de CORNET et DUBERTRET (1990), concernant le compartiment photosynthétique d'un écosystème clos. En effet, un photoréacteur à base de *S. platensis* présente l'inconvénient de ne pouvoir fournir une biomasse équilibrée, mais une biomasse essentiellement riche en protéines. Elle est donc plutôt favorable au recyclage de l'azote et du soufre, mais défavorable au recyclage du carbone et de l'oxygène.

Un bioréacteur de 1 m<sup>3</sup> fonctionnant en continu, avec une concentration en biomasse de 1 kg/m<sup>3</sup>, et un taux de dilution de 0,05 h<sup>-1</sup>, produirait environ 1 kg de biomasse et 2 kg d'oxygène par jour. Ceci satisfait aux besoins de 10 personnes pour la ration protéique, et de 2 personnes seulement pour la quantité d'oxygène.

Si l'on utilise alors un deuxième réacteur dépourvu d'azote, on peut bénéficier du fait démontré que la biomasse s'enrichit fortement en polysides. Une telle biomasse présente alors l'avantage d'être plus équilibrée, et donc plus propice au recyclage des éléments C,H,O,N,S.

Le modèle permet de calculer que si la biomasse issue du premier réacteur est envoyée dans un réacteur d'environ 4 m<sup>3</sup>, ne contenant pas d'azote, on obtient 2,7 kg de biomasse équilibrée et 5,4 kg d'oxygène par jour. Ceci satisfait approximativement les besoins journaliers de 5 personnes. La figure 5.11 montre la composition de la biomasse en différents constituants cellulaires à la sortie du premier puis du deuxième réacteur.

En tout état de cause, les modèles développés constituent des outils intéressants pour l'étude du compartiment photosynthétique d'un écosystème clos artificiel. ils permettent d'envisager des simulations de cultures en discontinu, semi-continu, ou continu qui seront à la base de l'étude de faisabilité et de stabilité du système. Ils constituent également un outil performant pour la conception et le dimensionnement des photobioréacteurs. Enfin, ils



**Figure 5.11:** Proposition de deux photoréacteurs opérant en continu et en série. L'alimentation du deuxième réacteur est dépourvue de nitrate, ce qui permet l'enrichissement de la biomasse en polysaccharides. Les compositions de la biomasse obtenue sont données respectivement en sortie du premier et du deuxième réacteur. Ces résultats sont obtenus à partir des modèles proposés.

peuvent être simplifiés en vue de leur introduction dans des algorithmes de contrôle de l'écosystème artificiel.



## CONCLUSION

La modélisation du comportement des microorganismes en photobioréacteur nécessite la connaissance de deux types de phénomènes. L'énergie lumineuse disponible en chaque point du réacteur impose l'existence de vitesses locales aux microorganismes, ce qui conduit, pour des concentrations élevées en pigments, à une vitesse de croissance constante fixée par les caractéristiques de l'appareillage. Dans certains cas, les caractéristiques technologiques conditionnent également les échanges en  $\text{CO}_2$  entre les microorganismes et leur environnement. Par ailleurs, les voies métaboliques qui convertissent les substrats minéraux en produits sont fixées par l'équipement enzymatique des cellules; le couplage entre le fonctionnement des différentes voies métaboliques détermine les rendements d'utilisation des substrats. Le problème principal réside dans le fait que tous ces phénomènes physiques et biologiques interagissent et doivent donc être étudiés séparément, puis globalement, pour obtenir des informations cinétiques et stoechiométriques.

Dans notre cas, l'étude de l'ensemble de ces phénomènes est particulièrement importante; le photobioréacteur devant s'intégrer au sein d'un système dynamique complexe tel qu'un écosystème clos artificiel. Dans cette optique, on doit également envisager l'étude du bilan énergétique.

La particularité des microorganismes photosynthétiques comme *Spirulina platensis*, lorsqu'ils sont cultivés en masse dans un photobioréacteur, réside dans le fait qu'ils ne fonctionnent quasiment jamais à vitesse maximale. En effet, l'apport d'énergie



lumineuse dans le réacteur est généralement l'étape limitante. La modélisation de ce phénomène conduit à déterminer le terme d'énergie échangée entre la phase photonique et la phase matérielle du réacteur. Néanmoins, cette information globale de type "boîte noire" ne suffit pas pour accéder à l'ensemble des données cinétiques qui demandent en plus la connaissance d'informations locales.

La démarche qui a été adoptée, pour exploiter les résultats expérimentaux sur la culture de *S. platensis* en fioles de Roux de tailles différentes et en bioréacteur cylindrique de 7 litres, a consisté à reprendre le formalisme de la théorie des transferts radiatifs développée par CHANDRASEKHAR (1960). Une technique de maillage originale de photoréacteurs parallélépipédiques et cylindriques a permis de calculer les intensités spécifiques locales. Cette démarche confère au modèle trois caractéristiques importantes:

- obtention des vitesses spécifiques locales d'absorption de l'énergie lumineuse par les microorganismes, et de la vitesse spécifique globale par intégration spatiale;
- détermination du volume utile éclairé où a lieu la croissance, à partir de la connaissance de l'énergie lumineuse disponible en chaque point du réacteur;
- détermination du terme d'énergie photonique échangée, intervenant dans les bilans enthalpique et entropique.

L'application de l'équation des transferts radiatifs au milieu fini que constitue le photobioréacteur pose cependant des problèmes numériques. Une méthode de résolution originale a été développée et le programme a été vectorisé de façon à augmenter sa rapidité d'exécution. Néanmoins, cette démarche reste coûteuse en temps de calcul et doit rester limitée à la simulation du procédé; elle n'est pas utilisable pour l'identification des paramètres cinétiques du modèle.

---

Celle-ci peut être effectuée à partir de modèles monodimensionnels simplifiés. En accord complet avec AIBA (1982), nous avons établi que le modèle de Lambert-Beer était trop simpliste pour rendre compte des phénomènes. Celui-ci, pourtant utilisé couramment en photométrie, globalise les phénomènes d'absorption et de diffusion de l'énergie lumineuse. Entre la simplicité du modèle de Lambert-Beer et la complexité du maillage tridimensionnel du photoréacteur, nous avons développé un modèle monodimensionnel original fondé sur les hypothèses de SCHUSTER (1905). Celui-ci permet de calculer les profils d'énergie disponible suivant une direction privilégiée. Le système d'équations algébriques obtenu n'est applicable qu'aux cas de réacteurs parallélépipédiques de faible épaisseur et ne permet pas d'obtenir la vitesse spécifique de consommation de l'énergie lumineuse.

L'utilisation de coefficients globaux d'absorption et de diffusion de la lumière, intégrés sur le spectre visible, et le modèle ainsi établi nous ont permis d'introduire le concept de volume utile éclairé dans lequel la réaction de croissance se produit. L'autre partie du réacteur peut être assimilée à une zone morte car nous avons montré que, chez *S. platensis*, la respiration était inhibée à la lumière et demandait une minute pour reprendre à l'obscurité, ce qui est bien supérieur aux temps de séjour évalués. Cette simplification conduit à une identification aisée des paramètres.

Le transfert de  $\text{CO}_2$  de la phase gazeuse à la phase liquide est un autre phénomène physique pouvant générer une étape limitante. Celle-ci est alors caractérisée par la détermination du coefficient volumétrique de transfert et par la solubilité du  $\text{CO}_2$  dans le milieu de culture. Nos résultats montrent cependant que ce cas de figure est beaucoup moins courant que la limitation par le

transfert d'oxygène chez les microorganismes non photosynthétiques pour deux raisons essentielles:

- il existe une réserve considérable en carbone dissous dans le milieu, sous forme de carbonate et bicarbonate;

- lorsque la concentration devient limitante, les cyanobactéries concentrent le bicarbonate, ce qui maintient élevée l'activité carboxylase de la Rubisco et diminue les possibilités de photorespiration.

Il s'agit alors d'une limitation biologique par la source de carbone qui se traduit par une diminution du rendement de conversion de l'énergie lumineuse, les microorganismes devant consommer beaucoup d'ATP pour maintenir le gradient de concentration en bicarbonate. Ce phénomène semble très difficile à modéliser et il a été impossible de relier la diminution de rendement à la concentration extracellulaire en bicarbonate.

En tout état de cause, nous avons établi que le transfert de  $\text{CO}_2$  dans les milieux de culture à pH élevé était caractérisé par un régime instationnaire car les dynamiques sont très lentes au sein de la phase liquide. Les évolutions des concentrations des différentes espèces du carbone inorganique dissous peuvent être déterminées si l'on connaît leurs coefficients d'activité pour des forces ioniques élevées.

Le calcul des nombres de Hatta a montré que l'accélération du transfert par la réaction chimique était peu importante, sauf si le coefficient de transfert, toujours difficile à mesurer, devenait faible.

Le recyclage des principaux éléments C,H,O,N,S,P, étant le but des écosystèmes clos artificiels, nous avons été amenés à nous intéresser aux modifications physiologiques et métaboliques résultant de carences en substrats minéraux comme l'azote, le soufre et le phosphore. Dans tous les cas, nos résultats montrent que toutes les molécules impliquées ont été correctement identifiées et dosées, ce qui est une étape préliminaire à tout

travail de modélisation.

Les comportements obtenus chez *Spirulina platensis* sont assez semblables lors des carences en azote et en soufre. Les résultats montrent que lorsque ces substrats sont épuisés, les cellules arrêtent de se diviser mais continuent à synthétiser des composés carbonés à une vitesse fixée par la vitesse d'absorption de l'énergie lumineuse. Ces composés carbonés sont essentiellement du glycogène et un exopolysaccharide. Parallèlement, on observe une décroissance de la concentration en phycocyanines, alors que la concentration en protéines totales reste constante lors d'une carence en nitrates mais diminue lors d'une carence en sulfates.

En ce qui concerne le phosphore, la limitation se déroule de façon plus classique dans le sens où l'absence de phosphate dans le milieu conduit à un arrêt de croissance de l'ensemble des composants cellulaires. Après cette phase transitoire, les synthèses peuvent reprendre à partir des réserves intracellulaires en polyphosphates. Il semble alors que la biomasse ne se divise plus jusqu'à l'épuisement total des réserves.

L'ensemble de ces observations a permis d'établir les hypothèses cinétiques du modèle. Les résultats expérimentaux obtenus pour des cultures en conditions de limitation par le transfert de lumière et par les minéraux ont servi à l'établissement d'un modèle biologique non structuré compartimenté. Ce modèle utilise des paramètres cinétiques qui ont été identifiés à partir des résultats obtenus en fiole de Roux en utilisant le modèle physique monodimensionnel simple bâti à partir des hypothèses de SCHUSTER (1905). Les résultats obtenus montrent une bonne adéquation entre les valeurs expérimentales et le modèle proposé. Néanmoins, celui-ci est basé sur une équation stoechiométrique valable pour un nombre restreint d'applications.

Afin d'élargir le domaine d'application du modèle, deux types d'améliorations ont été proposées:

- développement d'un modèle physique d'utilisation de l'énergie lumineuse;

- utilisation d'un modèle de connaissance pour le fonctionnement du métabolisme.

Il faut remarquer, d'ailleurs, que la progression vers les modèles cognitifs doit être menée de façon équilibrée entre la connaissance de la physique et la connaissance de la biologie du problème. Ce point méthodologique a guidé pour une large part la démarche générale qui a été suivie.

Le modèle physique utilise le maillage numérique du photoréacteur en énergie lumineuse disponible. La détermination des coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière dans les suspensions cellulaires de *S. platensis* pour 40 longueurs d'onde a ainsi permis de calculer numériquement, pour différentes conditions de concentration en biomasse et de flux lumineux, la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse dans deux types de réacteurs parallélépipédiques. Cette approche a été généralisée à l'ensemble des cultures réalisées en discontinu, soit en réacteur parallélépipédique, soit en réacteur cylindrique. Les résultats obtenus dans les deux types de photobioréacteurs ont été modélisés par le même jeu de paramètres. Ceci confirme la validité de l'approche mathématique qui a été proposée et la justesse des approximations effectuées dans le cas des réacteurs parallélépipédiques.

Partant de là, le rendement vrai de conversion de l'énergie lumineuse en biomasse et son évolution en fonction de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie lumineuse ont été déterminés. Nos résultats montrent que ce rendement diminue lorsque la vitesse d'absorption augmente, ce qui traduit une diminution du rendement quantique moyen dans le réacteur. Le rendement énergétique global de la photosynthèse a été calculé; il varie entre 0,12 et 0,06 suivant les conditions d'éclairement. Ces valeurs sont en parfait accord avec celles déterminées par AIBA

(1982) sur des réacteurs fonctionnant en continu, bien que nous ayons fait varier la vitesse d'absorption dans une gamme bien plus importante. Ce résultat s'explique par le fait que lorsque cette vitesse devient élevée, la diminution du rendement quantique moyen est compensée par une augmentation des seuils de saturation, le rendement global restant alors constant.

La modélisation du métabolisme par un modèle non structuré, mais toutefois compartimenté, conduit à des rendements d'utilisation des substrats minéraux fixés, et ne permet donc pas d'envisager la prédiction du comportement des microorganismes dans des situations variées. Ce problème définit d'ailleurs la limite d'application des modèles non structurés.

L'utilisation de modèles structurés biochimiquement a été envisagée. Ces modèles prennent en compte l'analyse des voies métaboliques, et permettent d'écrire les relations de conservation des différents transporteurs d'énergie, principalement l'ATP et les cofacteurs réduits. Ces modèles ont été développés pour la respiration des microorganismes par DUSSAP (1988); pour la première fois leur application à la photosynthèse a été envisagée ici.

Ils permettent de diminuer le nombre de paramètres du modèle et surtout de prévoir les vitesses d'évolution des substrats et produits quelles que soient les contraintes appliquées au métabolisme des microorganismes. La détermination des rendements de conversion devient alors théorique; elle est basée sur le calcul du rapport  $P/2e^-$  *in vivo*, en fonction de la limitation appliquée. Ce calcul s'effectue en appliquant au métabolisme les lois de la thermodynamique phénoménologique linéaire des processus irréversibles. Il repose essentiellement sur le théorème du minimum de production d'entropie (PRIGOGINE, 1968), qui est utilisé pour caractériser le couplage entre la photosynthèse et la production d'ATP d'une part, et, d'autre part, le couplage entre

---

la production d'ATP et son utilisation par une voie métabolique particulière.

Ce modèle a été présenté dans le cas d'une limitation physique par le transfert de lumière, pour laquelle on constate que la quantité d'exopolysaccharide produit dépend de la vitesse d'absorption de l'énergie lumineuse. Cependant, les résultats préliminaires obtenus permettent d'envisager une utilisation plus générale de ce modèle. En effet, des valeurs théoriques du rapport  $P/2e^-$  ont été obtenues dans différents cas de limitations; elles sont en excellent accord avec les valeurs observées, déterminées par analyse du métabolisme. Ainsi il a été établi que ce rapport variait entre 1,27 en condition de limitation par le transfert de lumière et 1,71 lors de limitations minérales, avec une valeur qui chute à 1,21 en limitation par la source de carbone.

Notons que dans le cas des faibles flux lumineux qui concerne toutes les cultures en réacteur parallélépipédique, le modèle proposé permet de traduire la limitation par le transfert de lumière sans aucun paramètre à identifier. En effet, dans ce cas, le rendement quantique est connu, et le rendement de la photosynthèse est donné par les relations de la thermodynamique phénoménologique.

Cependant, les modèles établis semblent répondre aux objectifs fixés au début de ce travail. Ils fournissent en effet des informations cinétiques et stoechiométriques sur la croissance de microorganismes photosynthétiques cultivés en photobioréacteur, et notamment sur *S. platensis*, dans une large gamme de conditions opératoires; ils permettent également d'obtenir les bilans enthalpique et entropique.

Ces résultats permettent d'envisager des simulations de cultures en continu, en discontinu, ou en semi-continu, ainsi que le dimensionnement et l'optimisation de photoréacteurs.

Dans le cadre de ce travail, ils constituent un outil pour la conception, le contrôle, et l'étude de la stabilité d'écosystèmes clos artificiels comportant un compartiment photosynthétique à base de microorganismes.



**Conclusion**

---

## NOMENCLATURE

a	Surface d'échange	( $m^{-1}$ )
$a_{\lambda}$	Coefficient d'extinction de Lambert	( $m^{-1}$ )
$a_i$	Activité de l'espèce i	( $kmol/m^3$ ou $mol/kg$ )
$A$	Vitesse volumétrique locale d'absorption de l'énergie lumineuse	( $W/m^3$ )
$A_i$	Affinité chimique de la réaction i	( $J/kmol$ )
b	Hauteur d'une pale de turbine Rushton	(m)
c	Largeur d'une pale de turbine Rushton	(m)
$C_i$	Concentration de l'espèce i	( $kg/m^3$ ou $kmol/m^3$ )
$\dot{C}_p$	Capacité calorifique à pression constante	( $J.kg^{-1}.K^{-1}$ )
$\dot{C}_v$	Capacité calorifique à volume constant	( $J.kg^{-1}.K^{-1}$ )
d	Diamètre d'une turbine Rushton	(m)
D	Diamètre de la cuve du réacteur	(m)
D	Taux de dilution	( $h^{-1}$ )
$D_i$	Coefficient de diffusion de l'espèce i	( $m^2/s$ )

---

$\epsilon$	Vitesse volumétrique locale d'émission de l'énergie lumineuse	$(W/m^3)$
$\epsilon(x,y,z)$	Espace	
E	Energie radiante	(J)
E	Facteur d'accélération	(-)
$\dot{E}$	Energie totale par unité de masse	(J/kg)
$E_a$	Coefficient d'absorption massique de la lumière	$(m^2/kg)$
$E_s$	Coefficient de diffusion massique de la lumière	$(m^2/kg)$
$EA$	Coefficient d'absorption de la lumière	$(m^{-1})$
$ES$	Coefficient de diffusion de la lumière	$(m^{-1})$
F	Flux lumineux d'énergie radiante	$(W/m^2)$
$F_\nu$	Flux lumineux d'énergie radiante pour la fréquence $\nu$	$(J/m^2)$
$F_\lambda$	Flux lumineux d'énergie radiante pour la longueur d'onde $\lambda$	$(W/m^3)$
$\mathcal{F}$	Constante de Faraday	(C/kmol)
g	Accélération de la pesanteur	$(m.s^{-2})$
G	Débit molaire	(kmol/s)
$G_p$	Enthalpie libre	(J/kmol)

---

$h$	Constante de Planck	(J.s)
$h_1$	Coefficient de Schumpe	(m <sup>3</sup> /kmol)
$H$	Hauteur utile de milieu dans le réacteur	(m)
$H_1$	Enthalpie	(J)
$\dot{H}_1$	Enthalpie par unité de masse	(J/kg)
$Ha$	Nombre de Hatta	(-)
$He$	Constante de Henry	(kmol/m <sup>3</sup> ou Pa.kg.mol <sup>-1</sup> )
$\Delta H_c$	Enthalpie de combustion de <i>S. platensis</i>	(J/kg)
$I$	Intensité lumineuse spécifique	(W/m <sup>2</sup> )
$I_\nu$	Intensité lumineuse spécifique pour la fréquence $\nu$	(J/m <sup>2</sup> )
$I_\lambda$	Intensité lumineuse spécifique pour la longueur d'onde $\lambda$	(W/m <sup>3</sup> )
$I$	Force ionique	(kmol/m <sup>3</sup> ou mol/kg)
$\mathcal{F}_\nu$	Fonction source pour la fréquence $\nu$	(J/m <sup>2</sup> )
$j_\nu$	Coefficient d'émission	(J/kg)
$J$	Intensité lumineuse moyenne	(W/m <sup>2</sup> )
$J_\nu$	Intensité lumineuse moyenne pour la fréquence $\nu$	(J/m <sup>2</sup> )
$J_\lambda$	Intensité lumineuse moyenne pour la longueur d'onde $\lambda$	(W/m <sup>3</sup> )

$J_i$	Vitesse spécifique molaire de la réaction i	( $\text{kmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
$k$	Coefficient de transfert de matière	(m/s)
$k_i$	Constante cinétique de vitesse	( $\text{s}^{-1}$ ou $\text{m}^3 \cdot \text{kmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
$k_p$	Constante de décroissance des protéines	(-)
$k_{1,a}$	Coefficient volumétrique de transfert	( $\text{s}^{-1}$ ou $\text{h}^{-1}$ )
$K$	Energie cinétique	(J)
$K_i$	Constante d'équilibre	( $\text{kmol}/\text{m}^3$ ou $\text{mol}/\text{kg}$ )
$K_j$	Constante cinétique de Monod	( $\text{kg}/\text{m}^3$ )
$l$	Largeur d'une chicane	(m)
$L$	longueur	(m)
$L_2$	Longueur utile éclairée	(m)
$L_{13}$	Coefficient phénoménologique	( $\text{kmol}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
$m$	Masse	(kg)
$m$	Indice de consistance	( $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ )
$m$	Coefficient de maintenance	( $\text{s}^{-1}$ )
$m_a$	Coefficient de Lambert-Beer	( $\text{m}^2/\text{kg}$ )
$m_i$	Molalité de l'espèce i	( $\text{mol}/\text{kg}$ )

$M_i$	Masse molaire de l'espèce i	(kg/kmol)
n	Indice de pseudoplasticité	(-)
N	Vitesse d'agitation	(s <sup>-1</sup> )
$N_i$	Flux de matière de l'espèce i	(kmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )
$N_o$	Nombre d'Avogadro	(-)
$N_p$	Nombre de puissance	(-)
$N_g$	Nombre de pompage	(-)
p	Pression partielle	(Pa)
$p(\vec{u}, \vec{u}')$	Fonction de phase	(-)
P	Pression	(Pa)
$P_o$	Puissance dissipée sans aération	(W)
$P_g$	Puissance dissipée avec aération	(W)
q	Flux de conduction thermique	(J.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )
Q	Puissance calorifique	(W)
$\bar{Q}$	Energie calorifique	(J)
$Q_p$	Quotient photosynthétique	(-)
r	Puissance massique de dissipation	(W/kg)

$r_i$	Vitesse volumétrique massique de réaction de l'espèce i ( $\text{kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ ou $\text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ )
$r'_i$	Vitesse volumétrique molaire de réaction de l'espèce i ( $\text{kmol.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ ou $\text{kmol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ )
$r_i$	Vitesse spécifique de consommation de l'énergie lumineuse ( $\text{J.kg}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )
R	Constante des gaz parfaits ( $\text{J.kmol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ )
$R(\lambda)$	Réflexion de la lumière (-)
$Re_a$	Nombre de Reynolds d'agitation (-)
s	Surface ( $\text{m}^2$ )
$s_i$	Flux d'entropie ( $\text{W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$ )
S	Surface ( $\text{m}^2$ )
$\hat{S}$	Débit d'entropie (W/K)
$S_i$	Entropie (J/K)
$\dot{S}_i$	Entropie par unité de masse ( $\text{J.K}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ )
t	Temps (h ou s)
t	Température ( $^{\circ}\text{C}$ )
$t_m$	Temps de mélange (s)

T Température (K)

$T(\lambda)$  Transmission de la lumière (-)

$u, u'$  Vecteur unitaire

$u_\nu$  Densité spectrale d'énergie radiante ( $J/m^3$ )

U Energie interne (J)

$\dot{U}$  Energie interne par unité de masse (J/kg)

v Vitesse (m/s)

V Volume ( $m^3$ )

$V_2$  Volume utile éclairé ( $m^3$ )

$\dot{V}$  Volume massique ( $m^3/kg$ )

w Débit massique (kg/s)

W Puissance de travail (W)

$\bar{W}$  Travail (J)

$\dot{\bar{W}}$  Travail par unité de masse (J/kg)

$y_i$  Fraction molaire de l'espèce i (-)

$Y_E$  Rendement énergétique (-)

$Y_q$  Rendement quantique (-)



- $Y_T$  Rendement total de la photosynthèse (-)  
 $Y_{\phi_s}$  Rendement de la photosynthèse (kg/J)  
 $Y_{i/j}$  Rendement massique de conversion (kg/kg)  
 $Y'_{ij}$  Rendement molaire de conversion (kmol/kmol)  
 $Y_{i/i}$  Rendement de conversion de l'énergie lumineuse en l'espèce i  
(kg de i/J)  
 $z$  Longueur (m)  
 $z_i$  Charge de l'ion i (-)  
 $z_i$  Fraction massique biotique (kg/kg)  
 $Z$  Longueur adimensionnelle (-)

$$\langle X \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V X \cdot dV \quad \text{Moyenne spatiale sur le volume du réacteur}$$

**Exposants:**

- $E$  Entrée  
 $S$  Sortie  
 $'$  Relatif à la lumière infra-rouge  
 $*$  Valeur à saturation

Indices:

- a Antennes photosynthétiques
- c Cyclique
- CH Chlorophylle
- g gaz
- G Glycogène
- I Energie lumineuse
- J Energie lumineuse disponible
- l Liquide
- l Linéaire
- m Mesuré
- M Maintenance
- Mo Matière organique
- N Nitrate
- N Cofacteur NADP
- P Protéines
- P Phosphorylation

PC	Phycocyanines
Ph	Phosphate
PS	Polysaccharide
S	Sulfate
X	Biomasse
XA	Biomasse active
XT	Biomasse totale
XV	Biomasse végétative

Lettres grecques:

$\alpha$	Coefficient de Bunsen	(-)
$\beta_{ij}$	Coefficient d'interaction	(-)
$\gamma$	Fraction du volume éclairé	(-)
$\gamma_i$	Coefficient d'activité de l'espèce i	(-)
$\dot{\gamma}$	Vitesse de déformation	(s <sup>-1</sup> )
$\delta$	Epaisseur du film liquide où est localisée la résistance au transfert	(m)
$\Delta$	Différence ou [entrée - sortie]	

$\eta$	Viscosité	(Pl)
$\theta$	Angle	(rd)
$\lambda$	Longueur d'onde	(m)
$\mu$	Taux de croissance	(h <sup>-1</sup> )
$\mu_M$	Taux de croissance maximum	(h <sup>-1</sup> )
$\mu_i$	Potentiel chimique de l'espèce i	(J/kmol)
$\nu$	Fréquence	(s <sup>-1</sup> )
$\nu_{ij}$	Coefficient stoechiométrique	(-)
$\rho$	Masse volumique	(kg/m <sup>3</sup> )
$\sigma$	Fonction de dissipation	(J.kg <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
$\sigma'$	Fonction source	(W.m <sup>-3</sup> .K <sup>-1</sup> )
$\tau$	Contrainte de cisaillement	(Pa)
$\phi$	Angle	(rd)
$\phi_i$	Coefficient de fugacité	(-)
$\Phi$	Energie potentielle	(J)
$\Phi$	Energie potentielle par unité de masse	(J/kg)
$\psi$	Potentiel électrique	(V)

Nomenclature

---

$\omega, \omega'$  Angle solide (-)

$\bar{\omega}_o$  Albedo de diffusion simple (-)

## ABREVIATIONS

A	Absorption
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BFMV	Biochimie Fonctionnelle des Membranes Végétales
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique
CELSS	Closed Ecological Life Support System
CH	Chlorophylle a
CNES	Centre National d'Etudes Spatiales
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Cyt	Cytochrome
D.O.	Densité optique
E	Atténuation semi-intégrale
ESA	European Spatial Agency

FAO Food Administration Organisation

Fd Ferredoxine

kd kilodalton

MELiSSA Microbial Ecological Life Support System Alternative

MFLOPS Millions d'opérations à virgule flottante par seconde

Mo Mégaoctet

N Conditions normales de pression et de température

NADP Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

PC Phycocyanines

Ph Phéophytine

P<sub>i</sub> Phosphate inorganique

ppm Partie par million

PQ Plastoquinone

PR Pourcentage de récupération

PS I,II Photosystème I ou II

P/O Rapport de la vitesse de phosphorylation à la vitesse de respiration

P/2e<sup>-</sup> Rapport de la vitesse de phosphorylation à la vitesse de photosynthèse

Q Quinone

Rubisco Ribulose 1-5-diphosphate carboxylase

v.v.m. Volume d'air par volume de milieu par minute

v.v.h. Volume d'air par volume de milieu par heure



Abréviations

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIBA, S. 1982. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. Ad. Biochem. Eng. 23: 85-156.

AIBA, S., OGAWA, T. 1977. Assessment of growth yield of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. J. Gen. Microbiol. 102: 179-181.

ALLEN, J.F., HOLMES, M.G. 1986. A general model for regulation of photosynthetic unit function by protein phosphorylation. FEBS. Letters 202: 175-181.

ALLEN, M.M., HUTCHISON, F. 1980. Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. Arch. Microbiol. 128: 1-7.

ALLEN, M.M., HUTCHISON, F., WEATHERS, P.M. 1980. Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. J. Bacteriol. 141: 687-693.

ALLEN, M.M., LAW, A., EVANS, E.H. 1990. Control of photosynthesis during nitrogen depletion and recovery in a non-nitrogen fixing cyanobacterium. Arch. Microbiol. 153: 428-431.

ALLEN, J.F., SANDERS, C.E., HOLMES, N.G. 1985. Correlation of membrane protein phosphorylation with excitation energy distribution in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. FEBS. 193: 271-275.

ALLEN, M.M., SMITH, A.J. 1969. Nitrogen chlorosis in blue green algae. Arch. Mikrobiol. 69: 114-120.

ARNON, D.I., MAC SWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.Y., WADA, K. 1974. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.* 35: 231-245.

ARVERNER, M., KAREL, M., RADMER, R. 1984. Problems associated with the utilisation of algae in bioregenerative life support systems. In: NASA report 166615.

BADGER, M.R., ANDREWS, T.J. 1982. Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 70: 517-523.

BADGER, M.R., BASSETT, M., COMINS, H.N. 1985. A model for  $\text{HCO}_3^-$  accumulation and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. 77: 465-471.

BENNET, A., BOGORAD, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419-435.

BENNETT, J. 1983. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochem. J.* 212: 1-13.

BERGE, P., POMEAU, Y., VIDAL, C. 1988. L'ordre dans le chaos. 2<sup>nd</sup> edition. Hermann, Paris.

BIRD, R.B., STEWART, W.E., LIGHTFOOT, E.N. 1960. Transport phenomena. J. Wiley and Sons Inc.

BIRMINGHAM, B.C., COLEMAN, J.R., COLEMAN, B. 1982. Measurement of photorespiration in algae. *Plant Physiol.* 69: 259-262.

BLIGH, L.G., DYER, A.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37: 911-917.

BLUMENKRANTZ, N., ASBOE-HANSEN, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.

BOFFI, V.C., SANTARELLI, F., STRAMIGIOLI, C. 1977. Integral transform method in radiative transfer. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 18: 189-203.

BOUMAH RAT, M., GOURDIN, A. 1983. Méthodes numériques appliquées. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

BOUSSIBA, S. RICHMOND, A.E. 1980. C phycocyanin as a storage protein in the blue green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125: 143-147.

BREZIS, H. 1983. Analyse fonctionnelle. Théorie et applications. Masson, Paris.

BURLEW, J.S. 1964. Algal culture: from laboratory to pilot plant. 4<sup>th</sup> ed. Carnegie institution of Washington publication 600.

BUSLENKO, N.P., GOLENKO, D.I., SHREIDER, Y.A., SOBOĽ, I.M., SRAGOVICH, V.G. 1966. The Monte Carlo method, the method of statistical trials. Pergamon Press.

CARR, N.G., WHITTON, B.A. 1973. The biology of blue green algae. Botanical Monographs, vol. 9. Blackwell Scientific Publications.

CARR, N.G., WHITTON, B.A., 1982. The biology of blue green algae. Botanical Monographs, vol. 19. Blackwell Scientific Publications.

CAWSE, P.,A. 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*. 92: 311-315.

CHANDRASEKHAR, S. 1960. Radiative transfer. Dover publications Inc. New York.

CHENG, K.H., COLMAN, B. 1974. Measurements of photorespiration in some microscopic algae. *Planta*. 115: 207-212.

CHU, C.M., CHURCHILL, S.W. 1955. Numerical solution of problems in multiple scattering of electromagnetic radiation. *J. Phys. Chem.* 59: 855-863.

CIFERRI, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47: 551-578.

CIFERRI, O., TIBONI, O. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 503-526.

CLEMENT, G. 1975. Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*. *Nutr. Rev. Alim.* 29: 477-488.

CLUZEL, P. 1990. Etude et modélisation de la limitation azotée d'une culture de cyanobactéries en photobioréacteur. Application au compartiment photosynthétique d'un écosystème clos spatialisable. Mémoire d'Ingénieur du Centre Universitaire des Sciences et Techniques, Institut des Sciences de l'Ingénieur de Clermont-Ferrand.

COHEN BAZIRE, G., BRYANT, D.A. 1982. Phycobilisomes: composition and structure. p. 143-190 In: N.G. Carr and B.A. Whitton (ed.), *The biology of cyanobacteria*, vol. 19. B.A. Botanical Monographs. Blackwell Scientific Publication.

COLEMAN, J.R., COLMAN, B. 1981. Inorganic carbon accumulation and photosynthesis in a blue green alga as a function of external pH. *Plant. Physiol.* 67: 917-921.

CORLETT, R.C. 1966. direct Monte Carlo calculation of radiative heat transfer in vacuum. *J. Heat transfer.* 88: 376-382.

CORNET, J.F. 1990. Bilan d'énergie sur un milieu liquide absorbant-diffusant la lumière. Application à la détermination des vitesses spécifiques de consommation d'énergie lumineuse par les microorganismes photosynthétiques. Obtention des bilans enthalpique et entropique sur un photobioréacteur. Rapport Matra Espace / C.N.R.S.

CORNET, J.F., DUBERTRET, G. 1990. The cyanobacterium *Spirulina* in the photosynthetic compartment of the MELISSA ecosystem. p.91-97 In: proceedings of Workshop on artificial ecological systems, Oct. 1990, Marseille.

CORNET, J.F., DUSSAP, C.G., DUBERTRET, G. 1992a. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors. I. Coupling between light transfer and growth kinetics. Soumis à *Biotechnology and Bioengineering*.

CORNET, J.F., DUSSAP, C.G., CLUZEL, P., DUBERTRET, G. 1992b. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors. II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. Soumis à *Biotechnology and Bioengineering*.

CORNET, J.F., DUSSAP, C.G., DUBERTRET, G., GROS, J.B. 1991. Modelling light transfer inside photobiofermentors. Applications to the photosynthetic compartments of CELSS. In: proceedings of the 4<sup>th</sup> european symposium on thermal control and life support systems. Oct. 1991, Florence. In press.

COSBY, B.J., HORNBERGER, G.M. 1984. Identification of photosynthesis-light models for aquatic systems. I. Theory and simulations. Ecological Modelling. 23: 1-24.

CRITCHLEY, C. 1988. The molecular mechanism of photoinhibition. Facts and fiction. Aust. J. Plant Physiol. 15: 27-41.

CURLESS, C.E. 1986. Mathematical modeling and simulation of photosynthetic growth in continuous culture under bicarbonate and light limited conditions, Master thesis, Kansas State University, Manhattan, Kansas.

DANCKWERT, P.V. 1970. Gas-liquid reactions. McGraw-Hill.

DANIEL, K.J., LAURENDEAU, N.M., INCROPERA, F.P. 1979. Predictions of radiation absorption and scattering in turbid water bodies. ASME J. Heat Transfer. 101: 63-67.

DE LA NOUE, J., DE PAUW, N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. Biotech. Adv. 6: 725-770.

DE LEYE, L., FROMENT, G.F. 1986. Rigorous simulation and design of columns for gas absorption and chemical reaction. Computers and Chem. Eng. 10: 493-515.

DERMOUN, D. 1987. Ecophysiologie de *Porphyridium cruentum*: Validation expérimentale d'un modèle de croissance. Etude de la production de polysaccharide, Thèse, Université de technologie de Compiègne.

DER VARTANIAN, M., JOSET-ESPARDELLIER, F., ASTIE, C. 1981. contributions of respiratory and photosynthetic pathways during growth of a facultative photoautotrophic cyanobacterium, *Aphanocapsa* 6714. Plant. Physiol. 68: 974-978.

DE VITA, D. 1989. Etude et modélisation de la production de succinoglucane par *Agrobacterium radiobacter* NCIB 9042 en cuve agitée aérée. Mémoire de diplôme d'ingénieur CNAM. Clermont-Ferrand.

DUSSAP, C.G. 1988. Etude thermodynamique et cinétique de la production de polysaccharides microbiens par fermentation en limitation par le transfert d'oxygène. Modèle structuré de la production de xanthane. Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques. Université B. Pascal. Série E, n° d'ordre 409. Clermont-Ferrand.

EDWARDS, T.J., MAURER, G., NEWMAN, J., PRAUSNITZ, J.M. 1978. Vapor-liquid equilibria in multicomponent aqueous solutions of volatile weak electrolytes. A.I.Ch.E. Journal. 24: 966-976.

ERICKSON, L.E., CURLESS, C.E., LEE, .Y. 1987. Modeling and simulation of photosynthetic microbial growth. Annals N. Y. Academy of Sciences. 308-324.

FAY, P., VAN BAALEN, C. 1987. The cyanobacteria. Elsevier.



FILALI-MOUHIM, R. 1991. Etudes préliminaires de l'exopolysaccharide de *Spirulina platensis*, rapport de stage, Institut universitaire de technologie mention biologie appliquée, Université de Paris XII.

FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. 1925. J. Biol. Chem. 66: 375-400.

FOGG, G.E., STEWART, W.D.P., FAY, P., WALSBY, A.E. 1973. The blue green algae. Academic Press.

FORTERRE, P. 1986. Les archaebactéries: origine et évolution des lignées cellulaires procaryotes et eucaryotes. Ann. Biol. 25: 273-306.

FOX, R.D. 1986. Algoculture: la spirulina, un espoir pour le monde de la faim. Edisud.

FREDRICKSON, A.G., BROWN, A.H., MILLER, R.L., TSUCHIYA, H.M. 1961. Optimum conditions for photosynthesis in optically dense cultures of algae. ARS Journal. 1429-1435.

FROHLICH, B.T., WEBSTER, J.A., ATTAL, M.M., SHULER, M.L. 1983. Photobioreactors: models for interaction of light intensity, reactor design and algal physiology. Biotechnol. Bioeng. Symp. 13: 331-350.

GAVIS, J., FERGUSON, J.F. 1975. Kinetics of carbon dioxide uptake by phytoplankton at high pH. Limnol. Oceanogr. 20: 211-221.

GIBBONS, B.H., EDSALL, J.T. 1963. Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25°C. J. Biol. Chem. 238: 3502-3507.

GITELSON, I.I. 1990. Artificial closed ecological systems research: issues and benefits. p. 29-40 In: proceedings of Workshop on artificial ecological systems, 24-26 oct. 1990, Marseille.

GITELSON, I.I., KOVROV, B.G., LISOVSKIY, G.M., OKLADNIKOV, Y.N., RERBERG, M.S., SIDKO, F.Y., TERSKOV, I.A. 1976. Problems of space biology: experimental ecological systems including man. NASA TT F-16993. 28: 1-351.

GOLDMAN, J.C., OSWALD, W.J., JENKINS, D. 1974. The kinetics of inorganic carbon limited algal growth. Journal WPCF. 46: 554-574.

GONZALEZ DE LA VARA, L., GOMEZ-LOJERO, C. 1986. Participation of plastoquinone, cytochrome  $c_{553}$ , and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxido-reductase in both photosynthesis and respiration in *Spirulina maxima*. Photosynthesis Research. 8: 65-78.

GREEN, L.S., GROSSMAN, A.R. 1988. Changes in sulfate transport characteristics and protein composition of *Anacystis nidulans* R2 during sulfur deprivation. J. Bacteriol. 170: 583-587.

GUDIN, C., THEPENIER, C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. p. 73-110 In: Advances in biotechnological processes, vol. 6. Alan and Liss Inc.

GUSTAFSON, K.R., CARDELLINA, J.H., FULLER, R.W., WEISLOW, O.S., KISER, R.F., SNADER, K.M., PATTERSON, G.M.L., BOYD, M.R. 1989. AIDS antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue green algae). J. Natl. Cancer Inst. 81: 1254.

HAXO, F.T., BLINKS, L.R. 1950. J. Gen. Physiol. 33: 389.

HEALEY, F.P., HENDZEL, L.L. 1975. Effect of phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. *J. Phycol.* 11: 303-309.

HERBERT, D., PHILLIPS, P.J., STRANGE, R.E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. p. 209-344 In: NORRIS J.P. and RIBBONS D.W.(ed), *Methods in microbiology*, vol. 5b. Academic Press.

HO, C.S., SMITH, M.D., SHANAHAN, J.F. 1987. Carbon dioxide transfer in biochemical reactors. p. 83-125 In: A. Fiechter (ed.), *Advances in biochemical engineering/Biotechnology*, vol. 35. Springer Verlag, Berlin.

HOLLAND, C.D., LIAPIS, A.I. 1983. *Computer methods for solving dynamic separation problems*. Mc-Graw Hill.

HOLTZAPPLE, M.T., LITTLE, F.E., MAKELAS, M.E., PATTERSON, C.O. 1989. Analysis of an algae based C.E.L.S.S. *Acta Astronautica*. 19: 353-375.

HOWELL, J.R., PERLMUTTER, M. 1964a. Monte carlo solution of thermal transfer through radiant media between gray walls. *J. Heat Transfer*. 86: 116-122.

HOWELL, J.R., PERLMUTTER, M. 1964b. Monte Carlo solution of radiant heat transfer in a nongrey nonisothermal gas with temperature dependent properties. *A.I.Ch.E. Journal*. 10: 562-567.

INCROPERA, F.P., THOMAS, J.F. 1978. A model for solar radiation conversion to algal in a shallow pond. *Solar Energy*. 20: 157-165.

JOLIOT, P. 1966. Oxygen evolution in algae illuminated by modulated light. *Brookhaven Symposia in biology*. 19: 418-433.

JURETIC, D. 1984. Efficiency of free energy transfer and entropy production in photosynthetic systems. *J. Theor. Biol.* 106: 315-327.

KAPLAN, A., ZENVIRTH, D., REINHOLD, L., BERRY, J.A. 1982. Involvement of a primary electrogenic pump in the mechanism for  $\text{HCO}_3^-$  uptake by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. 69: 978-982.

KERN, D.M. 1960. The hydration of carbon dioxide. *J. Chem. Ed.* 37: 14-23.

KERNEVEZ, J.P., LE DIMET, F.X., PAVE, A. 1990. Simulation and control of closed artificial ecosystems. p. 177-190 In: proceedings of Workshop on artificial ecological systems, oct. 1990, Marseille.

KOVROV, B.G., BELYANIN, V.N., SHTOHL, A.A., 1969. Calculation of algae cultivator for life support system. p. 1183-1187 In: proceedings of the 8<sup>th</sup> International symposium of space technology and science, Tokyo.

LASSEUR, C., BINOT, R.A. 1991. Control system for artificial ecosystems. Application to MELISSA. In: proceedings of I.C.E.S. July 1991, San Fransisco, In press.

LASSEUR, C., BINOT, R.A., TAMPONNET, C., CORNET, J.F. 1991. MELISSA: Physical links of compartments *Nitrobacter/Spirulina*. In: proceedings of the 4<sup>th</sup> european symposium on thermal control and life support systems. Oct. 1991, Florence. In press.

LAU, R.H., MAC KENZIE, M.M., DOOLITTLE, F.W. 1977. Phycocyanin synthesis and degradation in the blue green bacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 132: 771-778.

LEE, H.Y. 1986. Bioenergetics and kinetics of photosynthetic single cell protein production processes, Master thesis, Manhattan University, KANSAS, USA.

LEHMAN, J.T. 1978. Enhanced transport of inorganic carbon into algal cells and its applications for the biological fixation of carbon. *J. Phycol.* 14: 33-42.

LEHMAN, M., WOBER, G. 1976. Accumulation, mobilisation and turn over of glycogen in the blue green bacterium *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 111: 93-97.

LEISEIFER, H.P., SKOOG, A.I., BROUILLET, A.O. 1983. Biological life support system. p.289-298 In: Proceedings of Environmental and thermal systems for space vehicles, 4-7 oct. 1983, Toulouse.

LLOYD, N.D.H., CANVIN, D.T., CULVER, D.A. 1977. Photosynthesis and photorespiration in algae. *Plant Physiol.* 59: 936-940.

MAC-ELROY, R.D. 1990. Artificial ecological systems: activities in the U.S and Japan. p. 21-28 In: proceedings of Workshop on artificial ecological systems, 24-26 oct. 1990, Marseille.

MAGID, E., TURBECK, B.O. 1968. The rates of the spontaneous hydration of CO<sub>2</sub> and the reciprocal reaction in neutral aqueous solutions between 0 and 38°C. *Biochim. Biophys. Acta.* 165: 515-524.

MEEROV, M., MIKHAILOV, Y., FRIEDMAN, V. 1983. Principes de la commande automatique. Ed. Mir, Moscou.

MERGEAY, M., VERSTRAETE, W., DUBERTRET, G., LEFORT-TRAN, M., CHIPAUX, C., BINOT, R.A. 1988. MELISSA, a microorganisms based model for CELSS development. p. 65-68 In: proceedings of the 3<sup>th</sup> Eur.Symp.Space Thermal Control and Life Support Systems, Oct. 1988, Nordwijk.

MEUNIER, L. 1991. Le compartiment photosynthétique d'un écosystème clos: étude des bilans gazeux et de la limitation par le transfert de CO<sub>2</sub> sur une culture de *Spirulina platensis*. Mémoire de DUT de Biologie Appliquée, Université de Paris XII.

MIDOUX, N. 1978. Les réacteurs gaz-liquide à cuve agitée. Thèse de doctorat ès Sciences physiques. I.N.P.Lorraine.

MIDOUX, N., 1988. Mécanique et rhéologie des fluides en génie chimique. 2<sup>nd</sup> édition. Technique et documentation. Lavoisier.

MILLER, A.G., COLMAN, B. 1980. Active transport and accumulation of bicarbonate by a unicellular cyanobacterium. J. Bacteriol. 143: 1253-1259.

MILLER, A.G., TURPIN, D.H., CANVIN, D.T. 1984. Growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> limited chemostats. Plant Physiol. 75: 1064-1070.

MODELL, M., EVANICH, P., CHEN, C., ANAVI, S., MAI, J. 1988. The role of computerized modeling and simulation in the development of life support system technologies. In: proceedings of the 27<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1988, Helsinki.

MOO-YOUNG, M., BLANCH, H.W. 1981. Design of biochemical reactors. Mass transfer criteria for simple and complex systems. Advances in Biochem. Eng. 19: 1-69.

MORI, K., OHYA, H., MATSUMOTO, K., FURUNE, H. 1986. Sunlight supply and gas exchange systems in microalgal bioreactor. p. 45-50 In: proceedings of the 26<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1986, Toulouse.

MORI, K., OHYA, H., MATSUMOTO, K., FURUNE, H., ISOZAKI, K., SIEKMEIER, P. 1988. Design for a bioreactor with sunlight supply and operations systems for use in the space environment. In: proceedings of the 27<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1988, Helsinki.

MYERS, J., GRAHAM, J.R., WANG, R.T. 1980. Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. Plant. Physiol. 66: 1144-1149.

MYERS, J., KRATZ, K.A. 1955. Relation between pigment content and photosynthetic characteristics in blue green algae. J. Gen. Physiol. 39: 11-22.

NAGATA, S. 1975. Mixing, principles and applications. John Wiley.

NILSEN, S., JOHNSEN, O. 1982. Effect of CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and Diamox on photosynthesis and photorespiration in *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga), and *Anacystis nidulans* (cyanobacterium, blue green alga). Physiol. Plant. 56: 273-280.

NISHI, I., TATEISHI, T., TOMIZAWA, G., NITTA, K., OGUCHI, M. 1986. Fundamental study on gas monitoring in CELSS. p. 75-78 In: proceedings of the 26<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1986, Toulouse.

NITSCHMANN, W.H. 1986. Chemiosmotic coupling in cyanobacteria: ATP synthesis in a two-membrane system. J. Theor. Biol. 122: 409-419.

OGAWA, T., AIBA, S. 1978. CO<sub>2</sub> assimilation and growth of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in continuous culture. J. Appl. Chem. Biotechnol. 28: 515-521.

OGAWA, T., KOZASA, H., TERUI, G. 1971. Studies on the growth of *Spirulina platensis* (II). J. Ferm. Technol. 50: 143-149.

OGREN, W.L. 1984. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 415-442.

OGUCHI, M., NITTA, K., OTSUBO, K., SHIMADA, A., MIYAZAKI, K., KOYANO, T., MIKI, K. 1989. Application of tubular photobioreactor system to culture *Spirulina* for gas exchange and food production in CELSS. In: proceedings of the 40<sup>th</sup> congress of the IAF, October 1989, Malaga.

OGUCHI, M., OTSUBO, K., NITTA, K., HATAYAMA, S. 1987. Food production and gas exchange system using blue-green alga *Spirulina* for CELSS. Adv. Space. Res. 7: 7-10.

OGUCHI, M., OTSUBO, K., NITTA, K., SHIMADA, A., FUJII, S., KOYANO, T., MIKI, K. 1988. Closed and continuous algae cultivation system for food production and gas exchange in CELSS. In: proceedings of the 27<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1988, Helsinki.

OKADA, M., SUDO, R., AIBA, S. 1982. Phosphorus uptake and growth of blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. Biotech. Bioeng. 24: 143-152.

OURA, E. 1983. Biomass from carbohydrates. p. 1-41 In: H.J. Rehm and G. Reed, Biotechnology. Vol. 3.



PANOFF, J.M., PRIEM, B., MORVAN, H., JOSET, F. 1988. Sulfated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. Arch. Microbiol. 150: 558-563.

PESCHEK, G.A. 1987. Respiratory electron transport. p. 118-150 In: P. Fay and C. Van Baalen (ed.), The cyanobacteria. Elsevier.

PIRONNEAU, O. 1988. Méthodes des éléments finis pour les fluides. Collection RMA 7. Masson.

PRIGOGINE, I. 1968. Introduction à la thermodynamique des processus irréversibles. Dunod. Paris.

RADMER, R., BEHRENS, P., ARNETT, K., GLADUE, R., COX, J., LIEBERMAN, D. 1987. Algal culture studies for CELSS. In: NASA report 177448.

RADMER, R., BEHRENS, P., FERNANDEZ, E., OLLINGER, O., HOWELL, C., VENABLES, A., HUGGINS, D., GLADUE, R. 1984. Algal culture studies related to a CELSS. In: NASA report 177322.

RADMER, R., OLLINGER, O., VENABLES, A., FERNANDEZ, E. 1982. Algal culture studies related to a CELSS. In: NASA report 166375.

REINHOLD, L., ZVIMAN, M., KAPLAN, A. 1989. A quantitative model for inorganic carbon fluxes and photosynthesis in cyanobacteria. Plant Physiol. Biochem. 27: 945-954.

RICHMOND, A.E. 1986. Microalgaculture. p. 369-438 In: CRC Critical Reviews in Biotechnology, vol 4, Issue 4. CRC Press Inc.

RICHTER, O., DIEKCRUGER, B. 1990. Differences and similarities between natural and artificial ecosystems. p.233-245 In: proceedings of Workshops on artificial ecological systems, 24-26 oct. 1990, Marseille.

RIPPKA, R. 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. p. 28-67 In: L. Packer and A.N. Glaser (ed.), Methods in enzymology, vol. 167.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M., STANIER, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111: 1-111.

ROELS, J.A. 1983. Energetics and kinetics in biotechnology. Elsevier Biomedical Press.

ROUSTAN, M. 1978. Contribution à l'étude des phénomènes d'agitation et de transfert de matière dans les réacteurs gaz-liquide. Thèse de doctorat d'état. Université P. Sabatier, Toulouse.

SAUTIER, C., TREMOLIERES, J. 1976. Valeurs alimentaires des algues spirulines chez l'homme. Ann. Nutr. Alim. 30: 517-534.

SAVAGE, C.J., BINOT, R.A., NOVARA, M. 1990. A european facility for CELSS and habitability research. p. 9-20 In: Proceedings of Workshop on artificial ecological systems, 24-26 oct. 1990, Marseille.

SCHMIDT, A., ERDLE, I., KOST, H.P. 1982. Changes of C-phycocyanin in *Synechococcus* 6301 in relation to growth on various sulfur compounds. Z. Naturforsch. 37: 870-876.

SCHNEIDER, K., FRISCHKNECHT, K. 1977. Determination of the  $O_2$  and  $CO_2$   $K_a$  values in fermenters with the dynamic method measuring the step responses in the gas phase. J. Appl. Chem. Biotechnol. 27: 631-642.

SCHÜGERL, K. 1981. Oxygen transfer into highly viscous media. Advances in Biochem. Eng. 19: 71-174.

SCHUMPE, A., QUICKER, G., DECKWER, W.D. 1982. Gas solubilities in microbial culture media. Advances in Biochem. Eng. 24: 1-38.

SCHUSTER, A. 1905. Radiation through a foggy atmosphere. Astrophys. J. 21: 1-22.

SEKHARAM, K.M., VENKATARAMAN, L.V., SALIMATH, P.V. 1989. Structural studies of a glucan isolated from blue green alga *Spirulina platensis*. Food Chemistry. 31: 85-91.

SHERWOOD, T.K., PIGFORD, R.L., WILKE, C.R. 1975. Mass transfer. Mac Graw-Hill.

SHETH, M., RAMKRISHNA, D., FREDRICKSON, A.G. 1977. Stochastic models of algal photosynthesis in turbulent channel flow. A.I.Ch.E. Journal. 23: 794-804.

SHIBATA, K. 1958. Spectrophotometry of intact biological materials. J. Biochem. 45: 599-623.

SIEGEL, R., HOWELL, J.R. 1981. Thermal radiation heat transfer. 2<sup>nd</sup> edition. Hemisphere publishing corporation. Mc Graw-Hill book company.

SIMON, R.D. 1987. Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. p. 199-221 In: P. Fay and C. Van Baalen (ed.), The cyanobacteria. Elsevier.

SKOOG, A.I., BROUILLET, A.O. 1981. Trends in space life support. Acta Astronautica. 6: 1135-1146.

SMERNOFF, D.T., WHARTON, R.A., AVERNER, M.M. 1986. Operation of an experimental algal gas exchanger for use in CELLS. p. 15-25 In: proceedings of the 26<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1986, Toulouse.

SMITH, A.J. 1983. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. Ann. Microbiol. 134B: 93-113.

SMITH, R.A. 1980. The theoretical basis for estimating phytoplankton production and specific growth rate from chlorophyll, light and temperature data. Ecological Modelling. 10: 243-264.

SPADONI, G., BANDINI, E., SANTARELLI, F. 1978. Scattering effects in photosensitized reactions. Chem. Eng. Science. 33: 517-524.

STADLER, T., MOLLION, J., VERDUS, M.C., KARAMANOS, Y., MORVAN, H., CHRISTIAEN, D. 1988. Algal biotechnology. Elsevier applied science.

STEVENS, S.E., BALKWILL, D.L., PAONE, D.A.M. 1981. The effects of nitrogen limitation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. Arch. Microbiol. 130: 204-212.

STOUTHAMER, A.H. 1973. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. Antonie Van Leeuwenhoek. 39: 545-563.

TAMPONNET, C., BINOT, R.A. 1991. Microbial and higher plant biomass selection for closed ecological systems. In: proceedings of 9<sup>th</sup> I.A.A. Man in space symposium, June 1991, Cologne, In press.

TAMPONNET, C., BINOT, R.A., LASSEUR, C., SAVAGE, C. 1991. Presence of man in space: a european challenge in space biological life support. p. 1-10 In: ESA Journal august 1991.

TEN HOOPEN, H.G.J., ROELS, J.A., VAN GEMERT, J.M., NOBEL, P.J., FUCHS, A. 1981. An unstructured model of algal growth in continuous cultures. p. 315-321 In: Advances in Biotechnology. Int. Ferm. Symp. Pergamon Press.

TEREKHOVA, I.V., CHERNYADEV, I.I., MIKHAILOV, A.A., DOMAN, N.G. 1986. Effect of sodium chloride on the biomass growth and the activity of carboxylation enzymes in *Spirulina platensis*. Microbiology. 55: 173-176.

TERHO, T., T., HARTIALA, K. 1971. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans. Anal. Biochem. 41: 417-476.

TERRY, K.L. 1986. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. Biotech. Bioeng. 28: 988-995.

THOMPSON, J.M.T., STEWART, H.B. 1991. Nonlinear dynamics and chaos. 7<sup>th</sup> edition. J. WILEY and Sons LTD.

TOOR, J.S., VISKANTA, R. 1968. A numerical experiment of radiant heat interchange by the Monte Carlo method. Int. J. Heat Mass Transfer. 11: 883-897.

TRAMBOUZE, P., VANLANDEGHEM, M., WAUQUIER, J.P. 1984. Les réacteurs chimiques. Conception, calcul, mise en oeuvre. Edition Technip, Paris.

TREMOLIERES, A. 1990. Communications personnelles.

VAN EYKELENBURG, C. 1977. On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 43: 89-99.

VAN EYKELENBURG, C. 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 45: 369-390.

VINCENZINI, M., SILI, C., DE PHILIPPIS, R., ENA, A., MATERASSI, R. 1990. Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Spirulina* species. *J. Bacteriol.* 172: 2791-2792.

VOLK, T., RUMMEL, J.D. 1986. Mass balances for a biological life support system simulation model. p. 139-146 In: proceedings of the 26<sup>th</sup> COSPAR meeting, July 1986, Toulouse.

VOLOKITA, M., ZENVIRTH, D., KAPLAN, A., REINHOLD, L. 1984. Nature of the inorganic carbon species actively taken up by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Physiol.* 76: 599-602.

VONSHAK, A., GUY, R., POPLAWSKY, R., OHAD, I. 1988. Photoinhibition and its recovery in two strains of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 29: 721-726.

WALZ, D. 1990. Biothermokinetics of processes and energy conversion. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1019: 171-224.

WANNER, G., HENKELMAN, G., SCHMIDT, A., KOST, H.P. 1986. Nitrogen and sulfur starvation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. An ultrastructural, morphometrical and biochemical comparison. *Z. Naturforsch.* 41: 741-750.

WIGGINS, S. 1990. Introduction to applied nonlinear dynamical systems and chaos. Springer Verlag, Paris.

YAMANAKA, G., GLAZER, A.N. 1980. Dynamic aspects of phycobilisome structure. Phycobilisome turnover during nitrogen starvation in *Synechococcus* sp. *Arch. Microbiol.* 124: 39-47.

ZARROUK, C. 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Thèse de doctorat, Paris.

ZEIDLER, E. 1990. Nonlinear functional analysis and its applications. II/B. Nonlinear monotone operators. Springer Verlag, Paris.

## RESUME

La modélisation du comportement des microorganismes en photobioréacteur nécessite la connaissance de phénomènes physiques et biologiques.

La théorie des transferts radiatifs appliquée à un photobioréacteur permet d'obtenir des informations cinétiques et énergétiques locales, et par la suite conduit à l'obtention des vitesses spécifiques de consommation d'énergie lumineuse par les microorganismes, ainsi qu'aux bilans enthalpique et entropique.

L'écriture des équations de conservation sur les différentes espèces qui constituent le carbone inorganique dissous permet d'appréhender les modifications de comportement des microorganismes, lors de limitations par le transfert de CO<sub>2</sub> ou par la source de carbone.

L'utilisation de modèles structurés biochimiquement conduit à écrire les relations de conservation des différents transporteurs d'énergie que sont l'ATP et les cofacteurs. L'analyse du couplage entre la photosynthèse, la production et l'utilisation de l'ATP par le métabolisme est alors possible, en utilisant les relations de la thermodynamique linéaire des processus irréversibles.

Cette approche permet de diminuer le nombre de paramètres du modèle, et conduit à la détermination prédictive des rendements de conversion des substrats en produits.

L'ensemble de cette démarche a été appliqué à la culture de la cyanobactérie *Spirulina platensis*, dans une large gamme de conditions limitantes et pour différents types de photoréacteurs.

Les résultats obtenus permettent d'envisager des applications au niveau de l'utilisation de ce microorganisme, dans le compartiment photosynthétique d'un écosystème clos artificiel.