



# Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO<sub>2</sub>,

Barbara Clement-Larosière

## ► To cite this version:

Barbara Clement-Larosière. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO<sub>2</sub>,. Autre. Ecole Centrale Paris, 2012. Français. NNT : 2012ECAP0005 . tel-00697006

**HAL Id: tel-00697006**

**<https://theses.hal.science/tel-00697006>**

Submitted on 4 Jul 2014

**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.



**ÉCOLE CENTRALE DES ARTS  
ET MANUFACTURES  
« ÉCOLE CENTRALE PARIS »**

**THÈSE**  
présentée par

**Barbara Clément-Larosière**

pour l'obtention du

**GRADE DE DOCTEUR**

**Spécialité : Sciences pour l'ingénieur**

**Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Génie des Procédés et des Matériaux**

**SUJET : Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO<sub>2</sub>**

**soutenue le : 23 janvier 2012**

**devant un jury composé de :**

**Patrick Perré  
Dominique Pareau  
Jérémy Pruvost  
Benoît Veron  
Filipa Lopes  
Michel Minier**

**Directeur de Laboratoire  
Directrice de Thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur**

**2012ECAP0005**

## Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Arsène Isambert, qui fut mon directeur de thèse les premières années de cette thèse. Il m'a permis de réaliser ce travail de recherche. Et sous sa direction j'ai pu faire la découverte des photobioréacteurs et du monde du procédé dans une ambiance de travail chaleureuse.

Je souhaite tout particulièrement remercier le Professeur Dominique Pareau pour avoir repris haut la main la direction de cette thèse. Merci pour votre présence, votre disponibilité et ces nombreuses heures à essayer d'inculquer à mon esprit retord aux équations, les rudiments de la modélisation. Je crois que vous aurez réussi l'exploit de me réconcilier avec les mathématiques. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous pendant cette dernière année de thèse.

J'exprime également toute ma gratitude au Professeur Jérémie Pruvost et au Docteur Benoît Véron qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je voudrais remercier le Docteur Filipa Lopes. Merci pour tes conseils au cours de ce travail de thèse, pour tes relectures très minutieuses de ce manuscrit et pour m'avoir poussé à aller toujours plus au fond des questions que ce travail a soulevé.

Je remercie chaleureusement Michel Minier pour m'avoir accompagné tout au long de ce travail.

Merci à Behnam Taidi pour ton accompagnement lors de mes premiers pas avec la culture en continu et la correction de mon anglais. Je pense que je n'oublierais plus les deux espaces après le point !

Je souhaite vivement remercier le Docteur Pascal Claquin. Merci de t'être rendu disponible à chaque fois que le besoin s'en est fait sentir et d'avoir répondu à mes nombreuses questions. Merci également de m'avoir permis de revenir travailler au Laboratoire PE2M au cours de ces années. Et enfin merci de m'avoir ouvert la porte des microalgues, il y a de cela quelques années maintenant.

Je tiens aussi à remercier Marc Benedetti de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Géochimie des Eaux pour y réaliser une partie des analyses qui ont permis d'aboutir à ce travail. Un grand merci également à Hassiba pour l'aide et le temps passé à traiter mes échantillons.

Je souhaite également remercier Jean-François Cornet pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique et d'avoir pris le temps de discuter avec moi, pour me faire part de son expertise dans le domaine de la culture en photobioréacteur.

Merci à Olivier Bernard pour avoir pris le temps de répondre à maintes reprises à nos nombreuses questions ses derniers temps.

Un grand merci à Cyril pour ton aide au cours de ces années aussi bien sur les manips que lors des TP et toujours dans la bonne humeur ! Merci à Thierry d'avoir toujours su trouver une solution technique aux nombreux problèmes qui se sont posés lors des expérimentations. Merci pour avoir su rivaliser d'inventivité pour combler toutes mes demandes.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Estelle Couallier pour avoir su trouver les mots réconfortants dans les moments de doutes et de découragements.

Ces années n'auraient pas été les mêmes si elles n'avaient pas été partagées avec d'autres thésards. Merci à Giuliana, Rayen, Clément, Fred, Arun, Yacine. Un grand merci à Sepideh pour ta bonne humeur, ta carte pour la machine à café, l'arrosage de mes plantes quand je les ai abandonnées pour rédiger, pour la découverte des mets iraniens....bref pour tout ! C'était vraiment chouette de partager le bureau avec toi.

Enfin, je n'en serais sûrement pas arrivée là sans mes parents qui m'ont soutenue et accepté mes choix et mon désir de me tourner vers un parcours scientifique.

Merci à Alban ; mais « merci » n'est pas grand-chose à côté de ce que tu as apporté à ces dernières années. Même très très très loin tu as su me faire sentir ton attention et ton soutien.

# Sommaire

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| <b><u>Introduction générale</u></b> | p.1 |
|-------------------------------------|-----|

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| <b><u>I.A Le système carboné</u></b> | p.7 |
|--------------------------------------|-----|

|                                                  |      |
|--------------------------------------------------|------|
| <b><u>I.B Présentation du modèle d'étude</u></b> | p.10 |
|--------------------------------------------------|------|

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| <i>I.B1 Présentation structurale de Chlorella vulgaris</i> | p.10 |
|------------------------------------------------------------|------|

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| <i>I.B.2 La photosynthèse</i> | p.12 |
|-------------------------------|------|

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| <i>a. Réaction photochimique</i> | p.13 |
|----------------------------------|------|

|                                             |      |
|---------------------------------------------|------|
| <i>Transport non cyclique des électrons</i> | p.14 |
|---------------------------------------------|------|

|                                         |      |
|-----------------------------------------|------|
| <i>Transport cyclique des électrons</i> | p.15 |
|-----------------------------------------|------|

|                                                           |      |
|-----------------------------------------------------------|------|
| <i>b. Fixation du CO<sub>2</sub> : le cycle de Calvin</i> | p.17 |
|-----------------------------------------------------------|------|

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
| <i>I.B.3 <math>\beta</math>-carboxylation</i> | p.19 |
|-----------------------------------------------|------|

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| <i>I.B.4 Photorespiration</i> | p.20 |
|-------------------------------|------|

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| <i>I.B.5 La respiration</i> | p.21 |
|-----------------------------|------|

|                                                                                                                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <i>I.B.6 Le transport et l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans la cellule : les différents Mécanismes de Concentration de CO<sub>2</sub> chez les Chlorophytes</i> | p.23 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|

|                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------|------|
| <i>I.B.7 L'utilisation du genre Chlorella dans l'industrie</i> | p.24 |
|----------------------------------------------------------------|------|

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b><u>I.C La culture en photobioréacteur : le cas de la colonne à bulle</u></b> | p.26 |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|

|                                                                                                        |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <i>I.C.1 Le transfert gaz-liquide dans un réacteur colonne à bulle : le modèle de la couche limite</i> | p.27 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|

|                                                        |      |
|--------------------------------------------------------|------|
| <i>I.C.2 La croissance cellulaire dans le réacteur</i> | p.29 |
|--------------------------------------------------------|------|

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| <i>a. La culture en batch</i> | p.29 |
|-------------------------------|------|

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| <i>b. La culture en continu</i> | p.34 |
|---------------------------------|------|

|                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| <i>c. Les modèles microalgaux</i> | p.35 |
|-----------------------------------|------|

**I.D L'impact des paramètres de culture** p.38

*I.D.1 L'impact des paramètres de culture sur le transport et l'accumulation du carbone inorganique et les Mécanismes de Concentration de CO<sub>2</sub>* p.38

*a. Le CO<sub>2</sub>* p.38

*b. La lumière* p.40

*c. Les nutriments* p.40

*d. La température* p.41

*e. Le pH* p.42

*I.D.2 L'impact des paramètres de culture sur la culture de microalgues* p.42

*a. Le gaz* p.42

*b. La lumière* p.46

*c. L'azote* p.49

*d. Le phosphore* p.52

*e. Les microéléments* p.53

*f. La température* p.54

*g. Le pH* p.55

**Chapitre II : Matériel et Méthodes**

**II.A. Culture de *Chlorella vulgaris*** p.59

*II.A.1 Le photobioréacteur* p.59

*II.A.2 Cultures batch* p.60

*II.A.3 Cultures continue* p.61

*II.A.4 Milieu de culture* p.63

*II.A.5 Inoculum* p.64

**II.B. Analyses** p.64

*II.B.1. Comptage cellulaire* p.65

|                                                                            |      |
|----------------------------------------------------------------------------|------|
| <i>II.B.2. Analyse élémentaire de la composition de Chlorella vulgaris</i> | p.65 |
| <i>II.B.3. Carbone organique dissous</i>                                   | p.65 |
| <i>II.B.4. Chlorophylle a</i>                                              | p.66 |
| <i>II.B.5. Exopolysaccharides</i>                                          | p.66 |
| <i>II.B.6. Matière sèche</i>                                               | p.66 |

### **Chapitre III : Etude de l'influence de la concentration de CO<sub>2</sub> et de l'intensité lumineuse sur la croissance de Chlorella vulgaris en photobioréacteur batch**

|                                                                                                                                                               |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b><u>III.A. Etude du transfert gaz-liquide dans le photobioréacteur</u></b>                                                                                  | p.69  |
| <i>III.A.1 Vérification du modèle parfaitement agité par la méthode des traceurs</i>                                                                          | p.69  |
| <i>III.A.2 Principe de détermination du coefficient volumique de transfert de CO<sub>2</sub> (k<sub>La</sub>)</i>                                             | p.71  |
| <i>III.A.3 Détermination expérimentale du coefficient volumique de transfert de CO<sub>2</sub> (k<sub>La</sub>)</i>                                           | p.73  |
| <i>a. Principe de la mesure</i>                                                                                                                               | p.73  |
| <i>b. Résultats expérimentaux</i>                                                                                                                             | p.74  |
| <b><u>III.B. CO<sub>2</sub> biofixation by Chlorella vulgaris at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities (Article Scientifique)</u></b> | p.77  |
| <b><u>III.C. Modélisation de la croissance de Chlorella vulgaris</u></b>                                                                                      | p.97  |
| <i>III.C.1. Présentation du modèle</i>                                                                                                                        | p.97  |
| <i>III.C.2. Identification des paramètres du modèle</i>                                                                                                       | p.101 |
| <i>III.C.3. Validation du modèle de croissance</i>                                                                                                            | p.109 |
| <b><u>III.D. Conclusion</u></b>                                                                                                                               | p.114 |

## **Chapitre IV : Etude de l'influence du taux de dilution et de la concentration en nitrate sur la croissance et la fixation de CO<sub>2</sub> de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur continu**

### **IV.A. Matériel et méthodes** p.119

*IV.A.1. Conditions expérimentales* p.119

*IV.A.2. Analyses* p.120

*IV.A.3. Calcul de la productivité et de la biofixation de *Chlorella vulgaris* lors de la culture en continu* p.120

*IV.A.4. Bilans carbone dans la phase gazeuse et dans la phase liquide* p.122

*IV.A.5. Bilan carbone dans le réacteur à l'état stationnaire* p.124

*IV.A.6. Traitements statistiques* p.125

### **IV.B. Résultats** p.125

*IV.B.1. Effet des différentes conditions de culture sur la concentration cellulaire de *Chlorella vulgaris** p.125

*IV.B.2. Effet du taux de dilution sur la biomasse et le rendement de fixation du CO<sub>2</sub>* p.126

*IV.B.3. Effet de la concentration en nitrate sur la biomasse et le rendement de fixation du CO<sub>2</sub>* p.129

*IV.B.4. Bilan carbone dans le réacteur à l'état stationnaire* p.129

*IV.B.5. Description du modèle* p.130

**IV.C. Discussion** p.136

**IV.D. Conclusion** p.139

## **Chapitre V : Perspectives de développement industriel**

### **V.A. Hypothèses et procédure de dimensionnement** p.143

*V.A.1. Hypothèse et paramètres de cultures fixés* p.143

*V.A.2. Procédure de dimensionnement* p.148

|                                                                                                                  |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <i>a. Un seul réacteur parfaitement agité</i>                                                                    | p.148 |
| <i>b. Réacteur multi-étagé</i>                                                                                   | p.150 |
| <i>c. Réacteur piston</i>                                                                                        | p.152 |
| <b><u>V.B. Résultats</u></b>                                                                                     | p.154 |
| <i>V.B.1 Volume de gaz à traiter de 0.14 mol.h<sup>-1</sup> (conditions de culture en laboratoire)</i>           | p.154 |
| <i>V.B.2 Volume de gaz à traiter 1000 mol.s<sup>-1</sup> (condition de culture à l'échelle industrielle)</i>     | p.156 |
| <b><u>V.C. Discussion</u></b>                                                                                    | p.159 |
| <b><u>V.D. Conclusion</u></b>                                                                                    | p.161 |
| <b><u>Conclusions et Perspectives</u></b>                                                                        | p.164 |
| <b><u>Références bibliographiques</u></b>                                                                        | p.172 |
| <b><u>Annexes</u></b>                                                                                            |       |
| <b><u>Annexe I : Milieu Bristol N modifié</u></b>                                                                | p.201 |
| <b><u>Annexe II : Protocole d'analyses</u></b>                                                                   | p.203 |
| <i><u>Annexe.II.1. Principe de la méthode de mesure de la concentration cellulaire au granulomètre laser</u></i> | p.203 |
| <i><u>Annexe.II.2. Analyse de la fraction en azote et en quota intracellulaire chez Chlorella vulgaris</u></i>   | p.205 |
| <i><u>Annexe.II.3. Analyse du carbone organique dissous (DOC)</u></i>                                            | p.218 |
| <i><u>Annexe.II.4. Protocole d'extraction et de quantification de la chlorophylle a</u></i>                      | p.209 |
| <i><u>Annexe.II.5. Quantification des exopolysaccharides solubles (EPS solubles)</u></i>                         | p.209 |



# Liste des Figures

## Chapitre I : Etude bibliographique

- Figure I.1.** Distribution des espèces carbonées en fonction du pH à 25°C p.9
- Figure I.2.** Cellules de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11 p.11
- Figure I.3.** Structure d'un chloroplaste. p.11
- Figure I.4.** Organisation interne de la cellule chez Chlamydomonas (Chlorophyta). p.12
- Figure I.5.** Schéma du transport acyclique des électrons. p.15
- Figure I.6.** Schéma du transport cyclique des électrons. p.16
- Figure I.7.** Complexes macromoléculaires et transferts d'électrons et de protons au niveau de la membrane du thylakoïde. p.17
- Figure I.8.** Schéma du Cycle de Calvin. p.19
- Figure I.9.** Schéma de synthèse des relations existantes entre les réactions de photosynthèse et les réactions de respiration. p.22
- Figure I.10.** Colonne à bulle. p.26
- Figure I.11.** Schéma d'une culture en photobioréacteur en mode batch. p.30
- Figure I.12.** Courbe de croissance théorique d'une population de microalgues en fonction du temps. D'après Richmond (2007). p.32
- Figure I.13.** Schéma d'une culture en photobioréacteur en mode continu. p.34
- Figure I.14.** Evolution du rendement photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse. p.47
- Figure I.15.** Chemins métaboliques menant à la synthèse des protéines : mise en lumière des liaisons étroites existantes entre le métabolisme du carbone et celui de l'azote. p.51

## Chapitre II : Matériels et méthodes

- Figure II.1.** Montage du photobioréacteur pour la culture de *Chlorella vulgaris* en mode batch. p.61
- Figure II.2.** Montage du photobioréacteur pour la culture de *C. vulgaris* en mode continu. p.63

## **Chapitre III : Etude de l'influence de la concentration de CO<sub>2</sub> et de l'intensité lumineuse sur la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch**

### **III.A. Etude du transfert gaz-liquide dans le photobioréacteur**

**Figure III.1.** Evolution du pH en fonction du temps pour le réacteur alimenté en continu par une solution de HCl 0.1 mol.L<sup>-1</sup>. p.70

**Fig.III.2.** Validation du modèle du réacteur parfaitement agité p.71

**Figure III.3.** Principe de fonctionnement de la sonde YSI 8500 (BioVision) p.73

**Figure III.4.** Evolution de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous pour un gaz d'alimentation contenant 13.5%de CO<sub>2</sub> p.75

**Figure III.5.** Détermination de k<sub>L</sub>a pour 13,5% de CO<sub>2</sub> p.75

**Figure III.6.** Evolution de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous pour une culture de *Chlorella vulgaris*, en phase stationnaire de croissance. p.77

### **III.B. CO<sub>2</sub> biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities**

**Figure 1.** Growth of *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities p.87.

**Figure 2.** Light absorption of the bioreactor as a function of the *C. vulgaris* cellular concentration under different carbon concentrations and light intensities. p.88

**Figure 3.** Carbon quota of *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities. p.89

**Figure 4.** Nitrogen quota of *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities. p.90

**Figure 5.** C : N variation over time for *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities. p.91

**Figure 6.** Variations of the medium residual nitrate concentration with time for different carbon concentrations and light intensities. p.91.

**Figure 7.** Chlorophyll content with time, under different carbon concentrations and light intensities. p.92

### **III.C. Modélisation de la croissance de *Chlorella vulgaris***

**Figure III.7.** Détermination de  $p$  pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub> et une intensité lumineuse de 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . p.99

**Figure III.8.** Absorption de la lumière dans le réacteur en fonction de la concentration cellulaire de *C. vulgaris* lors des différentes cultures en batch (2% et 13% de CO<sub>2</sub>, 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) p.102

**Figure III.9.** Modélisation de la fraction massique d'azote dans la cellule  $y$ , après trois jours pour *C. vulgaris* cultivée avec une intensité lumineuse de 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  p.106

**Figure III.10.** Régression de la concentration cellulaire,  $X$ , en fonction du temps pour 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 13% CO<sub>2</sub> p.107

**Figure III.11.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub>, 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  p.110

**Figure III.12.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 2% de CO<sub>2</sub>, 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  p.111

**Figure III.13.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub>, 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  p.112

**Figure III.14.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub>, 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  p.113

## **Chapitre IV : Etude de l'influence du taux de dilution et de la concentration en nitrate sur la croissance et la fixation de CO<sub>2</sub> de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur continu**

**Figure IV.1.** Evolution de la concentration cellulaire de *Chlorella vulgaris* en fonction du temps. Les lignes pointillées représentent le changement de conditions de culture. p.125

**Figure IV.2.** Comparaison des données de la concentration cellulaire avec celles calculées par le modèle pour les essais à différents taux de dilution et concentration en nitrate A)  $D = 0.22 \text{ d}^{-1}$ ,  $N_0 = 0,14 \text{ g. L}^{-1}$ , B)  $D = 0.31 \text{ d}^{-1}$ ,  $N_0 = 0,14 \text{ g. L}^{-1}$ , C)  $D = 0.31 \text{ d}^{-1}$ ,  $N_0 = 0,18 \text{ g.L}^{-1}$  p.134

## **Chapitre V : Perspectives de développement industriel**

**Figure V.1.** Absorption de la lumière dans le réacteur en fonction de la concentration cellulaire de *C. vulgaris* p.145

**Figure V.2.** Réacteur simple. p.148

**Figure V.3.** Réacteur multiétagé avec n étages. p.150

**Figure V.4.** Réacteur à écoulement piston. p.152

**Figure V.5.** Volume de réacteur d'un réacteur simple, d'un réacteur multi-étagé et d'un réacteur piston pour un gaz entrant de 13% et sortant à 2% de CO<sub>2</sub>. p.159

## **Annexes**

**Figure A.1.** Ganulomètre laser QICPIC (SympaTEC) p.203

**Figure A.2.** Principe du ganulomètre laser. p.204

**Figure A.3.** Principe de fonctionnement de l'analyseur élémentaire p.205

# **Liste des tableaux**

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

- Tableau I.1.** Variation de la constante de Henry pour différentes températures p.8
- Tableau I.2.** Valeurs des  $pK_1$  et  $pK_2$  pour les couples  $CO_{2aq}/HCO_3^-$  et  $HCO_3^-/CO_3^{2-}$  pour différentes température p.9
- Tableau I.3.** Effet de la température sur les concentrations de différentes espèces carbonées pour une eau en équilibre avec l'atmosphère. p.41
- Tableau I.4** Impact du pourcentage de  $CO_2$  (v/v) sur différentes espèces de Chlorophytes, pour différentes conditions de culture. p.45

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

- Tableau II.1.** Fréquence des prélèvements pour chaque analyses en fonction de la culture en batch et en continu de *Chlorella vulgaris* p.64

## **Chapitre III : Etude de l'influence de la concentration de $CO_2$ et de l'intensité lumineuse sur la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch**

### **III.A. Etude du transfert gaz-liquide dans le photobioréacteur**

- Tableau III.1.** Valeurs de  $kLa$  pour différentes concentration de  $CO_2$  testées. p.76

### **III.B. $CO_2$ biofixation by *Chlorella vulgaris* at different $CO_2$ concentrations and light intensities**

- Table 1.** Specific growth rates and growth phase durations for *Chlorella vulgaris* grown at different carbon dioxide concentrations and light intensities. p.85
- Table 2.** Biomass concentrations (X) and soluble exopolysaccharide (EPS) concentrations at day 9. Mean  $CO_2$  biofixation rate ( $R_{CO_2}$ ) between days 1 and 9 for cultures under different  $CO_2$  concentration and light intensities. p.87

### **III.C. Modélisation de la croissance de *Chlorella vulgaris***

- Tableau III.2.** Valeurs de matière sèche par cellule p, pour *C. vulgaris* cultivée avec différentes concentrations de  $CO_2$  et différentes intensités lumineuses. p.100
- Tableau III.3.** Concentrations cellulaires pour les jours 2 et 3 de culture pour *Chlorella vulgaris*, en fonction de la concentration de  $CO_2$  et de l'intensité lumineuse appliquées. p.103

**Tableau III.4.** Modélisation de  $y$  en fonction du temps  $y = b \exp(-\delta t)$  et valeurs de  $y_{\min}$  pour différentes conditions de culture p.106

**Tableau III.5.** Vitesse maximale de consommation de nitrate ( $\rho_m$ ) et constante de demi-saturation ( $K_N$ ) pour la culture de *C. vulgaris*. p.108

## **Chapitre 4 : Etude de l'influence du taux de dilution et de la concentration en nitrate sur la croissance et la fixation de CO<sub>2</sub> de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur continu**

**Tableau IV.1** Valeurs de matière sèche par cellule (MS) et de fraction en carbone intracellulaire pour la culture de *Chlorella vulgaris* avec différents taux de dilution (D) et différentes concentrations d'azote dans le milieu de culture ( $N_0$ ) à l'état stationnaire p.121

**Tableau IV.2.** Valeur de la concentration de biomasse (X), de la productivité ( $R_X$ ), de la biofixation du CO<sub>2</sub> ( $R_{CO_2}$ ), du quota de carbone interne (POC), de la concentration en carbone organique dissous ([DOC]), de la concentration d'exopolysaccharides ([EPS]) et de la concentration en nitrate exprimée en équivalent azote ( $NO_3^-N$ ) dans le réacteur à l'état stationnaire, pour *Chlorella vulgaris* cultivée en continu avec deux taux de dilution (D) et deux concentration de nitrate dans le milieu de culture ( $N_0$ ) p.126

**Tableau IV.3.** Bilan carbone dans le réacteur. Comparaison entre les flux de CO<sub>2</sub> dans la phase liquide et dans la phase gazeuse p.130

**Tableau IV.4.** Valeurs optimisées de la constante de demi-saturation pour la lumière ( $K_E$ ), de la constante de vitesse maximale de consommation des nitrates ( $\rho_m$ ) et de la constante de demi-saturation pour les nitrates ( $K_N$ ) p.134

**Table IV.5.** Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs déterminées par le modèle pour la concentration en nitrate ( $NO_3^-N$ ) dans le réacteur et le quota intracellulaire d'azote ( $y$ ) à l'état stationnaire lors de la culture en continu de *Chlorella vulgaris*. p.136

## **Chapitre V : Perspectives de développement industriel**

**Tableau V.1.** Conditions appliquées aux calculs pour les différents types de réacteur p.147

**Tableau V.2.** Conditions de culture appliquées au calcul p.154

**Tableau V.3.** Variation de la concentration cellulaire en sortie de réacteur, du débit de liquide et du volume de réacteur pour différents taux de dilution p.156

**Tableau V.4.** Conditions de culture appliquées au calcul. p.157

**Tableau V.5.** Variation du volume de réacteur et du taux de dilution en fonction de l'intensité lumineuse et de la concentration cellulaire p.158

**Tableau V.6.** Variation du volume de réacteur en fonction de la fraction molaire de CO<sub>2</sub> sortante p.158

## **Annexes:**

Composition du milieu Bristol 3N Modifié

Solution A p.201

Solution B p.201

Solution microéléments p.202



# Liste des abréviations

|                               |                                                |
|-------------------------------|------------------------------------------------|
| 3PGA                          | Acide 3-phosphoglycérique                      |
| ADN                           | Acide Désoxyribonucléique                      |
| ADP                           | Adénosine di-phosphate                         |
| ATP                           | Adénosine-tri-phosphate                        |
| CA                            | Anhydrase carbonique                           |
| Ci                            | Carbone inorganique                            |
| CCM                           | Mécanisme de concentration du CO <sub>2</sub>  |
| CID                           | Carbone inorganique dissous                    |
| CO <sub>2</sub>               | Dioxyde de carbone                             |
| CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | Carbonate                                      |
| D                             | Taux de dilution                               |
| DOC                           | Carbone organique dissous                      |
| EPS                           | Exopolysaccharides                             |
| Fe                            | Fer                                            |
| H <sup>+</sup>                | Ion hydrogène                                  |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Bicarbonate                                    |
| I <sub>in</sub>               | Intensité lumineuse incidente                  |
| I <sub>out</sub>              | Intensité lumineuse réfléchie par le réacteur  |
| kLa                           | Coefficient volumique de transfert de gaz      |
| K <sub>E</sub>                | Constante de demi-saturation pour la lumière   |
| K <sub>N</sub>                | Constante de demi-saturation pour les nitrates |
| MS                            | Matière sèche                                  |
| N                             | Azote                                          |
| NADP                          | Nicotine adénine dinucléotide phosphate        |
| NADPH                         | Nicotine adénine dinucléotide phosphate réduit |

|                 |                                                |
|-----------------|------------------------------------------------|
| $\text{NH}_4^+$ | Ammonium                                       |
| $\text{NO}_2^-$ | Dioxyde d'azote                                |
| $\text{NO}_3^-$ | Nitrate                                        |
| $\text{O}_2$    | Dioxygène                                      |
| P               | Phosphore                                      |
| pK              | Constante de dissociation                      |
| PSI             | Photosystème I                                 |
| PSII            | Photosystème II                                |
| Rubisco         | Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase |
| RuBP            | Ribulose-1,5-biphosphate                       |
| v/v             | Volume à volume                                |
| $y_C$           | Fraction en carbone intracellulaire            |
| $y_N$           | Fraction en azote intracellulaire              |
| $y_{\min}$      | Fraction minimale du nutriment concerné        |
| Zn              | Zinc                                           |
| $\mu$           | Vitesse spécifique de croissance               |
| $\rho$          | Vitesse maximale de consommation des nitrates  |



## **Introduction générale**

Devant l'éveil des consciences collectives et individuelles aux problèmes environnementaux, de nombreuses solutions sont envisagées qui devraient permettre une meilleure gestion de notre environnement. Un des challenges écologiques majeurs que nos sociétés rencontrent aujourd'hui est l'éraîllement du réchauffement planétaire, qui est en partie dû à l'augmentation des rejets de gaz à effets de serre dans l'atmosphère. L'augmentation de la température à la surface de la Terre devrait causer de grands bouleversements climatiques. Ces changements pourraient engendrer des perturbations sur la quantité et la localisation des pluies, la production de ressources alimentaires, l'accélération de la fonte des glaciers, l'augmentation du niveau des océans ou bien encore l'accélération de l'extinction de certaines espèces (Bilanovic *et al.*, 2008).

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est le principal gaz à effet de serre. Sa concentration actuelle dans l'atmosphère est de 380 ppm et si les pratiques actuelles ne changent pas, il est prédit une élévation de sa teneur dans l'atmosphère de 200 ppm d'ici 2050 (Hoffmann *et al.*, 2006). La majeure partie du CO<sub>2</sub> produit provient de l'utilisation d'énergies fossiles. Les plus grosses industries productrices de CO<sub>2</sub> sont les centrales thermiques, les raffineries, les cimenteries et la pétrochimie (IPCC, 2005). En France plus de 1 160 sites industriels seraient concernés par le système pollueur-payeur mis en place par le protocole de Kyoto dont le but est de réduire les émissions de CO<sub>2</sub> (Livre Turquoise, 2011). La totalité des émissions de CO<sub>2</sub> sur une année en 2005 était estimée à 13 466 Mt (IPCC, 2005). Il est donc primordial de proposer des solutions pour lutter contre son augmentation dans l'atmosphère.

Parmi les solutions proposées pour diminuer la concentration de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère peuvent être citées entre autre la séquestration dans les formations géologiques, l'enfouissement dans les océans, la transformation chimique, le captage biologique. Cependant, la résolution du problème ne viendra pas d'une seule méthode mais d'un ensemble de techniques appliquées simultanément (IPCC, 2005). Le choix de la méthode de stockage dépend de la concentration en CO<sub>2</sub>, de la pression et de la composition du gaz ciblé.

De plus les méthodes de séquestration de CO<sub>2</sub> doivent proposer un piégeage à long terme du carbone si elles veulent être efficaces (Bilanovic *et al.*, 2008).

Une des solutions proposées serait l'utilisation de microorganismes photosynthétiques afin de capter le CO<sub>2</sub> au niveau des sites industriels. Dans ce but, l'utilisation des microalgues pour le piégeage et le stockage de CO<sub>2</sub> est actuellement un domaine de recherche en expansion. En effet les algues en fixant CO<sub>2</sub> sous la forme de matière organique, grâce à l'énergie lumineuse, sont de potentielles candidates pour participer à la diminution de celui-ci dans l'atmosphère. Elles se composent d'environ 50% de carbone sous forme organique provenant essentiellement du CO<sub>2</sub> fixé via la photosynthèse. D'après certains auteurs la production de 100 tonnes de biomasse algale permettrait la capture de 180 tonnes de CO<sub>2</sub> (Chisti, 2007). Cependant il faut rester vigilant sur la faisabilité de ces chiffres qui se basent sur des calculs théoriques ; l'efficacité de la fixation de CO<sub>2</sub> par les microalgues est fortement dépendante des conditions environnementales.

Aujourd'hui 127 000 noms d'espèces d'algues sont recensés dont la majorité sont des microalgues. Il reste encore de nombreuses espèces à découvrir et leur nombre total est estimé entre 100 000 à plusieurs millions selon les sources (Livre Turquoise, 2011). D'autre part, les microalgues ont colonisé aussi bien les milieux marins, que d'eau douce ou bien encore terrestres ce qui en fait des organismes adaptés à un grand nombre de conditions environnementales. Il s'en trouve également sous tous les climats, des plus chauds au plus froids. Cette large diversité laisse entrevoir de nombreuses possibilités quant à leur utilisation. Cependant malgré cette diversité, une dizaine d'espèces de microalgues sont cultivées à une échelle industrielle et parmi elles, trois espèces sont prédominantes: *Arthrospira* (Spirulina), *Chlorella* et *Dunaliella*. Aujourd'hui il existe de nombreux débouchés pour les microalgues : l'alimentation animale et humaine, la production de pigments et de molécules d'intérêt pour la cosmétique, l'agroalimentaire ou encore la pharmacologie.

Les premières installations industrielles de microalgues ont vu le jour au Japon en 1960 pour la culture de *Chlorella vulgaris*. En France, c'est dans les années 70 que la production a commencé afin de fournir du fourrage pour l'aquaculture et les écloserie de mollusques. Depuis la production n'a cessé d'augmenter. Entre 1975 et les années 2000, elle est passée de 5 tonnes à 3 500 tonnes par an. En 2004, elle représentait entre 7000 et 10 000 tonnes de matières sèches produites soit l'équivalent de 3,3 milliards d'Euros. Le marché de la biomasse

algale est donc en constante expansion. Aujourd'hui on estime à 10 000 tonnes la production de biomasse de microalgues par an. L'Asie est le premier producteur de microalgues au monde et représente 50% de la production mondiale. La France quant à elle, reste encore un acteur mineur dans ce marché mondial avec une trentaine de sites de production pour 10 à 15 tonnes de biomasse par an (Livre Turquoise, 2011).

Les microalgues sont cultivées soit en système ouverts, appelés bassins ouverts (open ponds) ou en systèmes fermés, les photobioréacteurs. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes de culture dépend du devenir de la biomasse produite. Les photobioréacteurs offrent un certain nombre d'avantages par rapport aux systèmes ouverts. Ils présentent un meilleur rendement de fixation du CO<sub>2</sub> par les microalgues, une meilleure production de biomasse, un meilleur contrôle du procédé et permettent de limiter les contaminations. Cependant ce système de production est cher et reste donc peu utilisé pour la culture à grande échelle, contrairement aux bassins ouverts (Ho et al., 2011). Afin que la production des microalgues se fasse à grande échelle et qu'elle ait un rôle significatif sur le marché mondial les techniques de productions doivent donc évoluer (Livre Turquoise, 2011). C'est au travers d'une bonne maîtrise de l'outil de production couplé à une connaissance approfondie de ce modèle biologique qu'il sera possible de rendre performant l'émergence des nouvelles biotechnologies. En France de nombreux projets de recherche ont vu le jour ces dernières années, dans le domaine des bioénergies: SHAMAH, BIOSOLIS, SALINALGUE, WINSEAFUEL, AGROGASOIL, PHOTOBIO 2. Parmi les projets cités seulement un fait référence à l'étude de la remédiation du CO<sub>2</sub> industriel. Dans le monde, quelques entreprises ou projets sont aussi tournés vers la captation du CO<sub>2</sub>, tel que Solix Biofuels (USA), Saembiotic (Israël), Grower Harvester Algal Project (USA). Ce domaine reste donc peu investi contrairement à d'autres, tel que la production de biocarburant.

L'étude de la séquestration du CO<sub>2</sub> par les microalgues repose sur deux domaines : le procédé de culture et les interactions qui existent entre les cellules et le CO<sub>2</sub>. De nombreuses études portent sur l'amélioration du procédé et des conditions de culture (Chae et al., 2006 ; Chiu et al., 2008). De même la littérature sur la résistance de différentes espèces de microalgues à de fortes concentrations de CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture est vaste (Chiu et al., 2009 ; Douskova et al., 2009 ; Tang et al., 2011). Dans ces différents types d'étude il est rare que les mécanismes biologiques entrant en jeux lorsque la cellule est confrontée à de fortes

concentrations de CO<sub>2</sub> soient abordés. D'autre part, le domaine d'étude de l'assimilation et de la fixation de CO<sub>2</sub> par les microalgues est largement documenté (Kaplan et Reinhold, 1999 ; Young et Beardall, 2004 ; Giodano et al., 2005 ; Raven, 2011). Cependant ces études se placent le plus souvent dans le contexte naturel, c'est-à-dire avec des concentrations de CO<sub>2</sub> dissous faibles. Les études portant sur les réponses biologiques des cellules algales et les mécanismes physiologiques mis en place à de fortes concentrations de CO<sub>2</sub> restent minoritaires (Iwasaki et Miyachi, 1998 ; Kurano et Miyachi, 2004).

Le but de cette thèse est l'étude de la faisabilité d'un procédé de captage de CO<sub>2</sub> par le biais de la culture de la microalgue *Chlorella vulgaris*. Ce travail s'est fixé sur la levée d'une partie des verrous liés à la séquestration de CO<sub>2</sub> par les microalgues, tel que comprendre l'impact de différentes conditions environnementales (concentration de CO<sub>2</sub>, intensité lumineuse, ) sur *C. vulgaris* et sa capacité à consommer CO<sub>2</sub>.

Dans le but de présenter les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, ce manuscrit se divise en 4 parties :

- Une étude bibliographique qui tente de mettre en relation le domaine de la culture des microalgues en photobioréacteur et celui des mécanismes physiologiques de fixation et d'assimilation de CO<sub>2</sub> ainsi que l'effet des paramètres environnementaux sur la croissance de l'algue.
- Puis une première étude s'attache à décrire l'effet de différentes concentrations de CO<sub>2</sub> et différentes intensités lumineuses sur la croissance de *Chlorella vulgaris* lors de sa culture en photobioréacteur en mode batch. A partir des résultats de cette étude, un modèle mathématique décrivant la croissance de *C. vulgaris* est proposé et les paramètres du modèle déterminés.
- Une seconde étude est consacrée à la culture de *C. vulgaris* en mode continu. Elle s'applique à caractériser l'efficacité du procédé pour la séquestration de CO<sub>2</sub>.
- Enfin, à partir du modèle mathématique une étude sur le dimensionnement du procédé à taille industrielle est proposée.



# **Chapitre I :** **Etude bibliographique**

Le but de ce travail de thèse étant la valorisation du dioxyde de carbone par *Chlorella vulgaris* cultivée en photobioréacteur, cette étude bibliographique se consacrera à trois domaines d'étude : CO<sub>2</sub>, les microalgues et la mise en œuvre du procédé. Pour être en mesure d'optimiser la croissance de la microalgue au sein du procédé de culture, il faut appréhender les liens étroits qui se tissent entre ces trois domaines. De plus le contrôle du procédé de valorisation de CO<sub>2</sub> passe par la compréhension des interactions complexes qui existent entre CO<sub>2</sub>, son environnement et la cellule de microalgue.

## **I.A Le système carboné**

Afin d'appréhender le comportement de CO<sub>2</sub> lorsqu'il se dissout dans un milieu aqueux, il faut prendre en compte deux phénomènes : la dissolution physique du gaz dans le milieu liquide et la réaction chimique conduisant à la formation des différentes espèces carbonées.

La dissolution de CO<sub>2</sub> dans l'eau dépend de la pression partielle de CO<sub>2</sub> dans le gaz et de la température. CO<sub>2</sub> dissous lorsque la phase gazeuse et la phase liquide sont à l'équilibre s'exprime par la loi de Henry (I.1)

$$[CO_2]d = \frac{P_{CO_2}}{H_{CO_2}} \quad (I.1)$$

**Avec :**

$[CO_2]d$  : concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$P_{CO_2}$  : pression partielle de CO<sub>2</sub> dans le gaz (atm)

$H_{CO_2}$  : constante de Henry (L.atm.mol<sup>-1</sup>)

La constante de Henry est dépendante de la température (Tableau I.1) : elle diminue avec une baisse de la température. Donc d'après l'équation (I.1), pour une pression partielle de CO<sub>2</sub> fixe, une baisse de la température va entraîner une augmentation de la quantité de CO<sub>2</sub> dissous.

La constante de Henry est aussi dépendante de la salinité du milieu ; plus la salinité du milieu sera faible, plus la concentration de  $\text{CO}_2$  dissous sera importante (Falkowski et Raven, 2007). Ceci est lié à l'activité de l'eau, plus réduite en milieu salin.

**Tableau I.1.** Variation de la constante de Henry pour différentes températures, calculées à partir d'Edwards *et al.* (1978)

| Température<br>(°C) | H<br>(L.atm.mol <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|---------------------------------|
| 0                   | 12,55                           |
| 25                  | 28,55                           |
| 40                  | 41,44                           |

Dans le liquide,  $\text{CO}_2$  dissous va réagir avec l'eau et former l'acide carbonique,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Un équilibre s'établit entre ces deux espèces carbonées. Comme l'acide carbonique est en très faible concentration dans le liquide, il est d'usage de considérer que  $\text{CO}_2$  dissous et  $\text{H}_2\text{CO}_3$  forment à eux deux  $\text{CO}_2$  aqueux :

$$[\text{CO}_{2aq}] = [\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{CO}_2d] \quad (\text{I.2})$$

Le  $\text{CO}_{2aq}$  peut se dissocier en  $\text{HCO}_3^-$  et en  $\text{CO}_3^{2-}$ . L'équilibre entre les trois espèces s'écrit :



Les constantes de dissociation des couples  $\text{CO}_{2aq}/\text{HCO}_3^-$  et  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  sont appelées respectivement  $K_1$  et  $K_2$ .

$$K_1 = \frac{[\text{HCO}_3^-] \times [\text{H}^+]}{[\text{CO}_{2aq}]} \quad (\text{I.6})$$

$$K_2 = \frac{[\text{CO}_3^{2-}] \times [\text{H}^+]}{[\text{HCO}_3^-]} \quad (\text{I.7})$$

La répartition des différentes espèces carbonées peut être calculée à partir des constantes d'acidités qui dépendent légèrement de la température (Tableau I.2).

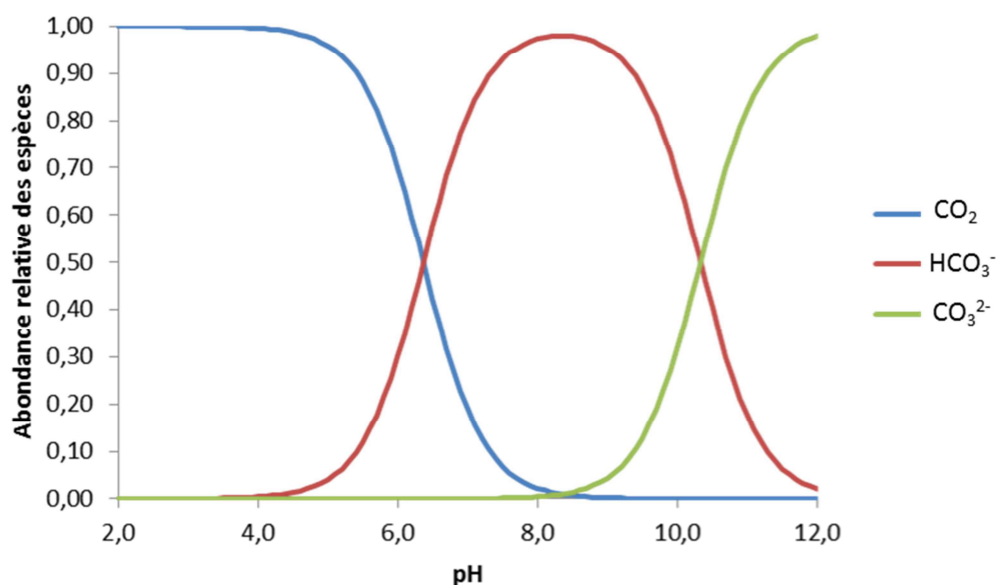
$$pK_1 = -\log K_1 \quad (I.8)$$

$$pK_2 = -\log K_2 \quad (I.9)$$

**Tableau I.2.** Valeurs des  $pK_1$  et  $pK_2$  pour les couples  $\text{CO}_{2\text{aq}}/\text{HCO}_3^-$  et  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  pour différentes température, calculées à partir d'Edwards *et al.* (1978).

| Température<br>(°C) | pK1  | pK2   |
|---------------------|------|-------|
| 0                   | 6,57 | 10,64 |
| 25                  | 6,36 | 10,33 |
| 40                  | 6,30 | 10,22 |

La répartition des espèces carbonées en fonction du pH est donnée sur la Figure I.1.



**Figure I.1.** Distribution des espèces carbonées en fonction du pH à 25°C.

Deux paramètres physico-chimiques affectent donc la répartition des espèces carbonées dans le milieu aquatique : la température et le pH.

Les  $pK_1$  et  $pK_2$  sont dépendants de la température (Tableau I.2). Plus la température va augmenter et plus les équilibres vont se déplacer vers la gauche de l'équation (I.5) et donc

modifier la répartition du carbone inorganique en solution. De plus, les trois espèces carbonées seront présentes dans des proportions variables en fonction du pH (Figure I.1).

La somme des trois espèces carbonées va former le carbone inorganique dissous, aussi appelé CID :

$$[CO_2 aq] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] = CID \quad (I.10)$$

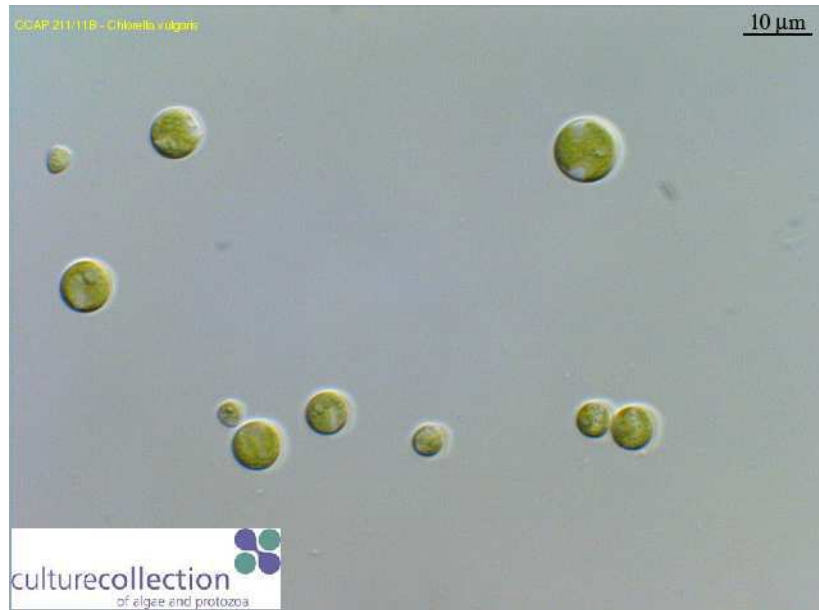
Les microorganismes photoautotrophes, tel que les microalgues, vont interagir plus ou moins, en fonction des espèces, avec ces trois formes de carbone inorganique dissous. Elles fixent  $CO_2$  aqueux et/ou  $HCO_3^-$  au travers du processus de photosynthèse. Certaines espèces, tel que les coccolithophores utilise aussi  $CO_3^{2-}$  pour former leur coquille de calcium via un processus de calcification (Falkowski et Raven, 2007).

## **I.B Présentation du modèle d'étude**

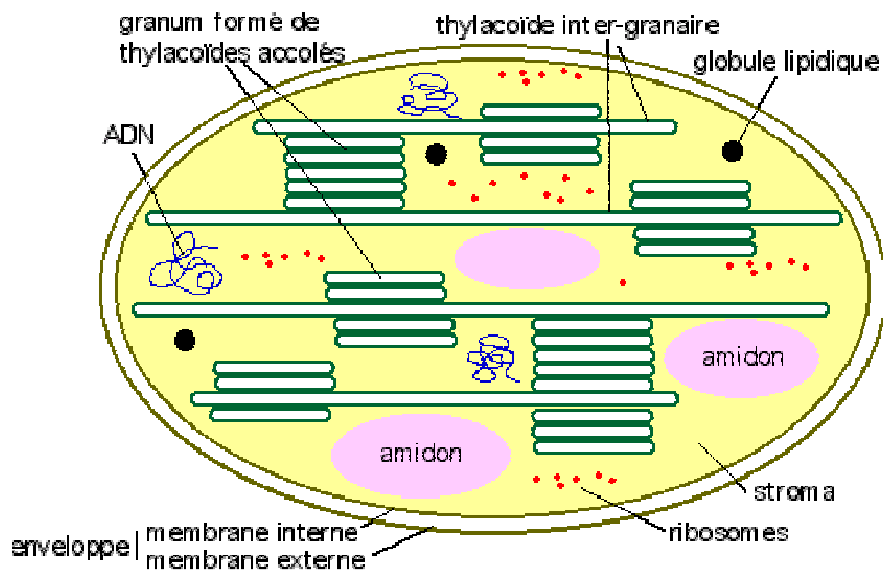
### *I.B.1 Présentation structurale de Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) appartient à la lignée des *Chlorophytes*. Le genre *Chlorella* se retrouve dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eau douce.

*C. vulgaris* est une algue verte unicellulaire eucaryote d'eau douce (Figure I.2). Elle est de forme ronde ou ellipsoïde, d'un diamètre moyen de 5  $\mu m$ . Elle possède un chloroplaste pariétal contenant de la chlorophylle a et b ainsi que des caroténoïdes comme pigments accessoires, un pyrénoïde, des thylakoïdes, des grains d'amidons et du matériel génétique (Figure I.3). L'amidon est la réserve majeure de glucides de la cellule. D'autres organites sont également présents dans la cellule : un noyau, des mitochondries, de petites vacuoles, des gouttelettes lipidiques, des ribosomes (Van Den Hoek *et al.*, 1995). La membrane cellulaire externe est composée de trois membranes contenant de la glucosamine (Takeda, 1993 ; Allard *et al.*, 2000).

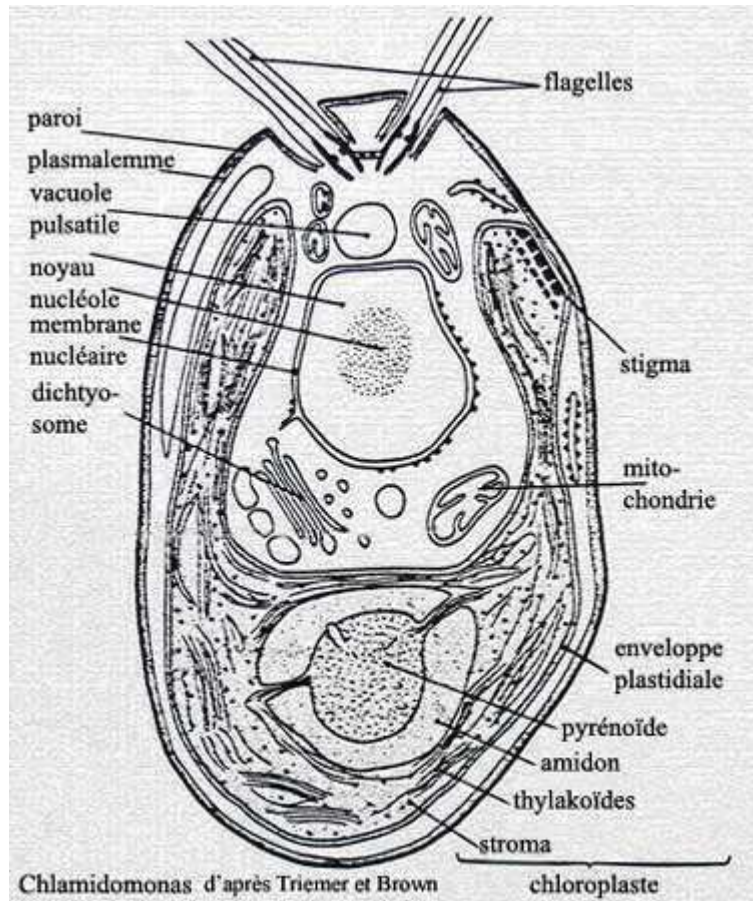


**Figure I.2.** Cellules de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B observées au microscope optique (Culture collection of algae and protozoa, Royaume-Uni)



**Figure I.3.** Structure d'un chloroplaste. D'après : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthesecours/02-localisation.htm>

La Figure I.4 présente la structure d'une cellule de *Chlamydomonas*. *Chlamydomonas* est une algue appartenant à la même lignée que *Chlorella vulgaris*. Son organisation intracellulaire est identique à celle de *C. vulgaris* à l'exception des flagelles absents dans notre modèle d'étude.



**Figure I.4.** Organisation interne de la cellule chez Chlamydomonas (Chlorophyta). D'après Triemer et Brown.

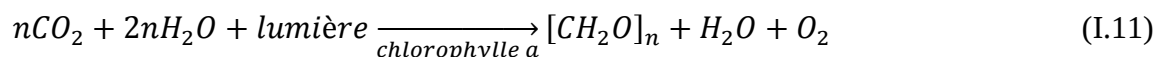
### *I.B.2 La photosynthèse*

Près de la moitié de l'activité photosynthétique sur Terre est réalisée par des organismes aquatiques qui ne représentent pourtant que 1 % de la biomasse totale. Ces micro-organismes, les microalgues, constituent le phytoplancton et sont à l'origine de 90 % de la production primaire aquatique (Falkowski et Raven, 2007).

La photosynthèse est le processus par lequel les microalgues transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et fixent le carbone inorganique dissous (CID). Il en résulte la synthèse de matière organique et la production d'oxygène. Ainsi l'activité photosynthétique est la fixation du  $\text{CO}_2$  et la production d' $\text{O}_2$  via les mécanismes de la photosynthèse.

Elle se compose de deux phases indépendantes chimiquement et physiquement, mais liées par des intermédiaires communs et des régulations enzymatiques.

Le processus photosynthétique dans son ensemble peut être décrit par l'équation suivante :



Bien que les deux phases se déroulent toutes les deux dans le chloroplaste de la cellule, elles se localisent au niveau de sites distincts. L'oxydation de l'eau et la réaction photochimique ont lieu dans la membrane des thylakoïdes alors que la réduction de  $CO_2$  se déroule dans le stroma des chloroplastes.

#### *a. Réaction photochimique*

C'est au sein de la membrane des thylakoïdes que se trouve l'appareil photosynthétique. Il est composé de pigments photosynthétiques associés à des photosystèmes I et II (PSI et PSII), d'accepteurs et de donneurs d'électrons. Le PSI et PSII sont aussi appelés respectivement PS 700 et PS 680. Les photosystèmes sont des complexes au sein desquels sont associées des protéines et des pigments. Le PSII comporte trois domaines : une antenne, un centre réactionnel et un complexe d'oxydation de l'eau. Et le PSI comporte une antenne et un centre réactionnel.

Les pigments photosynthétiques sont la chlorophylle a, b, c et d en fonction des espèces d'algues. Les chlorophytes ne contiennent que des chlorophylles a et b. La chlorophylle a est un pigment actif car elle capte et convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique. Alors que la chlorophylle b est un pigment surnuméraire car elle ne fait que transmettre les photons à la chlorophylle a. Il existe d'autre type de pigments surnuméraires chez les algues vertes, appelés caroténoïdes qui en plus de capter la lumière sont impliqués dans la dissipation de l'excès d'énergie lié à un excès de lumière (Jeffrey et Wright, 2006).

Une fois que l'énergie lumineuse a atteint la chlorophylle a des centres réactionnels des photosystèmes, celle-ci passe à un état excité et expulse alors un électron. A partir de là va se dérouler le transport des électrons au travers de différents accepteurs de l'appareil photosynthétique jusqu'à un accepteur final permettant la production de pouvoir réducteur NADPH. En parallèle la réaction de photosynthèse permet aussi la synthèse d'ATP.

Il existe deux types de transport des électrons: cyclique et non cyclique.

*Transport non cyclique des électrons*

Au sein du photosystème II, l'antenne collectrice de photon se compose de chlorophylle a et b, de caroténoïdes et de protéines. Elle capte les photons et les amènent jusqu'au centre réactionnel, qui contient une paire de molécule de chlorophylle a dont la longueur d'onde du pic d'absorption est 680 nm. Lorsque la molécule de chlorophylle a est excitée un électron est libéré. Cet électron est transporté dans un premier temps jusqu'à des plastoquinones. Elles le cèdent par la suite à un complexe appelé cytochrome  $b_6-f$  qui le transfère à une plastocyanine. Enfin, celle-ci cède l'électron au PSI.

En parallèle de cette réaction à lieu la scission d'une molécule d'eau, catalysée par le complexe d'oxydation de l'eau (OEC), lié au PSII :



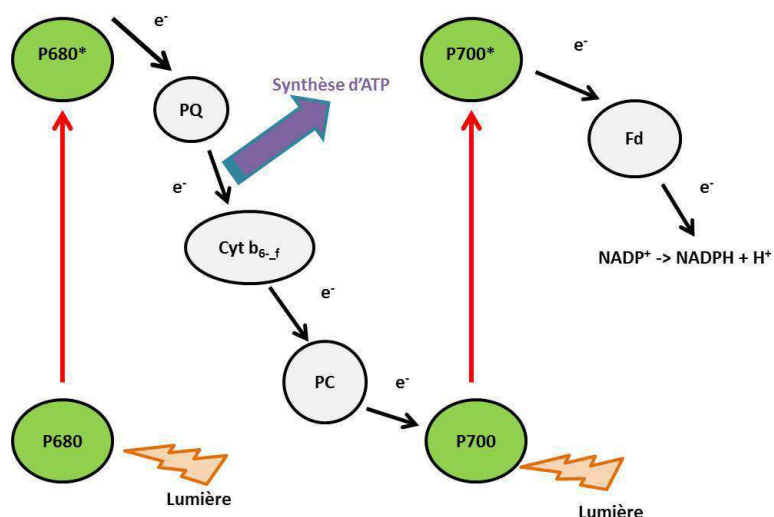
Cette réaction permet la libération d'électron et de protons et la production d'oxygène.

Les électrons formés par l'oxydation de l'eau, vont remplacer les électrons perdus au sein du PSII.

L'antenne collectrice du PSI se compose de chlorophylle a et b, ainsi que de caroténoïdes. Elle transmet au centre réactionnel les photons. Le centre réactionnel contient une paire de molécule de chlorophylle a dont la longueur d'onde du pic d'absorption est 700 nm. L'électron libéré au sein du centre réactionnel est transporté jusqu'à la ferrédoxine. La ferrédoxine va donner cet électron à la ferrédoxine NADP-oxydoréductase. Il va alors y avoir la réduction de  $NADP^+$  en Nicotinamide adénosine diphosphate (NADPH), aussi appelé pouvoir réducteur. Ce pouvoir réducteur joue un rôle important dans de nombreuses réactions métaboliques.

L'électron perdu au sein du PSI va être remplacé par l'électron précédemment expulsés par le PSII.

La Figure I.5. représente le transport acyclique des électrons au sein de la membrane des thylakoïdes. Lorsque les photons atteignent les molécules de chlorophylles au sein des PS 680 (PSII) et PS 700 (PSI), celles-ci passent d'un état stable à un état excité (flèches rouges) et libèrent des électrons qui vont permettre la synthèse d'ATP et NADPH.



**Figure I.5.** Schéma du transport acyclique des électrons. P680 : photosystème II, PQ : plastoquinone, PC : plastocyanine, Cyt  $b_{6-f}$  : cytochrome  $b_{6-f}$ , PS700 : photosystème I, Fd : ferrédoxine.

Le transport des électrons via la réaction de photosynthèse, libère de l'énergie qui va permettre la synthèse d'adénosine-tri-phosphate (ATP) au niveau du complexe ATP synthase associé à la membrane des thylakoïdes. Le transport des électrons génère une force proton-motrice au travers du complexe de l'ATP synthase qui permet le fonctionnement de l'enzyme et donc la synthèse d'ATP à partir d'adénosine di-phosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi). L'ATP est une molécule à haut pouvoir énergétique se retrouvant dans tous les organismes. Elle fournit de l'énergie pour la croissance cellulaire mais également pour la maintenance des processus physiologiques des organismes (Yang *et al.*, 2000).

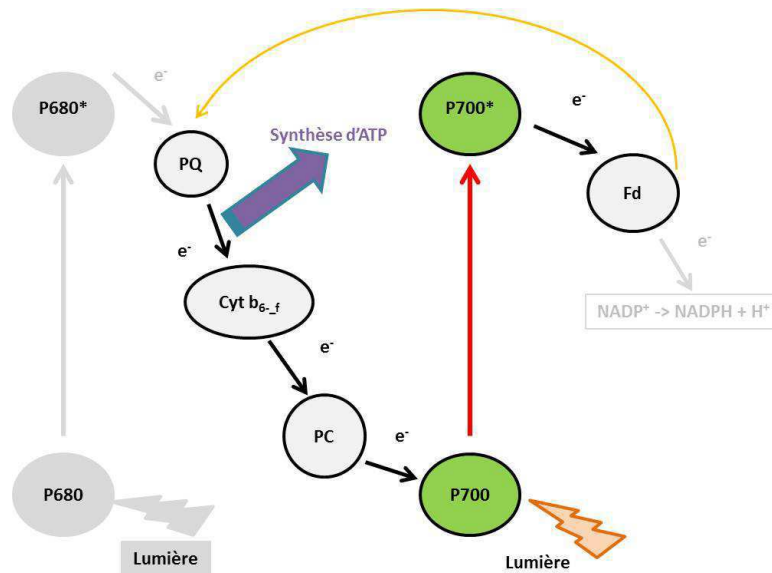
Lors de cette phase de la photosynthèse, on a donc formation d'ATP et de NADPH. Ces deux molécules rentreront en jeu lors de la fixation du  $\text{CO}_2$ .

#### *Transport cyclique des électrons*

Lors du transport cyclique des électrons, il n'y a pas synthèse de NADPH mais uniquement d'ATP.

Les électrons expulsés par le PSI ne sont pas dirigés vers la production de NADPH mais utilisés pour augmenter la force proton motrice qui permet la synthèse d'ATP (Figure I.6). La

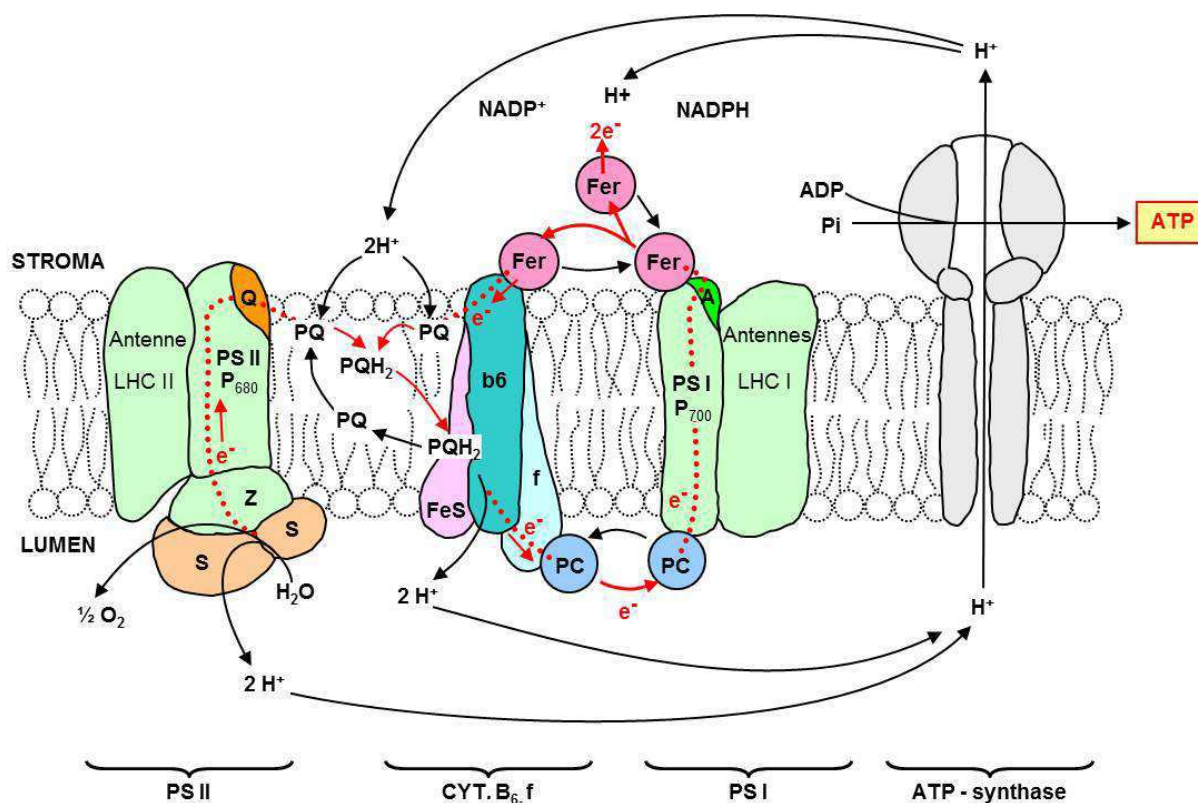
cellule n'ayant pas les mêmes besoins en ATP et en NADPH, ce mécanisme lui permet d'adapter la synthèse de ces composés en fonction de ses besoins physiologiques (Turpin, 1991).



**Figure I.6.** Schéma du transport cyclique des électrons. P680 : photosystème II, PQ : plastoquinone, PC : plastocyanine, Cyt  $b_{6-f}$  : cytochrome  $b_{6-f}$ , PS700 : photosystème I, Fd : ferrédoxine.

La Figure I.7 montre le transfert des électrons et des protons au sein de la membrane des thylakoïdes lors de la réaction photochimique de la photosynthèse. Lorsque les électrons arrivent au niveau de la ferrédoxine, celle-ci les distribue soit :

- Au  $\text{NADP}^+$ . Le transport est alors dit acyclique et s'accompagne d'une dissociation de l'eau et de la synthèse de NADPH et d'ATP
- Au cytochrome  $b_{6-f}$  qui les transferts à nouveau aux plastoquinone. Le transport est alors cyclique et l'ATP est la seule molécule synthétisée.

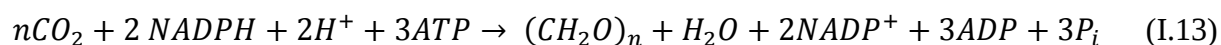


**Figure I.7.** Complexes macromoléculaires et transferts d'électrons et de protons au niveau de la membrane du thylakoïde. PSII : photosystème II, PQ : plastoquinone, PC : plastocyanine,  $b_{6-f}$  : cytochrome  $b_{6-f}$ , PSI : photosystème I, Fer : ferrédoxine. D'après Robert (1998).

### *b. Fixation du $CO_2$ : le cycle de Calvin*

Dans la cellule  $CO_2$  va être intégré au cycle de Calvin, au niveau du chloroplaste. De ce processus va résulter la synthèse de matière organique.

Cette réaction peut s'écrire:

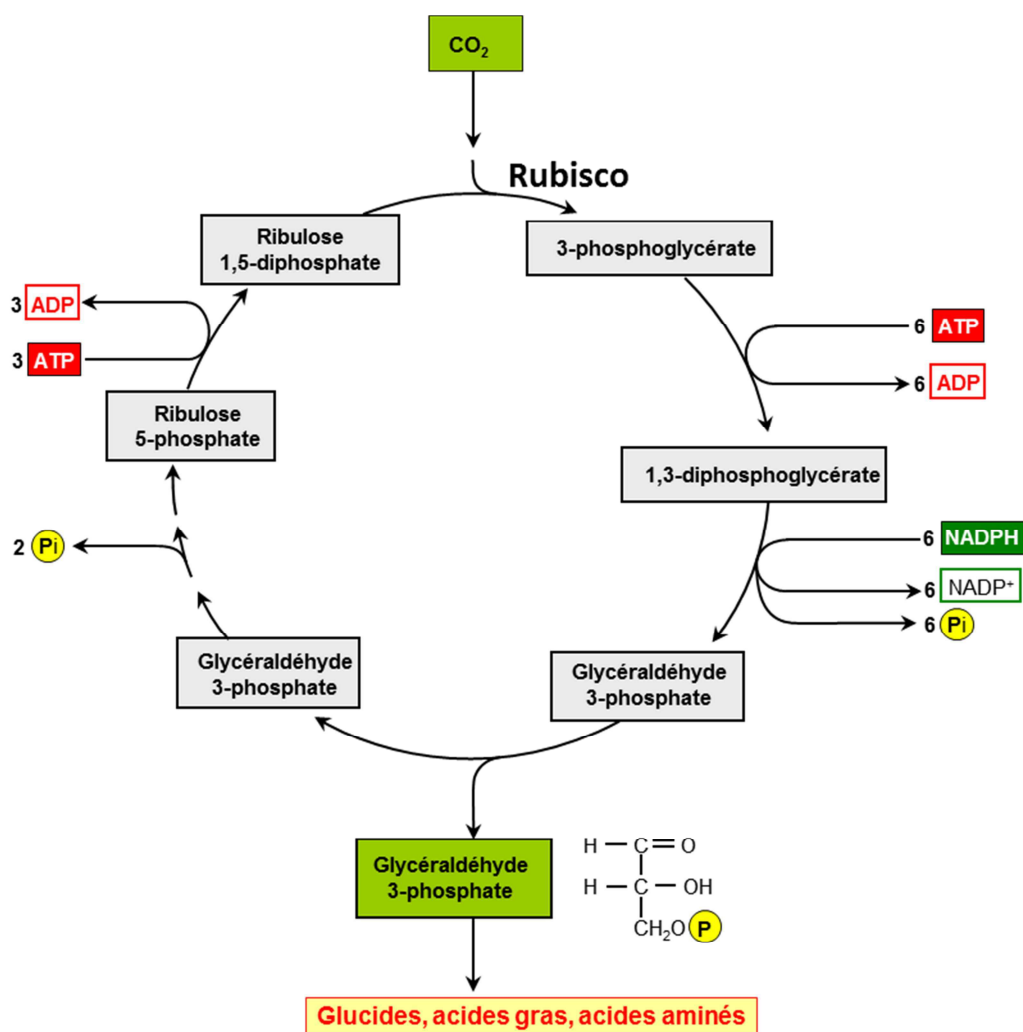


C'est l'enzyme Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui va catalyser cette réaction de carboxylation.  $CO_2$  réagit avec le Ribulose-1,5-biphosphate pour donner le glycéraldéhyde 3-phosphate (Figure I.8). Cette réaction nécessite un apport d'énergie sous forme d'ATP et de NADPH. Le cycle de Calvin va consommer 95% du NADPH et plus de 60% de l'ATP générés lors de la phase photochimique (Falkowski et Raven, 2007).

Les 5/6 du glycéraldéhyde 3-phosphate vont être utilisés pour fournir le cycle en Ribulose-1,5-biphosphate et le 1/6 restant est exporté dans le cytoplasme de la cellule pour servir à la synthèse de molécules organique (Figure I.8). Ces molécules organiques sont essentiellement des glucides et en faible proportion des acides organiques et acides aminés. Ces différentes molécules seront utilisées par la cellule pour la synthèse de nouveaux composés ou comme réserves (Falkowski et Raven, 2007).

La fixation du CO<sub>2</sub> ne nécessite pas directement de lumière pour avoir lieu, c'est pourquoi elle est aussi appelé réaction sombre. Cependant de par sa dépendance énergétique aux produits de la photosynthèse, elle reste intimement liée à celle-ci.

Bien que 95% du carbone organique des microalgues soit fixé par la Rubisco, il existe une autre voie de fixation du carbone appelée  $\beta$ -carboxylation (Raven et Beardall, 2003).



**Figure I.8.** Schéma du Cycle de Calvin. Les nombreux intermédiaires entre le glycéraldéhyde 3-phosphate et le Ribulose 5-phosphate ne sont pas indiqués pour plus de clarté. D'après Alberts *et al.*, 1995.

### I.B.3 $\beta$ -carboxylation

La  $\beta$ -carboxylation est un ensemble de réactions qui fixent le carbone inorganique, indépendamment de la lumière. Elles sont appelées  $\beta$ -carboxylation car le  $\beta$ -carbone d'un composé en C3 est carboxylé lors de la réaction.

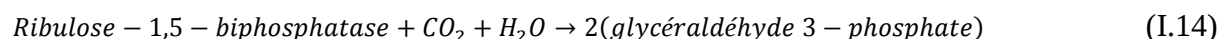
Elles permettent de recharger les cycles métaboliques en intermédiaires essentiels à la croissance cellulaire, qui ne sont pas produits par le Cycle de Calvin (acides aminés essentiels, lipides, purines, pyrimidine et tétrapyrroles) (Yang *et al.*, 2000).. Bien que ces réactions soient indépendantes de la lumière, le taux de synthèse de ces métabolites est plus important à la lumière (Falkowski et Raven, 2007).

Il est important de retenir que malgré l'importance de ces réactions de  $\beta$ -carboxylation pour le métabolisme de la cellule, elles ne représentent qu'une faible part de la fixation nette du carbone chez la plupart des organismes aquatiques photoautotrophes (Falkowski et Raven, 2007).

#### *I.B.4 Photorespiration*

La photorespiration est due à l'activité d'oxygénation de la Rubisco, se déroulant à la lumière. Cette enzyme possède deux activités compétitives. Elle a une action oxygénase sur les molécules d' $O_2$  et une action carboxylase sur  $CO_2$  :

*PHOTOSYNTHESE:*



*PHOTORESPIRATION:*



La photorespiration va mener à la synthèse de glycolate et au rejet de  $CO_2$  par la cellule. La réalisation de l'une ou l'autre de ces réactions va être dépendante de la concentration des différents substrats présents au niveau du site de fixation de l'enzyme. Cette compétition est renforcée par la très faible affinité de la Rubisco pour  $CO_2$ . Or, malgré cette limitation ainsi que la faible concentration en  $CO_2$  dans le milieu aquatique, la photorespiration est inhibée par l'activité photosynthétique de la cellule. Ceci est en partie dû à la capacité de la cellule à accumuler  $CO_2$  (Falkowski et Raven, 2007).

Il est important de noter que ce phénomène de photorespiration n'est susceptible d'arriver que lorsque la concentration de  $CO_2$  est très faible ou la concentration en  $O_2$  anormalement élevée. Pour des concentrations de  $CO_2$  supérieures à 5% dans le milieu liquide, la photorespiration peut donc être négligée (Yang *et al.*, 2000).

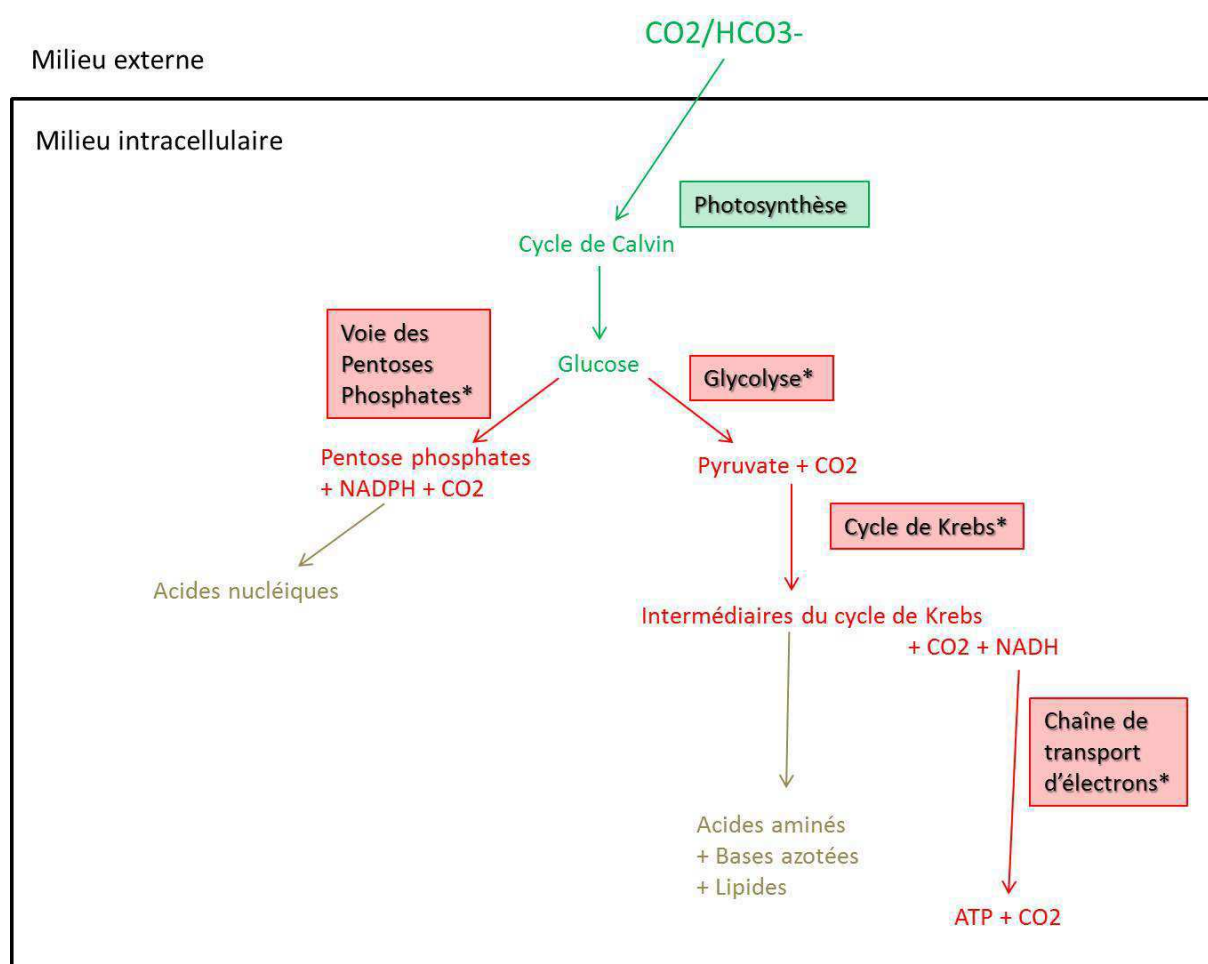
### *I.B.5 La respiration*

En ne considérant que le cycle du carbone, Raven et Beardall (2003) définissent la respiration comme étant l'ensemble des réactions qui consomment de l'O<sub>2</sub> et rejettent du CO<sub>2</sub> de façon indépendante de la lumière. A partir de cette définition, Falkowski et Raven (2007) se focalisent sur quatre mécanismes de respiration qui oxydent des composés carbonés afin de fournir des substrats à la croissance cellulaire. Ces mécanismes sont la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses phosphates et la respiration mitochondriale.

- La glycolyse est l'oxydation du glucose, formé lors de la photosynthèse, en pyruvate. Chez les algues vertes eucaryotes, elle se déroule dans le cytoplasme et le stroma des chloroplastes.
- Le cycle de Krebs se déroule au sein de la matrice mitochondriale. Le pyruvate produit par la glycolyse est oxydé en CO<sub>2</sub>. Les intermédiaires du cycle de Krebs seront utilisés comme substrat pour la synthèse de différents composés essentiels à la cellule comme des bases azotées, des acides aminés et des lipides.
- La voie des pentoses phosphates concerne la transformation du glucose en NADPH et pentoses phosphates. Le rôle majeur de ce mécanisme est la production du pouvoir réducteur NADPH qui est essentiel pour la synthèse des lipides et la réduction du NO<sub>2</sub><sup>-</sup> qui a lieu à l'obscurité (Falkowski et Raven, 2007 ; Turpin, 1991). Chez les Chlorophytes, la voie des pentoses-phosphates a lieu dans le cytosol et les chloroplastes.
- La respiration mitochondriale est le dernier mécanisme de respiration. Elle est localisée dans la membrane interne des mitochondries. L'oxydation du NADH produit lors du cycle de Krebs est oxydé par les NADPH déshydrogénases. Cette réaction est couplée à une chaîne de transport des électrons qui permet la formation d'un gradient de H<sup>+</sup>. Celui-ci fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. Ce mécanisme produit une grande quantité d'ATP nécessaire au bon fonctionnement de la cellule, notamment l'assimilation de l'azote pour la synthèse de protéines (Turpin, 1991). Yang et ses collaborateurs (2000), à partir de l'étude des flux métaboliques chez *Chlorella pyrenoidosa*, ont démontré que la respiration mitochondriale produisait 40% de l'ATP de la cellule.

Bien que ces réactions soient dites indépendantes de la lumière, il existe des interactions avec celle-ci. Yang et ses collaborateurs (2000) ont démontré que la glycolyse, le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale ne sont pas affectés par la lumière et restent actifs lorsque la cellule est éclairée. Seule la voie des pentoses phosphates est diminuée en présence de lumière. En effet au cours de la photosynthèse, NADPH est synthétisé et n'a donc plus besoin d'être produit par la voie des pentoses phosphates. L'activité de cette voie est donc diminuée en présence de lumière.

De plus, les réactions de respiration et de photosynthèse sont couplées via le métabolisme du glucose. Le rendement de synthèse du glucose est dépendant de la photosynthèse mais sa consommation par la cellule est liée à la respiration (Falkowski et Raven, 2007).



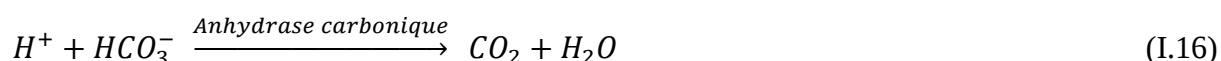
**Figure I.9.** Schéma de synthèse des relations existantes entre les réactions de photosynthèse et les réactions de respiration. Ce schéma général ne prend pas en compte la répartition des différentes réactions dans les compartiments intracellulaires. Vert : réaction de photosynthèse. Rouge : réactions de respiration. Beige : Produits découlant de ces réactions. \* : réactions indépendantes de la lumière.

### *I.B.6 Le transport et l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans la cellule : les différents Mécanismes de Concentration de CO<sub>2</sub> chez les Chlorophytes*

Le CCM (Mécanisme de Concentration de CO<sub>2</sub>) est l'ensemble des voies d'accumulation de CO<sub>2</sub> dans la cellule. La totalité de ces mécanismes et leur fonctionnement sont à l'heure actuelle encore mal connus (Giordano, 2005).

CO<sub>2</sub> entre dans la cellule de microalgue par diffusion au travers des membranes. Dans les cellules eucaryotes, la multiplicité des compartiments intracellulaires va présenter une difficulté supplémentaire pour l'arrivée de CO<sub>2</sub> au site fixateur de la Rubisco car il doit traverser ces différentes barrières. Ce transport passif n'est pas toujours suffisant pour approvisionner la Rubisco en CO<sub>2</sub>, surtout dans le milieu naturel où la concentration de CO<sub>2</sub> dissous est très faible car elle correspond à une très faible pression partielle de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère (0.036% CO<sub>2</sub>). C'est là qu'intervient le CCM.

Le processus le plus décrit dans la littérature est celui du transport actif de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Moroney et Ynalvez, 2007 ; Giordano, 2005 ; Falkowski et Raven, 2007 ; Raven et Beardall, 2003 ; Miyachi *et al.*, 2003). La majorité des Chlorophytes, dont *Chlorella vulgaris* (Findenegg, 1980), sont capables d'accumuler le carbone inorganique sous la forme HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> via ce processus. Celui-ci nécessite en partie l'intervention d'une enzyme appelée Anhydrase carbonique (CA) qui déshydrate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour le convertir en CO<sub>2</sub> :



Cette enzyme peut être aussi bien extracellulaire, située sur la paroi cellulaire, qu'intracellulaire, située dans le plasmallemme ou au niveau des membranes chloroplastiques. Son rôle exact et ses différentes localisations précises restent mal connus. Il semble aussi qu'il existe un autre type de transport actif pour CO<sub>2</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ne faisant pas intervenir cette enzyme. Mais cela reste encore peu documenté (Moroney et Ynalvez, 2007 ; Giordano, 2005). Une autre façon d'agir du CCM est l'accumulation de CO<sub>2</sub> par acidification d'un compartiment intracellulaire ciblé. La forme, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou CO<sub>2</sub>, sous laquelle est présent le carbone inorganique est fonction du pH du milieu. Ainsi un compartiment avec un pH acide accumulera plus de carbone inorganique sous la forme CO<sub>2</sub>. Le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporté dans le compartiment à pH acide, va réagir alors avec les H<sup>+</sup> présents, ce qui va entraîner la

formation de CO<sub>2</sub> et augmenter sa concentration dans ce compartiment (Moroney et Ynalvez, 2007).

Ces deux modes d'accumulation (acidification et transport actif) peuvent être présents en même temps au sein de la cellule. Ainsi, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est amené à la Rubisco via l'enzyme Anhydrase carbonique et en parallèle, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est transporté dans le lumen des thylakoïdes où le pH est acide. La concentration de CO<sub>2</sub> augmente et celui-ci pourra diffuser au travers de la membrane des thylakoïdes jusqu'à la Rubisco pour y être fixé (Giordano, 2005). Ce mécanisme d'acidification ne peut avoir lieu qu'en présence de lumière car le gradient de proton est généré lors du transport non cyclique des électrons mis en place au moment de la photosynthèse (Moroney et Ynalvez, 2007).

#### *I.B.7 L'utilisation du genre Chlorella dans l'industrie*

La culture du genre *Chlorella*, aussi bien en open ponds qu'en photobioréacteurs est grandement répandue dans l'industrie car elle propose une large palette d'utilisation. Elle peut être utilisée pour sa biomasse, pour la synthèse de molécules d'intérêt ou encore dans des procédés environnementaux.

La commercialisation de masse des microalgues commença dans les années 1960 avec la culture de *Chlorella* (Borowitzka *et al.*, 1999). Aujourd'hui *Chlorella* est produit par plus de 70 entreprises et les ventes annuelles de cette algue dépasse les 38 billions de dollars US (Spolaore *et al.*, 2006). C'est une nourriture traditionnellement consommée en Orient et également utilisée comme médicament. Elle est consommée comme complément alimentaire en Chine, en Europe, au Japon et aux Etats-Unis. Parmi le genre *Chlorella*, *Chlorella vulgaris* est l'une des espèces les plus consommées (Gouveia *et al.*, 2008).

L'importance de l'utilisation de *Chlorella vulgaris* dans l'industrie alimentaire vient de sa richesse cellulaire. En effet, elle est riche en caroténoïdes utilisés comme colorants alimentaires, en protéines, en vitamines, en minéraux, acides aminés essentiels et possède des propriétés antioxydantes (Gouveia *et al.*, 2008 ; Mizoguchi *et al.*, 2008).

*Chlorella vulgaris* est aussi largement utilisée dans l'aquaculture pour nourrir les larves de mollusques et des rotifères (Muller-Fuega, 2000). Elle sert de nourriture et de colorant à certain poissons et crevettes pour lesquels la couleur rouge-orangé apportée par les caroténoïdes est recherchée pour leur commercialisation (Gouveia *et al.*, 2008). Elle est aussi

utilisée comme complément alimentaire pour les volailles pour son effet positif sur la qualité des œufs et leur éclosion (Halle *et al.*, 2009).

*C. vulgaris* a également une utilisation dans le domaine de la cosmétologie. Elle sert de colorant dans les émulsions et rentre dans la composition de crèmes antirides car elle contient des molécules stimulant la synthèse du collagène par la peau (Spolaore *et al.*, 2006 ; Gouveia *et al.*, 2008).

On retrouve *Chlorella* dans de nombreuses applications pharmacologiques. Elle présente des propriétés intéressantes dans le traitement du diabète chez la souris (Mizoguchi *et al.*, 2008 ; Jong-Yuh et Mei-Fen, 2005). Elle a montré des résultats intéressants contre les effets de l'absorption de molécules toxiques sur les rats (Morita *et al.*, 1999), entre en jeu dans des traitements contre l'hypertension (Okamoto *et al.*, 1978) et présente de nombreuses propriétés immunologiques (Pugh *et al.*, 2001 ; Konishi *et al.*, 1990) et anti-cancéreuses (Justo *et al.*, 2001 ; Noda *et al.*, 1996 ; Yasukawa *et al.*, 1996 ).

Le genre *Chlorella* est employé au sein de nombreux bioprocédés. Elles sont largement utilisées dans le traitement des eaux usées grâce à leur capacité à éliminer des éléments indésirables comme l'ammonium, le phosphore (Perz-Garcia *et al.*, 2010 ; Travieso *et al.*, 2006) ou bien les métaux lourds des eaux souillées (Kaplan *et al.*, 1995 ; Dziwulska *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2010).

Powell *et al.* (2008) proposent l'utilisation de *Chlorella vulgaris* dans un procédé, appelé Microbial Fuel Cell, de production d'électricité à partir des réactions d'oxydo-réduction se déroulant dans la cellule. Ce procédé en produisant de l'électricité permet également la réduction de CO<sub>2</sub> présent dans le milieu en le transformant en biomasse.

Actuellement de nombreuses études sont menées sur la possibilité d'utiliser les microalgues pour fabriquer du biocarburant, aussi appelé biocarburant de troisième génération. Parmi les espèces de microalgues testées apparaissent de nombreuses espèces de *Chlorella*. En effet, de par leur contenu lipidique et leur capacité à croître rapidement elles se présentent comme des candidates intéressantes pour cette application (Phukan *et al.*, 2011 ; Xiong *et al.*, 2008 ; Converti *et al.*, 2009 ; Lva *et al.*, 2010).

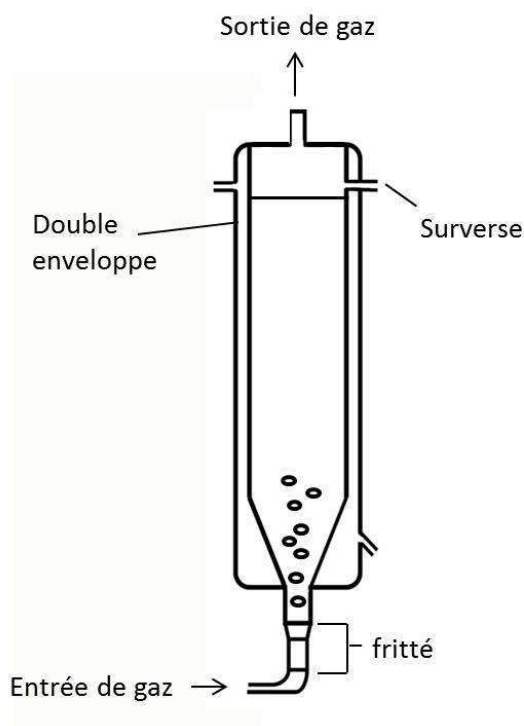
Enfin un dernier domaine dans lequel l'utilisation du genre *Chlorella* semble intéressante est celui de la consommation de CO<sub>2</sub> d'origine industrielle. L'espèce *Chlorella vulgaris* fait

notamment l'objet de nombreuses études. En effet non seulement elle résiste à de très fortes concentrations de  $\text{CO}_2$  mais également à des composés toxiques pouvant se trouver dans les rejets industriels et elle peut également être cultivée avec un apport en azote ou phosphore provenant d'eaux usées (Chinnasamy *et al.*, 2009 ; Keffer et Kleinheinz, 2002 ; Borkenstein *et al.*, 2011 ; Sakai, 1995 ; Sung, 1999 ; Yanagi *et al.*, 1995 ; Murakami *et al.*, 1998). Elle apporte donc la perspective d'un procédé robuste.

### **I.C La culture en photobioréacteur : le cas de la colonne à bulle**

Une colonne à bulle est un réacteur multiphasique cylindrique, vertical, dans lequel le gaz est introduit par le bas au travers d'un fritté (Figure I.10). Ces appareils permettent un transfert de masse efficace et demandent peu de maintenance ce qui en fait des contacteurs très utilisés. Ils sont d'ailleurs largement employés dans les procédés industriels en chimie, pétrochimie, biochimie ou encore hydrométallurgie. Et de par leur vaste utilisation ils sont intensivement étudiés depuis une vingtaine d'années (Kantarci *et al.*, 2005).

Pour la culture de microalgue en photobioréacteurs, tous les paramètres pouvant affecter la croissance et la physiologie des cellules (lumière,  $\text{CO}_2$ , nutriments, transfert du gaz vers le liquide, température,...) sont contrôlés.



**Figure I.10.** Colonne à bulle

### *I.C.1 Le transfert gaz-liquide dans un réacteur colonne à bulle : le modèle de la couche limite*

Le contact entre les deux phases se fait par l'intermédiaire de fines bulles de gaz dispersées dans le liquide.

Dans le cas présent, le transfert a lieu entre deux phases. Il y a donc deux couches limites (Fig. I.8). Dans la phase gazeuse les teneurs sont exprimées en pression partielle de CO<sub>2</sub>.

Le flux peut être exprimé de deux façons différentes :

$$\Phi_{\text{gaz}} = k_{\text{gaz}}(P_{\text{CO}_2} - P_{\text{CO}_2,i}) \quad (\text{I.17})$$

$$\Phi_{\text{liquide}} = k_{\text{liquide}}([CO_2]_i - [CO_2]) \quad (\text{I.18})$$

Avec :

$\Phi_{\text{gaz}}$  : flux de matière du côté gaz (mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

$\Phi_{\text{liquide}}$  : flux de matière du côté liquide (mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

$k_{\text{gaz}}$  : coefficient de transfert de matière du côté gaz (mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup>)

$k_{\text{liquide}}$  : coefficient de transfert de matière du côté liquide (m.s<sup>-1</sup>)

$P_{\text{CO}_2}$  : pression partielle de CO<sub>2</sub> (atm)

$P_{\text{CO}_2,i}$  : pression partielle de CO<sub>2</sub> dans la phase gazeuse à l'interface (atm)

$[CO_2]_i$  : Concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans la phase liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$[CO_2]$  : Concentration en CO<sub>2</sub> dissous dans la phase liquide à l'interface (mol.L<sup>-1</sup>)

En supposant qu'il n'y a pas d'accumulation à l'interface  $\Phi_{\text{gaz}} = \Phi_{\text{liquide}} = \Phi$

Par ailleurs le modèle suppose aussi que l'équilibre est atteint à l'interface :

$$P_{\text{CO}_2,i} = H_{\text{CO}_2}[CO_2]_i \quad (\text{I.19})$$

Avec :

$H_{\text{CO}_2}$  : constante de Henry (L.atm.mol<sup>-1</sup>)

$k_{gaz}$  et  $k_{liquide}$  sont appelés coefficients de transfert individuels de  $CO_2$ , respectivement dans les phases gazeuse et liquide.

Toutefois, il est souvent plus commode d'utiliser les coefficients de transfert globaux  $k_G$  et  $k_L$  définis par :

$$\Phi = k_G [P_{CO_2} - P_{CO_2}^*] = k_L [[CO_2]^* - [CO_2]] \quad (I.20)$$

Avec :

$k_G$  : coefficient de transfert global de  $CO_2$  dans la phase gazeuse ( $m.s^{-1}atm^{-1}$ )

$k_L$  : coefficient de transfert global de  $CO_2$  dans la phase liquide ( $m.s^{-1}$ )

$P_{CO_2}^*$  : pression qu'aurait la phase gazeuse si elle était en équilibre avec la phase liquide (atm)

$[CO_2]^*$  : concentration qu'aurait la phase liquide si elle était en équilibre avec la phase gazeuse ( $mol.L^{-1}$ )

$P_{CO_2}^*$  s'écrit :

$$P_{CO_2}^* = H_{CO_2} [CO_2] \quad (I.21)$$

De même :

$$[CO_2]^* = \frac{P_{CO_2}}{H_{CO_2}} \quad (I.22)$$

Dans la suite du travail, on utilisera pour décrire le flux l'expression :

$$\Phi = k_L [[CO_2]^* - [CO_2]] \quad (I.23)$$

La quantité transférée par unité de temps,  $N$ , sera donnée par :

$$N = \Phi A \quad (I.24)$$

Avec :

$\Phi A$  : aire interfaciale disponible dans le contacteur ( $m^2$ )

A peut être exprimée par :

$$A = a \times V \quad (I.25)$$

Avec :

$a$  : aire interfaciale par unité de volume de liquide ( $\text{m}^2.\text{m}^{-3}$ )

$V$  : volume de liquide ( $\text{L}^{-1}$ )

Il vient donc :

$$N = k_L a V \left[ [CO_2]^* - [CO_2] \right] \quad (I.26)$$

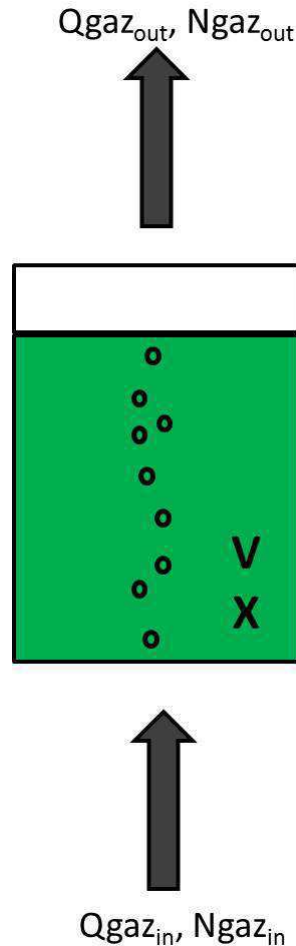
Le coefficient volumique de transfert de masse,  $kLa$  permet de caractériser le transfert de matière dans le photobioréacteur. C'est le produit entre  $kL$  le coefficient global de transfert du côté liquide ( $\text{m.h}^{-1}$ ) et  $a$  l'aire interfaciale par unité de volume ( $\text{m}^2.\text{m}^{-3}$ ) (Kantarci *et al.*, 2005). De nombreux paramètres influencent le produit  $kLa$ . L'augmentation du débit de gaz et la diminution de la taille des bulles vont accroître  $kLa$  et le transfert du gaz (Ashley *et al.*, 2009). La taille des bulles détermine leur forme ce qui modifie leur temps de séjour dans le réacteur et donc joue sur le transfert du gaz (Neto *et al.*, 2008). L'élévation de la viscosité du gaz, de sa densité et de sa pression augmente  $kLa$ , alors que l'augmentation de la concentration en solide dans le liquide et de la viscosité du liquide vont diminuer ce paramètre (Kantarci *et al.*, 2005). Le type de fritté utilisé agit aussi sur  $kLa$ , en modifiant la taille des bulles (Neto *et al.*, 2008).

### I.C.2 La croissance cellulaire dans le réacteur

#### *a. La culture en batch*

En mode de culture semi-batch (Figure I.11) tous les éléments essentiels à la croissance de l'algue (lumière, azote, phosphore, carbone, microéléments) sont apportés au temps zéro de la culture. Tout au long de la culture, ils vont être consommés par les algues et leur concentration va diminuer dans le milieu. L'augmentation de la concentration cellulaire dans le réacteur va cesser lorsque l'un de ces nutriments sera en quantité trop réduite pour soutenir le métabolisme de reproduction des cellules. La composition biochimique, les capacités

physiologiques et la vitesse à laquelle la cellule se divise vont alors être modifiées (Cullen *et al.*, 1992).



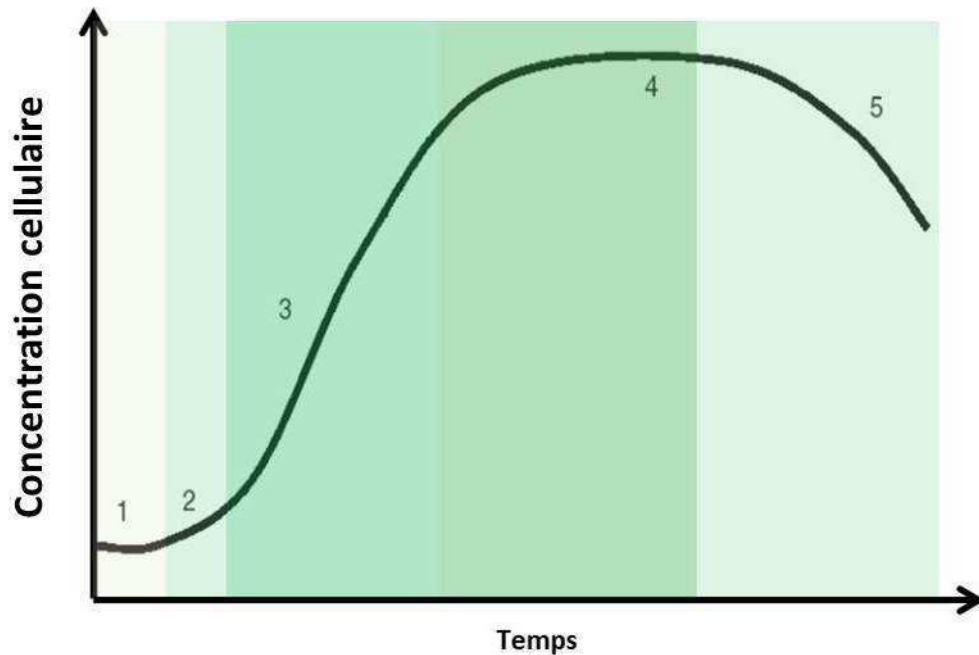
**Figure I.11.** Schéma d'une culture en photobioréacteur en mode batch.  $Q_{\text{gaz}_{\text{in}}}$  : débit volumique de gaz entrant dans le réacteur,  $Q_{\text{gaz}_{\text{out}}}$  : débit volumique de gaz sortant du réacteur,  $Ng_{\text{gaz}_{\text{in}}}$  : débit molaire de gaz entrant dans le réacteur,  $Ng_{\text{gaz}_{\text{out}}}$  : débit molaire de gaz sortant du réacteur,  $V$  : volume de culture,  $X$  : concentration cellulaire.

La Figure I.12 représente l'évolution théorique de la concentration cellulaire dans une culture en batch. Cinq phases peuvent être décrites d'après cette figure :

- Phase 1 : **phase de latence**. La cellule a besoin d'un temps d'acclimatation aux nouvelles conditions de culture qui lui sont appliquées; la croissance est très faible.

- Phase 2 : **phase d'accélération**. Les cellules ont accumulé suffisamment de composés intracellulaires et ont doublé leur matériel génétique. La population va commencer à croître grâce à la reproduction végétative. Les cellules se divisent donc en deux cellules filles identiques contenant chacune la moitié du contenu de la cellule mère et qui par la suite se diviseront elles-mêmes en deux (Andersen, 2005).
- Phase 3 : **phase exponentielle**. La vitesse de croissance de la culture reste constante et maximale. Les conditions du milieu sont optimales pour la croissance cellulaire. La quantité moyenne des constituants cellulaires ainsi que l'évolution de la population sont constantes (Andersen, 2005).
- Phase 4 : **phase stationnaire**. Un des éléments du milieu va venir à manquer (lumière, azote, phosphore, carbone,...) et en conséquence la vitesse de croissance diminue. Cependant tant que les cellules possèdent des produits de stockage leur permettant d'alimenter leur métabolisme, elles survivent (Richmond, 2004). Certains composés, tel que les lipides et les glucides, vont continuer à s'accumuler dans les cellules pendant cette période (Andersen, 2005). La quantité de cellules qui se reproduisent est égale à la quantité de cellules qui meurent donc la concentration cellulaire est constante.
- Phase 5 : **phase de décroissance**. La majorité des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires, elles ne peuvent donc plus produire l'énergie nécessaire pour les processus de maintenance cellulaire et elles meurent (Richmond, 2004). La quantité de cellules qui meurent est fortement supérieure à la quantité de cellules pouvant encore se reproduire.  
Certaines espèces de microalgue sont capables de se mettre en dormance cellulaire lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Elles pourront reprendre une activité métabolique lorsque l'environnement sera à nouveau propice à leur développement (Richmond, 2004).

Ogbonna *et al.* (1999) évoque une phase supplémentaire ayant lieu après la phase exponentielle. Cette phase appelée **phase stationnaire** serait la résultante d'une trop forte concentration cellulaire dans le réacteur après un temps  $t$  de culture, menant à la diminution de la quantité de lumière disponible pour les algues et donc au ralentissement de la multiplication cellulaire en réponse à cette limitation.



**Figure I.12.** Courbe de croissance théorique d'une population de microalgues en fonction du temps. D'après Richmond (2007).

Dans le cas d'un réacteur batch parfaitement agité, un bilan matière entre les instants  $t$  et  $t+dt$  donne :

$$V dX = rVdt \quad (\text{I.27})$$

Avec :

$V$  = volume de culture (L)

$r$  = vitesse de croissance ( $\text{cell.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ou  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$X$  = concentration cellulaire ( $\text{cell.L}^{-1}$  ou  $\text{g.L}^{-1}$ )

La vitesse de croissance des microalgues est donnée par le modèle:

$$r = \mu X \quad (\text{I.28})$$

Avec :

$\mu$  = vitesse spécifique de croissance ( $\text{h}^{-1}$ )

Avec l'équation (I.28), on obtient :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{I.29})$$

Si l'on considère toutes les phases de culture,  $\mu$  n'est pas constant. Toutefois dans la phase exponentielle  $\mu$  est constant. Il vient donc :

$$\frac{dX}{X} = \mu dt \quad (\text{I.30})$$

En intégrant l'équation (I.30), on obtient :

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu(t - t_0) \quad (\text{I.31})$$

Avec :

$t_0$  : temps initial ( $t_0 = 0$ )

$X_0$  : concentration cellulaire correspondant à  $t_0$

On peut également calculer le temps de doublement de population  $t_d$  (h):

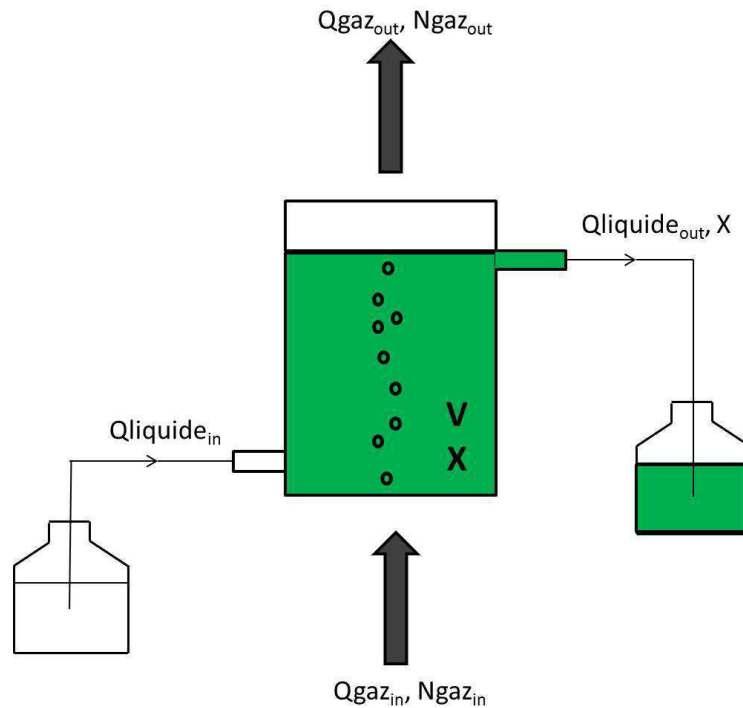
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{I.32})$$

Le temps de doublement de la population ne concerne que les cellules viables (Richmond, 2004).

Les cultures de microalgues en batch permettent d'appréhender les phénomènes cinétiques. Elles ont, notamment, été largement utilisées pour étudier les phénomènes de limitation sur les cultures (Richmond, 2004).

*b. La culture en continu*

En mode de culture continu (Figure I.13), le milieu de culture est apporté dans le réacteur de façon continu. Afin que le volume de la culture reste le même, l'excès de liquide contenant des algues est éliminé du réacteur par la surverse. Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire à l'intérieur du réacteur stable. La culture est débutée en mode batch jusqu'à ce que la concentration cellulaire souhaitée soit obtenue puis le milieu de culture est injecté en continu. Ainsi, théoriquement, la culture se trouvera continuellement en phase exponentielle de croissance (Andersen, 2005).



**Figure I.13.** Schéma d'une culture en photobioréacteur en mode continu.  $Q_{\text{gaz}_{\text{in}}}$  : débit volumique de gaz entrant dans le réacteur,  $Q_{\text{gaz}_{\text{out}}}$  : débit volumique de gaz sortant du réacteur,  $Ng_{\text{az}_{\text{in}}}$  : débit molaire de gaz entrant dans le réacteur,  $Ng_{\text{az}_{\text{out}}}$  : débit molaire sortant du réacteur,  $V$  : volume de culture,  $X$  : concentration cellulaire,  $Q_{\text{liquide}_{\text{in}}}$  : débit volumique de milieu de culture entrant dans le réacteur,  $Q_{\text{liquide}_{\text{out}}}$  : débit de milieu de culture contenant des algues sortant du réacteur.

On suppose la phase liquide parfaitement agitée dans le réacteur.

Un bilan matière sur la biomasse entre  $t$  et  $t+dt$  donne :

$$QXd t + VdX = \mu XVd t \quad (I.33)$$

Avec :

$Q$  = débit de liquide sortant du réacteur ( $L.h^{-1}$ ) supposé égal à celui d'entrée

$V$  = volume de culture (L)

$X$  = concentration cellulaire ( $cell.mL^{-1}$  ou  $g.L^{-1}$ )

$\mu$  = vitesse spécifique de croissance ( $h^{-1}$ )

$$\text{Soit } \frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{Q}{V}X \quad (I.34)$$

Le taux de dilution  $D$  de la culture est donné par :

$$D = \frac{Q}{V} \quad (I.35)$$

Lorsque l'état stationnaire est atteint la concentration cellulaire dans le réacteur est stable :

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (I.36)$$

$$\text{Et dans ce cas: } \mu = D \quad (I.37)$$

*c. Les modèles microalgaux :*

La prédiction de l'évolution de la biomasse algale au sein de bioprocédés est un domaine largement étudié, notamment à l'aide de modèles mathématiques. En effet, ces modèles permettent l'optimisation du procédé et ont pour but la prédiction du comportement du microorganisme dans le procédé.

En fonction de l'utilisation voulue pour un modèle celui-ci peut présenter un niveau d'organisation plus ou moins complexe. Les modèles mathématiques de croissance cellulaire se classent selon deux catégories :

- *Les modèles déterministes ou non-structurés.* Dans ces modèles, la biomasse cellulaire est considérée de façon globale et sa composition intracellulaire est ignorée. Ce type de modèle s'attelle uniquement à décrire la variation de la concentration en biomasse en fonction du temps sous l'influence des paramètres d'actions, par exemple la température, le pH, etc.
- *Les modèles structurés.* Ces modèles plus complexes prennent en compte des paramètres tel que l'âge, la taille, la morphologie, l'état physiologique ou la composition chimique de la cellule. Ce sont des modèles mathématiques très précis qui cherchent à approfondir la description des phénomènes physiologiques. Mais cette complexité en fait des modèles plus difficiles à utiliser.

Dans le cas des bioprocédés, il est important de relier la vitesse de réaction aux variables du système. Pour un procédé utilisant des microalgues, on peut par exemple étudier l'influence des paramètres environnementaux sur la vitesse spécifique croissance, qui joue un rôle important dans le bon fonctionnement et l'efficacité du procédé. Il faut alors être capable de déterminer qu'elles phénomènes physico-chimiques et biologiques influencent la cinétique de croissance. Cette étape se fait au travers d'expérimentations en laboratoire.

Il existe un grand nombre de modèles mathématiques. Le but de ce paragraphe n'est pas de présenter une compilation de la diversité pouvant être trouvée dans la littérature mais d'exposer les fondements des deux modèles ayant permis la construction du modèle mathématique utilisé dans cette thèse.

De nombreux modèles de croissance des microorganismes ont découlé des travaux réalisés par Monod sur la croissance bactérienne dans les années 1940. Le modèle de Monod est un modèle non structuré reliant la croissance cellulaire à la concentration du substrat limitant dans le milieu de culture. Il se présente sous la forme de la loi de Michaelis-Menten. Ce modèle considère que la composition intracellulaire ne varie pas au cours du temps.

La vitesse spécifique de croissance décrite par le modèle de Monod est donnée par la loi hyperbolique suivante :

$$\mu = \mu_0 \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{I.38})$$

Avec :

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_0$  : vitesse spécifique de croissance maximale ( $\text{h}^{-1}$ )

$S$  : concentration du substrat ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$K_s$  : constante d'affinité de Monod ( $\text{g.L}^{-1}$ )

D'après cette équation, lorsque la concentration du substrat est plus faible que le  $K_s$  alors la croissance est limitée par le substrat. Cependant cette équation n'est valable que dans la phase exponentielle et de ralentissement de la croissance cellulaire ou à l'état stationnaire lors de cultures en continu.

A l'opposé de Monod, le modèle de Droop établi en 1968, est un modèle structuré. Il considère que la composition cellulaire va varier au cours d'une culture. A partir de ce postulat, il détermine que la croissance cellulaire est liée au quota intracellulaire de l'élément limitant dans le milieu de culture. Cependant l'assimilation de cet élément limitant par la cellule est quant à elle dépendante de la concentration en l'élément limitant dans le milieu de culture (Droop, 1973).

Droop pose le postulat que la croissance est toujours limitée par un seul nutriment. Lorsque la cellule est limitée par cet élément, alors son quota cellulaire,  $q$  est à sa valeur minimum appelée  $q_0$ . Et à l'inverse lorsque cet élément n'est pas limitant le quota cellulaire de cet élément est à son maximum. Les limites physiologiques de la cellule sont donc les quotas maximum et minimum de cet élément pouvant être atteints dans la cellule pour une croissance donnée (Bougaran *et al.*, 2010).

La vitesse spécifique de croissance d'après le modèle de Droop s'écrit :

$$\mu = \mu_0 \cdot \left(1 - \frac{q_0}{q}\right) \quad (\text{I.39})$$

Avec :

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_0$  : vitesse spécifique de croissance maximale ( $\text{h}^{-1}$ )

$q_0$  : quota minimum pouvant être atteint dans la cellule pour l'élément limitant ( $\text{g.cell}^{-1}$ )

$q$  : quota de l'élément limitant dans la cellule ( $\text{g.cell}^{-1}$ )

Le modèle de Droop bien que prenant en compte la composition intracellulaire, continue à considérer la cellule comme un compartiment unique. Il existe d'autres modèles qui décrivent la cellule de façon plus complexe, comprenant deux compartiments ou plus qui chacun possède une composition biochimique fixe.

Il faut noter que la loi des quotas cellulaires reste l'approche préférée dans le domaine de l'étude de la physiologie (Bougaran *et al.*, 2010).

## **I.D L'impact des paramètres de culture**

### *I.D.1 L'impact des paramètres de culture sur le transport et l'accumulation du carbone inorganique et les Mécanismes de Concentration de CO<sub>2</sub>*

#### *a. Le CO<sub>2</sub> :*

Les différents mécanismes de concentration de CO<sub>2</sub> (CCM) sont une adaptation des organismes à un environnement contenant de faibles concentrations de CO<sub>2</sub>. L'activité du CCM dans la cellule va donc être affectée par une augmentation de CO<sub>2</sub> dans le milieu mais l'impact sur la cellule va dépendre aussi bien de la préférence de l'espèce à utiliser le carbone inorganique sous la forme CO<sub>2</sub> ou HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que de la présence ou non d'un CCM dans la cellule (Giordano, 2005). Ainsi les espèces dont l'assimilation du carbone inorganique se fait essentiellement ou uniquement par diffusion de CO<sub>2</sub> au travers de la paroi cellulaire, seront favorisées par une élévation de CO<sub>2</sub> dissous (Beardall and Stojkovic, 2006; Wu *et al.*, 2008). Au contraire, les espèces important HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> via le CCM vont être négativement affectées par une augmentation de CO<sub>2</sub> car celle-ci va entraîner la baisse du pH et donc diminuer la quantité de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> au profit de CO<sub>2</sub>. Par exemple, l'expression de gènes contrôlant le CCM est supprimée chez *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque celle-ci est cultivée avec une forte

concentration de CO<sub>2</sub> (Giordano *et al.*, 2005). A l'inverse, pour ces espèces, lorsqu'elles sont transposées d'un milieu fortement à un milieu faiblement concentré en CO<sub>2</sub>, l'activité du CCM augmente (Kaplan, 1999, Miyachi, 2003) et par là donc, leur activité photosynthétique est augmentée. Cela se traduit par une augmentation de l'activité de l'anhydrase carbonique, comme chez *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricornutum*, deux diatomées marines (Burkhardt *et al.*, 2001). Chez *Chlamydomonas reinhardtii* cette activité augmente d'un facteur 10 (Miyachi *et al.*, 2003).

Bien que la plupart des algues et cyanobactéries soient capables de proliférer à de fortes concentrations de CO<sub>2</sub> dans le milieu, il a longtemps été pensé qu'elles ne résistaient pas à de très fortes concentrations (de l'ordre de 30%) (Miyachi *et al.*, 2003). Lorsqu'une concentration importante de CO<sub>2</sub> est dissoute dans le milieu, cela va entraîner une baisse importante du pH et par là même une baisse du pH intracellulaire. Or une baisse du pH dans le stroma des chloroplastes mène à l'inactivation de la Rubisco et donc de la fixation du CO<sub>2</sub> par la cellule. Cependant, des études ont souligné l'existence d'espèces résistantes. *Chlorella* sp. et *Scenedesmus obliquus* ont été cultivées à des concentrations de 30 à 50% de CO<sub>2</sub> (Sakai *et al.*, 1995 ; Murakami *et al.*, 1998 ; Tang *et al.*, 2011 ; Hanagata *et al.*, 1992) et *Chlorecocum littorale* a supporté une concentration de 40% de CO<sub>2</sub> (Kurano *et al.*, 1995 ; Iwasaki *et al.*, 1998). Les espèces *Cyanidium caldarium*, *Cyanidioschyzon merollae* et *Galdieria partita* sont quant à elles, capables de vivre avec 100% de CO<sub>2</sub> (Miyachi *et al.*, 2003). Des études ont été menées pour comprendre cette résistance des cellules. Lorsque *C. littorale* est transposée d'un milieu faiblement concentré en CO<sub>2</sub> à un milieu extrêmement concentré, dans un premier temps son activité photosynthétique est ralentie ; cela se traduit par la diminution de la fixation de CO<sub>2</sub> par la cellule, la chute de la production d'O<sub>2</sub> dans le milieu et la baisse de rendement du PSII (Satoh *et al.*, 2002 ; Pesheva *et al.*, 1994 ; Iwasaki *et al.*, 1998). En parallèle, le transfert cyclique des électrons lié au PSI est grandement augmenté. Cela mène à une synthèse d'ATP supplémentaire. Ces molécules d'ATP vont entraîner la mise en place de pompes à proton ATP-dépendantes qui vont permettre le maintien d'un pH neutre dans la cellule et plus particulièrement au niveau du compartiment de la Rubisco qui va ainsi pouvoir conserver son activité de fixation de CO<sub>2</sub> (Sasaki *et al.*, 1999).

b. La lumière :

Le transport et l'accumulation du carbone inorganique sont des processus consommateurs d'énergie et nécessitent donc l'apport d'ATP. L'ATP est synthétisée grâce au gradient de protons généré au travers de la membrane des thylakoïdes en réponse au transport d'électrons en provenance du PSI. Cette synthèse est directement liée à la quantité de photons reçus par la cellule. Le CCM est donc grandement influencé par la quantité de lumière disponible (Badger *et al.*, 1982 ; Kaplan *et al.*, 1987). Chez la cyanobactérie *Anabaena variabilis* (Ogawa, 1985) et chez la Chlorophycée *Chlamydomonas reinhardtii* (Spalding, 1984) il a été démontré qu'une diminution du flux de photon entraîne la répression du CCM et la baisse de la capacité de transport du carbone inorganique.

Cependant, la question de savoir si la limitation par la lumière a un impact direct sur la production d'énergie nécessaire au fonctionnement du CCM ou bien si elle influence la croissance cellulaire et donc la demande en carbone inorganique par la cellule reste en suspens (Young et Beardall, 2004).

c. Les nutriments :

Une limitation en éléments métalliques, tel que le fer et le zinc, aurait un impact sur l'activité du CCM et la fixation du carbone inorganique par la cellule. Morel (1994) a démontré que l'acquisition de  $\text{HCO}_3^-$  chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* est défavorisée par une limitation en Zn. En effet, l'enzyme CA est une métalloenzyme possédant un atome de Zinc (Wang *et al.*, 2005), ce qui expliquerait qu'une limitation de cet élément dans le milieu ait un impact sur le transport du  $\text{HCO}_3^-$  par la CA (Sun and Wang, 2009). Mais Wang (2004) souligne que cette interaction est dépendante de l'espèce concernée.

Young et Beardall (2004) ont démontré, chez la microalgue marine *Dunaliella tertiolecta*, qu'une limitation en fer et en azote augmente le transport actif du carbone inorganique par la cellule mais endommage l'appareil photosynthétique. En effet, lors de cette étude, la capacité photosynthétique de la cellule était altérée et la concentration en chlorophylle ainsi que l'activité du PSII étaient diminuées. Une limitation en azote semblait avoir plus d'impact sur la cellule qu'une limitation en fer. Cela signifie qu'alors que le fer interagirait uniquement au niveau des enzymes jouant un rôle dans l'absorption de la lumière au sein de l'appareil photosynthétique, l'azote interviendrait au niveau de l'acquisition de la lumière ainsi qu'au

niveau de la fixation de  $\text{CO}_2$  en diminuant la quantité de Rubisco. L'hypothèse émise pour expliquer l'augmentation de l'affinité pour le carbone inorganique, bien que l'appareil photosynthétique soit endommagé, est qu'une augmentation de l'efficacité de fixation du carbone inorganique permet une meilleure utilisation du Fe et de l'azote lorsqu'ils sont en faible concentration dans le milieu. Cependant, les mécanismes régulant l'affinité de la cellule pour le carbone inorganique, lors d'une limitation de ces deux éléments, restent obscurs. Manuel (1988) propose l'hypothèse que chez *Chlamydomonas reinhardtii* le CCM nécessite la synthèse de protéines spécifiques et qu'une limitation en azote jouerait sur celles-ci. De plus, Giordano (1997) introduit l'idée que la forme sous laquelle l'azote est présent dans le milieu ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) a un impact sur la fixation du carbone inorganique. Mais les différents rôles de l'azote sur le CCM restent encore mal compris (Young et Beardall, 2004).

Contrairement à l'azote, une limitation en phosphore dans le milieu entraîne une baisse de l'activité du CCM (Beardall *et al.*, 1998). Le phosphore joue un rôle primordial pour la production d'énergie, notamment via l'ATP et va donc fortement impacter le métabolisme et le cycle du carbone de la cellule qui nécessitent un apport d'énergie (Gauthier et Turpin, 1994 ; Weger, 1996).

#### d. La température :

Les variations de température ont un impact sur le partage de  $\text{CO}_2$  entre le gaz et le liquide. Plus la température est élevée et plus la dissolution de  $\text{CO}_2$  est faible. De plus, une augmentation de la température déplace les équilibres chimiques du système carboné en abaissant les valeurs des pKa et modifie donc la distribution des différentes espèces carbonées (Tableau I.3).

**Tableau I.3.** Effet de la température sur les concentrations de différentes espèces carbonées pour une eau en équilibre avec l'atmosphère. Valeurs données pour un pH de 8.2 (D'après Beardall *et al.*, 1998).

| Espèces carbonées      | Eau douce |      | Eau de mer |      |
|------------------------|-----------|------|------------|------|
|                        | 10°C      | 20°C | 10°C       | 20°C |
| $\text{CO}_2$ (%)      | 1.8       | 1.35 | 0.71       | 0.6  |
| $\text{HCO}_3^-$ (%)   | 97.6      | 85.6 | 92         | 90.1 |
| $\text{CO}_3^{2-}$ (%) | 0.5       | 13   | 7.3        | 9.2  |

L'activité du CCM devrait diminuer à de faibles températures en raison de l'augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$ , de l'augmentation du rapport  $\text{CO}_2 : \text{O}_2$  et du déplacement des  $\text{pK}_a$  vers de plus fortes valeurs (Beardall *et al.*, 1998). Ainsi une plus grande quantité de  $\text{CO}_2$  sera disponible pour la cellule. De plus, Descolas-Gros *et al.* (1987) démontrent que l'affinité de la Rubisco pour le  $\text{CO}_2$  augmente à de faibles températures, diminuant ainsi le besoin de  $\text{C}_i$  pour saturer l'enzyme.

*e. Le pH :*

Le pH va réguler la distribution des espèces carbonées présentes en solution. Beardall et ses collaborateurs (1998) rapportent que la quantité de l'enzyme Anhydrase carbonique externe diminue lorsque le pH est acide. En effet, le rapport  $\text{CO}_2 : \text{HCO}_3^-$  augmente et la diffusion du  $\text{CO}_2$  supplante le transport actif de  $\text{HCO}_3^-$  par la cellule.

Cependant, bien que Balkos et Colman (2007) rapportent que des algues acidophiles présentent une répression des Anhydrase carboniques externes à pH acide, ils démontrent aussi qu'il existe des espèces possédant des Anhydrases carboniques externes et tolérantes à de faibles pH, tel est le cas de *Chlamydomonas acidophila*. A l'inverse deux espèces d'*Euglena*, dont une acidophile, ne présentent pas d'Anhydrase carbonique externe (Colman et Bulkos, 2005) et toutes les deux ne présentent pas le même processus de transport du  $\text{HCO}_3^-$ . Il est donc important de noter que la présence ou non d'Anhydrases carboniques externes est fonction de l'espèce étudiée.

Les algues acidophiles montrent aussi la capacité à garder un pH intracellulaire proche de la neutralité. Ainsi ce gradient de pH permet la diffusion du  $\text{CO}_2$  vers l'intérieur de la cellule (Balkos et Colman, 2007).

I.D.2 L'impact des paramètres de culture sur la culture de microalgues

*a. Le gaz*

- *Le transfert gaz-liquide*

$\text{CO}_2$  est apporté dans la culture par injection d'un gaz, le plus souvent un mélange d'air et  $\text{CO}_2$ . Le transfert de  $\text{CO}_2$  de la phase gazeuse à la phase liquide va déterminer la quantité de

CO<sub>2</sub> disponible dans la culture. Dans la colonne à bulle, l'injection du gaz permet aussi le mélange de la culture. Un bon mélange permet l'homogénéisation de la concentration des cellules et des nutriments, améliore les échanges de matière, enfin il limite les phénomènes de photo-ombrage et de photoinhibition (Ugwu *et al.*, 2008). Mais une aération trop importante peut aussi entraîner une détérioration des cellules de microalgues (Ugwu *et al.*, 2008 ; Contreras *et al.*, 1998).

Le transfert gaz-liquide dépend de plusieurs facteurs :  $k_L a$ , le temps de séjour, le temps de séjour du gaz dans le réacteur, le holdup du gaz (Ugwu *et al.*, 2008). Le holdup représente le volume des bulles. Il dépend quant à lui, des dimensions de la colonne, de la température et de la pression du gaz, de la taille des bulles et de la façon dont le gaz est introduit dans le réacteur (Kantarci *et al.*, 2005). Maîtriser le transfert du gaz vers le liquide dans un photobioréacteur est donc un facteur clé pour la culture des microalgues.

Diverses études ont été menées pour apprécier le rôle du transfert de gaz sur la production de biomasse dans des cultures algales. Contreras *et al.* (1998) ont mis en lumière l'interaction entre le transfert de CO<sub>2</sub> et la densité de cellules dans une culture de *Phaeodactylum tricornutum*. Pour une faible densité de cellule, la consommation de CO<sub>2</sub> restait inférieure au transfert de CO<sub>2</sub>. Les auteurs en déduisaient que la concentration de CO<sub>2</sub> n'était pas limitante mais que le gradient de CO<sub>2</sub> au sein du réacteur était le facteur influençant la consommation de celui-ci par les algues. A l'inverse lorsque la culture atteignait une densité cellulaire plus importante, la consommation de CO<sub>2</sub> devenait plus importante que le transfert de gaz et celui-ci devenait le facteur limitant. D'autre part la vitesse de croissance optimale de la culture, lors de cette étude, était atteinte pour une vitesse de gaz de 0.055 m.s<sup>-1</sup>. Mais au-delà de cette vitesse, la croissance chutait. Les auteurs expliquent ce résultat par une altération des cellules due à un holdup trop important.

Soletto *et al.* (2008) ont également mis en relation le débit de gaz avec la croissance de *Spirulina platensis*. Lorsque le débit gazeux était augmenté de 0.74 à 1.03 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, la croissance des algues et la fixation du CO<sub>2</sub> étaient diminuées. Les auteurs expliquent ces résultats à la fois par un excès de CO<sub>2</sub> dans le milieu et par une augmentation de la salinité du milieu car l'augmentation du débit gazeux entraînant un fort ajout de NaOH pour contrer la baisse du pH et donc, une augmentation de la salinité dû aux Na<sup>+</sup>.

- *Le CO<sub>2</sub>*

De nombreuses études examinent l'impact de fortes concentrations de CO<sub>2</sub> (jusqu'à 50% de CO<sub>2</sub> v/v) sur des cultures d'algues en photobioréacteur. Le Tableau I.4 reprend, de manière non exhaustive, les résultats obtenus dans différentes publications. Ces études ont été sélectionnées car elles concernent toutes des espèces de microalgues cultivées en systèmes fermés avec CO<sub>2</sub> sous forme gazeuse. Ce choix a été fait dans le but d'être en mesure de comparer par la suite ces résultats avec ceux obtenus lors de ce travail de thèse. Dans ces travaux, les auteurs ont étudié l'effet de différentes concentrations de CO<sub>2</sub> sur différentes espèces de microalgues. Bien que toutes les espèces étudiées résistent à de fortes concentrations de CO<sub>2</sub>, la gamme de concentration optimale pour la croissance cellulaire se situe entre 5 et 10 % de CO<sub>2</sub>. La croissance cellulaire est stimulée par une augmentation de la concentration de CO<sub>2</sub> en deçà de cette concentration optimale. Pour une concentration de CO<sub>2</sub> supérieure à la concentration optimale définie lors des études, l'effet est négatif.

Néanmoins, à la lecture des différentes données compilées dans le Tableau I.4, il apparaît une grande hétérogénéité dans les pratiques de culture : culture en photobioréacteur ou erlenmeyer, lumière continue ou photopériode, intensités lumineuses variables, contrôle ou non du pH,... qui rendent difficiles la comparaison des résultats obtenus. Par exemple dans deux études réalisées avec *Chlorella vulgaris*, cultivées à des concentrations équivalentes de CO<sub>2</sub> (5 et 6% CO<sub>2</sub>) sous une intensité lumineuse de 47  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , une différence de 90 % dans la concentration cellulaire finale est observée (Chinnasamy *et al.*, 2009 ; Sydney *et al.*, 2010). Les différences notables entre ces deux études semblent être le contrôle du pH et le mode de culture. Cependant à partir de ces seules informations il est difficile de conclure sur l'effet du CO<sub>2</sub> dans ces études sur *Chlorella vulgaris*.

De par la complexité des relations entre CO<sub>2</sub>, l'environnement et la cellule il est essentiel de prendre en compte l'ensemble des paramètres environnementaux dans l'étude de l'effet de CO<sub>2</sub> sur les cultures de microalgues en photobioréacteur.

**Tableau I.4** Impact du pourcentage de CO<sub>2</sub> (v/v) sur différentes espèces de Chlorophytes, pour différentes conditions de culture. I = intensité lumineuse appliquée, X0 = concentration en cellule au début de l'expérimentation,  $\mu$  = vitesse spécifique de croissance, X = biomasse produite, P = productivité, Fixation CI = fixation en carbone inorganique

| Espèces                       | Gamme CO <sub>2</sub> (%) | % CO <sub>2</sub> optimal | Débit gazeux (mL.min <sup>-1</sup> ) | I ( $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Type d'éclairage | Mode de culture | T (°C) | Contrôle pH | X0 (g/L-1)  | $\mu$ (d-1) | X (g/L)   | P (g DW.L-1.d-1) | Fixation CI (g.L-1.d-1) | Références                        |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|------------------|-----------------|--------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| <i>Botryococcus braunii</i>   | 5                         | 5                         | -                                    | 47                                       | pp               | PBR             | -      | oui         | -           | 0,24        | 3,11      | 0,61             | 0,496                   | Sydney et al. (2010)              |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>   | 0,03-50                   | 10                        | 200                                  | 180                                      | lc               | erlenmeyer      | 25     | non         | 0,05        | 0,887±0,012 | 1,84±0,01 | 0,155±0,004      | 0,288±0,004             | Tang et al. (2011)                |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>   | 0,038-18                  | 12                        | 540                                  | 43                                       | pp               | PBR             | 30     | non         | 0,15        | 0,249±0,021 | 1,14±0,01 | 0,076±0,001      | -                       | Greque de Morais et Costa (2007b) |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>   | 5-70                      | 10                        | -                                    | 60                                       | lc               | PBR             | 28     | -           | 0,015-0,018 | 1,19        | 3,51      | 0,292            | 0,5499                  | Ho et al. (2010)                  |
| <i>Chlorella kessleri</i>     | 0,038-18                  | 6                         | 540                                  | 43                                       | pp               | PBR             | 30     | non         | 0,15        | 0,267±0,013 | 0,98±0,01 | 0,087±0,001      | -                       | Greque de Morais et Costa (2007b) |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>  | 0,03-50                   | 10                        | 200                                  | 180                                      | lc               | erlenmeyer      | 25     | non         | 0,05        | 0,993±0,082 | 1,55±0,01 | 0,144±0,011      | 0,260±0,260             | Tang et al. (2011)                |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> | 0,04-12                   | 4                         | -                                    | 350±10                                   | cl               | PBR             | 26±0,5 | -           | -           | -           | 3,60±0,74 | 0,73±0,16        | 0,51±0,11               | Hulatt et al. (2011)              |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> | 5                         | 5                         | -                                    | 47                                       | pp               | PBR             | -      | oui         | -           | 0,21        | 2,15      | 0,42             | 0,272                   | Sydney et al. (2010)              |
| <i>Chlorella vulgaris</i>     | 0,036-20                  | 6                         | -                                    | 47                                       | pp               | erlenmeyer      | -      | -           | -           | 0,22        | 0,201     | -                | 0,038                   | Chinnasamy et al. (2009)          |
| <i>Chlorella vulgaris</i>     | 0,03-15                   | 4                         | -                                    | 80                                       | pp               | erlenmeyer      | 25±1   | non         | -           | -           | 1,22      | -                | 0,14                    | Bhola et al. (2011)               |
| <i>Chlorella vulgaris</i>     | 0,04-12                   | 4                         | -                                    | 350±10                                   | cl               | PBR             | 26±0,5 | -           | -           | -           | 3,79±0,05 | 0,6±0,11         | 0,38±0,05               | Hulatt et al. (2011)              |
| <i>Chlorella vulgaris</i>     | 5                         | 5                         | -                                    | 47                                       | pp               | PBR             | -      | oui         | -           | 0,29        | 1,94      | 0,31             | 0,251                   | Sydney et al. (2010)              |

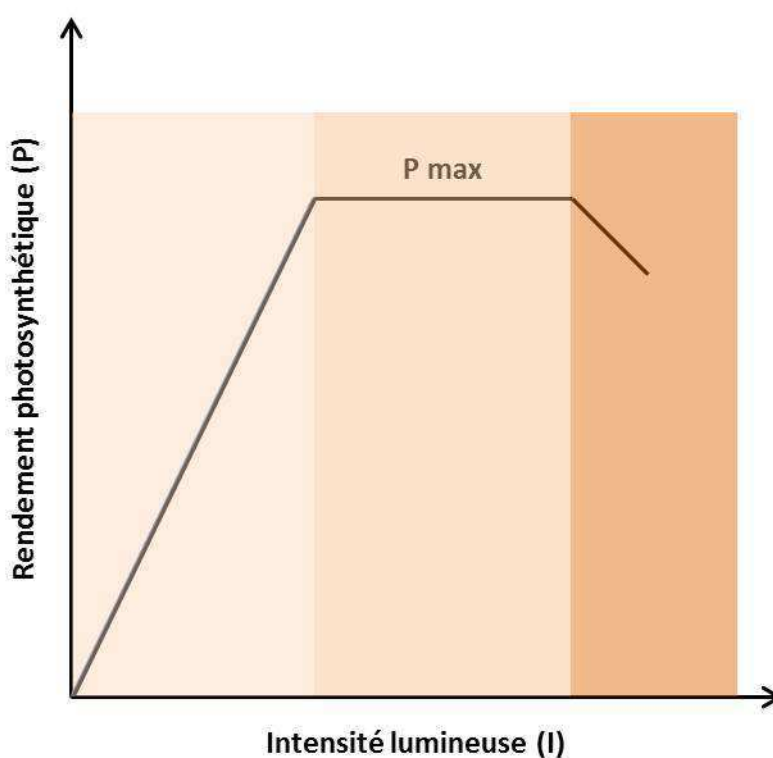
### *b. La lumière*

Dans le monde aquatique, la lumière, via le processus de photosynthèse, contrôle les flux de carbone et la production de molécules énergétiques dans les cellules et détermine donc le rendement de consommation des nutriments chez les photoautotrophes (Dubinsky et Schofield, 2010). C'est pourquoi la lumière est un paramètre clé dans la culture en photobioréacteur (Cornet, 2010 ; Carvalho *et al.*, 2011).

Une limitation ou un excès de lumière vont donc avoir des répercussions sur le métabolisme des cellules et la croissance des populations. Ce phénomène s'appelle la photoinhibition. Lorsque la cellule reçoit plus d'énergie lumineuse qu'elle ne peut en intégrer vers la synthèse d'ATP et l'assimilation du carbone, la photosynthèse est inhibée (Figure I.14) et la croissance cellulaire chute (Subba Rao *et al.*, 2005 ; Yeh *et al.*, 2010). Lors de la photoinhibition, le photosystème II (PSII) trop excité par l'excès de lumière va être inactivé et il se forme alors une accumulation d'électrons entre les deux photosystèmes (PSII et PSI) qui peut conduire à des altérations irréversibles au sein de la cellule (Voronova *et al.*, 2008). Pour contrer ces phénomènes de photoinhibition, la cellule met en place des processus de photoprotection qui vont soulager le PSII et permettre ainsi à l'appareil photosynthétique de retrouver son fonctionnement optimal. Le premier mécanisme de protection est l'élimination de l'énergie en excès sous forme de chaleur en faisant intervenir des pigments particuliers, les caroténoïdes (Choudhury et Behera, 2001 ; Voronova *et al.*, 2008 ; Peers *et al.*, 2009). L'inactivation du PSII peut aussi dans certain cas être un processus de photoprotection. L'un des résultats de la photoprotection sera la photoacclimatation de la cellule. Celle-ci va accroître son activité photosynthétique via l'augmentation de l'activité de la Rubisco et de l'ATPase (Chow, 1994). Ainsi des cellules d'algue transposées d'un environnement faiblement éclairé à un environnement fortement éclairé vont diminuer leur quantité intracellulaire de chlorophylles et augmenter celle de caroténoïdes, modifier la taille du pool de composés transporteurs d'électrons (Henley *et al.*, 1991 ; Falkowsky et Raven, 2007 ; Solovchenko *et al.*, 2010). Dans certain cas il peut y avoir synthèse d'autres composés intracellulaires, comme chez *Haematococcus pluvialis* où un stress lumineux va se traduire par la production d'astaxanthine, un pigment très recherché dans l'industrie alimentaire (Kang *et al.*, 2007). Tous ces réarrangements permettent à la cellule d'augmenter son rendement de photosynthèse

c'est-à-dire sa production d'O<sub>2</sub>, ce qui entraîne la mobilisation de l'énergie en excès captée et donc évite des dégradations cellulaires.

Les autres paramètres environnementaux peuvent aussi influencer sur le phénomène de photoinhibition dans la cellule de microalgue. Lorsque la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* est soumise à une concentration de CO<sub>2</sub> de 0.1% (v/v) sa croissance, sa fixation de carbone inorganique et sa production photosynthétique sont augmentées mais elle est également plus sujette à la photoinhibition, ce qui ne se produit pas lorsqu'elle est cultivée avec 0.038% de CO<sub>2</sub> (Wu *et al.*, 2010).



**Figure I.14.** Evolution du rendement photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse. D'après Carvalho *et al.* (2011)

Cependant une augmentation de l'intensité lumineuse si elle respecte les besoins de l'algue peut stimuler son métabolisme au lieu de le stresser. Ainsi une forte intensité lumineuse va augmenter la biomasse, la consommation de carbone par l'algue et les ratios des éléments intracellulaires C : N, C : P et N : P (Subba Rao *et al.*, 2005 ; Hill et Fanta, 2008 ; Soletto *et al.*, 2008 ; Dubinsky et Schofield, 2010 ; Westerhoff *et al.*, 2010). Néanmoins la réponse des cellules à une augmentation de l'intensité lumineuse et éventuellement à la photoinhibition va

être fonction de la condition physiologique de la cellule (Voronova *et al.*, 2008). Par exemple, *Prymnesium parvum* ne présente pas d'augmentation de sa vitesse spécifique de croissance lorsque l'intensité lumineuse est augmentée de 122 à 336  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Baker *et al.*, 2007). De même, un autre élément nutritif limitant dans le milieu peut interférer avec l'adaptation de l'algue. Chez l'algue *Ulva rotundata* une limitation en azote dans le milieu va limiter sa photoacclimatation à de fortes intensités lumineuses et entraîner des dommages intracellulaires (Henley *et al.*, 1991). Yun et Park (1997) ont montré que l'accroissement de l'intensité lumineuse permettait l'augmentation de la vitesse spécifique de croissance, de l'activité photosynthétique et de la fixation du carbone, mais la concentration cellulaire n'était pas modifiée et dépendait de la limitation par les nitrates dans le milieu.

De même qu'elle s'adapte à une lumière croissante, la cellule réagit à une limitation en lumière par des modifications métaboliques. Ainsi, un stress lumineux va entraîner une modification de l'appareil photosynthétique afin d'utiliser plus efficacement la lumière faiblement disponible. La cellule va augmenter sa concentration en chlorophylles, son rapport en PSII/PSI, et diminuer son pool de plastoquinone (Li *et al.*, 2004 ; Dickman *et al.*, 2006 ; Voronova *et al.*, 2008 ; Dubinsky et Schofield, 2010). Elle va également augmenter la synthèse des lipides polyinsaturés dans les membranes des thylakoïdes et la concentration en antioxydants intracellulaires et à l'inverse la concentration cellulaire ainsi que la vitesse spécifique de croissance vont diminuer (Li *et al.*, 2004 ; Dubinsky et Schofield, 2010).

Mais l'intensité de la lumière apportée à la culture n'est pas le seul facteur influençant les cellules de microalgues. La durée de l'illumination a un impact sur la production de la biomasse. Les études présentant différents cycles jour : nuit sur des cultures de microalgues ont montré que l'activité photosynthétique et la fixation du  $\text{CO}_2$  étaient d'autant plus importantes que la durée du jour était longue (Ribeiro Zucchi et Necchi Jr, 2001 ; Jacob-Lopes *et al.*, 2008). Il est également possible d'améliorer l'activité photosynthétique en utilisant uniquement une partie des longueurs d'ondes du spectre lumineux. Cependant l'effet sur les cultures est dépendant des espèces de microalgues. Ainsi, lors d'une étude menée par Veski et Jeffrey (1972), l'apport de lumière bleue augmentait la concentration en chlorophylle a de certaines espèces de diatomées mais pas des espèces de dinoflagellés testées. *Skeletonema costatum* ne montre pas non plus de modification de ces paramètres de croissance lorsqu'elle est cultivée en lumière bleue par rapport à une lumière blanche

(Mercado *et al.*, 2004). Alors que Wang *et al.* (2007) ont montré, chez *Spirulina platensis* exposée à de la lumière rouge, que la vitesse spécifique de croissance et la production de biomasse étaient plus importantes.

L'efficacité d'un photobioréacteur à produire de la biomasse algale est donc en partie gouvernée par la quantité de lumière qui pénètre dans la culture (Cornet, 2010). L'une des façons d'améliorer cette pénétration est d'ajuster la concentration cellulaire dans le réacteur. Une trop forte densité de cellule empêche la lumière d'atteindre la totalité des cellules et augmente les phénomènes de photo-ombrage alors qu'une trop faible densité de cellules augmente les risques de photoinhibition (Cornet, 2010). En fait, pour chaque intensité lumineuse, il existe une densité cellulaire optimale (Qiang *et al.*, 1998 ; Zijffers *et al.*, 2010). Une autre façon d'améliorer la pénétration de la lumière dans un réacteur est de diminuer le chemin parcouru par celle-ci et d'augmenter le rapport surface/volume du réacteur (Jacop-Lopes *et al.*, 2009 ; Cornet, 2010 ; Zijffers *et al.*, 2010). Ainsi, Qiang *et al.* (1998) en diminuant le chemin parcouru par la lumière de 200 mm à 7.5 mm ont augmenté de 20% la vitesse de croissance de *Spirulina platensis*.

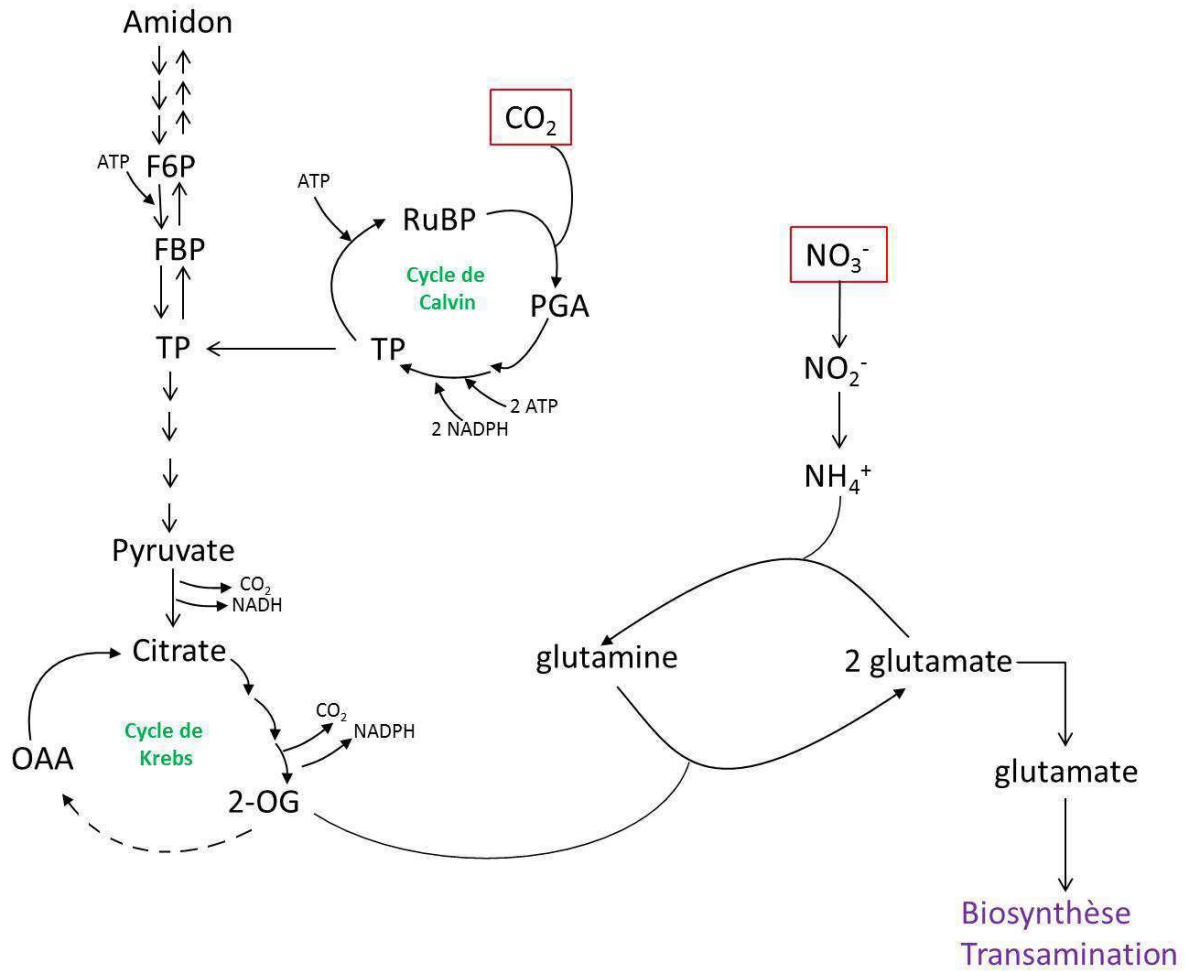
### c. L'azote

L'azote, après le carbone, est l'élément majeur de la constitution cellulaire. Sa quantité varie en fonction des espèces et des conditions du milieu mais elle correspond en moyenne à environ 7% de la matière sèche de la cellule (Mandalam *et al.*, 1998 ; Bhola *et al.*, 2010). Chez *Chlorella minutissima*, Lourenço *et al.* (2004), ont montré que l'azote est principalement utilisé pour la synthèse protéique. Néanmoins, il est également présent sous la forme d'azote inorganique ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), au sein des acides nucléiques (ARN et ADN) et en faible proportion dans la chlorophylle.

De nombreuses études se sont penchées sur l'effet de la concentration de cet élément dans le milieu de culture. Chez *Chlorella vulgaris* (Bhola *et al.*, 2010 ; Tam *et al.*, 1996 ; Dragone, 2011 ; Lv *et al.*, 2010) et *C. ellipsoidea* (Yang *et al.*, 2011) une l'augmentation de la concentration d'azote dans le milieu entraîne une augmentation de la biomasse, de la quantité de protéines et de chlorophylles par cellule. Mais ceci jusqu'à une certaine concentration d'azote au-dessus de laquelle l'effet s'inverse (Bhola *et al.*, 2010 ; Tam *et al.*, 1996 ; Dragone *et al.*, 2011). De plus, il a été montré chez *C. sorokiniana*, *Oocystis polymorpha* et *C.*

*ellipsoidea*, qu'une limitation en azote va stimuler la production des lipides par la cellule (Richardson, 1969 ; Chen *et al.*, 2011). En revanche, la diminution de l'azote dans le milieu entraîne une baisse de la capacité photosynthétique de la cellule (Yuong et Beardall, 2004 ; Richardson, 1969, Osborne et Geider, 1986). Le déclin de cette activité s'explique d'une part par la baisse de la concentration en protéines Rubisco (Küppers et Weidner, 1980 ; Falkowsky *et al.*, 1989) et d'autre part par la diminution de la quantité de chlorophylle dans la cellule (Richardson, 1969). Cette baisse d'activité photosynthétique diminue la capacité de la cellule à utiliser l'énergie lumineuse captée pour la transformer en produits carbonés et rend alors les algues plus susceptibles de subir le phénomène de photoinhibition (Prézelin *et al.*, 1986 ; Kolber *et al.*, 1988).

Vanlerberghe *et al.*, 1990) rapportent que 50% du carbone intracellulaire est couplé au métabolisme de l'azote, ce qui met en lumière les liens étroits entre ces deux mécanismes (Figure 15). Pour la production de protéines, l'assimilation de l'azote s'accompagne de la synthèse de glutamate. A l'aide de traceur radioactif ( $^{14}\text{C}$ ), il a été démontré que cette réaction mobilise des intermédiaires du cycle de Krebs. La cellule a donc besoin de pyruvate pour faire fonctionner le cycle de Krebs, celui-ci étant synthétisé à partir du glucose, produit de l'activité photosynthétique (Turpin, 1991 ; Syrett, 1981). Si les cellules sont limitées en azote, elles accumulent plus de réserves glucidiques car le glucose est dirigé préférentiellement vers la formation d'amidon, au lieu de fournir les précurseurs carbonés nécessaires à la synthèse des acides aminés, éléments de base des protéines. Ces réserves glucidiques pourront lors être utilisées par la cellule pour synthétiser les acides aminés (Turpin, 1991).



**Figure I.15.** Chemins métaboliques menant à la synthèse des protéines : mise en lumière des liaisons étroites existantes entre le métabolisme du carbone et celui de l'azote. Ce schéma général ne prend pas en compte la répartition des différentes réactions dans les compartiments intracellulaires, ni les particularités dus aux différences taxonomiques. RuBP : Ribulose-1.5-biphosphate, PGA : 3-phosphoglycérate, TP : triose-phosphate, FBP : fructose-biphosphate, F6P : fructose-6-phosphate, 2-OG : 2-oxoglutarate, OAA : acide oxaloacétique. D'après Turpin (1991).

#### d. Le phosphore

Le phosphore entre dans la synthèse des acides nucléiques et des phospholipides (constituants des membranes cellulaires) et dans la constitution des molécules du métabolisme énergétique, l'ATP et le NADPH (Moseley *et al.*, 2006 ; Davey *et al.*, 2008 ; Bougaran *et al.*, 2010). Il va donc intervenir au cours de nombreux processus métaboliques dans la cellule (Chen *et al.*, 2011). Il entre en jeu dans les chemins métaboliques régulant la division cellulaire, sa concentration cellulaire va donc avoir un impact direct sur la production de biomasse. Il est aussi nécessaire dans la cellule pour satisfaire les besoins énergétiques et de biosynthèse des organites (Moseley *et al.*, 2006).

Une limitation en phosphore va entraîner une baisse de la biomasse, de la quantité de chlorophylle, de polysaccharides et de protéines dans la cellule (Wykoff *et al.*, 1998 ; Persic *et al.*, 2009 ; Sun and Wang, 2009). Elle va également réduire la fixation du carbone (Kozłowska *et al.*, 2004), par exemple, en diminuant la synthèse de la Rubisco (Jacob et Lawlor, 1993) ou bien en ayant une répercussion sur les intermédiaires de la voie des pentoses phosphate (Moseley *et al.*, 2006).

Une limitation en phosphore va également grandement dénaturer l'appareil photosynthétique en diminuant le transport des électrons au niveau du PSII (Wykoff *et al.*, 1998 ; Zer et Ohad, 2003) et en dénaturant les polypeptides de l'appareil photosynthétique, qui gèrent l'absorption de la lumière (Moseley *et al.*, 2006).

Il a été démontré chez certaines algues, qu'une limitation en phosphore dans le milieu induisait la synthèse d'une enzyme extracellulaire, une phosphatase, capable de cliver des molécule phosphorylées sur des composés organiques présents dans le milieu, permettant ainsi à la cellule de pallier ce manque (Quisel *et al.*, 1996 ; Moseley *et al.*, 2006 ; Spijkerman, 2007). Chez *Chlorella vulgaris* (Kozłowska *et al.*, 2004), il a été montré que les cellules déficientes en phosphore, augmentaient la production de glycolate via le mécanisme de photorespiration permettant ainsi la dissipation de l'énergie absorbée en excès par le photosystème, évitant ainsi d'endommager la cellule. Cependant, les mécanismes de régulation du manque de phosphore par la cellule restent peu connus (Moseley *et al.*, 2006).

De nombreuses études menées in situ, au sein de communautés phytoplanctoniques, ont démontré l'existence d'une co-limitation par le phosphore et l'azote sur la croissance de ces organismes. Davey *et al.* (2008) ont montré que dans les eaux tropicales et subtropicales du nord de l'Atlantique, une augmentation de la chlorophylle intervenait après ajout de

phosphore couplé à un ajout d'azote. De même que chez *Skeletonema costatum* (Davies et Sleep, 1989) la fixation du carbone n'augmentait pas après un apport d'azote, mais augmentait après ajout concomitant d'azote et de phosphore. Néanmoins les mécanismes liant l'azote au phosphore restent encore mal connus (Bougaran, 2010).

*e. Les microéléments*

Les microéléments sont des éléments présents dans le milieu en très faible quantité. Dans le milieu naturel leur concentration va varier en fonction des époques de l'année, des conditions environnementales ou bien des pollutions anthropogéniques. En laboratoire, leurs limitations sont rarement rencontrées car les milieux de culture sont adaptés pour éviter tout manque de ces éléments. Les changements de concentration vont avoir des répercussions sur la cellule de microalgue.

Chez *Isochrysis galbana* une carence en fer va se traduire par une baisse de la densité cellulaire, de la taille des cellules, de la quantité de chlorophylle, de protéines et de polysaccharides intracellulaires, une baisse de l'activité de l'anhydrase carbonique et une diminution de l'incorporation des autres nutriments (azote, phosphore, carbone) (Valera *et al.*, 2011). L'anhydrase carbonique étant une métalloenzyme contenant du zinc, une baisse de son activité en réponse à une carence en zinc peut se répercuter sur tout le métabolisme du carbone de la cellule et donc sur la production des métabolites intracellulaires. Les limitations en microéléments visent souvent le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Par exemple une trop faible concentration en sulfure va diminuer le flux d'électrons au niveau de l'appareil photosynthétique (Rochaix, 2001) et une baisse de la concentration de fer va induire une baisse des constituants de l'appareil photosynthétique (PSI, PSII, cytochromes) car ceux-ci possèdent de nombreux co-facteurs contenant du fer (Terauchi *et al.*, 2010). De même, le cuivre étant présent dans de nombreuses enzymes de l'appareil photosynthétique, sa limitation impacte le métabolisme de photosynthèse (Hill *et al.*, 1996 ; Rochaix, 2001). Mais d'autres processus intracellulaires peuvent être concernés ; c'est le cas du métabolisme de l'azote dont l'assimilation dans la cellule est diminuée lors d'une carence en molybdène dans le milieu (Glass *et al.*, 2009).

Une augmentation de ces éléments dans le milieu va à l'inverse avoir un impact positif sur les cellules. C'est le cas du magnésium ou du fer qui permettent l'augmentation de la concentration cellulaire lorsqu'ils sont en plus forte concentration dans le milieu (Mandalam

*et al.*, 1998 ; Terauchi *et al.*, 2010 ; Dragore, 2011). Seulement cet effet positif a lieu jusqu'à une certaine concentration, à partir de laquelle ces composés deviennent toxiques pour la cellule. Ainsi le fer en trop forte quantité dans la cellule, va endommager les membranes biologiques, les protéines ou bien encore l'ADN (Estevez, 2001). De même le zinc à des concentrations trop importantes bloque la croissance des algues (Sun et Wang, 2009 ; Varela *et al.*, 2011).

Face à ces variations de concentration dans le milieu, les algues offrent un large panel d'adaptations physiologiques qui leur permettent de survivre. Chez *Chlorella vulgaris* par exemple, il existe une hormone, la brassinolide, qui aide la cellule à contrer les effets cytotoxiques de fortes concentrations de métaux lourds (cuivre, plomb, cadmium) (Bajguz, 2010). Pour le cuivre, il existe des mécanismes qui permettent de réguler son assimilation lorsque sa concentration dans le milieu est trop faible pour l'algue. Ces mécanismes se traduisent, entre autre, par l'expression spécifique de certains gènes (Hill *et al.*, 1996 ; La Fontaine *et al.*, 2002 ; Moseley *et al.*, 2000). De même, l'appareil photosynthétique de la cellule peut lui aussi présenter des modifications afin de s'adapter à une carence du milieu. C'est le cas pour des limitations en fer, où par exemple, les antennes collectrices de photons vont être réorganisées de façon à s'adapter aux modifications physiologiques de la cellule carencée et de limiter les phénomènes de dommage cellulaire liés à la lumière, tout en optimisant l'activité photosynthétique (Moseley *et al.*, 2002 ; Michel et Pistorius, 2004).

#### *f. La température*

La réponse des cellules à différentes températures est variable selon les espèces de microalgues (Ribeiro Zucchi et Necchi Jr, 2001). Ainsi, la vitesse spécifique de croissance de *Nannochloropsis oculata* augmente jusqu'à 20°C puis diminue pour des températures supérieures (Converti *et al.*, 2009). De même, *Scenedesmus almeriensis* présente une vitesse de croissance maximale à 35°C, au-dessus de laquelle sa croissance chute (Sanchez *et al.*, 2008). Le contenu cellulaire va lui aussi varier avec la température. Par exemple, la quantité d'acides gras insaturés augmente avec une diminution de la température chez *S. platensis*, *C. vulgaris*, *B. Braunii* et *P. tricornutum* (Sushchik *et al.*, 2003 ; Jiang et Gao, 2004). Chez *Scenedesmus almeriensis* la quantité de lutéine augmente en même temps que la température (Sanchez *et al.*, 2008). *Chlorella vulgaris* et *Dunaliella salina*, à basse température, présentent

une baisse de l'assimilation du CO<sub>2</sub>, de la capacité photosynthétique, de la synthèse de chlorophylle et une augmentation des xanthophylles (Huner *et al.*, 1998).

Chez *Spirulina platensis* la température affecte l'ultrastructure, la morphologie et l'activité photosynthétique de la cellule (Gao *et al.*, 2008). De plus, Gao *et al.* (2008) ont montré chez cette espèce une corrélation entre les radiations lumineuses et la température. Il est connu que les UV-R endommagent la double hélice d'ADN chez les organismes végétaux. Chez *S. platensis* ces lésions étaient moins importantes à forte température qu'à faible température. Les auteurs ont montré que les dommages photochimiques n'étaient pas liés aux variations de température. En revanche les mécanismes de réparation de l'ADN semblent plus efficaces à température élevée. Ces modifications du métabolisme sont semblables à celles mises en place pour lutter contre la photoinhibition. En effet, il a été démontré que *Chlorella* exposée à des intensités lumineuses moyennes répondait à de faibles températures en adoptant les mêmes modifications physiologiques que lorsqu'elle subit de très fortes intensités lumineuses. Lorsque la cellule subit des températures basses, son métabolisme est ralenti, mais la quantité d'énergie absorbée par la photosynthèse reste identique, elle absorbe donc trop d'énergie par rapport à sa capacité à l'utiliser et souffre de photoinhibition (Huner *et al.*, 1998).

De plus, les variations de température vont avoir un impact sur l'assimilation du carbone inorganique. Tout d'abord de façon indirecte car plus la température est élevée et moins CO<sub>2</sub> va se dissoudre dans l'eau (Tableau I.1). De plus, l'équilibre entre les différentes espèces va être modifié et donc leur concentration dans le milieu (Tableau I.3). Enfin, l'impact de la température peut être direct car une hausse de celle-ci va diminuer l'affinité de la Rubisco pour CO<sub>2</sub> en élevant son seuil de saturation pour celui-ci (Beardall *et al.*, 2004).

#### *g. Le pH*

Comme pour la température, chaque espèce possède un pH optimal pour sa croissance et répondra différemment aux variations de pH en fonction de cette valeur et de sa physiologie (Necchi Jr et Ribeiro Zucchi, 2001 ; Olaizola, 2003 ; Gertoff-Elias *et al.*, 2005).

Entre le pH intracellulaire de la cellule et le pH extracellulaire, il existe un équilibre pour des conditions environnementales stables. Cet équilibre ainsi que le pH intracellulaire fixe de la cellule lui permettent de fonctionner correctement. De nombreux processus métaboliques sont dépendants du pH tel que l'activité des enzymes (Bartual et Galvez, 2002). En effet, ce sont

des mécanismes de protonation et déprotonation qui rendent actifs les sites fixateurs pour leur substrat. La modification du pH interne va donc entraîner la modification des activités enzymatiques.

Lorsque le pH extérieur est modifié, le gradient de pH entre la cellule et le milieu environnant va changer et un nouvel équilibre va tenter de se former entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ce qui va tendre vers la modification du pH intracellulaire. La capacité de la cellule à survivre à des variations de pH va être dépendante de ses facultés à modifier sa physiologie pour contrer le gradient de pH. Par exemple, lorsque le pH externe diminue, la quantité de  $H^+$  extracellulaire augmente. Les cellules qui vont résister à cette entrée de  $H^+$  sont celles capables d'adapter leur production de molécules d'ATP, car le transport des  $H^+$  en excès vers l'extérieur de la cellule est un processus coûteux en énergie (Gertoff-Elias *et al.*, 2005).

Enfin, il existe aussi un effet indirect des variations de pH sur la cellule de microalgue via l'impact sur l'assimilation du carbone inorganique (Beardall et Stojkovic, 2004). Comme vu précédemment une variation du pH provoque une modification des équilibres au sein du système carboné (Figure I.1) et donc modifie la disponibilité en carbone inorganique pour la cellule. Bartual et Galvez (2002) ont montré que l'association d'un pH basique et d'une limitation en lumière entraînait un stress chez *Phaeodactylum tricornutum*. Les cellules ont été soumises à différents pH allant de 7.9 à 9.5 pour des conditions de lumière saturante ( $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et limitante ( $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Pour des conditions de lumière saturante et pour un pH très basique, la vitesse spécifique de croissance des algues n'était pas modifiée par rapport au contrôle. Cependant lorsqu'un pH basique (supérieur à 8.5) était associé à une limitation en lumière, la vitesse spécifique de croissance diminuait fortement. Cette modification de la croissance des algues était associée à une augmentation du rapport intracellulaire C : N et une diminution de l'azote intracellulaire. Les auteurs ont supposés que ces résultats étaient le reflet d'une compétition énergétique entre les métabolismes du carbone et de l'azote. En effet chez *P. tricornutum* le transport de  $\text{HCO}_3^-$  et des nitrates est actif et lorsque la cellule est soumise à de faible lumière la quantité d'ATP et NADPH disponible pour ces deux mécanismes diminue fortement. Dans le cas d'un pH élevé et d'une limitation en lumière, l'assimilation du carbone inorganique était maintenu au dépend du transport des nitrates.



# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

## **II.A. Culture de *Chlorella vulgaris***

### *II.A.1 Le photobioréacteur*

Le photobioréacteur utilisé dans ce travail de thèse est de type colonne à bulle. Ses dimensions sont : 13 cm de diamètre extérieur et 41.5 cm de hauteur pour sa partie centrale. Il possède un volume utile de 2.4 L et sa surface éclairée est de 0.1096 m<sup>2</sup>.

Il est équipé d'une double enveloppe au sein de laquelle circule de l'eau distillée dont la température est contrôlée par un cryostat. Lors des cultures de *Chlorella vulgaris* la température de la double enveloppe est contrôlée à 25°C.

Le gaz est injecté par le bas du réacteur. Le débit utilisé lors des expérimentations est de 50 mL.min<sup>-1</sup> à 1 atm et 25°C. Le gaz passe par un filtre stérile (Millipore, 0.2 µm), puis entre dans le réacteur au travers d'une pastille de verre fritté. Son débit et sa composition sont contrôlés par deux débitmètres massiques : un débitmètre contrôlant l'arrivée d'air et un autre l'arrivée de CO<sub>2</sub>. Le mélange et l'approvisionnement en CO<sub>2</sub> de la culture se fait à l'aide de cette arrivée gazeuse. Le gaz ressort par le haut du réacteur en passant à nouveau par un filtre stérile (Millipore, 0.2 µm). Des mesures du débit gazeux sont effectuées en entrée et sortie de réacteur afin de s'assurer que celui-ci ne change pas au cours de la culture.

Le photobioréacteur est éclairé sur deux côtés, à l'aide de lampes fluorescentes : quatre lampes fluorescentes de couleur blanche (Biolum L36W/965) et quatre autres de couleur rose (Fluora L36W/77). Les lampes de type Biolum émettent dans les longueurs d'ondes similaires à la lumière naturelle. Les lampes de type Fluora émettent plus particulièrement dans les longueurs d'onde du rouge et du bleu qui sont les longueurs d'ondes qui excitent préférentiellement les pigments photosynthétiques. L'association des deux types de lampes permet donc d'optimiser la réaction de photosynthèse lorsque les cellules sont cultivées dans le photobioréacteur.

Les intensités lumineuses incidentes et sortantes du réacteur sont mesurées à l'aide d'un photomètre (LI 250A, LI-COR, USA). Pour mesurer l'intensité lumineuse incidente la cellule du photomètre est tournée vers les lampes fluorescentes. Pour mesurer l'intensité de la lumière sortante, la cellule du photomètre est tournée vers le réacteur.

Trois sorties se situent dans le haut du réacteur. Elles permettent de faire les prélèvements lors des cultures et de mesurer le pH lorsque celui-ci est suivi en continu (II.A.2).

Le réacteur ainsi que le milieu de culture sont stérilisés par un traitement à l'autoclave (121°C, 20 min) avant toute utilisation. Les prélèvements et l'inoculation du réacteur se font sous contrôle de la flamme afin de préserver la stérilité du montage et de la culture.

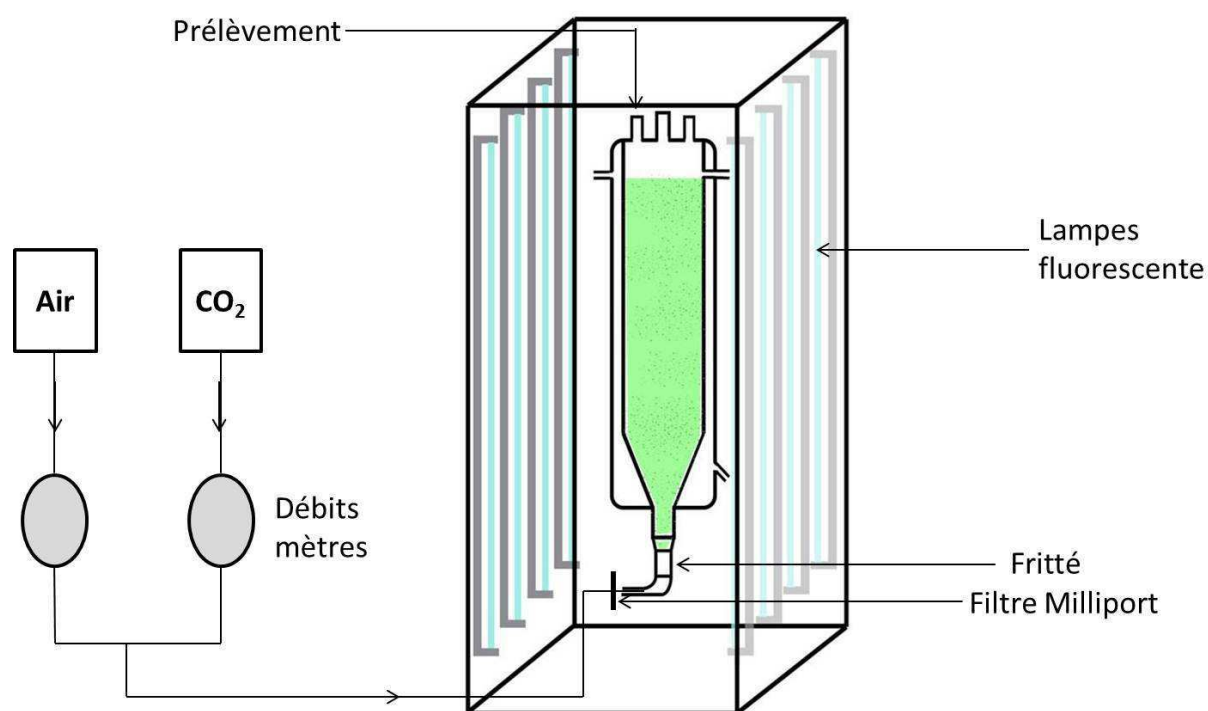
### *II.A.2 Cultures batch*

Lors de la culture en batch la phase liquide est introduite en début d'expérimentation (mode discontinu) alors que la phase gazeuse est introduite en mode continu tout le long de l'expérience. La figure II.1. présente le montage du photobioréacteur lors d'une culture de *C. vulgaris* en mode batch.

Le débit de gaz et sa composition sont contrôlés par deux débitmètres de modèle VSO® de la marque Pneutronics (Parker, USA). Lors de cette culture la concentration de CO<sub>2</sub> est progressivement augmentée jusqu'à la valeur choisie, ceci afin d'éviter tout phénomène d'inhibition de la croissance cellulaire par une trop forte concentration de CO<sub>2</sub> lorsque la concentration cellulaire est faible. La lumière est également augmentée progressivement pour éviter tout phénomène d'inhibition de la croissance cellulaire par une trop forte intensité lumineuse lorsque la concentration cellulaire est trop faible (Chisti, 2007).

Lors de la culture de *C. vulgaris* avec une intensité lumineuse de 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (III.C) le réacteur était éclairé sur trois côtés. Cette disposition était imposée par le montage des lampes fluorescentes afin d'ajuster l'intensité lumineuse voulue.

La mesure du pH se fait grâce à une sonde pH Consort C864 (Biopoint, England) après prélèvement d'un échantillon de culture dans le réacteur.



**Figure II.1.** Montage du photobioréacteur pour la culture de *Chlorella vulgaris* en mode batch.

### II.A.3 Cultures continue

Lors d'une culture en continu, la phase liquide tout comme la phase gazeuse sont introduites en continu dans le réacteur.

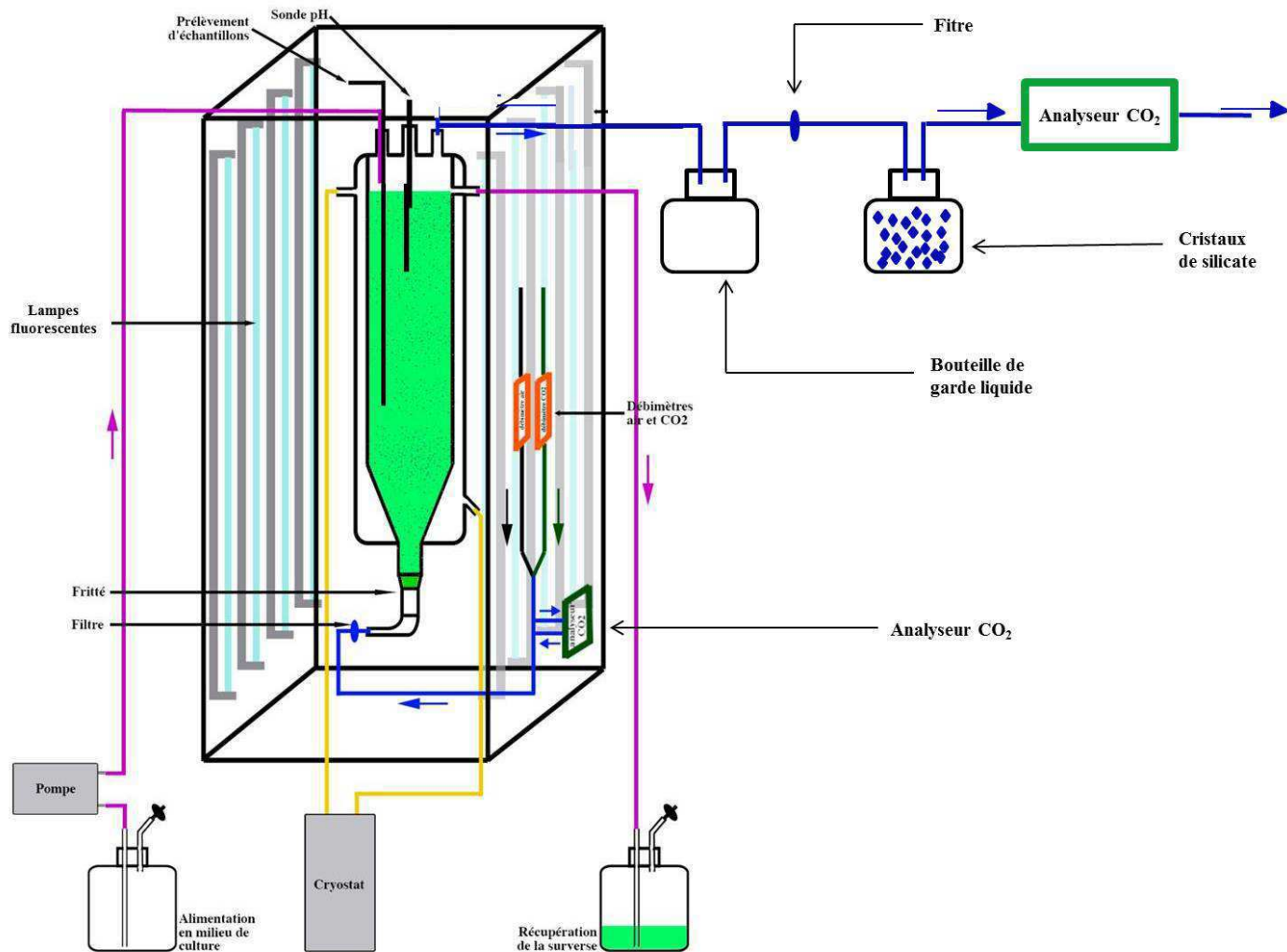
Le débit et la composition du gaz d'entrée sont contrôlés par deux débits-mètres massiques différents de ceux présentés lors de l'étude en batch. C'est débits-mètres sont des modèles Red-Y Smart Series de la marque Vögtlin Instruments. De plus deux analyseurs à CO<sub>2</sub> à détecteur à infrarouges (smartMODUL, smartGAS, Mikrosensorik GmbH) sont branchés en entrée et en sortie du réacteur. Le premier est branché après le mélange de l'air et du CO<sub>2</sub>. Le second analyseur est branché à la sortie du réacteur après le filtre stérile. Afin que le gaz qui arrive au niveau de cet analyseur ne contienne pas de microorganismes ou de liquide, ce qui

pourrait endommager son fonctionnement, un dispositif de garde a été mis en place. Tout d'abord à la sortie supérieure du réacteur est placée une bouteille de garde (2L) pour éviter toute remontée de liquide puis un filtre stérile de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore) et ensuite une bouteille contenant des grains de silicate afin d'enlever toute trace d'humidité avant l'entrée du gaz dans l'analyseur ce qui pourrait perturber le détecteur infrarouge. Les analyseurs sont étalonnés (Annexe II) avant que la culture de *C. vulgaris* ne soit initiée. Une fois l'étude terminée des mesures sur les analyseurs montés en série sont à nouveau effectuées pour vérifier l'état de la calibration.

Le milieu de culture se trouvant dans une bouteille stérile est amené jusqu'au cœur du réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 500S). L'excédent de culture est récolté dans une bouteille placée à la sortie de la surverse. Le débit de liquide est mesuré par pesée de la bouteille de milieu de culture plusieurs fois dans la journée. Les prélèvements se font dans le réacteur à l'aide d'une pipette stérile.

Le pH est contrôlé pour rester à une valeur fixe de 6,5. Il est mesuré de façon continue, à l'aide d'une sonde (W83906, Bioblock Scientific) plongée dans le haut du réacteur. Le contrôle du pH se fait par une console (Biostat B, B Braun) reliée à la sonde, qui gouverne l'ajout de NaOH 0,2 mol.L<sup>-1</sup> ou de HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup> lorsque le pH varie par rapport à sa consigne.

Le réacteur, les bouteilles de gardes, la bouteille contenant le milieu de culture et celle de surverse et les tuyaux pour le passage du gaz sont stérilisés à l'autoclave avant toute utilisation (20 minutes à 121°C). La sonde pH est stérilisée par un traitement aux UV (deux fois 20 minutes). Les tuyaux amenant le milieu de culture au sein du réacteur sont stérilisés en faisant passer plusieurs fois de l'eau de javel fortement concentrée à l'intérieur. En effet, leur composition ne permet pas la stérilisation par l'autoclave.



**Figure II.2.** Montage du photobioréacteur pour la culture de *C. vulgaris* en mode continu.

#### II.A.4 Milieu de culture

La culture de *C. vulgaris* se fait dans du milieu de culture Bristol 3N modifié dont la composition est détaillée dans l'Annexe I. Ce milieu se compose d'un mélange de trois solutions. Les solutions sont préparées à l'avance et conservées à 4°C. Elles sont renouvelées tous les deux mois.

Une fois la solution de milieu Bristol préparée, elle est autoclavée 20 minutes à 120°C puis conservée à 4°C. La solution de milieu Bristol est préparée juste avant une culture de façon à éviter toute contamination par des bactéries lors du stockage.

### II.A.5 Inoculum

L'inoculum de *C. vulgaris* CCAP 211/11B pour les cultures en photobioréacteurs est conservé dans une enceinte fermée, à 25°C dans laquelle un gaz contenant un mélange air et CO<sub>2</sub> est introduit avec une concentration en CO<sub>2</sub> de 1,4% (v/v). La culture est éclairée en continu avec une intensité lumineuse de 24  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . L'inoculum est continuellement agité.

Régulièrement, une partie de la culture est diluée avec du milieu Bristol modifié 3N neuf, afin de renouveler le milieu de culture en nutriments.

### II.B. Analyses

Les prélèvements se font à l'aide de pipettes stériles (10 mL) plongées depuis le haut jusqu'au cœur du réacteur et sous contrôle d'une flamme pour éviter toute contamination bactérienne.

Le tableau II.1 présente les différents prélèvements réalisés en fonction du type de cultures menées pour *Chlorella vulgaris* lors des différentes études menées.

**Tableau II.1.** Fréquence des prélèvements pour chaque analyses en fonction de la culture en batch et en continu de *Chlorella vulgaris*

|                                | Culture batch                                                                                                                                       | Culture continu                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Prélèvements quotidiens</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ concentration cellulaire</li> <li>○ pH</li> <li>○ analyse élémentaire</li> </ul>                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ concentration cellulaire</li> <li>○ pH (mesure en continu dans le réacteur)</li> </ul>                                                                                       |
| <b>Prélèvements ponctuels</b>  | Fin de culture (jour 9) : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ exopolysaccharides</li> <li>○ chlorophylle a</li> <li>○ matière sèche</li> </ul> | A l'état stationnaire : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ exopolysaccharides</li> <li>○ chlorophylle a</li> <li>○ matière sèche</li> <li>○ carbone organique dissous</li> <li>○ analyse élémentaire</li> </ul> |

### *II.B.1. Comptage cellulaire*

La mesure de la concentration cellulaire se fait à l'aide d'un granulomètre laser de marque QICPIC (SympaTEC). Il permet d'analyser par diffraction laser des particules de taille allant de 0.1  $\mu\text{m}$  à 1750  $\mu\text{m}$ . Il se compose d'un système de dispersion LIXELL au sein duquel transite l'échantillon à analyser. La position de la cuvette est contrôlée par le logiciel WINDOX.

L'échantillon est d'abords passé au bain à ultra-son pendant 10 minutes pour éliminer les agrégats puis il est dilué avec de l'eau distillée avant le comptage au granulomètre.

### *II.B.2. Analyse élémentaire de la composition de Chlorella vulgaris*

Les analyses du carbone organique particulaire (POC) et de l'azote organique particulaire (PON) se font à l'aide d'un analyseur élémentaire FLASH 2000 séries CHNS/O analyser (Thermo Scientific).

Les échantillons sont centrifugés et nettoyés deux fois à l'eau ultrapure. Le surnageant est conservé pour des analyses ultérieures de carbone organique dissous. Le culot contenant les algues est filtré sur des filtres préalablement préparés. Le filtre est ensuite séché dans une étuve, puis des pastilles de 9 mm de diamètres sont découpées sur le filtre et analysées pour déterminer la composition en azote et en carbone organique intracellulaire. Pour chacun des filtres, trois pastilles sont analysées.

Le protocole détaillé et le principe de la mesure sont disponibles dans l'Annexe II.2

### *II.B.3. Carbone organique dissous*

L'analyse du carbone organique dissous se fait à l'aide d'un analyseur TOC-V CSH (Shimadzu, Europa GmbH, Duisburg).

Le surnageant des échantillons à partir desquels la mesure du carbone et de l'azote intracellulaire est faite, est utilisé pour cette mesure. Les échantillons sont dilués avec de l'eau ultrapure de façon à être en accord avec la gamme de concentration de l'appareil.

L'Annexe II.3 détaille le principe et le protocole de cette analyse.

#### *II.B.4. Chlorophylle a*

Lors de ce travail de thèse un protocole d'extraction a été optimisé afin d'être en mesure d'extraire correctement la chlorophylle des cellules de *C. vulgaris*. Une meilleure extraction des pigments a été obtenue en utilisant un mélange de méthanol et de sodium dithionite (Porra, 1990).

Les échantillons ont été centrifugés puis le mélange cité précédemment a été ajouté sur les culots. L'extraction a eu lieu pendant 32 minutes à 40°C. Les échantillons ont été de nouveau centrifugés et la chlorophylle a été mesurée dans le surnageant au spectrophotomètre à 664 nm et 650 nm.

La concentration en chlorophylle a été déterminée avec l'équation suivant (Porra, 1990) :

$$\text{Chl a (mg.L}^{-1}\text{)} = 16.41 A_{664} - 8.09 A_{650} \quad (\text{II.1})$$

Le protocole détaillé de cette méthode se trouve dans l'Annexe II.4.

#### *II.B.5. Exopolysaccharides*

Uniquement les exopolysaccharides solubles sont mesurés dans cette étude.

Les exopolysaccharides sont quantifiés dans le surnageant des échantillons. Le surnageant est récupéré après centrifugation des échantillons. Un dosage colorimétrique de Dubois (1956) est ensuite réalisé pour déterminer la concentration en exopolysaccharides, en utilisant comme référence le glucose.

Le protocole détaillé se trouve dans l'Annexe II.5.

#### *II.B.6. Matière sèche*

Des filtres GF/F sont séchés pendant 2h dans un four à 101°C. Le filtre vierge est pesé avec une balance de précision puis conservé dans un dessiccateur pour éviter qu'il ne s'humidifie. 10 mL de culture est filtré puis le filtre est déposé 2h dans un four à 101°C. Le filtre est ensuite à nouveau pesé sur une balance de précision. La différence entre les deux pesées permet de calculer la matière sèche.



## **Chapitre III**

# **Etude de l'influence de la concentration de CO<sub>2</sub> et de l'intensité lumineuse sur la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch**

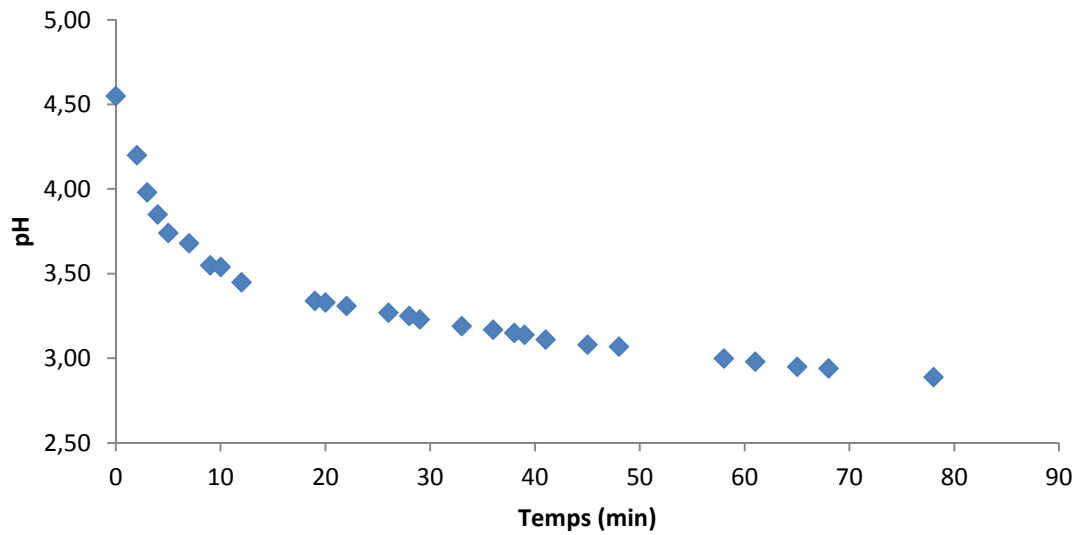
Cette partie s'attache dans un premier temps à décrire les caractéristiques du transfert gaz-liquide au sein du photobioréacteur. Puis elle présentera l'étude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur en mode batch lorsque différentes concentrations de CO<sub>2</sub> et différentes intensités lumineuses sont appliquées. Ces résultats ont permis la détermination d'un modèle mathématique décrivant la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur. La détermination des paramètres du modèle et la validation de ce modèle sont proposées pour clore cette étude.

### **III.A. Etude du transfert gaz-liquide dans le photobioréacteur**

#### *III.A.1 Vérification du modèle parfaitement agité par la méthode des traceurs*

Le bilan de CO<sub>2</sub> dissous sur lequel repose la méthode de mesure de  $k_La$  (III.B.2) est basé sur l'hypothèse que la phase liquide dans le réacteur est parfaitement agitée. Nous allons vérifier expérimentalement cette hypothèse.

La détermination se fait sur le réacteur marchant en continu avec deux débits d'eau entrant et sortant en régime stationnaire, égaux à ceux utilisés lors des cultures en mode continu (chapitre IV). A  $t_0$ , le débit d'eau entrant est remplacé par une solution de HCl 0.1 mol.L<sup>-1</sup> au même débit  $q = 0.53 \text{ mL.min}^{-1}$ , l'évolution du pH en fonction du temps à la sortie du réacteur est suivie à l'aide d'une électrode pH.



**Figure III.1.** Evolution du pH en fonction du temps pour le réacteur alimenté en continu par une solution de HCl 0.1 mol.L<sup>-1</sup>. Débit de liquide,  $q = 0.53 \text{ mL.min}^{-1}$

Si le réacteur est parfaitement agité, le bilan sur la concentration de H<sup>+</sup> est :

$$q \cdot C_0 \cdot dt = q \cdot C \cdot dt + V \cdot dC \quad (\text{III.1})$$

Avec :

$C_0$  : concentration de H<sup>+</sup> à l'entrée du réacteur (mol.L<sup>-1</sup>)

$C$  : concentration à la sortie réacteur (mol.L<sup>-1</sup>)

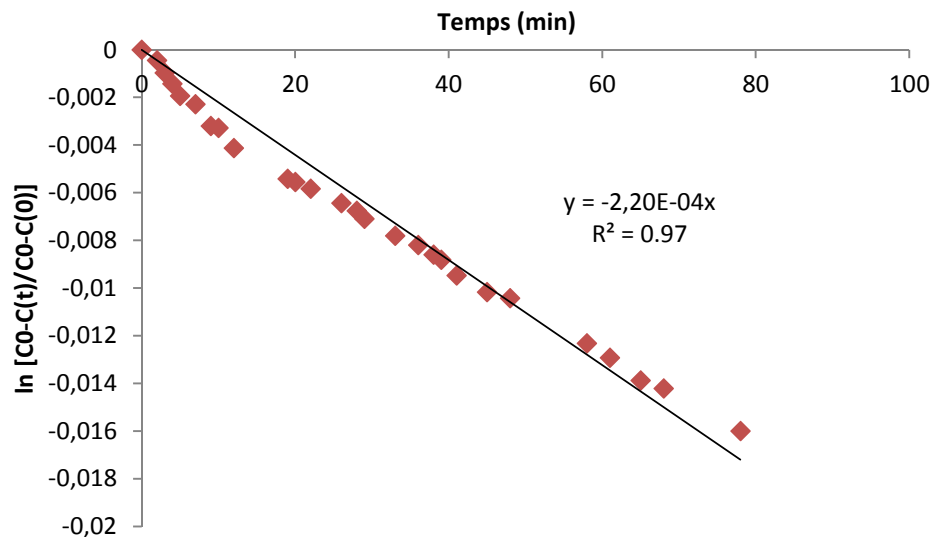
$q$  : débit de liquide (L.min<sup>-1</sup>)

$V$  : volume utile du réacteur (L)

En intégrant l'équation (III.1) on obtient :

$$\ln \left[ \frac{C_0 - C(t)}{C_0 - C(0)} \right] = -\frac{q}{V} t \quad (\text{III.2})$$

En portant  $\ln \left[ \frac{C_0 - C(t)}{C_0 - C(0)} \right]$  en fonction du temps, on doit obtenir une droite dont la pente donne la valeur du temps de séjour.



**Fig.III.2.** Validation du modèle du réacteur parfaitement agité

La valeur du temps de séjour obtenue expérimentalement est donc 1/0,00022, soit 4550 min ou 75,8h. Si on calcule le temps de séjour théorique, on trouve  $V/q = 75,5$  h, ce qui est tout à fait satisfaisant.

On en déduit donc que le réacteur est parfaitement agité et puisque  $k_L a$  est inchangé en présence d'algues (comme on le verra par la suite), on peut également considérer que le milieu est parfaitement agité dans ces conditions.

### III.A.2 Principe de détermination du coefficient volumique de transfert de CO<sub>2</sub> ( $k_L a$ )

$k_L a$  est le paramètre permettant de qualifier le transfert entre le gaz et le liquide. Sa détermination se fait par la mesure de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans le réacteur, contenant du milieu de culture en fonction du temps.

Dans un premier temps, un balayage à l'azote est réalisé afin de désorber tout le CO<sub>2</sub> se trouvant dans le milieu liquide. Après quoi un mélange d'air et de CO<sub>2</sub> est injecté dans le réacteur avec les mêmes concentrations de CO<sub>2</sub> et débit de gaz que lors des expériences de culture. On suit alors l'augmentation de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous jusqu'à saturation du milieu (équilibre avec la phase gazeuse). Cette méthode est dite de type dynamique.

Le bilan de matière en CO<sub>2</sub> traduit une égalité entre les termes d'accumulation et de transfert de matière gaz-liquide pour un réacteur parfaitement agité ; on néglige les autres formes de carbone inorganique dissous (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), car par suite du passage de CO<sub>2</sub>, les ions basiques présents dans le milieu Bristol (principalement phosphate) sont neutralisés rapidement car leur concentration est très faible (de l'ordre de la mmol.L<sup>-1</sup>). Le pH diminue donc, permettant de négliger HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Il vient donc :  $V d[CO_2] = k_L a [[CO_2]^* - [CO_2]] V dt$  ou :

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = k_L a [[CO_2]^* - [CO_2]] \quad (III.3)$$

Avec :

$[CO_2]$  : concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$[CO_2]^*$  : concentration maximale de CO<sub>2</sub> pouvant se dissoudre dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>), correspondant à l'équilibre avec la phase gazeuse

$k_L a$  : coefficient volumique de transfert relatif à la phase liquide (j<sup>-1</sup>), où  $k_L$  est le coefficient de transfert et  $a$  l'aire interfaciale par unité de volume de colonne

$V$  : volume de liquide (L)

En supposant que la teneur du gaz reste constante et égale à sa teneur d'entrée (la quantité dissoute est négligeable),  $[CO_2]^*$  est donc constant et donné par la loi de Henry dans les conditions de l'expérience. Et en intégrant l'équation II.3, on obtient la relation suivante :

$$\ln[[CO_2]^* - [CO_2]] = k_L a (t - t_0) + \ln[[CO_2]^* - [CO_2]_0] \quad (III.4)$$

Avec :

$[CO_2]$  : concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>) au temps  $t$

$[CO_2]_0$  : concentration initiale de CO<sub>2</sub> ( $t = 0$ ) dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$t$  : unité de temps (j)

En exploitant les résultats expérimentaux, si le modèle est correct, on doit obtenir une droite de pente égale à  $k_L a$ , pour la variation de  $\ln[CO_2]^* - [CO_2]$  en fonction du temps (III.2).

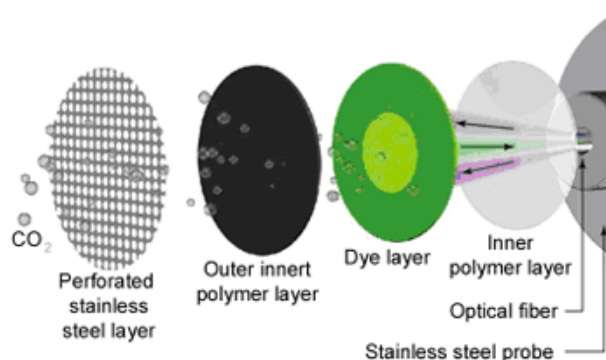
### III.A.3 Détermination expérimentale du coefficient volumique de transfert de CO<sub>2</sub> ( $k_L a$ )

#### a. Principe de la mesure

$k_L a$  est mesuré pour plusieurs concentrations de CO<sub>2</sub> dans le gaz injecté, la phase liquide se compose du milieu Bristol. Théoriquement des concentrations de CO<sub>2</sub> différentes ne devraient pas modifier la valeur de  $k_L a$ . Les valeurs de CO<sub>2</sub> étudiées varient entre 4 et 14% environ, proches des conditions qui seront étudiées dans les cultures de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur.

La mesure de CO<sub>2</sub> dissous se fait à l'aide d'une sonde YSI 8500 (BioVision) reliée à un moniteur CO<sub>2</sub> BioVision de type YSI 8500.

La sonde YSI 8500 se compose d'un réservoir recouvert d'une membrane en silicone, dans lequel se trouve un tampon bicarbonate et un colorant, l'acide trisulfonique hydroxypyrrène (HPTS). La fluorescence du HPTS change en réponse aux variations de pH du milieu. Le CO<sub>2</sub> dissous présent dans le liquide diffuse au travers de la membrane de silicone jusque dans le tampon bicarbonate. L'entrée de CO<sub>2</sub> modifie la valeur du pH ce qui entraîne un changement de fluorescence du HPTS. La sonde YSI 8500 compare la fluorescence du HPTS à deux longueurs d'ondes émises via une fibre optique reliant la sonde au moniteur. L'émission de lumière résultante de cette réaction est conduite jusqu'au moniteur où la réponse est calculée suivant une analyse radiométrique de la fluorescence du HPTS.



**Figure III.3.** Principe de fonctionnement de la sonde YSI 8500 (BioVision)

Avant chaque utilisation, l'état de la membrane se trouvant dans la sonde est vérifié. Puis la sonde est étalonnée à l'aide d'une bouteille de gaz étalon contenant un pourcentage fixe de CO<sub>2</sub> : 3,6 % (v/v). La même procédure que pour la mesure de  $k_{La}$  est appliquée. Tout le CO<sub>2</sub> contenu dans le liquide est désorbé par un balayage à l'azote. Puis un gaz contenant 3,6% de CO<sub>2</sub> est injecté dans le réacteur. La quantité de CO<sub>2</sub> dissous est mesurée à l'aide de la sonde. Lorsque cette quantité n'évolue plus, on indique sur le moniteur CO<sub>2</sub> BioVision YSI8500 le chiffre relatif à la concentration de CO<sub>2</sub> injecté et connue.

### *b. Résultats expérimentaux*

Dans un premier temps la variation de la quantité de CO<sub>2</sub> dissous est mesurée en fonction du temps, jusqu'à saturation du milieu. Elle est exprimée en équivalent pression partielle de CO<sub>2</sub> en équilibre avec cette solution ; la concentration de CO<sub>2</sub> dissous peut être calculée par la loi de Henry, selon

$$[CO_2] = \frac{P_{CO_2}}{H_{CO_2}} \quad (III.5)$$

Avec :

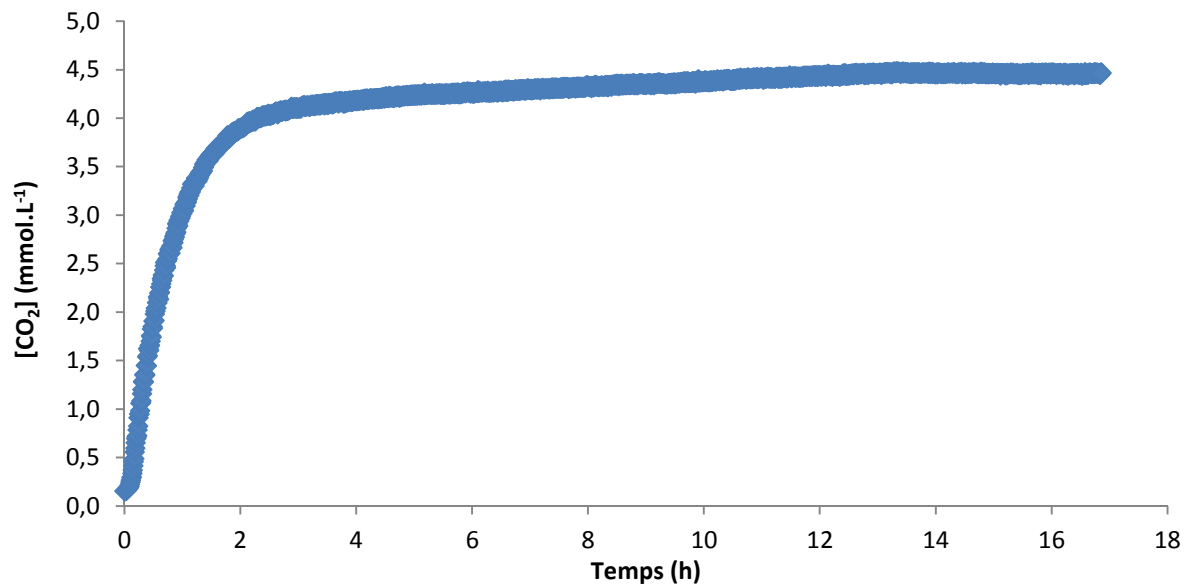
$[CO_2]$  : concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans la phase liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$P_{CO_2}$  : pression partielle de CO<sub>2</sub> dans le gaz (atm)

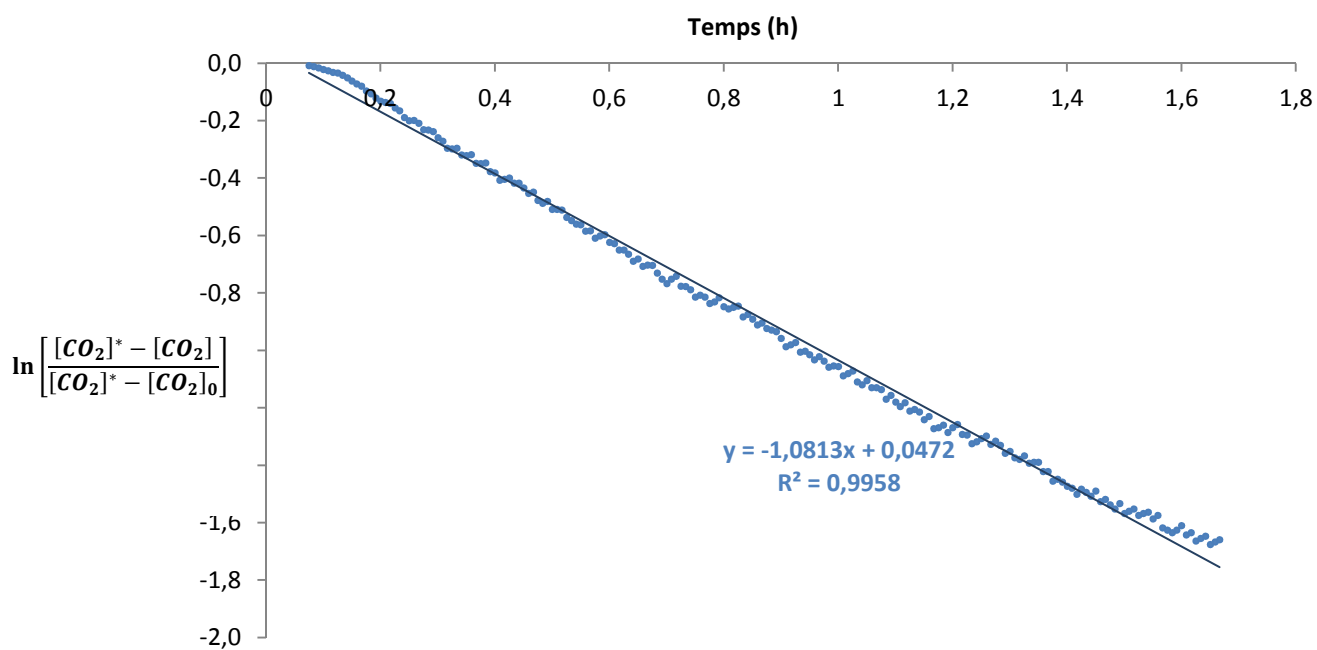
$H_{CO_2}$  : constante de Henry (L.atm.mol<sup>-1</sup>) à la température considérée

On donne sur les figures III.5 et III.6 un exemple de courbe obtenue pour la variation de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous en fonction du temps et un exemple de l'exploitation du modèle.

A noter que le pH mesuré lors de ces expérimentations atteignait une valeur de 3 lorsque l'équilibre était atteint.



**Figure III.4.** Evolution de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous pour un gaz d'alimentation contenant 13,5% de CO<sub>2</sub>



**Figure III.5.** Détermination de  $k_L a$  pour 13,5% de CO<sub>2</sub>

**Tableau III.1.** Valeurs de  $k_La$  pour différentes concentration de CO<sub>2</sub> testées.

| % CO <sub>2</sub> | $k_La$ (h <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> |
|-------------------|---------------------------|----------------|
| 13,5              | 1,1                       | 0.99           |
| 13,8              | 1,0                       | 0.99           |
| 12,8              | 1,1                       | 0.99           |
| 12,0              | 1,3                       | 0.99           |
| 4,2               | 1,0                       | 0.99           |

Le fait d'obtenir des droites permet de vérifier que  $k_La$  est constant, mais aussi que le réacteur se comporte comme un réacteur parfaitement agité.

D'après le Tableau III.1, lorsque la concentration de CO<sub>2</sub> passe de 4,2% à 13,8%,  $k_La$  n'est pas modifié. Nous prendrons donc la valeur moyenne de 1,1 h<sup>-1</sup>.

Toutefois il nous a semblé important de vérifier cette valeur en présence d'algues dans la culture. En effet il est reporté dans la bibliographie que l'augmentation de la part de solide dans une suspension diminue «  $a$  », l'aire interfaciale par unité de volume (Kantarci *et al.*, 2005).

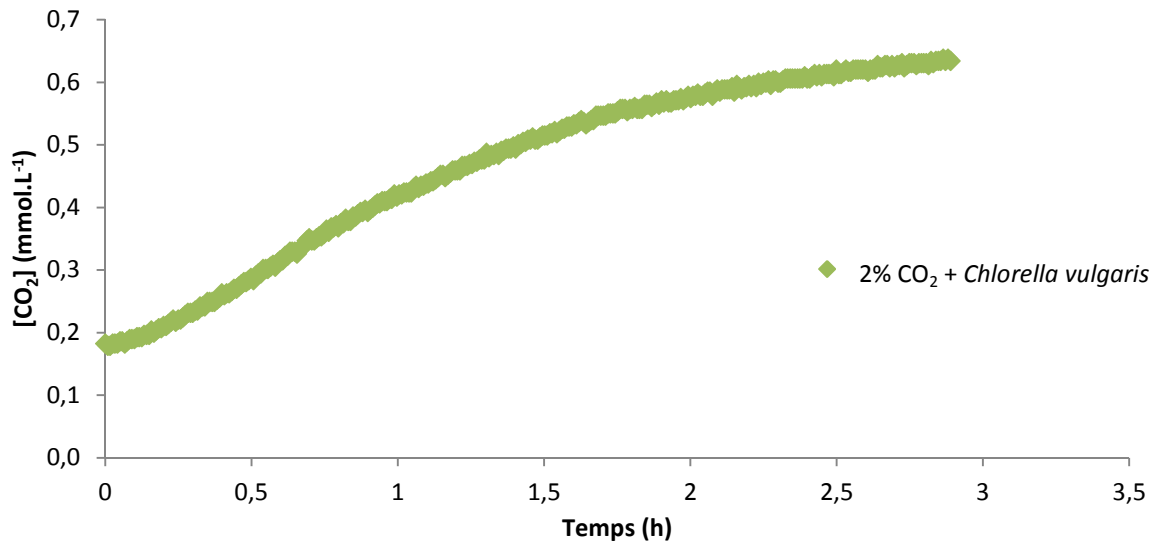
Par ailleurs  $k_L$  dépend de la turbulence du mélange, qui pour une même énergie d'agitation, décroît lorsque la viscosité et la masse volumique du mélange augmentent, ce qui pourrait être le cas en présence d'algues. La dispersion en fines bulles de gaz est aussi moins bonne, entraînant une augmentation de la fraction volumique des bulles de gros diamètre, ce qui conduit à une diminution de la valeur de l'aire interfaciale (Kantarci *et al.*, 2005).

Nous nous sommes placés dans les conditions suivantes : au jour 9 (phase stationnaire de croissance) d'une culture *C. vulgaris* avec 1,8% de CO<sub>2</sub> et une concentration cellulaire de l'ordre de  $6,5 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup>. Le milieu recueilli après 9 jours est donc contacté comme précédemment avec un gaz contenant 1,8% de CO<sub>2</sub>.

Nous suivons la concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans le milieu en fonction du temps. La manipulation a duré seulement 3 h, ce qui permet de négliger une éventuelle consommation de CO<sub>2</sub> par les algues qui, bien que ne croissant plus, pourraient accumuler du carbone intracellulaire, mais le feraient avec une vitesse relativement faible, au mieux comparable avec la vitesse de croissance. On suppose comme précédemment que l'on peut négliger HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> devant CO<sub>2</sub> dissous.

La même équation est donc applicable :

$$\ln[[CO_2]^* - [CO_2]] = k_L a (t - t_0) + \ln[[CO_2]^* - [CO_2]_0] \quad (III.6)$$



**Figure III.6.** Evolution de la concentration de CO<sub>2</sub> dissous pour une culture de *Chlorella vulgaris*, en phase stationnaire de croissance. La concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation est de 1,8% (v/v).

On trouve dans ce cas-là une valeur de  $k_L a$  de  $1,1 \text{ h}^{-1}$ , validant l'hypothèse que la présence des algues ne perturbe pas le transfert de matière gaz-liquide.

### **III.B. CO<sub>2</sub> biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities**

(Partie soumise sous forme d'article scientifique dans le journal Bioresource Technology)

**CO<sub>2</sub> biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities**

Barbara Clément-Larosière<sup>a</sup>, Ana Gonçalves<sup>a</sup>, Filipa Lopes<sup>a</sup>, Behnam Taidi<sup>a</sup>, Marc Benedetti<sup>c</sup>, Michel Minier<sup>b</sup> & Dominique Pareau<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire Génie des Procédés et Matériaux, Ecole Centrale Paris, Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire Charles Friedel, Ecole Chimie Paristech, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>c</sup>Laboratoire de Géochimie des eaux, Institut de Physique du Globe de Paris, 75205 Paris Cedex 13, France

**1. Abstract**

The use of microalgae to convert carbon dioxide into biomass through photobioreactor cultivation might be an interesting solution to fight against CO<sub>2</sub> increase in the atmosphere. In order to develop an effective CO<sub>2</sub> mitigation process we studied the growth of *Chlorella vulgaris* cultivated in a bubble column photobioreactor. *C. vulgaris* was grown at two CO<sub>2</sub> concentration (2% and 13% of CO<sub>2</sub>, v/v) and three light intensities (50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) during 9 days in a batch culture. In all cultures, the algal growth rate was light-limited. Nitrogen starvation seemed also to affect growth. The algae showed different physiological adaptation under the different culture conditions. The increase in light intensity led to an increase in cell concentrations. Cells grown at 13% CO<sub>2</sub> continued to grow even after nitrate starvation had occurred, which was not the case for cells grown at 2% CO<sub>2</sub>. Moreover, the higher CO<sub>2</sub> concentration stimulated the excretion of algal exopolysaccharides. The specific growth ( $1.1\text{ d}^{-1}$ ) rate was similar under all conditions tested. Over all the experiments the maximal biomass concentration and CO<sub>2</sub> biofixation rate were  $2.1\text{ g.L}^{-1}$  and  $1.45\text{ g CO}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  respectively which was when *C. vulgaris* was grown at 13% CO<sub>2</sub> and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light. During this study, *C. vulgaris* showed a very interesting potential for use in a process of CO<sub>2</sub> mitigation.

**2. Introduction**

Anthropogenic greenhouse gases, of which carbon dioxide is a major component, may be responsible for environmental changes (Hofmann *et al.*, 2006). The atmospheric CO<sub>2</sub> concentration has increased dramatically from its pre-industrial level of 280 ppm to 380 ppm

at present day (Hofmann *et al.*, 2008). If current practices continue unchanged, the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration is expected to reach 580 ppm by 2050 (Hofmann *et al.*, 2008). The major part of the CO<sub>2</sub> discharges comes from the industrial sector and contains 10% to 20% (v/v) of CO<sub>2</sub> (IPCC, 2005). To counter this threat, research has been steered towards developing CO<sub>2</sub> capture and sequestration (mitigation) processes. Recently, biological CO<sub>2</sub> mitigation by microalgae has attracted much attention because microalgae use photosynthesis to generate biomass from light and CO<sub>2</sub> with potential for high productivity and fast growth (Wang *et al.*, 2008). Several species, such as *Scenedesmus obliquus* (Ho *et al.*, 2010), *Chlorococcum littorale* (Pesheva *et al.*, 1994), *Synechocystis aquatilis* (Miyachi *et al.*, 2003), *Cyanidium caldarium* and *Galdieria partita* (Kurano and Miyachi, 2004) have already shown their potential to resist concentrations of CO<sub>2</sub> from 40 to 100% (v/v) in the feed gas. The species *Chlorella vulgaris* has shown good growth at CO<sub>2</sub> concentrations between 5 and 18% in the gaseous culture feed (Doucha *et al.*, 2005; Greque de Moraes and Costa, 2007; Hulatt and Thomas, 2011). This organism presents a good candidate for CO<sub>2</sub> mitigation thanks to its resistance to environmental changes and the numerous industrial uses of its products (Keffer and Kleinheinz, 2002; Fan *et al.*, 2008; Hulatt and Thomas, 2011). Indeed *C. vulgaris* contains a high intracellular content of protein (51-58%), carbohydrate (12-17%) and lipid (14-22%) that could be used as human health food and/or animal nutritional supplements (Wolfgang, 1994; Gouveia *et al.*, 2008; Halle *et al.*, 2009). Moreover, *C. vulgaris* provides interesting potential pharmaceutical agents for medical use (Pugh *et al.*, 2001; Justo *et al.*, 2001; Jong-Yuh and Mei-Fen, 2005; Mizoguchi *et al.*, 2008). Currently, *C. vulgaris* is used in bioprocesses such as wastewater treatment (Travieso *et al.*, 2006; Perz-Garcia *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010) and it is studied for its lipid content as a potential source of biofuel (Xiong *et al.*, 2008; Converti *et al.*, 2009; Phuken *et al.*, 2011); moreover the possibility of coupled bioprocesses using a *Chlorella* species and CO<sub>2</sub> capture has been proposed in several studies (Powell *et al.*, 2008; Fulke *et al.*, 2010).

In microalgal growth, the biomass composition and carbon fixation rate are largely dependent on light and nitrogen supply. Both factors have to be considered as potential sources for controlling growth rate and extent. The light as the key component of photosynthesis controls the carbon flux into the cell, the synthesis of energetic molecules and the rate of nutrient consumption (Badger and Andrews, 1982; Kaplan *et al.*, 1987; Dubinsky and Schofield, 2010). Studies have revealed that nitrogen limitation in microalgae leads to a decrease in photosynthetic activity and microalgae growth (Lourenço *et al.*, 2004; Young and Beardall,

2004). As nitrogen and carbon metabolisms are coupled through the synthesis of proteins, nitrogen limited cells fix 7 to 10 times less carbon than cells not limited in nutrients (Turpin, 1991). On the other hand Young and Beardall (2004) showed that nitrogen limitation increases the affinity of the cell for inorganic carbon in spite of damaging the photosynthetic apparatus.

Photobioreactors are widely used for CO<sub>2</sub> mitigation because of their great efficiency in trapping CO<sub>2</sub> through microalgal biomass production (Ho *et al.*, 2011). In photobioreactors, the culture conditions are well-controlled and the risk of contamination is lower compared to open cultivation techniques (Brennan and Owende, 2010; Mata *et al.*, 2010). An efficient microalgal CO<sub>2</sub>-fixation system must possess good mixing, high gas transfer rates and good light supply as well as its distribution (Ho *et al.*, 2011). Bubble columns are gas-liquid contactors widely used in industrial processes. They have the advantages of relatively high mass transfer rates, widely known flow patterns and short circulation times (Kantarci *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2011). So they are very useful for such applications, as well as having a low operational energy requirement

The purpose of this study was to explore the most critical factors affecting the growth kinetics of *C. vulgaris* cultivated in a bubble column photobioreactor, in order to develop an effective CO<sub>2</sub> mitigation process. The determination of the optimal culture conditions matching maximum CO<sub>2</sub> removal was intended. The effect of several CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities were tested on the growth and biomass yield of *C. vulgaris*.

### 3. Material and methods

#### *Strain and culture medium*

The strain *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B (Trebouxiophyceae) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP (UK). The inoculum was grown on modified 3N-Bristol medium (Bischoff and Bold, 1963) with the following composition (mmol.L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub> (8.8); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.171); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.3048); FeEDTA (0.0575); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.43); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.28); NaCl (0.341); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.0461); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (9.18 x 10<sup>-3</sup>); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (7.65 x 10<sup>-4</sup>); CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2.72 x 10<sup>-4</sup>); MoO<sub>3</sub> 85% (2.5 x 10<sup>-4</sup>); CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (3.20 x 10<sup>-4</sup>). The strain was maintained in liquid culture (500 mL) in a 1L Erlenmeyer's flask, at 25°C, under continuous agitation, illumination and an atmosphere of air fortified to 1.4% CO<sub>2</sub> (v/v). The light intensity was 24 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

#### *Photobioreactor and batch culture conditions*

Batch cultures were performed in a cylindroconical bubble-column photobioreactor (2.4 L working volume; 13 cm outer diameter; 41.5 cm height). The culture medium was the same as that used for the preparation of the inoculum (Bischoff and Bold, 1963). The temperature was controlled at 25°C and the culture was continuously illuminated by four white and four pink OSRAM fluorescent tubes (Biolux L36W/965 and Fluora L36W/77 respectively) which were fixed on the two sides of the reactor (illuminated area of 0.1096 m<sup>2</sup>). Light intensity was gradually increased during the first days of the culture in order to avoid photoinhibition at low cell concentrations (Miron *et al.*, 2002; Chisti, 2007). A gas mixture containing the appropriate concentration of CO<sub>2</sub> (v/v) was used to supply CO<sub>2</sub> and provide mixing. The gas mixture was fed continuously into the reactor (50 mL.min<sup>-1</sup>) through a glass sinter after crossing a Millipore gas filter (0.22 μm). The gas flow rate and composition were regulated by two mass flow meters (VSO®, Pneutronics, Parker, USA), one for air and one for CO<sub>2</sub>. When aiming to supply CO<sub>2</sub> at 13% (v/v), the CO<sub>2</sub> concentration in the feed gas was increased progressively.

Four experiments were conducted where every set of conditions was tested in duplicate. Two concentrations of CO<sub>2</sub> (2% and 13% (v/v)) and three light intensities (50, 120, 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) were tested. All cultures were incubated for 9 days. The medium was inoculated with a concentration of about 10<sup>9</sup> cell.L<sup>-1</sup>. The culture pH was measured daily using a benchtop pH electrode (Consort C864, Biopoint, England) calibrated at 4.0 and 7.0 before every measurement. The light intensity was measured at twelve different points on four sides of the

reactor (one point at each extremity of the height and one point in the center) using a photometer (LI 250A, LI-COR, USA). A correction factor is applied to the measurement of the absorbed light as 30% of the incident light was already absorbed by the reactor and the liquid in the absence of algae. The light absorbed by the reactor full of liquid is then  $I_{in} - I_{out} = 0,7.I_{in}$ .  $I_{in}$  is the light received by the reactor and  $I_{out}$  is the light transmitted by the reactor.

### Analyses

Culture samples were collected daily for cell counts. Cells were counted using a granulometer with an optical path length of 0.2  $\mu\text{m}$  using a HELOS laser diffraction and QUICPIC image analysis (Sympatec Image Analysis Sensor QICPIC, Germany). The culture was sampled daily and the cells were analyzed for measuring their carbon quota (Cv) and nitrogen quota (Nv) using an elemental analyzer (Flash 2000 series CHNS/O analyser, Thermo Scientific) in the following way: glass fiber filters (Whatman® GF/F) were washed with 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10 mL), then with deionized water (10 mL), then heated (1h, 525°C) in order to eliminate all organic compounds on them prior to be weighed. A sample of the culture (10 mL) was removed from the reactor and centrifuged (20 minutes; 4000 rpm) and the pellet was washed with deionized water (10 mL). Then the sample was diluted in deionized water, filtered and dried overnight at 60°C. The filters were then weighed with the algae in order to measure the weight of algal biomass. On each filters, two circles of 9 mm diameter were cut using a die-cutter. The circles were placed in a bell jar with HCl for 24h, in order to eliminate the inorganic carbon of the samples. The circles were then placed on tin nacelles for analysis on the elemental analyzer.

Nitrogen and carbon quotas (gN. or gC.cell<sup>-1</sup>) were calculated from the mass fraction of nitrogen or carbon given by the elemental analyzer and the cell dry weight, represented by “p” in g DW.cell<sup>-1</sup> (see equation 1). p is considered to be constant and it is determined from the nitrogen mass balance in the medium between t = 0 and t:

$$N_0 + p.y_0.X_0 = N + p.y.X \quad \text{Eq. (1)}$$

where  $N_0$  and  $N$  are the nitrate concentrations (gN.L<sup>-1</sup>) in the liquid respectively at t = 0 and t,  $y_0$  and  $y$  are the nitrogen mass fraction in the cell, respectively at t = 0 and t,  $X_0$  and  $X$  are the cellular concentration respectively at t = 0 and t. It was assumed that the dissolved organic nitrogen can be neglected.

N is plotted as a function of  $yX$  (data not shown). For each culture the curves are straight lines which confirms that  $p$  is constant. The mean  $p$  value is  $3 \times 10^{-11}$  g DW.cell<sup>-1</sup>.

On day 9 of the experiment, final samples were taken in order to analyze the microalgal chlorophyll content, the soluble exopolysaccharide concentration (EPS) and culture dry weight. The microalgal dry weight was measured by vacuum filtration through a pre-weighed dry (2h, 100°C) glass fiber filters (Whatman® GF/F; 0.7 µm nominal pore size) followed by oven-dried 2h at 100°C. Three replicates (10 mL) of each sample were prepared.

Chlorophyll extraction was performed on microalgal suspensions (1 mL). Samples were centrifuged (5 minutes; 12,000 rpm). The supernatant was discarded and an aqueous solution of 85% methanol with 1.5 mmol.L<sup>-1</sup> of sodium dithionite (1 mL) was added to the pellet. The samples were extracted for 32 minutes at 40°C after which they were centrifuged (5 minutes; 12,000 rpm). The chlorophyll content was measured in the supernatant by measuring the absorbance at 664 and 650 nm (Cary 300 Scan UV-Visible, Varian Inc., Netherlands). Three replicates of each sample were prepared and measured in this way. All the assays were conducted in the absence of light, in order to avoid the formation of degradation products of chlorophyll (Cullen *et al.*, 2005). A second extraction was done if the pellet remained green. Chlorophyll *a* and *b* were quantified using the following expressions proposed by Porra (1990):

$$\text{Chl a (mg.L}^{-1}\text{)} = 16.41 A_{664} - 8.09 A_{650} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{Chl b (mg.L}^{-1}\text{)} = 30.82 A_{650} - 12.57 A_{664} \quad \text{Eq. (3)}$$

Where  $A_{664}$  and  $A_{650}$  are the absorbances at the two wavelengths

The exopolysaccharide concentration (EPS) were measured by the Dubois method (Dubois *et al.*, 1956), using glucose as standard. A culture sample (200 µL) was centrifuged (25 minutes, 4500 rpm), then 200 µL of 5% (v/v) phenol and 1 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added to the supernatant and mixed. After 10 minutes, the sample was mixed again and incubated (30°C; 15 min.). EPS concentrations were determined by measuring their absorbance at 488 nm (Cary 300 Scan UV-Visible, Varian Inc., Netherlands). Five replicates of each sample were analyzed.

The nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration in the medium was measured by anionic chromatography; the chromatograph (Dionex ICS-2500 Corporation, Germany) was equipped with an electrochemical generator of eluent (KOH, 30 mmol/L, at a flow rate of 1.5 mL.min<sup>-1</sup>) and with a conductimetric detector. An IonPac column AS11-HC (4×250 mm) was used at 30°C. The analyses were performed in duplicate; the culture samples (10 mL) were centrifuged (25 minutes; 4500 rpm) and the supernatant filtered (0.45 µm syringe filter) prior to the analysis.

### *Growth parameters and efficiency*

The specific growth rate ( $\mu$ ) was determined between the first and the third day of the cultivation period using the method proposed by Wood *et al* (2005), with the assumption that this period corresponded to the exponential phase.

In this case,  $\mu$  is constant over time and a mass balance on microalgae during a differential time interval  $dt$  can be written as:

$$dX = \mu \cdot X \cdot dt \quad \text{Eq. (4)}$$

where  $X$  is the cell concentration (cell.L<sup>-1</sup>). By integrating this equation between  $t_0$  and  $t$ , the following expression is obtained:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \quad \text{Eq. (5)}$$

where  $X_0$  is the initial cell concentration (cell.L<sup>-1</sup>).

According to this method, the specific growth rate is determined by representing graphically  $\ln(X/X_0)$  as a function of time;  $\mu$  is then the slope given by the linear regression of the data (between day 1 and 3).

The mean CO<sub>2</sub> removal rate (in g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) was determined with values of carbon quotas and EPS concentrations :

$$R_{CO_2} = \frac{(C_2 \cdot X_2 + EPS_2) - (C_1 \cdot X_1 + EPS_1)}{t_2 - t_1} * \frac{M_{CO_2}}{M_C} \quad \text{Eq. (6)}$$

where  $C_1$  and  $C_2$  are the carbon quotas (gC.cell<sup>-1</sup>) and  $EPS_1$  and  $EPS_2$  are exopolysaccharides concentrations (gC.L<sup>-1</sup>) and  $X_1$  and  $X_2$  are the cellular concentrations (cell.L<sup>-1</sup>) at time  $t_1$  and

$t_2$  respectively.  $M_{CO_2}$  and  $M_C$  are respectively the molar mass of carbon dioxide and carbon ( $\text{g.mol}^{-1}$ ). Calculations were done for day 1 to 9 of the experiment.

### *Statistical analysis*

To evaluate differences between mean values of cell, EPS and nitrate concentrations and specific growth rates with a confidence level of 95%, Student's T-tests were carried out. The null hypothesis states that the means are equal. A significant value  $\leq 0.05$  indicates that there is a significant difference between tested means. Analyses of variance (ANOVA) were also performed in order to evaluate if differences of nitrogen quotas and chlorophyll a contents with time.

## **Results and discussion**

### *1. Influence of CO<sub>2</sub> concentration and light intensity on the growth of Chlorella vulgaris*

The specific growth rates ( $\mu$ ) were similar ( $p > 0.05$ ) for all the cultures at around  $1.1 \text{ d}^{-1}$ , (Table 1). These values are in agreement with Sasaki *et al.* (1995) who reported a specific growth rate of  $1 \text{ d}^{-1}$  for a *Chlorella* strain grown at  $40^\circ\text{C}$  with 20% (v/v) CO<sub>2</sub> in the feed gas. Several studies have found a much lower value for *C. vulgaris*, for example, Greque de Moraes and Costa (2007) reported a value of  $0.25 \text{ d}^{-1}$ , for *C. vulgaris* grown with 6% or 12% (v/v) CO<sub>2</sub>. Chiu *et al* (2008) found a specific growth rate of  $0.3 \text{ d}^{-1}$  when the same alga was cultivated with 5% (v/v) CO<sub>2</sub> and  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity.

**Table 1.** Specific growth rates and growth phase durations for *Chlorella vulgaris* grown at different carbon dioxide concentrations and light intensities.

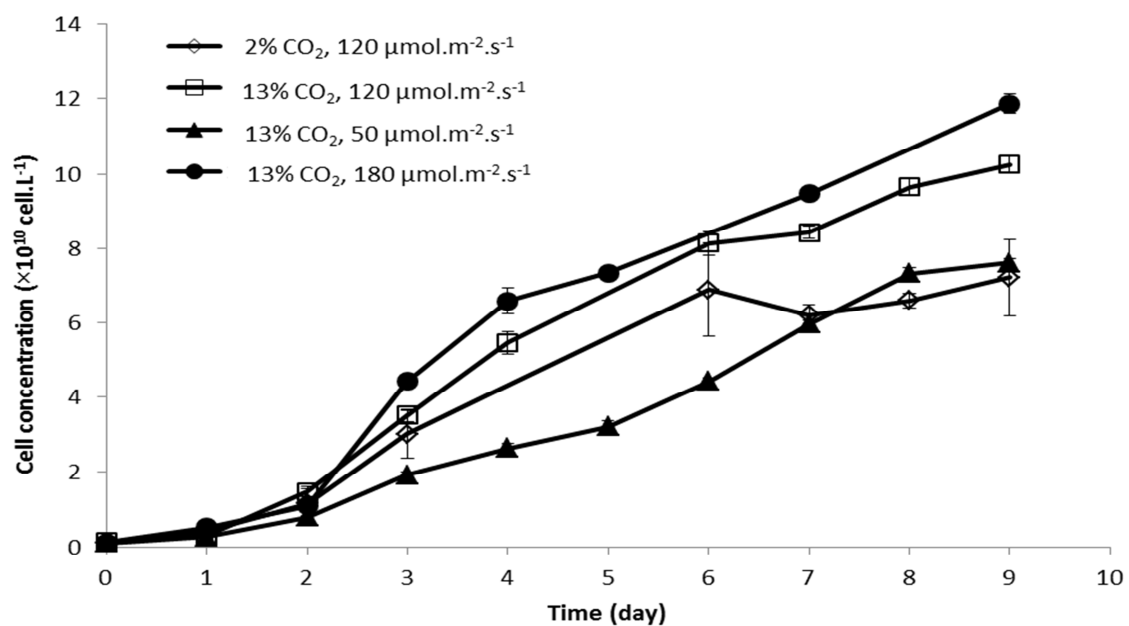
| CO <sub>2</sub><br>concentration                                                                  | 2%          | 13%          | 13%          | 13%          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Light intensity<br>( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )                                       | 120         | 120          | 50           | 180          |
| <b><math>\mu</math> (d<sup>-1</sup>) measured<br/>during the<br/>exponential<br/>growth phase</b> | 0.99 ± 0.12 | 1.32 ± 0.12  | 0.99 ± 0.09  | 1.22 ± 0.21  |
| <b>Days</b>                                                                                       |             |              |              |              |
| <b>Exponential<br/>growth phase</b>                                                               | 0-3         | 0-3          | 0-3          | 0-3          |
| <b>non-exponential<br/>growth phase</b>                                                           | 3-6         | 3-9          | 3-9          | 3-9          |
| <b>Stationary phase</b>                                                                           | 6-9         | not attained | not attained | not attained |

In the experiments reported here, the biomass concentration of *C. vulgaris* reached 2.10 g.L<sup>-1</sup> at 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity and 13% (v/v) CO<sub>2</sub> after 9 days of incubation (Table 2). These results are higher compared with those reported in previous studies. Bhola *et al.* (2011) found a maximal biomass concentration of 1.22 g.L<sup>-1</sup> with *C. vulgaris* (80  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light and 4% v/v CO<sub>2</sub>). Chiu *et al.* (2008) reported a maximal biomass concentration of 1.4 g.L<sup>-1</sup> for *C. vulgaris* cultivated at 2% (v/v) CO<sub>2</sub> and a light intensity of 300  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

**Table 2.** Biomass concentrations (X) and soluble exopolysaccharide (EPS) concentrations at day 9. Mean CO<sub>2</sub> biofixation rate ( $R_{CO_2}$ ) between days 1 and 9 for cultures under different CO<sub>2</sub> concentration and light intensities.

|                                                                   | 2% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| X (g.L <sup>-1</sup> )                                            | 1.4 ± 0.23                                                       | 1.70 ± 0.06                                                       | 1.32 ± 0.48                                                      | 2.10 ± 0.07                                                       |
| EPS (g CO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )                         | 0.4 ± 0.06                                                       | 0.6 ± 0.03                                                        | 0.5 ± 0.04                                                       | 0.5 ± 0.04                                                        |
| $R_{CO_2}$ (g CO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) | 0.9                                                              | 1.4                                                               | 0.8                                                              | 1.45                                                              |

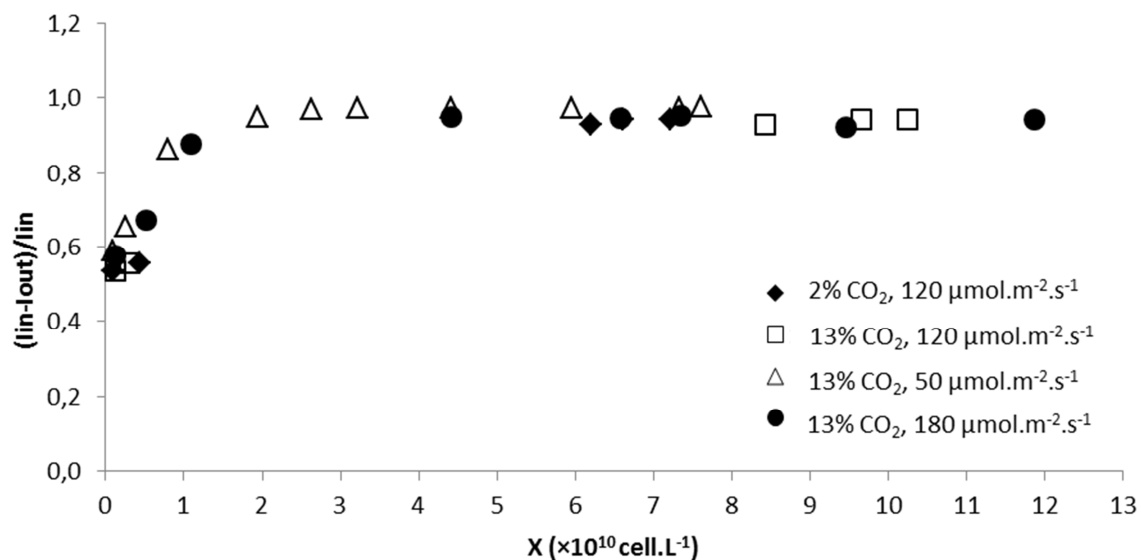
The effect on microalgal growth of two CO<sub>2</sub> concentrations and the three light intensities was tested (Figure 1). Different growth phases can be detected for the cultures; exponential, non-exponential and stationary growth phases. The duration of each phase is reported in Table 1. The exponential growth phase was always of the same duration. With a low supply of CO<sub>2</sub> (2% v/v), the non-exponential growth phase ended on day 6 leading to the stationary phase. At the higher CO<sub>2</sub> concentration (13% v/v), the stationary phase was not reached at all before the end of the experiment (day 9).



**Figure 1.** Growth of *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities.

The cultures illuminated at 50, 120 and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  developed different cell concentrations from day 2 onwards ( $p < 0.05$ ). From day 3 onwards, *C. vulgaris* illuminated with 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , had the highest cell concentration compared with the culture under the other conditions. For 2% and 13% (v/v) CO<sub>2</sub>, the cell concentrations were the same in both cultures until day 3 ( $p > 0.05$ ).

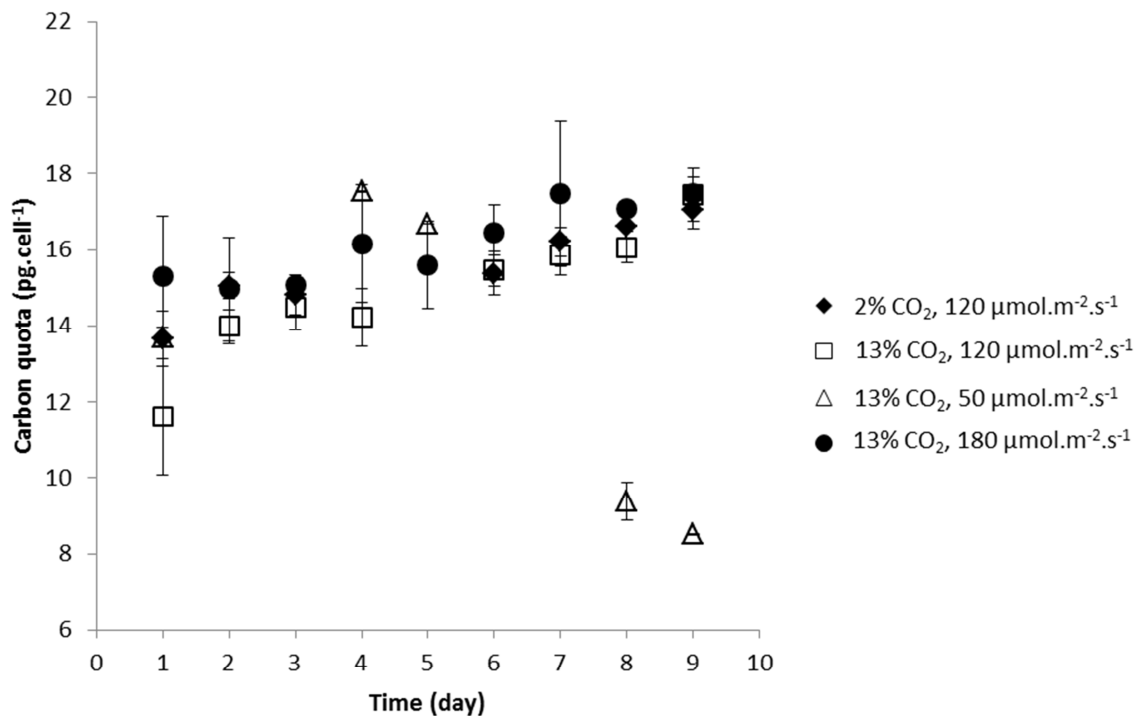
The absorption of light as a function of the cellular concentration is illustrated on Figure 2. For a cellular concentration of about  $2 \times 10^{10} \text{ cell.L}^{-1}$  the entire incident light was absorbed in the reactor, whatever the culture conditions. This cellular concentration roughly corresponds to the end of the exponential growth (Figure 1). Ogbonna *et al.* (1995) have proposed that when the cellular concentration is low, the effect of self-shading is negligible and growth is exponential. As the cell concentration increases above a certain value, self-shading is significant and cell growth becomes limited by the amount of light received by the cells (Miron *et al.*, 2002). This might explain the change in the growth phases observed in this study, from exponential to non-exponential growth, at day 3 approximately. This shift in growth phase may be related to light limitation which is in good agreement with Miron *et al.* (2002) who reported that non-exponential growth of *Phaeodactylum tricornutum* was correlated with light availability.



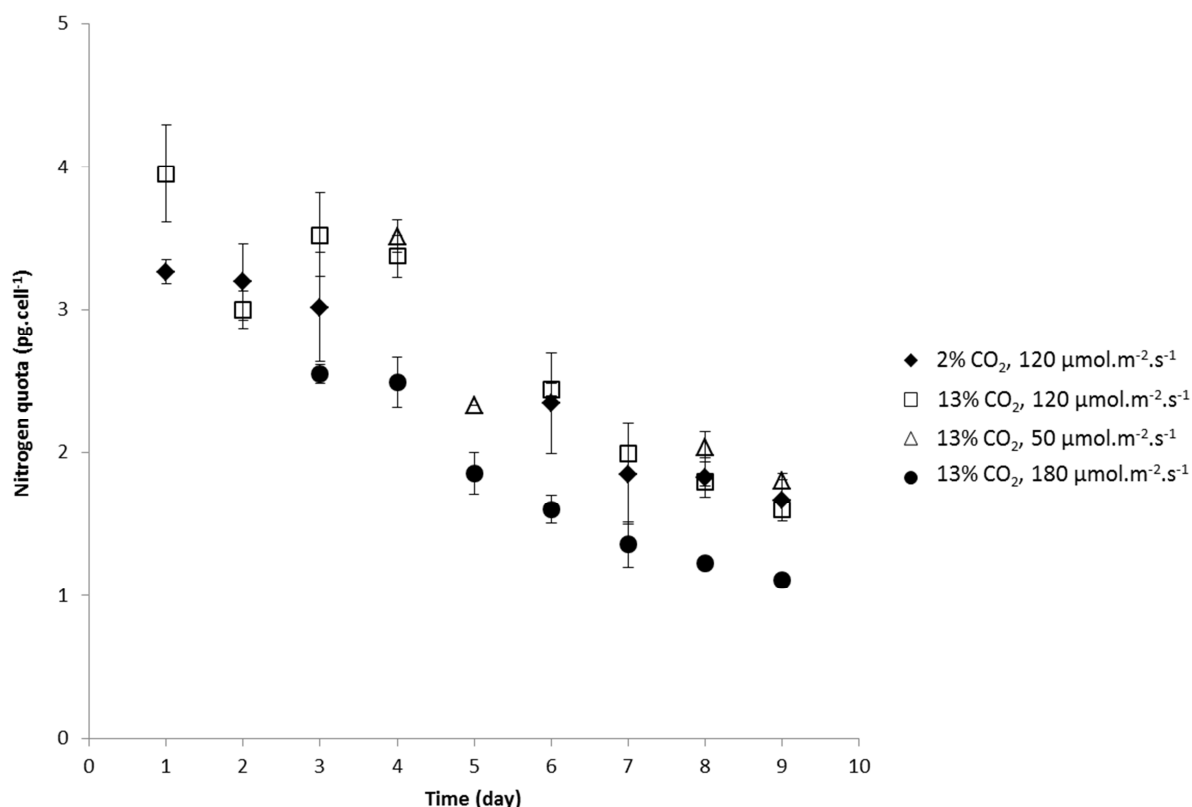
**Figure 2.** Light absorption of the bioreactor as a function of the *C. vulgaris* cellular concentration under different carbon concentrations and light intensities.

## 2. Effect of light intensity on the growth of *Chlorella vulgaris* at 13% CO<sub>2</sub>

As seen in Table 1 the light intensity did not affect the specific growth rate of *C. vulgaris*. The carbon quota increased during the entire growth period for the cultures at 120 and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity; very slightly before day 3 and more significantly afterwards, showing a difference between the exponential and non-exponential phases (Figure 3). The carbon quota increased until day 4 and then decreased until day 9 for the algae grown at a light intensity of 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . The nitrogen quota decreased all along the growth period for all the culture conditions, but much more significantly after day 3 (Figure 4). Lourenço et al. (2004) observed that the nitrogen quota decreased with time when the nitrate availability in the medium progressively decreased. The results presented here are in good agreement with these findings. The decrease in the nitrogen quota may be a consequence of the reduction in the nitrate concentration in the medium due to its consumption by the algae.



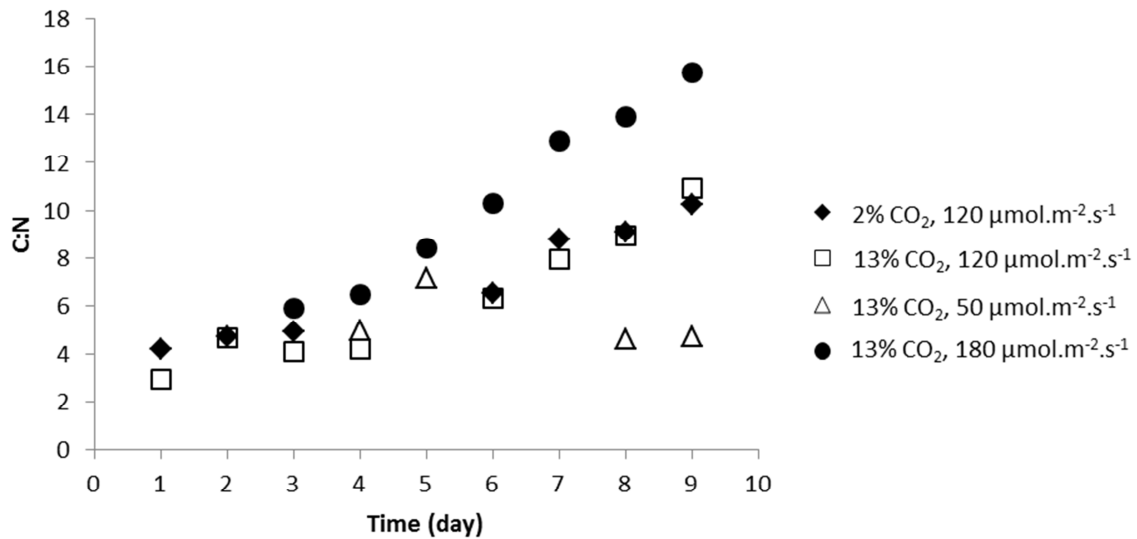
**Figure 3.** Carbon quota of *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities.



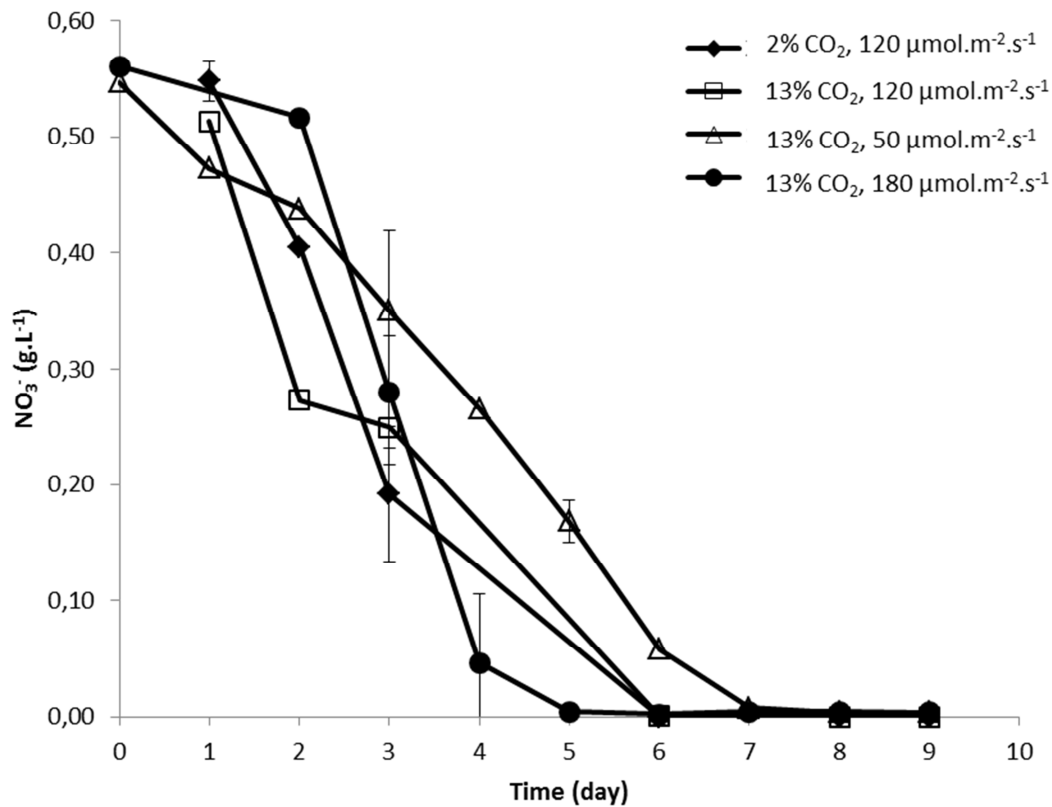
**Figure 4.** Nitrogen quota of *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities.

Common patterns of variations of the C:N ratio of the cells over time were observed for the cultures grown at 120 and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensities (Figure 5). The C:N ratio, for these cultures increased on day 5 for the algae grown at 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and on day 6 for the culture at 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensities. On the other hand, no increase in the C:N ratio of the cells was observed for the culture at 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  during the culture period. Nitrogen starvation occurred on day 5 (Figure 6) for the culture at 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity, on day 6 at 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity and on day 7 for the culture at 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity.

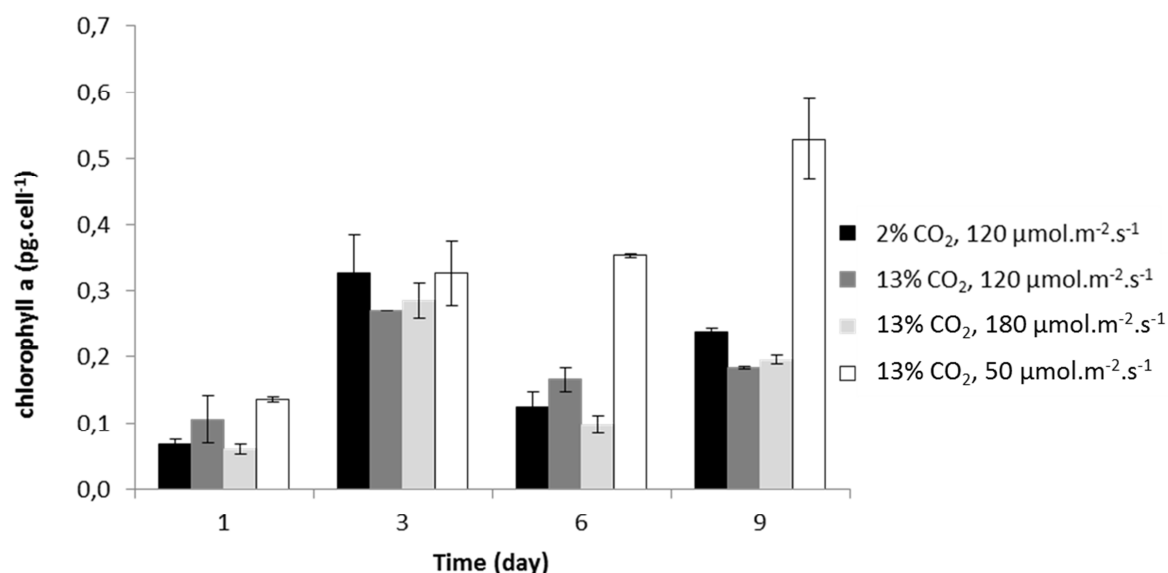
The concentration of chlorophyll a was measured during the incubation of the cultures (Figure 7). On day 6 and 9, a higher chlorophyll content was detected for the culture grown at 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity, than for other light intensities ( $p < 0.05$ ). For cultures grown at 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensities, chlorophyll a reached a maximum concentration at the end of the exponential phase and then decreased with time ( $p < 0.05$ ). Light intensity had no effect ( $p > 0.05$ ) on exopolysaccharide (EPS) production (Table 2).



**Figure 5.** C : N variation over time for *Chlorella vulgaris* under different carbon feed concentration and light intensities.



**Figure 6.** Variations of the medium residual nitrate concentration with time for different carbon concentrations and light intensities.



**Figure 7.** Chlorophyll content with time, under different carbon concentrations and light intensities.

At a light intensity of  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , the low cell concentration, the decrease in the carbon quota after day 5 and the higher chlorophyll a concentration might suggest light limitation (more than a nitrogen one as nitrate in the medium remained relatively high till day 5). After day 3, as the cell concentration increases with time, the light available per cell decreases which may explain the increase in the chlorophyll a content. Several studies reported the same trend when microalgae are faced with light limitation (Sciandra *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). Light limitation may also have caused the decrease in the carbon quota on day 5. At this point of the culture period, the cell concentration may have been so high that the light availed per cell could not have been high enough to ensure the synthesis of ATP and NADPH needed for carbon fixation resulting in a decrease in the carbon quota.

At light intensities of 120 and  $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , no reduction in the carbon quota was observed (Figure 3). Thus it seems that the light limitation did not affect carbon sequestration unlike the culture with a light intensity of  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As the light intensity increased the cellular concentration increased too. Under these ( $120$  and  $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) growth conditions the amount of light received by the algae may have been sufficient to support cellular metabolism and synthesis of energetic molecules needed for the fixation of CO<sub>2</sub> through the Calvin Cycle (Falkowsky and Raven, 2007).

The decrease in the chlorophyll a content and the increase of the cellular C:N ratio on day 5 and 6 for the cultures grown at  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and  $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensities

respectively may suggest an additional “nitrate effect” on the cell metabolism. The same trend has been reported in several studies (Turpin, 1991; Lourenço *et al.*, 2004; Sciandra *et al.*, 2000). Moreover, it can be seen in figure 6 that nitrate starvation in the medium occurred on day 5 and 6 respectively for the cultures at 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensities. Thus when the light intensity increased from 120 to 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , the cells experienced nitrate starvation earlier, due to their higher concentration at the latter light intensity.

All cultures, regardless of the incident light intensity are limited by light from day 3. Eventual nitrate limitation and starvation were observed in all the cultures, but earlier at higher light intensities. It could be assumed that between day 3 and 6, at a light intensity of 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , the major limiting factor is light, in contrast with 120 and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensities where  $\text{NO}_3^-$  starvation is reached earlier. This difference might be a consequence of increased cell concentration for higher light intensities. Nevertheless under all conditions tested, light intensity is the factor governing carbon sequestration and culture growth.

### 3. *Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the growth of Chlorella vulgaris*

Different CO<sub>2</sub> concentrations ( $p > 0.05$ ) in the gas did not affect the specific growth rate (Table 1). From day 3, the cell concentrations were higher at 13% (v/v) CO<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ) than at 2% (v/v) CO<sub>2</sub>, however, the carbon and nitrogen quotas were not significantly different for the two cultures ( $p > 0.05$ ). For both cultures, the carbon quota increased (Figure 3) while the nitrogen quota decreased (Figure 4) during the incubation period. The C:N ratio of the cells increased during the non-exponential growth phase, from day 6 to the end of the experiment (Figure 5) and nitrogen starvation occurred on day 6 for both cultures (Fig. 6). For both cultures, the chlorophyll a content was higher on day 3 than on day 9 ( $p < 0.05$ ) (Figure 7). The increase in the C:N ratio, the decrease of the nitrogen quota and of the chlorophyll a content are consistent with nitrate starvation in the culture medium (Turpin, 1991; Sciandra *et al.*, 2000). On the contrary, the EPS concentrations were significantly different for both cultures ( $p < 0.05$ ). Cells grown at 13% (v/v) CO<sub>2</sub> excreted 1.4 times more EPS than cells cultivated at 2% (v/v) CO<sub>2</sub>. These results are in accordance with other studies that reported an increase in the excretion of dissolved organic carbon including EPS at elevated C:N in the growth medium (Engel, 2002; Riebesell, 2004).

When *C. vulgaris* was grown at 13% (v/v) CO<sub>2</sub>, the cell concentration was higher than at 2% (v/v) CO<sub>2</sub> (Figure 1). Several studies have showed that, the increase in CO<sub>2</sub> concentration in the culture medium could stimulate cellular growth (Riebesell, 2004). However, the mechanisms responsible for these effects are still unknown (Czerny *et al.*, 2009). In addition, Sorokin (1965) attributed the increase in cell division to a pH variation, rather than a direct effect of the CO<sub>2</sub> concentration. In the same vein, in this study, an increase in the cell concentration at a higher CO<sub>2</sub> concentration might be linked either to a direct effect of dissolved carbon dioxide, or an indirect effect of pH.

The concentration of EPS was higher at the higher inlet CO<sub>2</sub> concentration. Therefore, the applied carbon dioxide concentration seemed to have affected the inorganic carbon fixation by the algae. Although the carbon quota was identical ( $p > 0.05$ ) for both cultures these results suggest that the excess carbon fixed by the cells grown at 13% (v/v) CO<sub>2</sub> was excreted in the medium. The EPS production may be the result of a cellular overflow, whenever nutrient acquisition limits biomass production but not photosynthesis, which is what may have occurred with nitrate starvation in this study (Engel, 2002).

Variations of the culture pH with time were measured daily (data not shown). The pH values ranged from 6.3 to 7.3 for 2% (v/v) CO<sub>2</sub> and from 6.5 to 6.9 for 13% (v/v) CO<sub>2</sub>. Huertas *et al.* (2000) suggest that, the higher pH values in the 2% (v/v) CO<sub>2</sub> culture might indicate a difference in the inorganic carbon assimilation mechanism compared with 13% (v/v) CO<sub>2</sub> culture, due to the difference in the relative dissolved CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations. The ratio [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]/[CO<sub>2</sub>] in the liquid significantly varied during the culture due to the pH variations: from 1 to 9 for 2% (v/v) CO<sub>2</sub> and from 1.4 to 3.5 for 13% (v/v) CO<sub>2</sub>. For an indication of the limit inorganic carbon concentration in the medium, an equilibrium was assumed between gas and liquid phases (this is certainly not the case due to mass transfer limitations), nevertheless it can give interesting indications. Henry's law provides dissolved CO<sub>2</sub> concentrations for 2% (v/v) CO<sub>2</sub> in the gas ( $7 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>) and 13% (v/v) CO<sub>2</sub> ( $4.6 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>). The composition of the liquid phase was then:

$$\begin{array}{ll} 2\% & [\text{CO}_2] 7 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \quad 7 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} < [\text{HCO}_3^-] < 6.3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \\ 13\% & [\text{CO}_2] 4.6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \quad 6.4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} < [\text{HCO}_3^-] < 1.6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1} \end{array}$$

As shown with the above calculations, at 2% (v/v) CO<sub>2</sub> the liquid was very low in dissolved CO<sub>2</sub> compared to 13% (v/v) CO<sub>2</sub>, its actual concentration being always lower than the equilibrium one possible ( $7 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>). The cells were then driven to consume HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, which would have been available in greater concentration. On the contrary for 13% (v/v) CO<sub>2</sub>, the dissolved CO<sub>2</sub> concentration was probably enough to ensure algal growth. Considering previous studies, *C. vulgaris* has already showed the ability to actively take up HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> when it was present in the medium (Findenegg, 1980). The active transport of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> needs enzymes and ATP as energy. On the contrary, the uptake of CO<sub>2</sub> is a passive process hence less energy-consuming.

On day 3 when light limitation occurred, cells grown at 2% (v/v) CO<sub>2</sub> were less able to produce energy-rich compounds (ATP) with a consequent negative impact on the active transport of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and culture growth. Then when nitrate starvation occurred on day 6, proteins synthesis and photosynthetic activity were affected leading to the end of the non-exponential growth for cells grown at 2% (v/v) CO<sub>2</sub>. These results suggest that both cell growth and carbon fixation are highly affected by the CO<sub>2</sub> concentration and that, a greater concentration of CO<sub>2</sub> (or a lower pH) presented an advantage when nitrate starvation occurs.

#### 4. *Effect of CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities on total CO<sub>2</sub> biofixation rate of Chlorella vulgaris*

The total CO<sub>2</sub> biofixation rate  $R_{CO_2}$  (g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) was calculated according to Eq. (6), it is a mean value between day 1 and 9. As shown in Table 2, the *C. vulgaris* maximal CO<sub>2</sub> biofixation rate was 1.45 g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, for 13% (v/v) CO<sub>2</sub> and a light intensity of 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. This value is high compared to the literature. For *C. vulgaris*, Hulatt *et al.* (2011) obtained a CO<sub>2</sub> biofixation rate of 0.38 g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> with 4% (v/v) CO<sub>2</sub> and 350 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Tang *et al.* (2011) reported a CO<sub>2</sub> biofixation rate of 0.28 g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> with the algae *Scenedesmus obliquus* using 10% (v/v) CO<sub>2</sub> and 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light intensity, while another study on *S. obliquus* had shown a CO<sub>2</sub> biofixation rate of 0.55 g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> (Ho *et al.*, 2010). The different culture conditions (CO<sub>2</sub> concentration, algae species, light intensity, ect...) may justify the differences observed in carbon dioxide biofixation rates.

As shown in Table 2, a higher carbon dioxide concentration and a higher light intensity lead to a greater rate of CO<sub>2</sub> biofixation. *C. vulgaris* grown at 2% (v/v) CO<sub>2</sub> presented a biofixation rate 1.45 times lower compared to cells cultivated at 13% (v/v) CO<sub>2</sub>. The culture

developed at 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity had a CO<sub>2</sub> biofixation rate 1.8 times lower compared with the culture at 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity. From these results the optimal conditions for carbon removal in the range tested are 13% (v/v) CO<sub>2</sub> and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity, for the given culture medium. Greater efficiencies could be obtained with higher nitrate concentrations and higher light intensities, but additional experiments would be necessary to optimise these conditions.

## Conclusion

This study aimed to investigate the effect of carbon dioxide concentration and light intensity on the growth, biochemical composition and CO<sub>2</sub> biofixation ability of *C. vulgaris* CCAP 211/11 B cultures. A very complex behaviour of the microalgae during their growth could be observed, in relation with three major parameters: light intensity, nitrate concentration in the medium and CO<sub>2</sub> concentration in the gas. The microorganisms are able to adapt their metabolism to carbon, nitrogen and light limitation, in order to maintain a certain growth rate before reaching stationary phase.

For the given culture medium, the best conditions for CO<sub>2</sub> removal are 13% (v/v) CO<sub>2</sub> and 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity. Under the conditions adopted in this study, the value of 1.45 g CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> removed is higher than reported in many publications; these results are very encouraging for a potential use of *C. vulgaris* for industrial CO<sub>2</sub> remediation.

### **III.C. Modélisation de la croissance de *Chlorella vulgaris***

#### *III.C.1. Présentation du modèle*

Le modèle de croissance appliqué à *C. vulgaris* doit pouvoir prédire l'évolution de la biomasse dans un procédé de taille industrielle. Avant d'appliquer ce modèle au procédé, il faut définir les paramètres le régissant et leurs donner une valeur numérique. Pour cela nous avons utilisé les données obtenues à partir des cultures de *C. vulgaris* en mode batch (voir III.B). Ces expériences nous ont permis d'étudier l'impact de la concentration de CO<sub>2</sub> dans le gaz et de l'intensité lumineuse sur la croissance de *C. vulgaris*. A partir de ces résultats expérimentaux, il nous a été possible de déterminer les valeurs numériques des paramètres de modélisation.

Les cultures en batch ont permis de montrer que la croissance de *C. vulgaris* était limitée, et nous supposons que c'est à la fois par la lumière et par l'azote.

Le modèle mathématique doit donc prendre en compte ces deux limitations. Pour cela, la limitation en azote est représentée par un terme donné par le modèle de Droop et la limitation par la lumière est traduite par une fonction de type Michaelis-Menten.

Les hypothèses posées précédemment nous permettent d'exprimer la vitesse spécifique de croissance de la façon suivante :

$$\mu = \mu_0 \cdot \left[ 1 - \frac{q_{min}}{q} \right] \cdot \frac{(I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}}{K_E + (I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}} \quad (III.7)$$

Avec :

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance (h<sup>-1</sup>)

$\mu_0$  : vitesse spécifique maximale de croissance en l'absence de toute limitation (h<sup>-1</sup>)

$q_{min}$  : quota minimum d'azote dans la cellule permettant le croissance cellulaire (gN.cell<sup>-1</sup>)

$q$  : quota d'azote dans la cellule (gN.cell<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

$I_{in}$  : intensité lumineuse incidente ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )

$I_{out}$  : intensité lumineuse transmise ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )

$A$  : surface éclairée du réacteur ( $\text{m}^2$ )

$V$  : volume utile dans le photobioréacteur (L)

$K_E$  : constante de demi-saturation pour la lumière ( $\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )

Le quota d'azote dans la cellule,  $q$  se calcule d'après l'équation (III.8) :

$$q = p \cdot y \quad (\text{III.8})$$

Avec :

$p$  : masse de matière sèche par cellule pour *C. vulgaris* ( $\text{g.cell}^{-1}$ )

$y$  : fraction massique d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* ( $\text{gN. g de matière sèche}^{-1}$ )

Si  $p$  est constant, le quota d'azote minimal dans la cellule,  $q_{min}$  se calcule d'après l'équation (III.9) :

$$q_{min} = p \cdot y_{min} \quad (\text{III.9})$$

Avec :

$y_{min}$  : fraction massique minimale d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* ( $\text{gN. g de matière sèche}^{-1}$ )

La détermination de  $p$  et la vérification que ce paramètre est constant se font à partir du bilan en azote dans le milieu liquide, exprimant que tout l'azote perdu par la phase liquide (perte en nitrate) est récupéré par les cellules sous forme d'azote intracellulaire. Donc le bilan en azote sur le réacteur entre l'instant 0 et l'instant  $t$  s'écrit :

$$N_0 + p \cdot y_0 \cdot X_0 = N + pyX \quad (\text{III.10})$$

Avec :

$N_0$  : concentration de nitrate exprimée en équivalent azote à  $t = 0$  ( $\text{gN.L}^{-1}$ )

$p$  : masse de matière sèche pour *C. vulgaris* ( $\text{g.cell}^{-1}$ )

$y_0$  : fraction massique d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* à  $t = 0$  ( $\text{g N. g matière sèche}^{-1}$ )

$X_0$  : concentration cellulaire à  $t = 0$  (cell.L<sup>-1</sup>)

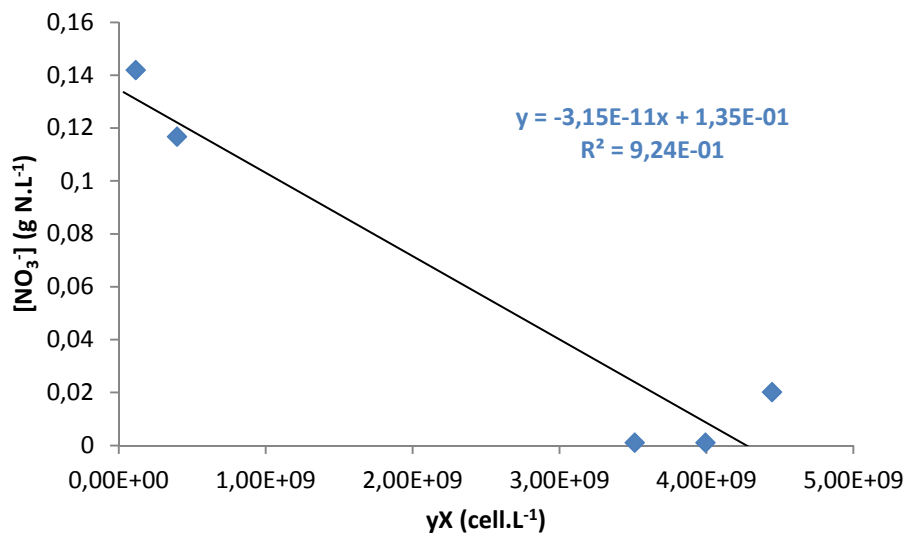
$N$  : concentration de nitrate exprimée en équivalent azote à  $t$  (g N.L<sup>-1</sup>)

$y$  : fraction massique d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* à  $t$  (g N. g matière sèche<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration cellulaire à  $t$  (cell.L<sup>-1</sup>)

La fraction massique d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* est donnée par les mesures de l'analyse élémentaire (voir Annexe II.2).

D'après (III.10), si  $p$  est constant, il est déterminé en traçant  $N$  en fonction du produit  $yX$ , qui doit donner une droite de pente  $-p$ .



**Figure III.7.** Détermination de  $p$  pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub> et une intensité lumineuse de 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

D'après la Figure II.7, on obtient une assez bonne linéarité. La même procédure est appliquée pour déterminer  $p$  pour les autres conditions de culture, où on obtient globalement de bonnes droites.  $p$  peut donc être considéré comme constant pour chaque essai, on peut donc écrire :

$$\frac{q_{min}}{q} = \frac{y_{min}}{y} \quad (\text{III.11})$$

Le Tableau III.3 donne les valeurs de  $p$  pour chacune des conditions de culture.

**Tableau III.2.** Valeurs de matière sèche par cellule,  $p$ , pour *C. vulgaris* cultivée avec différentes concentrations de CO<sub>2</sub> et différentes intensités lumineuses.

|                                             | 2% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 180% CO <sub>2</sub> ,<br>180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b><math>p</math> (g.cell<sup>-1</sup>)</b> | $2,5.10^{-11}$                                                   | $2,1.10^{-11}$                                                    | $4,0.10^{-11}$                                                   | $3,1.10^{-11}$                                                     |

La vitesse spécifique de croissance peut alors s'écrire :

$$\mu = \mu_0 \cdot \left[ 1 - \frac{y_{min}}{y} \right] \cdot \frac{(I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}}{K_E + (I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}} \quad (\text{III.12})$$

L'évolution de la concentration cellulaire en batch s'écrit :

$$dX = \mu \cdot X \cdot dt \quad (\text{III.13})$$

Avec :

$X$  : concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance (j<sup>-1</sup>)

L'évolution de la concentration du nitrate (exprimée en équivalent azote) est définie par :

$$dN = -\rho_m \cdot \frac{N \cdot X}{N + K_N} \cdot dt \quad (\text{III.14})$$

Avec :

$K_N$  : constante de demi-saturation pour les nitrates, exprimée en équivalent azote (gN.L<sup>-1</sup>)

$\rho_m$  : constante de vitesse de consommation des nitrates (gN.cell<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

En dérivant l'équation (III.10), on obtient  $dN = -p \cdot y \cdot dX - p \cdot X \cdot dy$ ; soit en remplaçant  $dX$  par sa valeur (Equation III.13), il vient :  $dN = -p \cdot X \cdot dy - p \cdot y \cdot \mu \cdot X \cdot dt$

Finalement :

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\rho_m}{p} \cdot \frac{N}{N+K_N} - \mu y \quad (\text{III.15})$$

Soit un système de 3 équations différentielles

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{III.16})$$

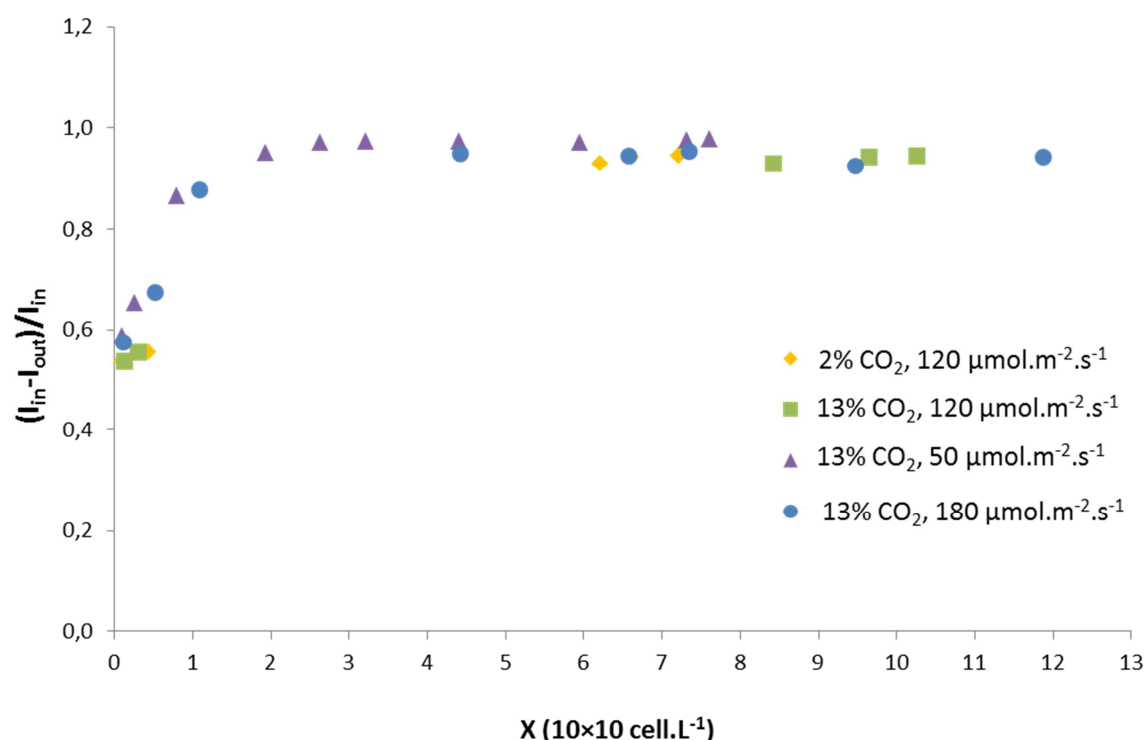
$$\frac{dN}{dt} = -\rho_m \cdot \frac{N}{N+K_N} X \quad (\text{III.17})$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\rho_m}{p} \cdot \frac{N}{N+K_N} - \mu y \quad (\text{III.18})$$

### III.C.2. Identification des paramètres du modèle

- *Modélisation de l'intensité de lumière absorbée en fonction de la concentration cellulaire*

Nous avons porté sur la figure ci-dessous le rapport de l'intensité de lumière absorbée sur l'intensité incidente :  $(I_{\text{in}} - I_{\text{out}})/I_{\text{in}}$  en fonction de la concentration cellulaire X, pour tous les essais réalisés.



**Figure III.8.** Absorption de la lumière dans le réacteur en fonction de la concentration cellulaire de *C. vulgaris* lors des différentes cultures en batch (2% et 13% de CO<sub>2</sub>, 50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, 120 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

La Figure III.8. montre que lorsque la concentration cellulaire de *C. vulgaris* atteint une valeur de l'ordre de  $2 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup>, toute la lumière est absorbée dans le réacteur, quelle que soit l'intensité incidente (50, 120 et 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Cette valeur de concentration sera appelée valeur seuil,  $X_{\text{seuil}}$ .

D'après l'exploitation des résultats obtenus en batch pour la culture de *C. vulgaris* (III.B), nous admettons que le passage de la phase exponentielle à la phase non-exponentielle de croissance est lié à une limitation par la lumière lorsque la concentration cellulaire augmente (accompagnée ou non d'une limitation par l'azote, comme il sera abordé par la suite).

Cela peut s'expliquer par le fait que dans un photobioréacteur tubulaire une forte densité cellulaire conduit à un gradient de lumière (Molina Grima et al.; 1999). Une zone sombre se situe au centre du réacteur et une zone illuminée en périphérie de celui-ci. Ainsi en fonction de l'endroit où se situent les cellules, elles reçoivent plus ou moins de lumière. La lumière incidente étant constante, de même que le débit de gaz entrant dans le réacteur, la zone illuminée et le temps passé par chaque algue dans cette zone vont diminuer avec l'augmentation de la concentration cellulaire (Zijffers et al., 2010). Dans notre cas, le réacteur

étant parfaitement agité, toutes les cellules expérimentent le même temps passé dans cette zone.

La valeur de  $X_{\text{seuil}}$  nous renseigne sur la gamme de concentration cellulaire à partir de laquelle ce phénomène va se produire. En effet, le fait que les cellules de *C. vulgaris* cultivées avec 120 et 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ne soient pas limitées dans leur croissance au jour 2 alors que la valeur de  $X_{\text{seuil}}$  est atteinte (Tableau III.4), montre que pendant encore un certain temps la zone illuminée et le temps passé dedans sont suffisants pour que toute l'énergie lumineuse reçue par les cellules soit allouée à la croissance (Zijffers et al., 2010). Au-delà du jour 3, la fraction de zone sombre dans le réacteur augmente dans de telles proportions qu'une partie non négligeable de l'énergie synthétisée par les cellules à la lumière est allouée aux mécanismes de maintenance cellulaire (tel que des processus d'osmorégulation, de défenses, ect.) et plus uniquement à la croissance. Ce phénomène peut expliquer la fin de la phase exponentielle de croissance (Cornet, 2010 ; Zijffers et al., 2010). Le rapport concentration cellulaire et intensité lumineuse n'est plus suffisant pour assurer une croissance exponentielle dans la culture. Ce même phénomène a lieu pour les cellules cultivées avec 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Mais la lumière incidente étant beaucoup plus faible, la limitation par la lumière intervient pour une concentration cellulaire plus faible que lors des autres conditions de culture (Tableau III.4).

**Tableau III.3.** Concentrations cellulaires pour les jours 2 et 3 de culture pour *Chlorella vulgaris*, en fonction de la concentration de CO<sub>2</sub> et de l'intensité lumineuse appliquées.

| Jours                             | 2% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>180 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| X ( $10^{10}\text{cell.L}^{-1}$ ) |                                                                  |                                                                   |                                                                  |                                                                   |
| 2                                 | 1,2                                                              | 1,45                                                              | 0,8                                                              | 1                                                                 |
| 3                                 | 3                                                                | 3,5                                                               | 1,9                                                              | 4,4                                                               |

A noter qu'une partie de la lumière est absorbée même lorsque la concentration cellulaire est nulle (Figure III.9), en effet un essai a été réalisé avec le réacteur rempli de milieu de culture sans algue et on obtient un rapport de l'intensité de lumière absorbée sur l'intensité incidente de 0,3, comme précédemment vu dans le paragraphe III.B. On considère la contribution du réacteur et de son contenu liquide sans algue est:

$$I_{in} - I_{out} = 0,3.I_{in} = \Delta I_{\text{réacteur}} \quad (\text{III.19})$$

A partir de l'équation (III.16), on peut écrire que dans le réacteur, lors d'une culture de *C. vulgaris* :

$$\Delta I_{total} = \Delta I_{réacteur} + \Delta I_{algues} \quad (III.20)$$

$$\Delta I_{algues} = I_{in} - I_{out} - 0,3 \cdot I_{in} \quad (II.21)$$

$$\Delta I_{algues} = 0,7 \cdot I_{in} - I_{out} \quad (III.22)$$

D'après l'équation (III.19) l'intensité de lumière moyenne absorbée par les algues est donc :

$$\Delta I_{algues} \sim 0,7 \cdot I_{in} \quad (III.23)$$

car  $I_{out}$  est toujours très faible, pour des concentrations cellulaires supérieures à  $2 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup>.

- *Exploitation des résultats expérimentaux*

Les résultats obtenus en culture batch sont utilisés dans un premier temps pour déterminer la constante de demi-saturation  $K_E$  et le quota d'azote intracellulaire minimal du modèle de Droop  $q_{min}$  (ou  $y_{min}$ ). La valeur de  $K_E$  doit être la même quelles que soient les conditions de culture, par contre  $q_{min}$  peut varier. Il est supposé qu'à partir du jour 3 des cultures, les deux limitations par la lumière et par l'azote peuvent coexister. La vitesse spécifique de croissance se décompose en deux termes : un terme de lumière indiquant la limitation par la lumière TL

$$= \frac{(I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}}{K_E + (I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}} \text{ et un terme (appelé terme de Droop) } TD = (1 - y_{min}/y) \text{ relatif à la limitation}$$

par l'azote intracellulaire.

Le terme TL peut s'exprimer selon :

$$\frac{1}{1 + \frac{K_E \cdot V \cdot X}{A \cdot 0,7 \cdot I_{in}}}$$

On notera  $\beta$  le terme  $\frac{K_E \cdot V}{A \cdot 0,7 \cdot I_{in}}$ , qui est constant pour chaque essai car il ne dépend que de  $I_{in}$ .

D'après l'équation III.12, il vient :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \mu_0 \frac{1}{1+\beta X} \left(1 - \frac{y_{min}}{y}\right) X \quad (III.24)$$

On modélise l'évolution de la fraction massique d'azote dans la cellule  $y$  après 3 jours. On verra avec les résultats expérimentaux que  $y$  peut être modélisé de façon très correcte par une exponentielle en fonction du temps :  $y = b \exp(-\delta t)$ .

$$\frac{dX}{dt} = \mu_0 \cdot \left(1 - \frac{y_{min}}{y}\right) \cdot \frac{1}{1+\beta X} \cdot X \quad (III.25)$$

$$\frac{1+\beta \cdot X}{X} dX = \mu_0 \left(1 - \frac{y_{min}}{y}\right) dt = \mu_0 \left[1 - \frac{y_{min}}{b \cdot \exp(-\delta t)}\right] dt \quad (III.26)$$

$$\frac{1+\beta \cdot X}{X} dX = \mu_0 \left[1 - \frac{y_{min}}{b} \cdot \exp(\delta t)\right] dt \quad (III.27)$$

En intégrant l'équation (III.27) on obtient :

$$\ln(X) + \beta \cdot X = \mu_0 \left[t - \frac{y_{min}}{b \cdot \delta} \cdot \exp(\delta t)\right] + cte \quad (III.28)$$

$$\ln(X) + \beta \cdot X = \mu_0 \left[t - \frac{y_{min}}{\delta \cdot y}\right] + cte \quad (III.29)$$

On va donc exploiter la relation  $\ln(X) - \mu_0 t = -\beta X - \frac{y_{min}}{\delta \cdot y} + cte$

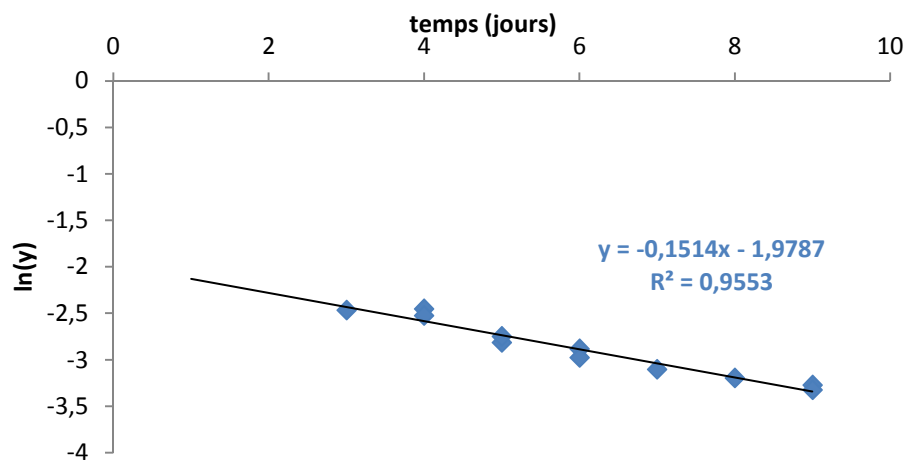
Il suffit donc de faire une régression linéaire de la fonction  $\ln(X) - \mu_0 t$  en fonction des deux variables  $X$  et  $1/y$ .

- *Détermination de  $K_E$*

On a exploité les deux répliquas à  $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  car ce sont dans ces conditions que nous avons le plus de résultats expérimentaux. La valeur de  $K_E$  obtenue sera retenue pour l'exploitation des autres cultures, puisque celle-ci est une constante.

On trouve dans ce cas  $y = 0,14 \exp(-0,15 t)$  (Figure III.10); les coefficients de corrélation donnent  $\beta$  et  $y_{min}$  :  $\beta = 2,48 \times 10^{-11} \text{ L} \cdot \text{cell}^{-1}$  et  $y_{min} = 0,033$  (coefficient de régression de 0,99).

Ceci donne la valeur de  $K_E = 1,4 \times 10^{-10} \mu\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .



**Figure III.9.** Modélisation de la fraction massique d'azote dans la cellule,  $y$ , après trois jours pour *C. vulgaris* cultivée avec une intensité lumineuse de  $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

- Détermination de  $y_{\min}$  pour les autres cultures

On fera de même pour les autres cultures de façon plus simple puisque l'on connaît  $K_E$ , donc  $\beta$ .

On portera donc  $\ln(X) - \mu_0 t + \beta X$  en fonction de  $1/y$  ; on devra trouver une droite de pente  $-y_{\min}/\delta$ . Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant.

**Tableau III.4.** Modélisation de  $y$  en fonction du temps  $y = b \exp(-\delta t)$  et valeurs de  $y_{\min}$  pour différentes conditions de culture

|                              | 2% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ | 13% CO <sub>2</sub> ,<br>180 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>b</b>                     | 0,13                                                                                | 0,18                                                                                 | 0,14                                                                                 |
| <b><math>\delta</math></b>   | 0,13                                                                                | 0,10                                                                                 | 0,15                                                                                 |
| <b><math>y_{\min}</math></b> | 0,047                                                                               | 0.033                                                                                | 0.030                                                                                |

On obtient donc des  $y_{\min}$  de même ordre de grandeur pour les différentes cultures. Nous n'avons pu exploiter de cette façon la culture à  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  car les valeurs de  $y$  sont dispersées.

Nous exploiterons cette culture lors de la simulation globale ultérieure.

- *Détermination de la constante de demi-saturation ( $K_N$ ) et de la vitesse maximale de consommation de nitrate ( $\rho_m$ )*

L'évolution de la concentration des nitrates (exprimées en équivalent azote) dans le milieu de culture peut s'écrire:

$$-\frac{dN}{dt} = \rho_m \cdot \frac{N}{N+K_N} \cdot X \quad (\text{III.30})$$

Avec :

$N$  : concentration en nitrate équivalent azote dans le liquide (gN.L<sup>-1</sup>)

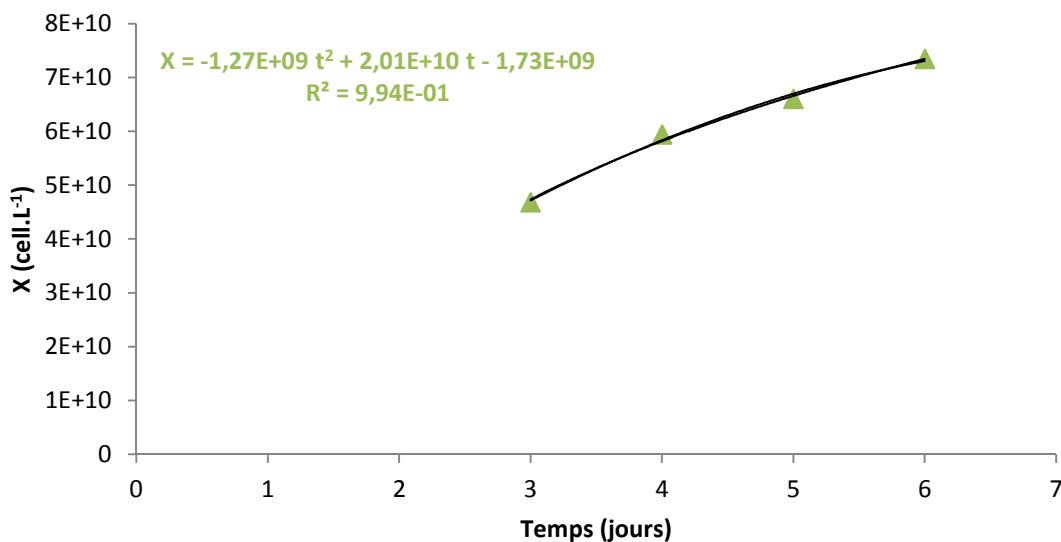
$K_N$  : constante de demi-saturation pour les nitrates, exprimée en équivalent azote (gN.L<sup>-1</sup>)

$\rho_m$  : constante de vitesse de consommation des nitrates (gN.cell<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

Pour la détermination de la constante de demi-saturation  $K_N$  et la vitesse maximale de consommation de nitrate  $\rho_m$ , on utilisera les données expérimentales de la culture de *C. vulgaris* cultivée à 13% CO<sub>2</sub> et avec une intensité lumineuse de 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

On commence par modéliser l'évolution de la concentration cellulaire,  $X$ , en fonction du temps entre les jours 3 et 6 par une régression polynômiale d'ordre 2.



**Figure III.10.** Régression de la concentration cellulaire,  $X$ , en fonction du temps pour 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et 13% CO<sub>2</sub>

On obtient :

$$X = -1,27 \times 10^9 \cdot t^2 + 2 \times 10^{10} \cdot t - 1,73 \times 10^9 \quad (\text{III.31})$$

$$\frac{N+K_N}{N} dN = \rho_m \cdot (-1,27 \times 10^9 \cdot t^2 + 2 \times 10^{10} \cdot t - 1,73 \times 10^9) dt \quad (\text{III.32})$$

En intégrant l'équation III.32, on obtient :

$$-N \cdot -K_N \cdot \ln(N) = \rho_m \cdot \left( -\frac{1,27}{3} \times 10^9 \cdot t^3 + \frac{2}{2} \times 10^{10} \cdot t^2 - 1,73 \times 10^9 \cdot t \right) + cte \quad (\text{III.33})$$

$$-N \cdot -K_N \cdot \ln(N) = \rho_m \cdot f(t) + cte \quad (\text{III.34})$$

On fait une régression linéaire de  $f(t)$  par rapport à deux variables  $N$  et  $\ln(N)$ . Les deux coefficients donnent  $\rho_m$  et  $K_N$ .

On trouve :

$$f(t) = -6,23 \times 10^{11} \cdot N - 1,66 \times 10^{10} \cdot \ln(N) + 7,38 \times 10^{10}, \text{ avec } r^2=1 \quad (\text{III.35})$$

**Tableau III.5.** Vitesse maximale de consommation de nitrate ( $\rho_m$ ) et constante de demi-saturation pour les nitrates ( $K_N$ ) pour la culture de *C. vulgaris*.

| $K_N$ (g.L <sup>-1</sup> ) | $\rho_m$ (gN.cell <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>0,03</b>                | 1,4.10 <sup>-12</sup>                                 |

$K_N$  et  $\rho_m$  étant des constantes relatives à la concentration de nitrate dans le milieu de culture, ces valeurs doivent être les mêmes pour toutes les conditions de culture appliquées à *C. vulgaris* lors de cette étude.

Sciandra et Ramani (1994) rapportent une valeur de vitesse maximale de consommation de nitrates  $\rho_m$  de  $0,85 \times 10^{-12}$  g N.cell<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans l'étude présentée ici.

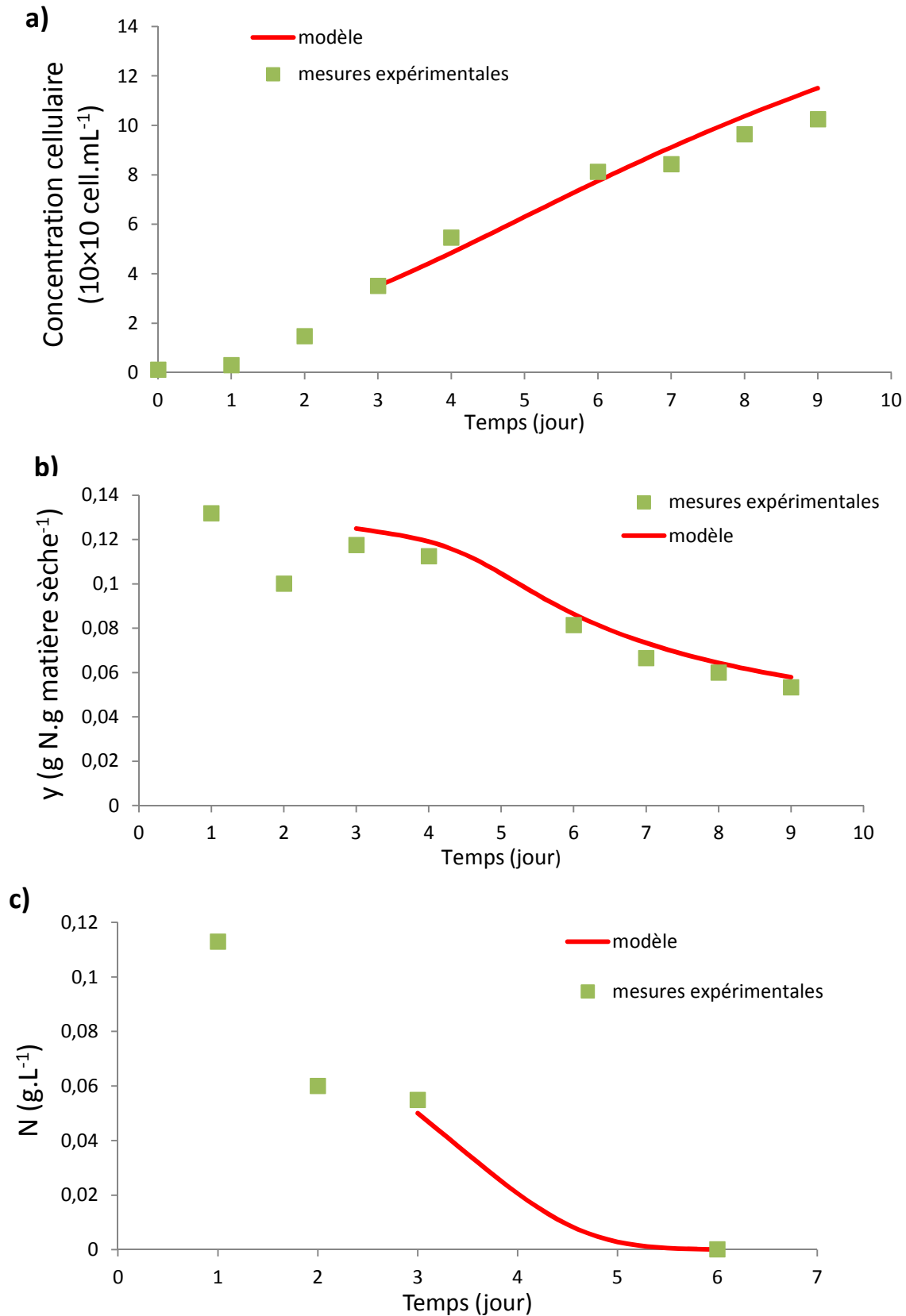
Des valeurs de  $K_N$  similaires ont été rapportées dans d'autres études sur *C. vulgaris* (Aslan et Kapdan, 2006 ; Rowley, 2010). Cependant, de nombreux auteurs rapportent des valeurs beaucoup plus faibles (Sciandra et Ramani, 1994 ; Bougaran et al., 2010). De nombreux facteurs peuvent influencer les paramètres  $K_N$  et  $\rho_m$  tels que la concentration en nitrate et en phosphate dans le milieu, la température, la taille des cellules (Eppley *et al.*, 1969; Hein *et al.*, 1995 ; Bougaran *et al.*, 2010). A partir des résultats de cette étude, il est difficile de tirer des conclusions pour tenter d'expliquer cette valeur.

### III.C.3. Validation du modèle de croissance

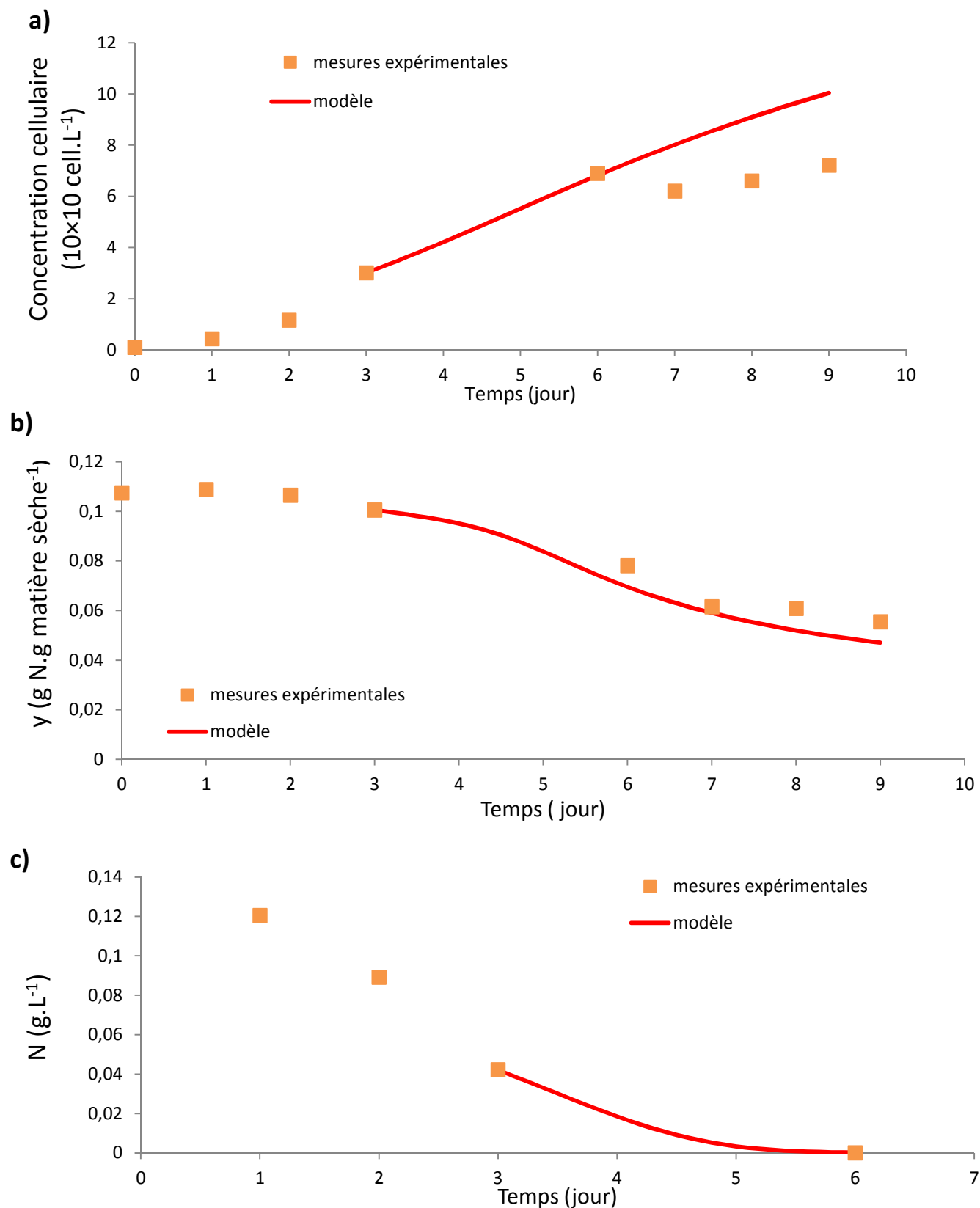
Afin de valider le modèle de croissance de *C. vulgaris* proposé, nous le comparons aux valeurs expérimentales obtenues en batch pour les cultures de *C. vulgaris* cultivées à 13% et 2% CO<sub>2</sub> et avec des intensités lumineuses de 50 et 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (ces données n'ont pas été utilisées pour la détermination des constantes  $K_E$ ,  $\rho_m$  et  $K_N$ ). La comparaison des résultats du modèle et les données expérimentales a été également faite pour les cultures réalisées dans les autres conditions. Les Figures III.11, III.12, III.13 et III.14 présentent la comparaison entre les mesures expérimentales et les résultats du modèle pour l'évolution de la concentration cellulaire (a), de la fraction massique en azote intracellulaire (b) et de la concentration de nitrate (équivalent azote) dans le liquide (c), avec le  $y_{\min}$  déterminé expérimentalement.

En ce qui concerne la culture à 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , le  $y_{\min}$  n'ayant pu être déterminé au préalable, nous avons essayé différentes valeurs entre 0 et 0,04 ; la meilleure concordance a lieu pour une valeur de  $y_{\min}$  très faible devant  $y$ , à savoir pour un terme de Droop proche de 1. Dans ce cas-là, la croissance est seulement limitée par la lumière et non par l'azote intracellulaire.

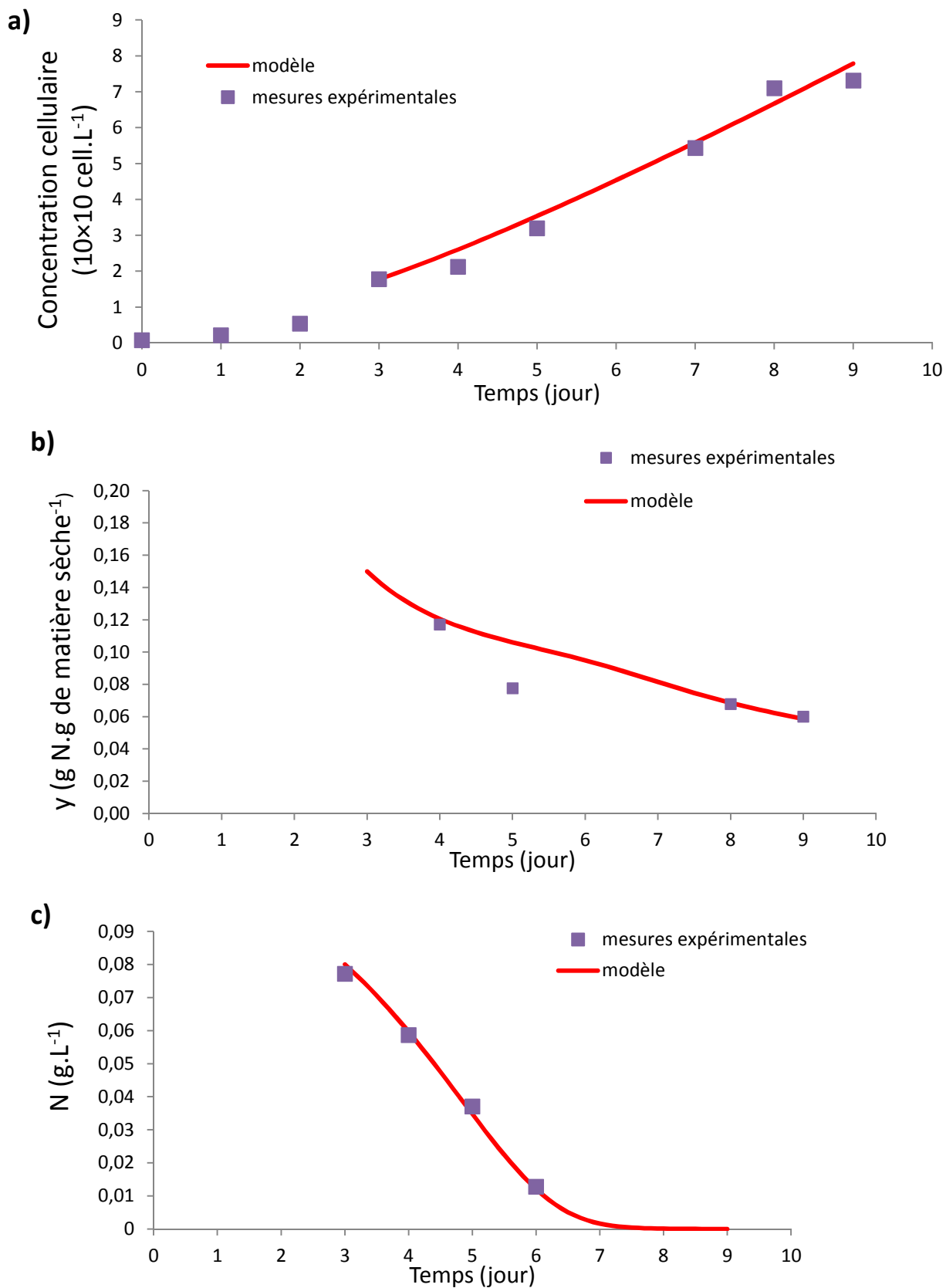
Tout d'abord le modèle est validé avec les données non utilisées pour la détermination des paramètres (Figures III.11 à III.13).



**Figure III.11.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub>, 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

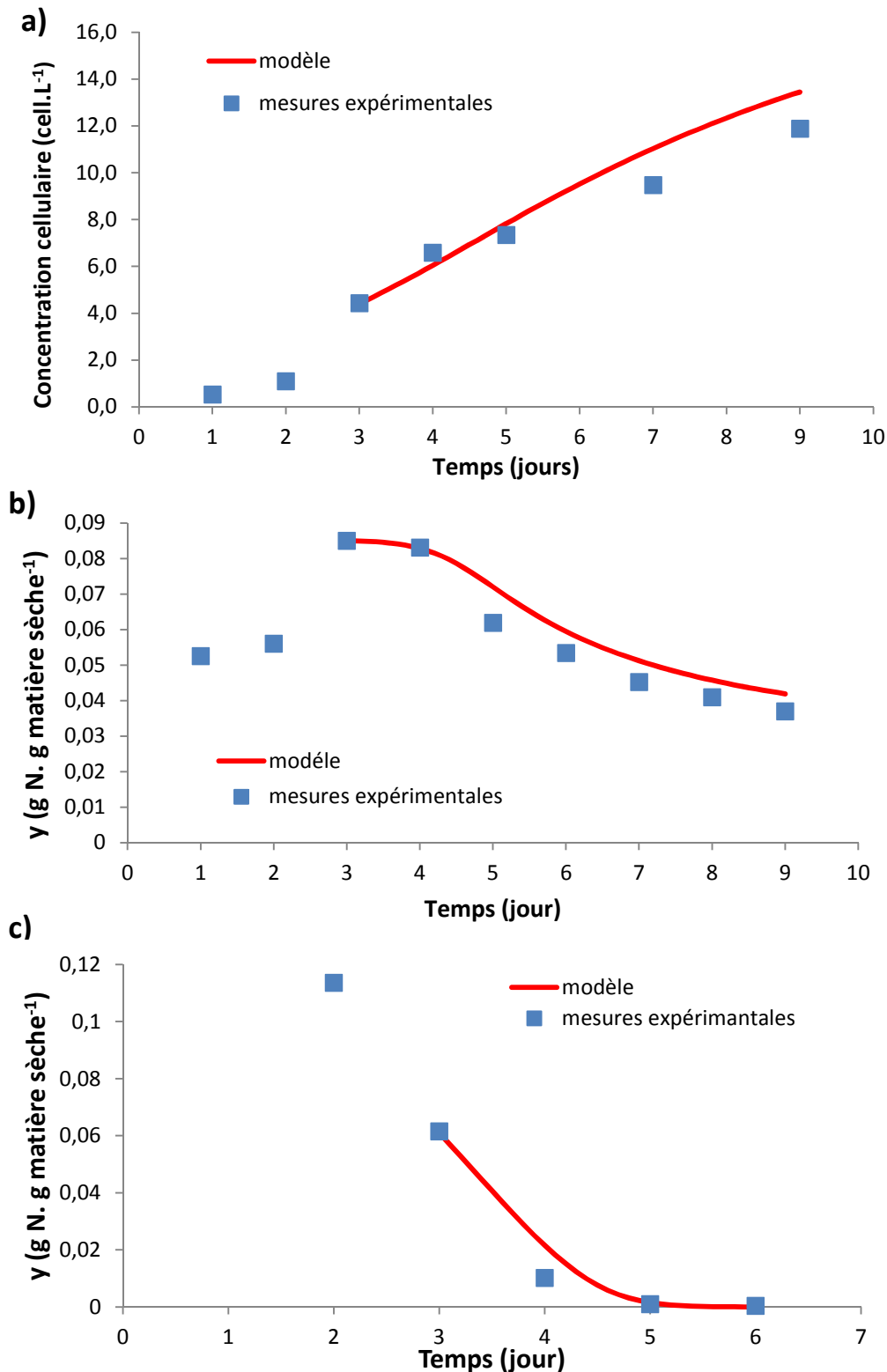


**Figure III.12.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 2% de CO<sub>2</sub>,  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$



**Figure III.13.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub>, 50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>

La Figure III.14 vérifie la validité du modèle avec les valeurs expérimentales pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub> et 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .



**Figure III.14.** Comparaison entre les résultats obtenus par l'expérimentation et le modèle pour a) l'évolution de la concentration cellulaire, b) l'évolution de la fraction azote intracellulaire et c) l'évolution de la concentration en azote dans le liquide pour *C. vulgaris* cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub>, 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Pour les cas présentés, à l'exception de la Figure III.12.a, la modélisation est en accord avec les valeurs expérimentales. Lorsque la croissance de *C. vulgaris* est limitée par la quantité de lumière perçue par la cellule et le quota intracellulaire en azote (Figure III.11 et III.14) ou bien uniquement par la lumière (Figure III.13) le modèle représente correctement les différents paramètres mesurés.

Cependant, la Figure III.12 présentant la croissance de *C. vulgaris* à 2% de CO<sub>2</sub> et avec une intensité lumineuse de 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , montre que le modèle surestime la concentration cellulaire à partir du jour 7 (III.12.a). En effet d'après les mesures expérimentales la culture atteint sa phase stationnaire de croissance au jour 6. A l'inverse, le modèle décrit la croissance de *C. vulgaris* comme étant non-exponentielle jusqu'à la fin de la période de culture. Or il a été observé précédemment (III.B) que *C. vulgaris* cultivée avec 2% de CO<sub>2</sub> et 120  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  entre en phase stationnaire de croissance lorsque il n'y a presque plus de nitrate dans le milieu de culture. Il semblerait que lorsqu'elles sont cultivées avec 2% de CO<sub>2</sub>, les cellules de *C. vulgaris* aient recourt à un mécanisme de transport actif du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour alimenter la cellule en carbone inorganique (III.B). Ce transport nécessitant un apport d'énergie sous la forme d'ATP et une enzyme appelée anhydrase carbonique, il est fortement impacté lorsque presque tout l'azote a disparu du milieu, ce qui entraîne le changement de phase de croissance (Kaplan *et al.*, 1987; Turpin, 1991 ; Young and Beardall, 2004). Pour que le modèle puisse représenter correctement la croissance de *C. vulgaris* à partir du jour 7, il faudrait y intégrer un terme représentant la limitation par le carbone inorganique dans le milieu de culture une fois l'azote épuisé.

Cependant, malgré ces écarts, le modèle semble tout à fait adapté lorsqu'interviennent simultanément une limitation en azote et une limitation en lumière dans la culture. Le modèle est donc validé à partir de nos résultats expérimentaux.

### **III.D. Conclusion**

L'étude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur en mode batch a permis d'évaluer la faisabilité de l'utilisation de cette espèce pour un procédé de captage du CO<sub>2</sub>. Bien que *C. vulgaris* ait été limitée par la lumière et les nitrates dans le milieu de culture,

lorsqu'elle était cultivée avec 13% de CO<sub>2</sub> et une intensité lumineuse de 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  elle a présenté une production de biomasse (2,10  $\text{g.L}^{-1}$ ) et une biofixation du CO<sub>2</sub> (1,45  $\text{g CO}_2.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) plus élevées que ce qui est rapporté dans la littérature. Il est également intéressant de noter que lorsque les nitrates étaient complètement épuisés du milieu de culture, les cellules cultivées avec 13% de CO<sub>2</sub> étaient encore capables de croître alors que les cellules cultivées avec 2% de CO<sub>2</sub> entraient en phase stationnaire de croissance. Il ne nous a pas été possible de mesurer la concentration en carbone inorganique dissous lors de cette étude, ce qui ne nous permet pas de conclure à un effet direct de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le milieu. Cependant les différences de pH mesurées nous permettent de mettre en lumière des rapports HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> différents dans les deux cultures, ce qui aurait entraîné des mécanismes d'assimilation du carbone inorganique différents. Les cellules consommant CO<sub>2</sub> sont avantagées, car bien que la limitation en nitrate puisse affecter l'activité de la Rubisco, assimiler le carbone inorganique sous la forme CO<sub>2</sub> est moins coûteux en énergie, ce qui permet à la cellule d'allouer ces molécules énergétiques préférentiellement à d'autres métabolismes permettant ainsi le maintien de l'activité cellulaire. Des études ont montré que la prédominance d'une espèce par rapport à une communauté phytoplanctonique lors d'enrichissement du milieu en CO<sub>2</sub> est due à sa capacité à efficacement assimiler CO<sub>2</sub> (Riebsell, 2004 ; Beardall et Stojkovic, 2006). De plus une augmentation de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation entraîne une plus forte excrétion d'EPS dans le milieu de culture. Ceci peut être un avantage dans un procédé de captation du CO<sub>2</sub> car cela signifie une plus grande fixation de CO<sub>2</sub> par les cellules. L'excrétion de composés organiques dissous, dont font partie les EPS, pourrait être une adaptation de la cellule afin de maintenir son intégrité intracellulaire lorsqu'elle n'est pas en mesure de métaboliser ces composés (Gordillo *et al.*, 2003). Donc la forme sous laquelle le carbone inorganique est assimilé par la cellule est un facteur clé dans la promotion de la croissance cellulaire. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si nos observations sont dues directement au carbone inorganique ou bien à la variation de pH. Il serait également nécessaire de faire des mesures de carbone inorganique dissous. Cependant, cette étude laisse envisager que l'optimisation des conditions de culture pourrait amener à un meilleur rendement du procédé et que donc *C. vulgaris* est une espèce prometteuse pour un tel procédé.

Cette étude a également permis la proposition d'un modèle pour la croissance de *C. vulgaris* et la détermination des paramètres associés à celui-ci. Le modèle prend en compte la limitation par la lumière au travers d'une fonction de type Michaelis-Menten et la limitation par les nitrates via un terme de Droop. Nous sommes donc partis de l'hypothèse que la

croissance de *C. vulgaris* était limitée par la quantité de lumière reçue ainsi que par le quota d'azote intracellulaire. Ce modèle a pu être validé par les résultats expérimentaux.

Cependant, lors de la détermination des paramètres du modèle, il n'a pas été possible de déterminer par le calcul la valeur de  $y_{\min}$  pour une intensité lumineuse de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 13% de CO<sub>2</sub>. Afin de pouvoir modéliser la croissance de l'algue dans ces conditions, nous avons cherché la valeur qui permettait la meilleure concordance entre le modèle et les valeurs expérimentales. Il en ressort que pour valider le modèle dans ces conditions, le terme de Droop doit être égal à 1 et donc que la croissance de *C. vulgaris* ne serait pas limitée par le quota intracellulaire d'azote. Ceci est en accord avec les conclusions tirées de l'étude en batch (III.B). Cependant dans un souci de rigueur et pour valider cette hypothèse de non limitation par l'azote dans ces conditions de culture, il sera nécessaire de mener une étude plus précise pour mesurer  $y_{\min}$ .



## **Chapitre IV**

# **Etude de l'influence du taux de dilution et de la concentration en nitrate sur la croissance et la fixation de CO<sub>2</sub> de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur continu**

Pour qu'un procédé de culture de microalgues soit économiquement viable, il faut qu'une forte densité cellulaire puisse être atteinte. Seuls les photobioréacteurs fonctionnant en continu sont capables d'atteindre cette exigence (Banerjee *et al.*, 2002). L'étude de la culture de microalgues en continu pour le captage du CO<sub>2</sub> nécessite encore d'être approfondie pour être en mesure de proposer un procédé fiable et efficace. Pour cela il est nécessaire d'étudier les différents facteurs influençant la culture de l'algue. Il faut également être capable de savoir prédire le comportement des cellules face à des variations des conditions de culture.

Dans l'étude proposée dans ce chapitre, *Chlorella vulgaris* a été cultivée en photobioréacteur en mode continu avec deux taux de dilution et deux concentrations de nitrate afin d'étudier sa capacité à assimiler le CO<sub>2</sub>.

## IV.A. Matériel et méthodes

### IV.A.1. Conditions expérimentales

*C. vulgaris* a été cultivée en culture continue avec une concentration de CO<sub>2</sub> de 13% dans le gaz d'entrée et une intensité lumineuse de 125  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Le montage du réacteur en continu est présenté dans le chapitre II.A.2.

Trois expérimentations ont été menées sur une durée de trois mois. Deux taux de dilution (0,22  $\text{j}^{-1}$  et 0,31  $\text{j}^{-1}$ ) ont été appliqués, ainsi que deux concentrations de nitrate dans le milieu d'alimentation du réacteur (0,14  $\text{g.L}^{-1}$  et 0,18  $\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  exprimé en équivalent N).

De plus, un essai témoin a été réalisé afin de s'assurer que le montage du réacteur ne présentait pas de fuite et qu'aucune réaction abiotique ne se produisait entre le milieu de culture et le CO<sub>2</sub> du gaz entrant. Cet essai, en mesurant la composition en CO<sub>2</sub> du gaz en entrée et en sortie du réacteur, et en suivant la concentration de carbone inorganique dissous a permis de s'assurer que le carbone inorganique dissous atteignait au bout d'un certain temps la concentration en équilibre avec le gaz, ce qui prouve qu'aucune réaction chimique ne se produit entre le milieu et CO<sub>2</sub>.

Il a été démontré dans le chapitre précédent que le réacteur se comportait comme un réacteur parfaitement agité (III.A).

#### IV.A.2. Analyses

Deux fois par jour des échantillons de la culture sont prélevés pour mesurer la concentration cellulaire. De plus, une fois l'état stationnaire atteint des prélèvements en duplicat sont réalisés pour mesurer la fraction intracellulaire en carbone (yC) et en azote (yN), la concentration d'exopolysaccharide (EPS), la concentration de carbone organique dissous (DOC), la matière sèche et la concentration en nitrate dans le réacteur. La concentration en nitrate dans le milieu de culture est mesurée lorsque la bouteille de milieu est changée.

Lors de cette étude, la matière sèche par cellule (g.cell<sup>-1</sup>) est mesurée par la méthode de filtration (voir Chapitre II.B.6). Cette mesure est donc obtenue différemment de la valeur p présentée dans le chapitre précédent ; afin d'éviter toute confusion elle sera notée MS dans l'étude présentée ici. Les méthodes et principes pour les différentes analyses sont reportés dans le chapitre II.

#### IV.A.3. Calcul de la productivité et de la biofixation de *Chlorella vulgaris* lors de la culture en continu

Le taux de dilution est calculé par

$$D = \frac{Q}{V} \quad (IV.1)$$

Avec:

Q : le débit de liquide (L.j<sup>-1</sup>)

V : le volume utile du réacteur (L)

La productivité en biomasse  $R_x$  (g.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) se calcule d'après l'Equation (IV.2)

$$R_x = X * D * MS \quad (IV.2)$$

Avec:

X: concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

MS: masse de matière sèche par cellule pour *C. vulgaris* (g.cell<sup>-1</sup>)

La biofixation du CO<sub>2</sub>,  $R_{CO_2}$  (mol C.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) est la somme du quota intracellulaire de carbone et du carbone organique dissous :

$$R_{CO_2} = ((MS \cdot y_C \cdot X + [DOC]) \cdot D) / M_C \quad (IV.3)$$

Avec:

$MS$ : masse de matière sèche par cellule pour *C. vulgaris* (g.cell<sup>-1</sup>)

$y_C$  : fraction massique de carbone dans les cellules de *C. vulgaris* (g C. g de MS<sup>-1</sup>)

$[DOC]$ : concentration de carbone organique dissous (gC.L<sup>-1</sup>)

$M_C$  : masse molaire du carbone (= 12 g.mol<sup>-1</sup>)

**Tableau IV.1** Valeurs de matière sèche par cellule (MS) et de fraction en carbone intracellulaire pour la culture de *Chlorella vulgaris* avec différents taux de dilution (D) et différentes concentrations d'azote dans le milieu de culture (N<sub>0</sub>) à l'état stationnaire

|                                          | D = 0,22 j <sup>-1</sup> , N <sub>0</sub> =<br>0,14 g.L <sup>-1</sup> | D = 0,31 j <sup>-1</sup> , N <sub>0</sub> =<br>0,14 g.L <sup>-1</sup> | D = 0,31 j <sup>-1</sup> , N <sub>0</sub> =<br>0,18 g.L <sup>-1</sup> |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| MS (g.cell <sup>-1</sup> )               | 2,4×10 <sup>-11</sup>                                                 | 2,1×10 <sup>-11</sup>                                                 | 1.6×10 <sup>-11</sup>                                                 |
| y <sub>C</sub> (g C.g MS <sup>-1</sup> ) | 0.5                                                                   | 0.5                                                                   | 0.5                                                                   |

On peut constater que la teneur en carbone des cellules est constante et que la masse de matière sèche par cellule est du même ordre de grandeur dans les 3 essais. Ces résultats sont très comparables à ceux obtenus en batch.

#### IV.A.4. Bilans carbone dans la phase gazeuse et dans la phase liquide

A l'état stationnaire le bilan carbone sur la phase gazeuse est le suivant (Equation IV.4)

$$\frac{Q_g}{Vm} \cdot Y_0 = \frac{Q_g}{Vm} \cdot Y_f + k_L a \cdot V \cdot ([CO_2^*] - [CO_2])$$

|                  |            |                        |
|------------------|------------|------------------------|
| Mol C/h          | Mol C/h    | Mol C/h transférées    |
| entrant          | sortant du | du gaz vers le liquide |
| dans le réacteur | réacteur   |                        |

$Y_0$  : fraction molaire de CO<sub>2</sub> dans le gaz entrant dans le réacteur

$Y_f$  : fraction molaire de CO<sub>2</sub> dans le gaz sortant du réacteur

$Q_g$  : débit volumique gazeux (L.h<sup>-1</sup>)

$Vm$  : volume molaire du gaz à 25°C et 1 atm (L.mol<sup>-1</sup>)

$k_L$  : coefficient de transfert du CO<sub>2</sub> (m.s<sup>-1</sup>)

$a$  : aire interfaciale des bulles de CO<sub>2</sub> par unité de volume (m<sup>2</sup>.m<sup>-3</sup>)

$[CO_2]^*$  : concentration maximale de CO<sub>2</sub> pouvant se dissoudre dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>), correspondant à l'équilibre avec la phase gazeuse

$[CO_2]$  : concentration de CO<sub>2</sub> dissous dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$V$  : volume utile du réacteur (L)

A l'état stationnaire le bilan carbone sur la phase liquide est donné par l'Equation (V.5) :

$$Q[CIT]_0 + k_L a \cdot V \cdot ([CO_2^*] - [CO_2]) = Q \cdot [CIT] + (Q \cdot [DOC])/M_C + (Q \cdot y_C \cdot MS \cdot X)/M_C$$

|              |                              |                  |                       |                 |
|--------------|------------------------------|------------------|-----------------------|-----------------|
| moles C/h    | moles C/h transférées du gaz | moles C/h        | moles C/h carbone     | moles C/h       |
| entrant avec | vers le liquide              | carbone          | organique quittant le | carbone         |
| le liquide   |                              | inorganique      | réacteur par la       | intracellulaire |
| dans le      |                              | dissous quittant | surverse              | quittant le     |
| réacteur     |                              | le réacteur par  |                       | réacteur par la |
|              |                              | la surverse      |                       | surverse        |

Avec:

$[CIT]$ : concentration en carbone inorganique total dissous dans le réacteur (mol.L<sup>-1</sup>)

$[CIT]_0$ : concentration en carbone inorganique total dans le milieu de culture (mol.L<sup>-1</sup>)

$[CIT]_0$  est considéré être négligeable car le milieu de culture ne contient pas de carbonate, donc

$[CIT]_0$  correspond à la concentration en CO<sub>2</sub> dissous dans le liquide lorsque le CO<sub>2</sub>

atmosphérique est à l'équilibre avec le milieu (0,036% CO<sub>2</sub>).

$[CO_2^*]$  est calculé d'après la loi de Henry :

$$CO_2^* = \frac{P_{CO_2}}{H} = \frac{P_t Y_f}{H} \quad (IV.6)$$

Avec:

$P_{CO_2}$  : pression partielle de CO<sub>2</sub> dans le gaz (atm)

$H_{CO_2}$  : constante de Henry (L.atm.mol<sup>-1</sup>) à 25°C

$P_t$  : pression totale dans le réacteur (atm)

$Y_f$ : fraction molaire de CO<sub>2</sub> dans le gaz sortant du réacteur

La concentration de carbone inorganique total dissous dans le réacteur  $[CIT]$ , est:

$$[CIT] = [CO_2] \cdot \left( 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 \cdot K_2}{[H^+]^2} \right) \quad (IV.7)$$

Avec  $K_1$  et  $K_2$  les constantes de dissociation de l'acide carbonique dans le liquide (25°C).

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

Avec :

$[CO_2]$  : concentration en CO<sub>2</sub> dissous dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$[HCO_3^-]$  : concentration en  $HCO_3^-$  dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

$[CO_3^{2-}]$  : concentration en  $CO_3^{2-}$  dans le liquide (mol.L<sup>-1</sup>)

La valeur du coefficient volumique de transfert  $k_L a$  est donnée par l'étude précédente (III.A.2).

On utilisera donc la valeur de 1,1 h<sup>-1</sup>.

#### IV.A.5. Bilan carbone dans le réacteur à l'état stationnaire

Flux de CO<sub>2</sub> perdu par le gaz (mol/h) :

$$\frac{Q_g}{V_M} \cdot (Y_0 - Y_f) \quad (IV.8)$$

Flux de CO<sub>2</sub> compris dans le carbone intracellulaire (mol/h) :

$$(y_C \cdot X \cdot MS \cdot Q_l) / M_C \quad (IV.8)$$

Flux de CO<sub>2</sub> compris dans le carbone organique dissous (mol/h)

$$([DOC] \cdot Q_l) / M_C \quad (IV.9)$$

Flux de CO<sub>2</sub> compris dans le carbone inorganique dissous (mol/h)

$$[CO_2^*] = \frac{P_T Y_f}{H}$$

D'après l'Equation IV.4 :

$$[CO_2] = \frac{P_T Y_f}{H} - \frac{N_g(Y_0 - Y_f)}{k_L a \cdot V}$$

$$[CIT] = Q_l \cdot 2,4 \cdot [CO_2] \quad (IV.10)$$

$$\text{avec : } 2,4 = 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 \cdot K_2}{[H^+]^2}$$

Le total du flux de CO<sub>2</sub> dans le liquide est la somme des équations IV.8, IV.9 et IV.10.

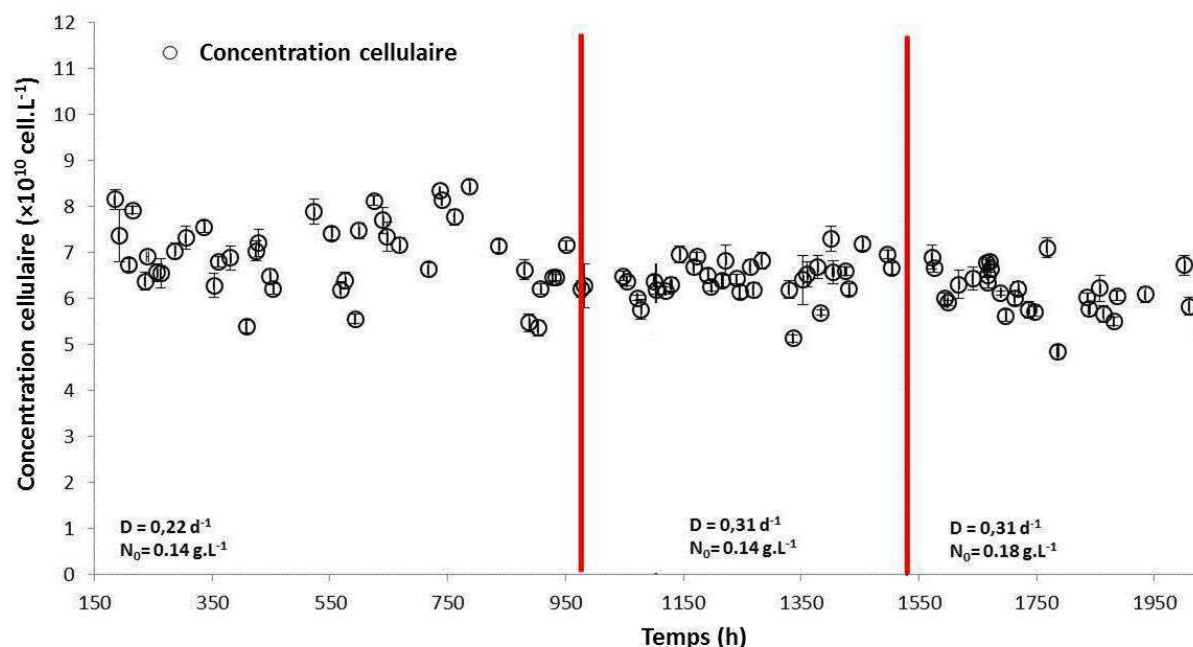
#### IV.A.6. Traitements statistiques

Les différences entre les moyennes des échantillons ont été testées à l'aide d'un test de Student (sous Excel). Les différences présentant une probabilité inférieure à 0,05% ( $p < 0,05$ ) sont considérées comme significatives.

### IV.B. Résultats

#### IV.B.1. Effet des différentes conditions de culture sur la concentration cellulaire de *Chlorella vulgaris*

La Figure IV.1 montre l'évolution de la concentration cellulaire de *Chlorella vulgaris* tout le long de la culture en continu en fonction des différentes conditions de culture appliquées (taux de dilution et concentration en nitrate dans le milieu d'alimentation). L'augmentation du taux de dilution ( $D$ ) entraîne une légère diminution de la concentration cellulaire. Par contre l'augmentation de la concentration en nitrate n'a pas d'impact sur la concentration cellulaire.



**Figure IV.1.** Evolution de la concentration cellulaire de *Chlorella vulgaris* en fonction du temps. Les lignes pointillées représentent le changement de conditions de culture.

#### IV.B.2. Effet du taux de dilution sur la biomasse et le rendement de fixation du CO<sub>2</sub> chez *Chlorella vulgaris*

Lors d'une culture en continu de *Chlorella vulgaris* avec une intensité lumineuse de 125  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 13% de CO<sub>2</sub>, le taux de dilution (D) a été augmenté de 0,22  $\text{j}^{-1}$  à 0,31  $\text{j}^{-1}$ . Lorsque l'on augmente le D la concentration de biomasse diminue ( $p < 0,05$ ) (Tableau 1). La productivité en biomasse, la biofixation de CO<sub>2</sub> par les algues augmente ( $p < 0,05$ ) (Tableau IV.2).

La concentration de biomasse maximale mesurée était de 1,65  $\text{g.L}^{-1}$  pour une valeur de D de 0,22  $\text{j}^{-1}$  et la productivité de biomasse maximale était de 0.44  $\text{g MS.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour D égale à 0.31  $\text{j}^{-1}$ .

**Tableau IV.2.** Valeurs de la concentration de biomasse (X), de la productivité ( $R_x$ ), de la biofixation du CO<sub>2</sub> ( $R_{\text{CO}_2}$ ), du quota de carbone interne (POC), de la concentration en carbone organique dissous ([DOC]), de la concentration d'exopolysaccharides ([EPS]) et de la concentration en nitrate exprimée en équivalent azote ( $\text{NO}_3^- \text{N}$ ) dans le réacteur à l'état stationnaire, pour *Chlorella vulgaris* cultivée en continu avec deux taux de dilution (D) et deux concentrations de nitrate dans le milieu de culture ( $N_0$ )

|                                                                              | D = 0,22 $\text{j}^{-1}$ $N_0 =$<br>0,14 $\text{g.L}^{-1}$ (eq N) | D = 0,31 $\text{j}^{-1}$ , $N_0 =$<br>0,14 $\text{g.L}^{-1}$ (eq N) | D = 0,31 $\text{j}^{-1}$ , $N_0 =$<br>0,18 $\text{g.L}^{-1}$ (eq N) |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| X ( $\text{g.L}^{-1}$ )                                                      | 1.65± 0.09                                                        | 1.36 ± 0.03                                                         | 1.1 ± 0.09                                                          |
| $R_x$ ( $\text{g MS.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ )                                 | 0.36 ± 0.02                                                       | 0.44 ± 0.09                                                         | 0.35 ± 0.02                                                         |
| $R_{\text{CO}_2}$ ( $\text{mol.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ )                      | 0.019 ± 8×10 <sup>-4</sup>                                        | 0.022 ± 2,9×10 <sup>-4</sup>                                        | 0.019 ± 1.6×10 <sup>-3</sup>                                        |
| [POC] ( $\text{mol.L}^{-1}$ )                                                | 0.07 ± 4×10 <sup>-3</sup>                                         | 0.06 ± 1×10 <sup>-3</sup>                                           | 0.05 ± 5×10 <sup>-3</sup>                                           |
| [DOC] ( $\text{mol.L}^{-1}$ )                                                | 0.02 ± 7×10 <sup>-4</sup>                                         | 0.01 ± 8×10 <sup>-4</sup>                                           | 0.01 ± 1×10 <sup>-4</sup>                                           |
| [EPS] ( $\text{mol.L}^{-1}$ )                                                | 5,7×10 <sup>-3</sup> ± 4,2×10 <sup>-4</sup>                       | 5,6×10 <sup>-3</sup> ± 3,5×10 <sup>-4</sup>                         | 6×10 <sup>-3</sup> ± 1,5×10 <sup>-4</sup>                           |
| Concentration en nitrate<br>(eq N) dans le réacteur<br>( $\text{g.L}^{-1}$ ) | 1×10 <sup>-3</sup> ± 2×10 <sup>-5</sup>                           | 2×10 <sup>-3</sup> ± 2×10 <sup>-4</sup>                             | 3×10 <sup>-2</sup> ± 2,9×10 <sup>-4</sup>                           |

Les valeurs de productivité en biomasse, trouvées lors de cette étude, sont en accord avec ce que d'autres articles rapportent. Pruvost et al. (2011) obtiennent une productivité de biomasse maximum de 17  $\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  lorsque *C. vulgaris* était cultivée dans un réacteur plan avec une

intensité lumineuse de  $270 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Si les valeurs de rendement de l'étude présentée ici sont converties dans les mêmes unités, celles-ci donnent une productivité de biomasse de  $7,9 \text{ g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour  $D = 0,22 \text{ j}^{-1}$  et  $9,2 \text{ g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour  $D = 0,31 \text{ j}^{-1}$ . Les différences observées avec l'étude de Pruvost et al. (2011) pourraient être attribuées aux conditions de cultures très différentes : une intensité lumineuse deux fois supérieure et une géométrie du réacteur très différente de ce qui est proposé dans cette étude.

En comparant ces résultats à d'autres espèces de microalgues (le terme englobe ici les microorganismes photosynthétiques : microalgues et cyanobactéries) des similarités apparaissent. La cyanobactérie *Anabaena sp.* présente une productivité maximale de  $0,31 \text{ g C.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour un  $D$  de  $0,35 \text{ j}^{-1}$  (Gonzalez Lopez et al., 2009). L'étude présentée ici rapporte une productivité maximale un peu supérieure de  $0,44 \text{ g C.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour un  $D$  sensiblement inférieur ( $0,31 \text{ j}^{-1}$ ). Gonzalez Lopez et ses collaborateurs ont également mesuré la production de carbone organique dissous (DOC) par *Anabaena sp.* ; ils rapportent une concentration maximale de  $0,58 \text{ g.L}^{-1}$  pour un  $D$  de  $0,45 \text{ j}^{-1}$ . *C. vulgaris* a présenté une excrétion maximale de DOC de  $0,24 \text{ gC.L}^{-1}$  ( $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ , Tableau IV.2) pour  $D$  égale à  $0,22 \text{ j}^{-1}$ . L'importance de la concentration de composés carbonés excrétés par une cellule est fortement dépendent de l'espèce concernée et des conditions de culture tel que l'âge des cellules ou encore la concentration en nutriments dans la culture (Gordillo et al., 2003 ; Henderson *et al.*, 2008) ; ceci pourrait expliquer les différences observées entre ces deux études.

Dans cette étude, la concentration en exopolysaccharides dans le milieu de culture (EPS) a également été mesurée. Il est intéressant de prendre en compte ces composés pour deux raisons : la première est leur utilité dans de nombreux secteurs industriels (cosmétique et pharmacologie) et la seconde est leur implication dans l'encrassement des parois des réacteurs menant à la formation de biofilms et donc à une moins bonne diffusion de la lumière dans la culture. Les EPS font partis des composés organiques dissous (DOC). Dans les conditions de culture appliquées ici, ils représentaient de 29% à 60% des DOC. La mesure des EPS se fait à l'aide de la méthode de dosage de Dubois (1956) pour laquelle le glucose a été choisi comme référence. Les EPS sont un assemblage d'oses tel que le glucose, le mannose, le xylose, etc (Takahashi et al., 2009). L'utilisation du glucose comme référence pour leur quantification peut donc entraîner une sous-estimation de la production réelle des EPS. Dans cette étude, le glucose a été choisi comme référence afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature.

Les DOC se composent aussi de protéines, de lipides, d'acides nucléiques et de petites molécules (Henderson *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant d'évaluer la part de chacun de ces composés dans la composition des DOC car ces substances peuvent avoir des propriétés intéressantes pouvant être valorisée dans l'industrie.

Pour déterminer la biofixation de CO<sub>2</sub>, la part de carbone entrant dans les quotas intracellulaires de carbone ainsi que celle entrant dans le carbone organique dissous ont été prises en compte (équation IV.3 et Tableau IV.2). A notre connaissance, peu d'études associent ces deux sources pour quantifier le CO<sub>2</sub> fixé par les algues ; en général uniquement le quota intracellulaire de carbone est considéré pour ce calcul. Hulatt *et al.* (2010) ont montré que *C. vulgaris* excrétaait 17% de carbone sous forme de DOC lorsqu'elle était cultivée en photobioréacteur en mode batch. Donc ne pas prendre en compte cette part de carbone organique revient à sous-estimer le calcul de R<sub>CO<sub>2</sub></sub> et donc l'efficacité du procédé pour le captage du CO<sub>2</sub>. Dans l'étude présentée, les DOC représentent 14% à 22% du carbone organique total dans le réacteur ; c'est donc une part non négligeable de CO<sub>2</sub> consommé.

La biofixation du CO<sub>2</sub> maximale relevée lors de cette étude est de 0,97 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> pour une valeur de D de 0,31 d<sup>-1</sup>. En continu, il existe peu d'études rapportant des mesures de la biofixation du CO<sub>2</sub> pour des microalgues. Gonzalez Lopez *et al.* (2009) rapportent une biofixation du CO<sub>2</sub> maximale de 1,45 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour une valeur de D de 0,5 d<sup>-1</sup> pour *Anabaena sp.* cultivée en photobioréacteur en mode continu avec une intensité lumineuse de 900 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Tang *et al.* (2011) mesurent une biofixation du CO<sub>2</sub> maximale de 0,26 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> lorsque *C. pyrenoidosa* est cultivée avec 10% de CO<sub>2</sub> et une intensité lumineuse de 180 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> dans un réacteur en mode batch. Peu d'études existent sur la culture de *Chlorella vulgaris* en continu et aucune n'a été trouvée présentant des résultats de biofixation de CO<sub>2</sub> (également concernant d'autres espèces de microalgues). Il est cependant reconnu que les conditions de culture influencent fortement la physiologie de l'algue et que des espèces différentes ne présentent pas les mêmes capacités physiologiques de fixation de CO<sub>2</sub>. Il est donc difficile dans ces conditions d'être en mesure de conclure quant aux divergences existantes entre les valeurs de cette étude et celles se trouvant dans la littérature. Cependant ce manque de données met en lumière la nécessité de conduire des études sur la biofixation de CO<sub>2</sub> par des microalgues, lors de cultures en continu.

#### *IV.B.3. Effet de la concentration en nitrate sur la biomasse et le rendement de fixation du CO<sub>2</sub> chez Chlorella vulgaris*

Afin de déterminer l'effet de la concentration en nitrate sur la culture de *C. vulgaris*, la concentration entrante en nitrate a été augmentée de 20% par rapport à la composition du milieu de culture Bristol pour un taux de dilution de 0,31 j<sup>-1</sup>. Dans le cas du milieu Bristol non enrichi, la concentration en régime stationnaire de ce nutriment était presque nulle (Tableau IV.2). Lorsque la concentration en nitrate est augmentée, la concentration à l'état stationnaire est de 0,03 g.L<sup>-1</sup>. Etonnamment, cette valeur correspond à la quantité de nitrate ajoutée dans le milieu de culture. De plus la concentration cellulaire n'a pas été modifiée par cet ajout de nitrate (Figure IV.1), par contre la concentration en biomasse a diminué ( $p < 0,05$ ) (Tableau IV.2). Nous pouvons certainement attribuer ce fait à la limitation prépondérante de la lumière.

#### *IV.B.4. Bilan carbone dans le réacteur à l'état stationnaire*

Lorsque le gaz carbonique contenu dans le gaz se dissout dans le liquide, il y a formation de carbone inorganique dissous, CO<sub>2</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans ce domaine de pH (6,5 environ). La concentration de carbone inorganique dissous dépend de la composition du gaz, de la vitesse du transfert de matière entre les deux phases et de la vitesse de consommation du carbone par les algues. Le carbone consommé par les algues peut se retrouver dans la cellule (quota intracellulaire de carbone, POC), ou être excrété par celles-ci (carbone organique dissous, DOC), le carbone résiduel reste dans le liquide sous forme de carbone inorganique.

A partir des mesures de CO<sub>2</sub> dans le gaz, de la concentration de DOC et de POC, un bilan carbone a été réalisé. Lors de cette étude il n'a pas été possible de mesurer la concentration en carbone inorganique dissous (CID) dans le liquide. A partir des bilans carbone sur la phase liquide, il est possible d'estimer cette concentration (équations IV.5 et IV.8).

Si la phase gazeuse était à l'équilibre avec la phase liquide, la concentration de CO<sub>2</sub>\* serait de  $4,2 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le liquide. Le pH étant de 6,5 et la constante de demi-saturation pour le CO<sub>2</sub> à 25°C, K<sub>1</sub> de 6,6, le CID est essentiellement composé de CO<sub>2</sub> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> à part égale. La concentration en CID varie de  $5,8 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> à  $6,7 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> suivant les expérimentations. La valeur de CO<sub>2</sub> dissous est donc comprise entre  $2,9 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et

$3,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Donc la phase liquide n'est pas tout à fait à saturation mais les cellules ne semblent pas limitées par l'apport de carbone inorganique dissous.

Le Tableau IV.3. présente la comparaison entre les flux de CO<sub>2</sub> dans la phase liquide et la phase gazeuse. Le flux de CO<sub>2</sub> de la phase gazeuse se retrouve donc majoritairement dans les cellules sous forme de carbone organique.

**Tableau IV.3.** Bilan carbone dans le réacteur. Comparaison entre les flux de CO<sub>2</sub> dans la phase liquide et celui dans la phase gazeuse

|                                                                                | Phase Liquide                                                           |                                                                           |                                                                             |                                                                                  | Phase gazeuse                               |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                                                                | Flux de CO <sub>2</sub> compris dans le carbone intracellulaire (mol/h) | Flux de CO <sub>2</sub> compris dans le carbone organique dissous (mol/h) | Flux de CO <sub>2</sub> compris dans le carbone inorganique dissous (mol/h) | Flux de total de CO <sub>2</sub> dans le liquide à la sortie du réacteur (mol/h) | Flux de CO <sub>2</sub> dans le gaz (mol/h) |
| <b>D = 0,22 j<sup>-1</sup></b><br><b>N<sub>0</sub> = 0,14 g.L<sup>-1</sup></b> | $2 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-4}$                               | $6,7 \times 10^{-4} \pm 2,3 \times 10^{-5}$                               | $2,26 \times 10^{-4}$                                                       | $3 \times 10^{-3}$                                                               | $2,9 \times 10^{-3}$                        |
| <b>D = 0,31 j<sup>-1</sup></b><br><b>N<sub>0</sub> = 0,14 g.L<sup>-1</sup></b> | $2 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-4}$                               | $4,4 \times 10^{-4} \pm 2,5 \times 10^{-5}$                               | $2,53 \times 10^{-4}$                                                       | $2,94 \times 10^{-3}$                                                            | $2,8 \times 10^{-3}$                        |
| <b>D = 0,31 j<sup>-1</sup></b><br><b>N<sub>0</sub> = 0,18 g.L<sup>-1</sup></b> | $1,5 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-4}$                             | $4,5 \times 10^{-4} \pm 3,1 \times 10^{-6}$                               | $2,61 \times 10^{-4}$                                                       | $2,24 \times 10^{-3}$                                                            | $2,5 \times 10^{-3}$                        |

#### IV.B.5. Description du modèle

Le modèle utilisé dans cette étude est celui défini dans le chapitre précédent (III.C). Les hypothèses émises sont les mêmes que précédemment, à savoir que la croissance cellulaire est limitée par la quantité de lumière disponible par cellules et par le quota intracellulaire d'azote. L'objectif est de vérifier si le modèle conçu précédemment décrit le comportement de la culture de *C. vulgaris* en réacteur continu.

Comme défini dans le chapitre III.C, la vitesse spécifique de croissance s'écrit :

$$\mu = \mu_0 \cdot \left[ 1 - \frac{y_{min}}{y} \right] \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot X} \quad (IV.8)$$

$$\text{Où } \beta = \frac{K_E \cdot V}{A \cdot 0,7 \cdot I_{in}}$$

Avec :

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance (h<sup>-1</sup>)

$\mu_0$  : vitesse spécifique maximale de croissance en l'absence de toute limitation (h<sup>-1</sup>)

$y_{min}$  : fraction massique minimale d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* (g N. g MS<sup>-1</sup>, )

$y$  : fraction massique d'azote dans les cellules de *C. vulgaris* (g N. g MS<sup>-1</sup>, )

$X$  : concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

$I_{in}$  : intensité lumineuse incidente (μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

$I_{out}$  : intensité lumineuse transmise (μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

$A$  : surface éclairée du réacteur (m<sup>2</sup>)

$V$  : volume utile dans le photobioréacteur (L)

$K_E$  : constante de demi-saturation pour la lumière (μmol.cell<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)

Comme précédemment la vitesse spécifique de croissance se compose de deux termes : un

terme de lumière indiquant la limitation par la lumière  $TL = \frac{(I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}}{K_E + (I_{in} - I_{out}) \cdot \frac{A}{V \cdot X}}$  et un terme

(appelé terme de Droop)  $TD = (1 - y_{min}/y)$  relatif à la limitation par l'azote intracellulaire.

Nous avons souhaité modéliser l'évolution de la biomasse, de la concentration en nitrate et du quota intracellulaire en azote pour *C. vulgaris* dans le temps. Les équations différentielles définies à partir des bilans massiques établis pour un réacteur parfaitement agité définissant ce modèle sont les suivantes.

L'évolution de la biomasse  $X$  en fonction du temps s'écrit :

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu - D) \quad (IV.9)$$

Avec:

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance (j<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration cellulaire (cell.L<sup>-1</sup>)

D: taux de dilution (j<sup>-1</sup>)

L'évolution des nitrates (sous forme d'azote) dans le réacteur N s'écrit :

$$\frac{dN}{dt} = D \cdot (N_0 - N) - \rho_m \cdot \frac{N}{N + K_N} \cdot X \quad (\text{IV.10})$$

Avec :

$N_0$  : concentration de nitrate exprimée en équivalent azote dans le milieu de culture (à l'entrée du réacteur) (g N.L<sup>-1</sup>)

$N$  : concentration de nitrate exprimée en équivalent azote dans le réacteur à temps  $t$  (g N.L<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration cellulaire à  $t$  (cell.L<sup>-1</sup>)

D: taux de dilution (j<sup>-1</sup>)

$K_N$  : constante de demi-saturation pour le nitrate, exprimée en équivalent azote (gN.L<sup>-1</sup>)

$\rho_m$  : constante de vitesse maximale de consommation des nitrates (gN.cell<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)

L'évolution de la fraction intracellulaire d'azote ( $y$ ) en fonction du temps s'écrit :

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\rho_m}{MS} \cdot \frac{N}{N + K_N} - \mu y \quad (\text{IV.11})$$

Avec :

$MS$  : masse de matière sèche pour *C. vulgaris* (g.cell<sup>-1</sup>)

Pour le calcul du taux spécifique de croissance  $\mu$ , il faut déterminer les termes de demi-saturation pour la lumière ( $K_E$ ), le quota minimum en azote intracellulaire ( $y_{\min}$ ), le quota en azote intracellulaire ( $y$ ) et la vitesse spécifique maximale de croissance en l'absence de toute limitation ( $\mu_0$ ). Le quota intracellulaire en azote ( $y$ ) est mesuré lors de l'état stationnaire pour les trois expériences. Les valeurs de  $K_E$  et  $\mu_0$  sont celles définies précédemment lors de l'étude en batch. La valeur de  $K_E$  est de  $1.36 \times 10^{-10}$   $\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}$  et la valeur de  $\mu_0$  est de  $1,1 \text{ h}^{-1}$ .

Enfin  $y_{\min}$  est calculé pour chacune des conditions de culture appliquées dans cette étude. Pour cela à partir de l'équation III.9, le terme de Droop (TD) est recalculé, ce qui permet par la suite de déterminer  $y_{\min}$ ; la fraction intracellulaire d'azote ( $y$ ) ayant été mesurée lors l'état

stationnaire. Pour  $D = 0.22 \text{ j}^{-1}$ , la valeur de  $y_{\min}$  est 0,025 ; ce qui est proche des valeurs trouvées en batch.

Cependant lorsque le taux de dilution augmente, le modèle n'est plus applicable si l'on considère le terme de Droop. Dans ces conditions de culture, le modèle est alors exprimé en prenant en compte uniquement une limitation par la lumière ce qui permet une meilleur adéquation du modèle et les résultats expérimentaux.

Pour caractériser l'évolution de la concentration en nitrate dans la culture (Equation IV.9) à partir du modèle, il faut également déterminer la constante de demi-saturation des nitrates  $K_N$  et la vitesse maximale de consommation des nitrates  $\rho_m$ . Dans un premier temps, les valeurs déterminées lors de l'étude en batch sont appliquées :  $\rho_m = 5,5 \times 10^{-14} \text{ gN.h}^{-1}.\text{cell}^{-1}$  et  $K_N = 0,033 \text{ gN.L}^{-1}$ .

Les valeurs de la concentration cellulaire calculées par le modèle deviennent constantes après environ 364h (soit 15 jours) montrant l'atteinte du régime stationnaire. Cependant lors de cette première simulation la concentration cellulaire en régime stationnaire était surestimée pour toutes les expériences et la concentration de nitrate dans le milieu de culture était également surestimée lorsque  $N_0$  est de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}$ .

Afin d'obtenir une meilleure concordance entre le modèle et les résultats expérimentaux, les valeurs des paramètres du modèle sont ajustées.

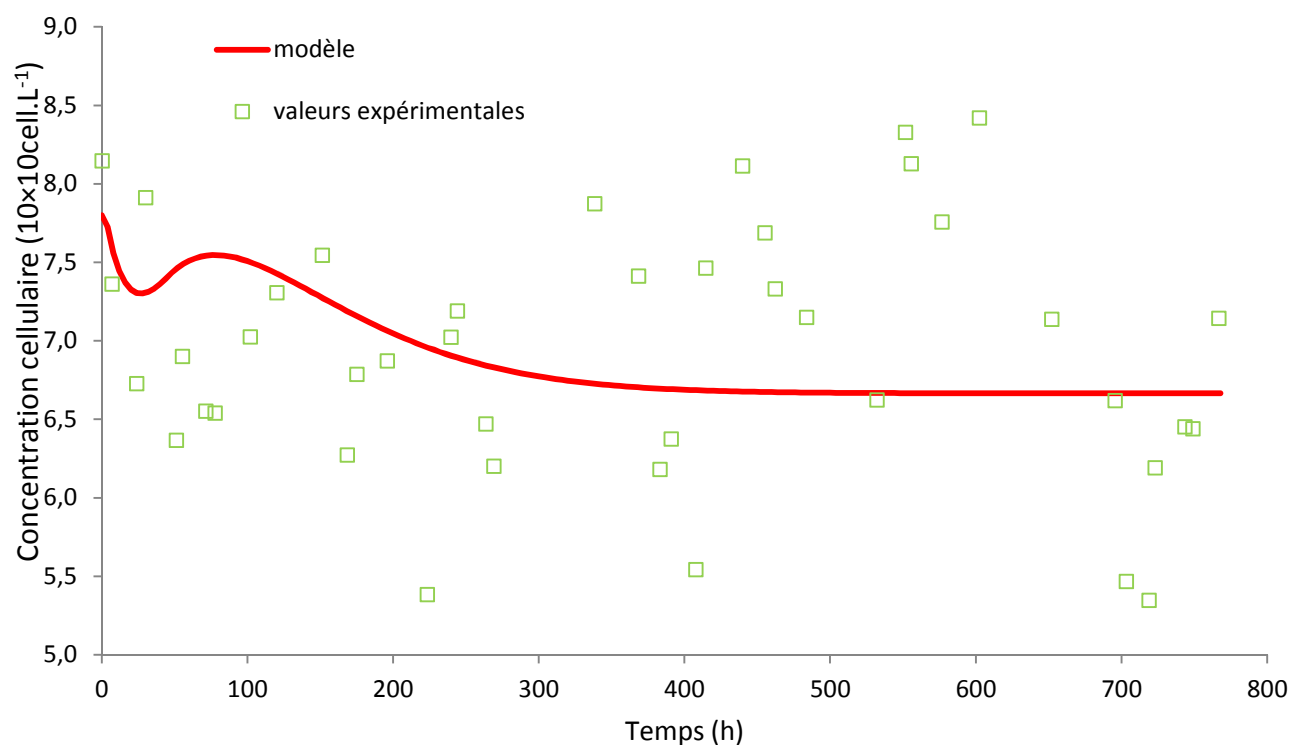
Le Tableau IV.4 présente les valeurs définitives utilisées pour le modèle. Les valeurs de  $K_E$ ,  $\rho_m$  restent les mêmes. La valeur de  $K_E$  trouvée est comparable à celle proposée par Chisti (2007). La valeur de  $K_N$  par contre devrait varier en fonction de la concentration en nitrate dans le milieu de culture. Lorsque la concentration en nitrate dans le milieu de culture est de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $K_N$  vaut  $4 \times 10^{-3} \text{ gN.L}^{-1}$ . Collos et al. (2005) rapporte des valeurs du même ordre de grandeur pour des populations de phytoplancton. De plus, la valeur de  $K_N$  lorsque la concentration en nitrate est de  $0,18 \text{ g.L}^{-1}$  est élevée ( $0,03 \text{ gN.L}^{-1}$ ) par rapport aux valeurs habituellement trouvées dans la littérature, mais égale à la valeur trouvée en batch. Cependant deux études rapportent un  $K_N$  similaire (Aslan et Kapdan, 2006 ; Rowley, 2010).

**Tableau IV.4.** Valeurs optimisées de la constante de demi-saturation pour la lumière ( $K_E$ ), de la constante de vitesse maximale de consommation des nitrates ( $\rho_m$ ) et de la constante de demi-saturation pour les nitrates ( $K_N$ )

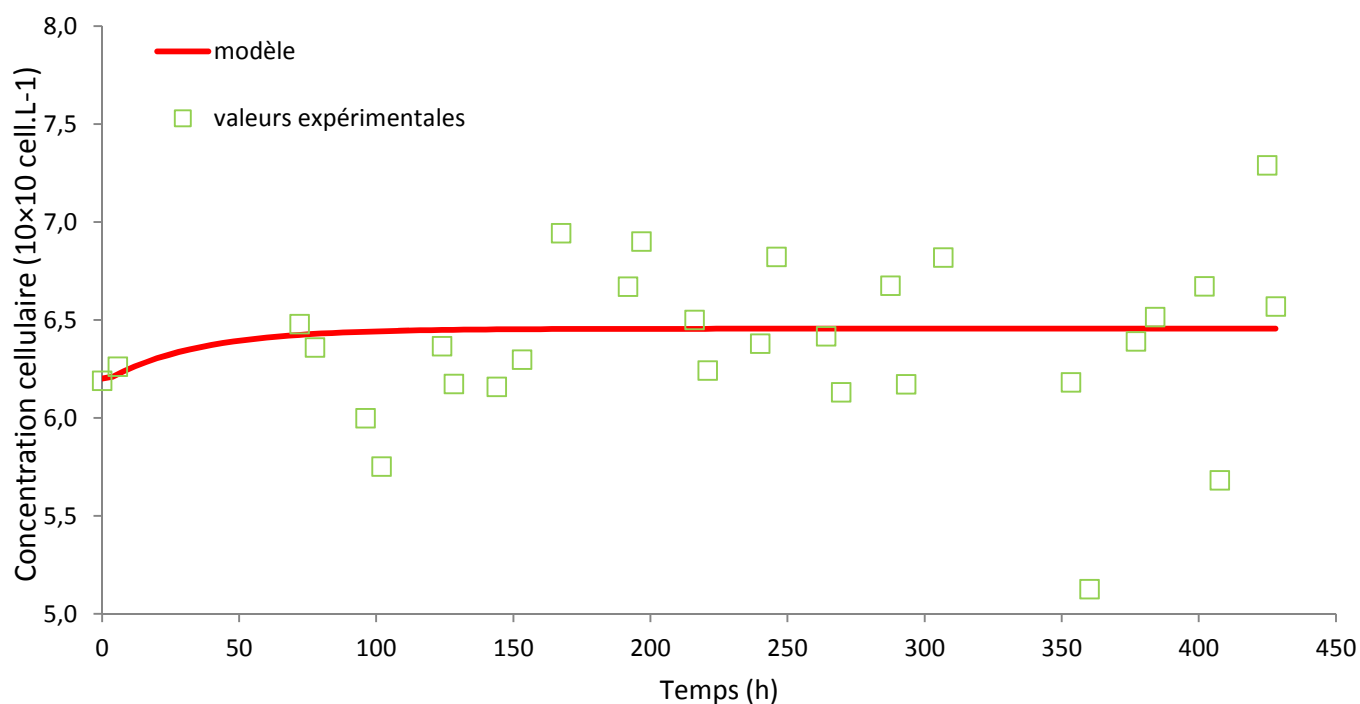
|                                               | $D = 0,22 \text{ j}^{-1}, N_0 = 0,14 \text{ g.L}^{-1}$ | $D = 0,31 \text{ j}^{-1}, N_0 = 0,14 \text{ g.L}^{-1}$ | $D = 0,31 \text{ j}^{-1}, N_0 = 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| $K_E (\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1})$ | $1.5 \times 10^{-10}$                                  | $1.5 \times 10^{-10}$                                  | $1.5 \times 10^{-10}$                                  |
| $\rho_m (\text{g.h}^{-1}.\text{cell}^{-1})$   | $5.5 \times 10^{-14}$                                  | $5.5 \times 10^{-14}$                                  | $5.5 \times 10^{-14}$                                  |
| $K_N (\text{g.L}^{-1})$                       | 0.004                                                  | 0,004                                                  | 0,03                                                   |

La Figure IV.2 présente la comparaison entre les valeurs mesurées et prédites par le modèle pour l'évolution de la concentration cellulaire au cours du temps et le Tableau VI.4 montre les valeurs pour le quota intracellulaire d'azote ( $y$ ) et la concentration en nitrate lors de l'état stationnaire.

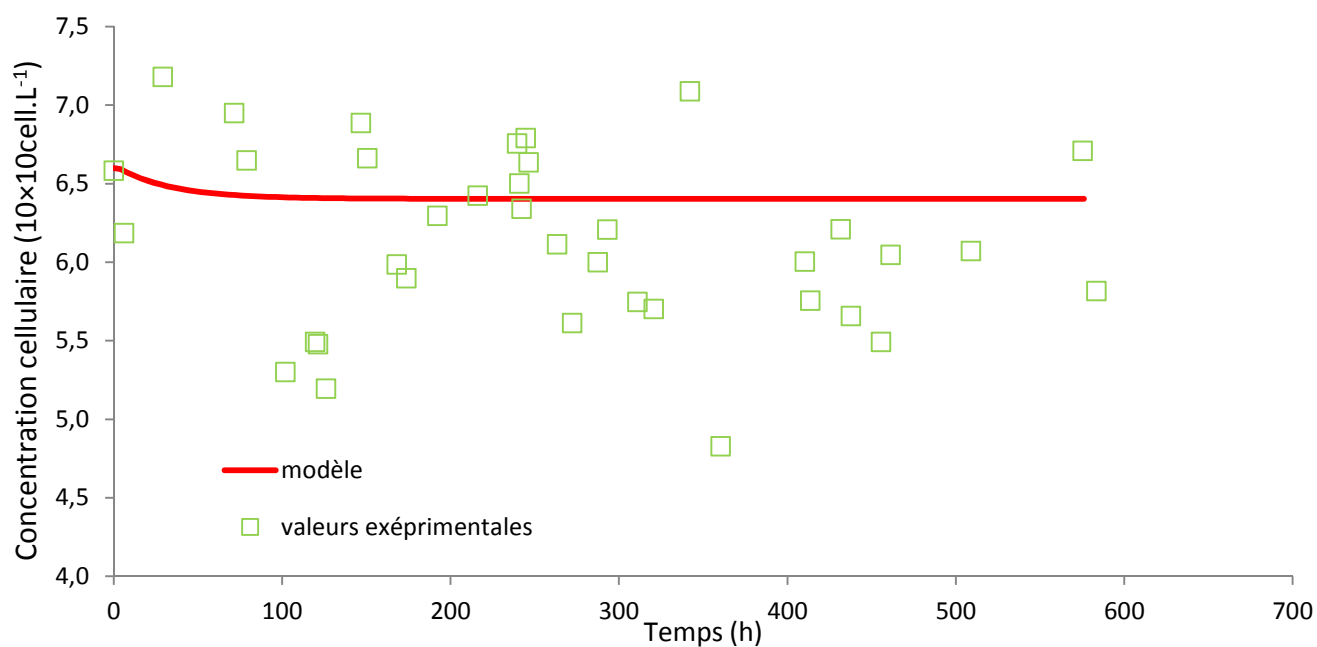
A)



B)



C)



**Figure IV.2.** Comparaison des données de concentration cellulaire avec les valeurs données par le modèle, pour les essais à différents taux de dilution et concentration en nitrate A)  $D = 0.22 \text{ d}^{-1}$ ,  $N_0 = 0.14 \text{ g.L}^{-1}$ , B)  $D = 0.31 \text{ d}^{-1}$ ,  $N_0 = 0.14 \text{ g.L}^{-1}$ , C)  $D = 0.31 \text{ d}^{-1}$ ,  $N_0 = 0.18 \text{ g.L}^{-1}$

**Table IV.5.** Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs déterminées par le modèle pour la concentration en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) dans le réacteur et le quota intracellulaire d'azote (y) à l'état stationnaire lors de la culture en continu de *Chlorella vulgaris* en fonction des différentes conditions de culture (A, B et C). .

|                                                      | A      |              | B      |              | C      |              |
|------------------------------------------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
|                                                      | Modèle | Expérimental | Modèle | Expérimental | Modèle | Expérimental |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (g.L <sup>-1</sup> ) | 0.002  | 0.001        | 0.004  | 0.002        | 0.6    | 0.03         |
| y (g N.g MS <sup>-1</sup> )                          | 0.082  | 0.082        | 0.084  | 0.091        | 0.09   | 0.091        |

Le modèle exprimant la croissance de *C. vulgaris* par la lumière et le quota en azote intracellulaire est validé lorsque D vaut 0,22 j<sup>-1</sup>. Lorsque D augmente le modèle considère uniquement une limitation de la croissance des algues par le facteur lumière ; ceci permet une bonne adéquation avec les valeurs expérimentales. Cependant pour D = 0,31 j<sup>-1</sup> et N<sub>0</sub> = 0,14 g.L<sup>-1</sup>, le quota en azote intracellulaire est sous-estimé par le modèle (Tableau IV.5).

#### IV.C. Discussion

En se référant à l'étude précédente de culture de *C. vulgaris* en batch, les cellules étaient limitées par la lumière reçue lorsque la concentration cellulaire était d'environ 2×10<sup>10</sup> cell.L<sup>-1</sup>, à cause de la diminution de la zone illuminée au sein du réacteur. Dans cette étude en continu, la concentration cellulaire est de l'ordre de 6×10<sup>10</sup> cell.L<sup>-1</sup>, les conditions de culture étant les mêmes que celles présentaient dans l'étude précédente, il est tout à fait envisageable que les cellules aient été limitées par la lumière dès le début de la culture en continu.

D'après les résultats expérimentaux, il est surprenant que l'augmentation de la concentration en nitrate dans le milieu de culture n'engendre pas une élévation de la concentration cellulaire comme Sciandra *et al.* (1997) l'ont démontré dans une précédente étude, alors que la concentration résiduelle en nitrate était pratiquement nulle. De plus une baisse de la biomasse a été observée. Sciandra et ses collaborateurs (1997) relatent que lors de l'étude de *Dunaliella tertiolecta* soumise à une co-limitation en nitrate et en lumière lors d'une culture continue,

l'algue perdait sa capacité à absorber les nitrates du milieu de culture lorsqu'elle était limitée par ces deux facteurs. Les auteurs suggèrent que l'absorption des nitrates est couplée avec la réaction de photosynthèse et que la force de ce lien est dépendante de l'activité photosynthétique de la cellule durant les périodes où elle est illuminée. La limitation par la lumière des cellules pourrait donc expliquer nos résultats. Les cellules limitées par l'apport en énergie lumineuse étant moins aptes à synthétiser des molécules à haut pouvoir énergétique (ATP et le NADPH) essentielles à l'assimilation de l'azote (Turpin, 1991), elles n'avaient alors plus la capacité physiologique d'assimiler les nitrates ajoutés dans le milieu de culture. De plus lors de la fin de la période de culture a été observé le dépôt d'un biofilm sur la partie conique des parois du réacteur. Ce phénomène pourrait avoir intensifié la limitation par la lumière en diminuant encore plus la pénétration de la lumière dans la culture et donc en augmentant la zone obscure dans le réacteur. Lorsqu'elles sont placées à l'obscurité, les cellules vont consommer leur réserves internes ce qui expliquerait la diminution de la biomasse (Zjiffers *et al.*, 2010). En effet, la biomasse est une mesure de la matière sèche dans le réacteur donc sa diminution peut s'expliquer soit par une baisse de la concentration cellulaire soit par une baisse de la matière sèche par cellule. Entre les deux expérimentations la matière sèche par cellule diminue de 21 pg.cell<sup>-1</sup> à 16 pg.cell<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ) alors que la concentration cellulaire varie de  $6,5 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup> avant ajout de nitrate à  $6,7 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup> après ajout de nitrates (la différence entre ces deux valeurs est considérée liée à la précision de la mesure). La baisse de la biomasse est donc liée à une perte de masse sèche par les cellules, ce qui peut s'expliquer par une augmentation des réactions de maintenance et donc à une augmentation de la consommation des réserves internes. Il faut noter que lorsque les cellules sont plongées dans l'obscurité, la respiration va augmenter et donc la production de CO<sub>2</sub> par les cellules. Ainsi ces réactions peuvent avoir un impact négatif sur le procédé de captage du CO<sub>2</sub>.

Malgré des conditions de culture non optimales pour la croissance de *C. vulgaris*, les valeurs de biomasse et de biofixation du CO<sub>2</sub> mesurées en font une candidate intéressante pour un procédé de captation du CO<sub>2</sub>. En effet, ces valeurs sont soit supérieures soit proches des valeurs trouvées dans la littérature. Cette étude laisse donc supposer que l'amélioration des conditions de culture pourrait fournir des résultats encore plus encourageants pour la mise en place d'un procédé de captage de CO<sub>2</sub>.

Les valeurs de  $K_N$  obtenues d'après le modèle, montrent que cette constante varie en fonction des conditions de culture. En effet, lorsque la concentration en nitrate dans le milieu a été augmentée,  $K_N$  a augmenté d'un facteur 10 (Tableau IV.4). Collos et ses collaborateurs (2005) rapportent que certaines espèces de phytoplancton sont capables d'adapter leur capacité d'assimilation de l'azote en fonction de la concentration de celui-ci dans le milieu de culture. Dans ce cas-là, la valeur de  $K_N$  est petite lorsque la concentration en nitrate dans le milieu est faible et la valeur de  $K_N$  plus grande dans le cas contraire. Smith et al (2009) rapporte également ce phénomène de modification de  $K_N$  en fonction de la concentration en nitrate dans le milieu et le met en relation avec le nombre de sites de fixation présents sur la cellule qui varie en fonction de la concentration externe en nitrates.  $K_N$  étant proportionnel au nombre de sites présents sur la surface de la membrane, une augmentation de ce paramètre pourrait être la conséquence d'une élévation du nombre de sites d'absorption au niveau de la cellule (Collos et al., 2005). Dans ces deux cas la variation de  $K_N$  est une adaptation de l'algue à son milieu environnemental. Bien que la valeur de  $K_N$  soit fortement dépendante de l'espèce considérée, ce phénomène d'acclimatation semble être généralisé aussi bien à des espèces marines que d'eau douce (Collos et al., 2005).

La valeur de  $K_N$ , pour une concentration en nitrate de 0.18 g.L<sup>-1</sup>, est très élevées (0.03 g.L<sup>-1</sup>). Deux études rapportent un  $K_N$  similaire à celui trouvé dans notre étude (Aslan et Kapdan, 2006 ; Rowley, 2010). Le phénomène de limitation par la lumière ayant été intensifié par le dépôt du biofilm sur les parois du réacteur, la quantité de lumière perçue par les algues devrait être plus faible que l'intensité de lumière incidente (125  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). L'augmentation de la valeur de  $K_N$  pourrait donc être une adaptation des algues à une faible quantité de lumière disponible. En effet, le métabolisme de l'azote est fortement couplé à la photosynthèse via la nécessité d'ATP pour son fonctionnement (Turpin, 1991).

Pour  $D$  égal à 0,22 j<sup>-1</sup> et une concentration en nitrate  $N_0$  de 0,14 g.L<sup>-1</sup>, le modèle déterminé dans l'étude précédente, c'est-à-dire comprenant un terme de limitation par la lumière et un terme de limitation par les nitrates (terme de Droop), permet de correctement prédire la concentration cellulaire, le quota d'azote intracellulaire et la concentration en nitrate dans le milieu de culture. Lorsque  $D$  augmente de 0,22 j<sup>-1</sup> à 0,31 j<sup>-1</sup>, le modèle prédit correctement  $X$ ,  $N$  et  $y$  si le terme de Droop n'est pas pris en compte. Par conséquent, la croissance serait uniquement dépendante de la limitation en lumière.

Ceci est en accord avec les résultats expérimentaux qui montrent que lorsque des nitrates sont ajoutés dans le milieu de culture la limitation en lumière ne permet pas aux cellules d'absorber cet excès de nutriments.

Cependant nous avons vu lors de l'étude en batch, que le modèle était apte à prédire l'évolution des différents paramètres lors d'une double limitation en lumière et en nitrate, ce qui n'est plus le cas en continu.

Lorsque le taux de dilution est augmenté, la fraction en azote intracellulaire ( $y$ ) augmente de 0,082 à 0,091 g N.g MS<sup>-1</sup>. Dans ce cas, les nutriments dans la culture sont apportés plus rapidement aux cellules. Ce phénomène pourrait peut-être être la raison pour laquelle la fraction interne d'azote augmente. De plus lorsque le taux de dilution augmente, le modèle exprime correctement la concentration cellulaire (Figure IV.3 B et C) si celle-ci est considérée uniquement limitée par la lumière. Cela va dans le sens des résultats obtenus lors de l'ajout de nitrates dans le milieu de culture ; les cellules sont incapables de consommer les nitrates ajoutés à cause d'un manque d'énergie pour l'absorption de ces composés ce qui va dans le sens d'une limitation par la lumière.

L'étude de *Dunaliella tertiolecta* en culture continu sans limitation par la lumière, avec différents taux de dilution et différentes concentrations en nitrate présente des similitudes avec notre étude (Sciandra et Ramani, 1994). Le modèle de Droop était utilisé pour simuler la croissance de l'algue dans le réacteur. Pour certaines valeurs de  $D$  et de concentrations en nitrate, les valeurs expérimentales de densité cellulaire étaient inférieures aux prédictions du modèle. Les auteurs évoquent la possibilité que dans ces conditions les algues passent d'une limitation unique par l'azote à une colimitation pour laquelle il n'était pas en mesure de préciser la nature du deuxième facteur limitant.

#### IV.D. Conclusion

La culture de *C. vulgaris* en photobioréacteur continu présente des résultats encourageants pour le développement d'un futur procédé de captage du CO<sub>2</sub>. En effet, les valeurs de biomasse et de fixation du CO<sub>2</sub> sont intéressantes par rapport aux valeurs trouvées dans la littérature, alors que les conditions de culture n'étaient pas les plus favorables pour la croissance de l'algue. Une amélioration des conditions de culture pourrait alors fournir de meilleurs résultats.

Le modèle défini lors de l'étude en batch a pu être appliqué seulement dans le cas d'un taux de dilution de  $0,22 \text{ j}^{-1}$ . Lorsque le taux de dilution était augmenté, il a fallu adapter le modèle et considérer que la croissance cellulaire était uniquement limitée par la lumière. Le modèle ainsi exprimé présentait des résultats en accord avec les valeurs expérimentales. Cependant les raisons de ce changement, d'une colimitation lumière et nitrate vers une limitation semblant être uniquement due à la lumière, n'ont pu être déterminées lors de cette étude.



## **Chapitre V**

# **Perspectives de développement industriel**

Une des étapes pour que le procédé étudié à l'échelle du laboratoire puisse être conçu à une échelle industrielle est le dimensionnement de celui-ci avec les conditions opératoires qui lui seront appliquées. Cette étape permet dans un premier temps de savoir si un tel procédé est envisageable, notamment si le volume total nécessaire pour un épuisement de gaz en CO<sub>2</sub> donné est industriellement acceptable.

Cette étude s'applique à étudier la faisabilité de la culture de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur pour le traitement d'un gaz industriel contenant une quantité importante de CO<sub>2</sub>. Elle s'applique à déterminer le volume total nécessaire pour qu'un gaz contenant en entrée de réacteur 13% de CO<sub>2</sub> en ressorte avec une teneur significativement moindre (de l'ordre de quelques %). Pour cela les résultats obtenus précédemment sont utilisés. Les calculs sont réalisés pour trois types de réacteurs : un réacteur simple, un réacteur multi-étagé et un réacteur à écoulement piston. Cette étude n'a évidemment pas la prétention de se présenter en dimensionnement industriel, mais elle a le mérite de donner une idée des configurations de réacteurs les plus favorables et d'ouvrir sur des perspectives d'études complémentaires nécessaires pour aboutir à un dimensionnement plus rigoureux.

## **V.A. Hypothèses et procédure de dimensionnement**

### *V.A.1. Hypothèse et paramètres de cultures fixés*

L'étude de la culture de *C. vulgaris* en continu, menée en laboratoire ne permet pas de connaître tous les paramètres nécessaires aux calculs du dimensionnement. Afin de faire le calcul de procédé, nous nous placerons donc dans des conditions favorables en nutriments, à savoir en limitation unique par la lumière. Il conviendra ensuite de calculer les teneurs minimales en nutriments à introduire afin de satisfaire ces conditions.

Nous avons pu vérifier lors des cultures en batch que le pourcentage de CO<sub>2</sub> entre 2 et 13% avait peu d'action sur la croissance des algues, sauf en période stationnaire. Si nous nous plaçons toujours dans des conditions de croissance, nous pouvons considérer que le carbone n'est pas limitant, à condition de rester au-dessus de 2% dans le gaz. Nous n'avons en effet pas la capacité de corriger l'expression de la vitesse de croissance par un terme de limitation

de carbone, ce qui nécessiterait des essais en batch ou continu supplémentaires en conditions de limitation de carbone.

La croissance cellulaire est donc uniquement limitée par la lumière reçue par les cellules.

D'après le modèle défini précédemment (II.D), la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  s'écrit donc:

$$\mu = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot X}$$

Avec :

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_0$  : vitesse spécifique maximale de croissance en l'absence de toute limitation ( $\text{h}^{-1}$ )

$X$  : concentration cellulaire ( $\text{cell.L}^{-1}$ )

$\beta$  représente le terme  $\frac{K_E \cdot V}{A \cdot 0,7 \cdot I_{in}}$  défini dans le chapitre III, avec :

$I_{in}$  : intensité lumineuse incidente ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )

$A$  : surface éclairée du réacteur ( $\text{m}^2$ )

$V$  : volume utile dans le photobioréacteur (L)

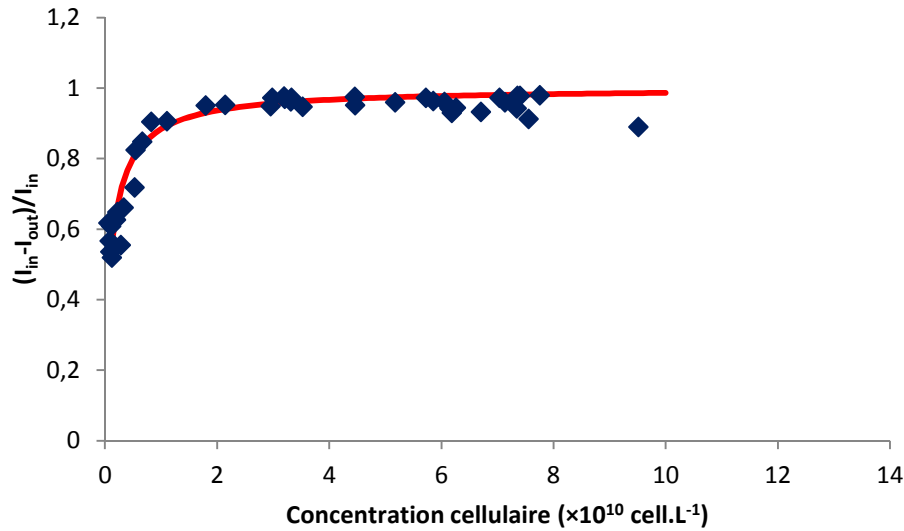
$K_E$  : constante de demi-saturation pour la lumière ( $\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}$ )

Rappelons que dans nos essais l'intensité de lumière absorbée était constante et égale à  $0,7 I_{in}$  car la concentration cellulaire était toujours supérieure à  $2 \cdot 10^{10} \text{ cell.L}^{-1}$ . Cela peut ne plus être le cas dans une partie de la cascade de réacteurs parfaitement agités ou dans une partie du réacteur piston.

Nous avons donc repris la courbe de variation du rapport intensité absorbée sur intensité incidente en fonction de la concentration cellulaire, en particulier pour modéliser lorsque la concentration cellulaire est inférieure à  $2 \times 10^{10} \text{ cell.L}^{-1}$ . Le modèle obtenu est cohérent avec les résultats expérimentaux comme le montre la Figure V.1.

On obtient l'équation suivante :  $\frac{I_{absorbée}}{I_{in}} = \frac{X + 6 \cdot 10^8}{X + 2 \cdot 10^9}$  avec  $X$ , la concentration cellulaire en  $\text{cell.L}^{-1}$ . En corrigeant l'effet du réacteur et du liquide, l'intensité absorbée par les algues est égale à 70% de cette valeur (Chapitre III).

Il est bien évident que ces valeurs doivent dépendre de la géométrie, de la taille et de l'éclairage du réacteur. Nous faisons l'hypothèse que l'éclairage est le même, à savoir que le rapport volume de réacteur/surface éclairée du réacteur ( $V/A$ ) reste constant entre le réacteur de laboratoire et les réacteurs multi-étagé et piston.



**Figure V.1.** Absorption de la lumière dans le réacteur en fonction de la concentration cellulaire de *C. vulgaris*

L'expression de  $\mu$  sera donc corrigée selon l'expression suivante :

$$\mu = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot \left[ \frac{X + 2 \cdot 10^9}{X + 6 \cdot 10^8} \right] X}$$

Les résultats obtenus lors de l'étude en continu montrent que la concentration de  $\text{CO}_2$  dissous est assez proche de  $\text{CO}_2^*$ , donc que la phase gazeuse était presque à l'équilibre avec la phase liquide. A défaut de disposer d'une corrélation empirique permettant d'estimer  $k_L a$  en fonction des différentes conditions de débits gazeux et liquide et de volume de réacteur (il faudrait estimer la taille des bulles, le hold up du gaz et le nombre de Reynolds dans le réacteur), nous supposons que la phase liquide est saturée en  $\text{CO}_2$ , à savoir qu'il y a équilibre avec la phase gazeuse. Ceci revient à surestimer la part de carbone inorganique dissous (de l'ordre de 10%), mais celle-ci reste toujours assez faible par rapport à la part de carbone intracellulaire.

Par ailleurs nous ne tiendrons pas compte du carbone organique dissous (DOC) qui est de l'ordre de 15% à 20% du carbone intracellulaire (comme vu lors de l'étude en continu, Chapitre IV), car nous ne sommes pas en mesure d'en estimer la production en fonction des conditions variées que nous appliquons dans le modèle.

Ces deux approximations sont considérées se compenser à peu près et permettre une première estimation du comportement d'un procédé continu.

Dans ce cas-là la concentration de CO<sub>2</sub> dissous correspond donc à la concentration d'équilibre avec le gaz, donnée par la loi de Henry, pour une pression et une température données :

$$[CO_2]_{dissous} = [CO_2]^* = \frac{PY}{H}$$

Où P est la pression totale (1 atm), Y la fraction molaire de CO<sub>2</sub> dans le gaz de sortie et H le coefficient de Henry (atm.L.mol<sup>-1</sup>).

- Le carbone inorganique dissous contenu dans le milieu de culture entrant dans le réacteur est considéré comme négligeable. En effet le milieu Bristol ne contenant pas de carbonates, le carbone inorganique dissous provient uniquement du gaz carbonique atmosphérique en équilibre avec le liquide. La fraction molaire de CO<sub>2</sub> dans l'air étant de 0,036% ceci correspond à une concentration de carbone inorganique dissous très faible ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, à 25°C et 1 atm). La concentration de carbone inorganique dissous C est donc donnée par :

$$C = \alpha [CO_2]^* = \alpha \cdot \frac{P \cdot Y}{H}$$

$$\text{Avec } \alpha = \frac{C}{\left(1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 \cdot K_2}{[H^+]^2}\right)}$$

[H<sup>+</sup>] est la concentration de H<sup>+</sup> dans la solution de sortie (mol.L<sup>-1</sup>), K<sub>1</sub> et K<sub>2</sub> sont les constantes de dissociation de l'acide carbonique dans le liquide (25°C). Si on prend un pH de l'ordre de 6,5, C vaut aux alentours de  $2,6 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, ce qui peut être négligé.

Les paramètres de culture fixés pour la culture de *Chlorella vulgaris* sont les mêmes que lors des études précédentes :

- culture en photobioréacteur continu

- température de 25°C
- pH = 6,5. Le pH est considéré constant dans toutes les unités de culture.

Les paramètres  $\mu_0$ ,  $K_E$ , quota en carbone intracellulaire, débits de gaz et débit de liquide déterminés précédemment sont utilisés. Les pressions d'entrée et de sortie du gaz sont égales à 1 atm.

**Tableau V.1.** Conditions appliquées aux calculs pour les différents types de réacteur

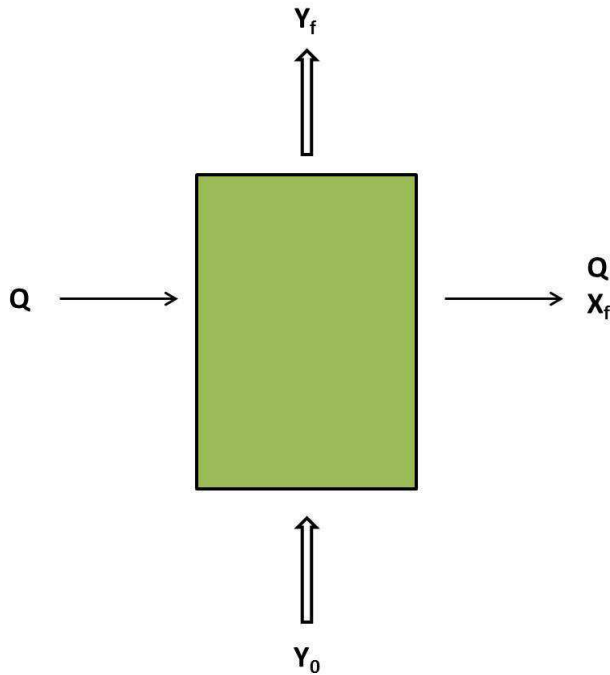
| Paramètres fixés                                        |                                              |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Débit molaire de gaz chargé en CO <sub>2</sub>          | 0,14 mol.h <sup>-1</sup>                     |
| Fraction molaire en CO <sub>2</sub> dans le gaz entrant | 13%                                          |
| Fraction molaire en CO <sub>2</sub> dans le gaz sortant | 2%                                           |
| Quota en carbone intracellulaire                        | $1 \times 10^{-12}$ mol C.cell <sup>-1</sup> |
| Débit de liquide                                        | 0,032 L.h <sup>-1</sup>                      |
| $\mu_0$                                                 | 0,045 h <sup>-1</sup>                        |

Dans un premier temps les calculs sont faits de façon à déterminer, pour les conditions de culture appliquées en laboratoire, le volume de réacteur nécessaire pour qu'un gaz entrant avec 13% de CO<sub>2</sub> ressorte du réacteur avec une concentration à 2% de CO<sub>2</sub>. Par la suite, nous

utiliserons un débit de gaz représentatif d'un cas industriel pour déterminer le volume de réacteur nécessaire pour obtenir un gaz en sortie de réacteur contenant 2% de CO<sub>2</sub>.

### V.A.2. Procédure de dimensionnement

#### a. Un seul réacteur parfaitement agité



**Figure V.2.** Réacteur simple.  $Y$  = fraction molaire de CO<sub>2</sub> dans le gaz en entrée ( $Y_0$ ) et en sortie ( $Y_f$ ) de réacteur,  $X_f$  = concentration cellulaire en sortie de réacteur,  $Q$  = débit de liquide

Les données sont donc les teneurs du gaz en entrée et sortie, le débit molaire de gaz et le débit de liquide. A partir de celles-ci peut être calculé le volume de réacteur nécessaire.

Un bilan sur la biomasse en régime stationnaire donne :

$$Q \cdot X_f = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot \left[ \frac{X_f + 2 \cdot 10^9}{X_f + 6 \cdot 10^8} \right]} \cdot X_f \cdot V \quad (\text{V.1})$$

Avec :

$Q$  : débit de liquide (L.j<sup>-1</sup>)

$X_f$  : concentration cellulaire qui sort du réacteur par la surverse (cell.L<sup>-1</sup>)

$\mu_0$  : vitesse spécifique maximale de croissance en l'absence de toute limitation (h<sup>-1</sup>)

$V$  : volume utile dans le photobioréacteur (L)

$\beta$  représente le terme  $\frac{K_E.V.}{A.0,7.I_{in}}$  défini dans le chapitre III, avec :

$I_{in}$  : intensité lumineuse incidente (μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>)

$A$  : surface éclairée du réacteur (m<sup>2</sup>)

$V$  : volume utile dans le photobioréacteur (L). Le rapport  $V/A$  employée sera le même que dans le réacteur de laboratoire.

$K_E$  : constante de demi-saturation pour la lumière (μmol.cell<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)

Bilan de carbone entre les deux phases en régime stationnaire:

$$N_g(Y_0 - Y_f) = QC_f + QX_f.q_C \quad (V.2)$$

Avec :

$N_g$  : débit molaire de gaz à traiter (mol.h<sup>-1</sup>) supposé constant entre l'entrée et la sortie (1 mol CO<sub>2</sub> est remplacée par 1 mol de O<sub>2</sub>)

$Y_0$ : fraction molaire de gaz à l'entrée du réacteur

$Y_f$ : fraction molaire de gaz à la sortie du réacteur

$C_f$  : concentration de carbone inorganique dissous dans le liquide à la sortie du réacteur (mol.L<sup>-1</sup>)

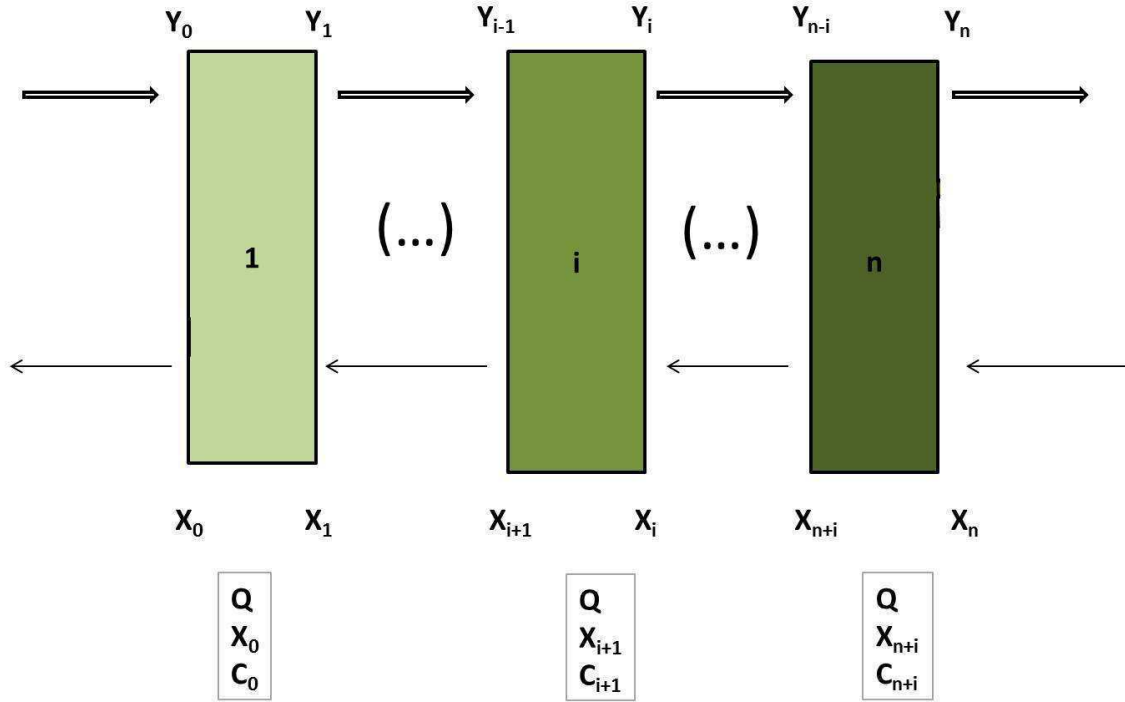
$q_C$  : quota intracellulaire de carbone (mol C.cell<sup>-1</sup>)

Calcul de  $C_f$  :

Le liquide en sortie de réacteur est à l'équilibre avec la phase gazeuse à 2%. La concentration de CO<sub>2</sub> dissous est donnée par la loi de Henry :  $[CO_2] = 7,00 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Pour un pH de 6,5,  $\alpha$  vaut 2,4. On déduit donc la valeur de  $C_f$  :  $C_f = 1,68 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>.

On peut alors calculer la concentration cellulaire en sortie de réacteur  $X_f$  et le volume nécessaire par les deux équations établies plus haut (V.1 et V.2).

*b. Réacteur multi-étagé*



**Figure V.3.** Réacteur multiétagé avec  $n$  étages.  $Y_i$  = fraction de  $\text{CO}_2$  dans le gaz sortant de l'étage  $i$ ,  $X_i$  = concentration cellulaire dans le liquide à la sortie de l'étage  $i$ ,  $Q$  = débit de liquide,  $C_i$  = concentration en carbone inorganique dissous dans le liquide à la sortie de l'étage  $i$ .

Les données sont donc les teneurs du gaz en entrée et sortie, le débit molaire de gaz, le débit de liquide et le volume d'un étage. A partir de ces données, le nombre d'étage nécessaire peut être calculé.

Bilan en biomasse sur l'étage  $i$ :

$$Q \cdot (X_i - X_{i+1}) = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot \left[ \frac{X_i + 2 \cdot 10^9}{X_i + 6 \cdot 10^8} \right] X_i} \cdot X_i \cdot V \quad (\text{V.3})$$

Avec :

$Q$  : débit de liquide ( $L.h^{-1}$ )

$X_i$  : concentration cellulaire dans le liquide issu de l'étage  $i$  ( $cell.L^{-1}$ )

$X_{i+1}$  : concentration cellulaire dans le liquide issu de l'étage  $i+1$  ( $cell.L^{-1}$ )

$\mu_0$  : vitesse spécifique maximale de croissance en l'absence de toute limitation ( $h^{-1}$ )

$V$  : volume utile dans chaque étage de photobioréacteur (L)

$\beta$  représente le terme  $\frac{K_E.V.}{A.0,7.I_{in}}$  défini dans le chapitre III.

On fait un bilan en carbone sur l'étage  $i$ :

$$N_g[Y_{1-i} - Y_i] = Q(C_i - C_{i+1}) + Q \cdot q_C \cdot (X_i - X_{i+1}) \quad (V.4)$$

Avec :

$N_g$  : débit molaire de gaz à traiter ( $mol.h^{-1}$ )

$Y_{1-i}$  : fraction molaire de  $CO_2$  dans le gaz issu de l'étage  $1-i$

$Y_i$  : fraction molaire de  $CO_2$  dans le gaz issu de l'étage  $i$

$Q$  : débit de liquide ( $L.h^{-1}$ )

$C_i$  : concentration de carbone inorganique dissous dans le liquide issu de l'étage  $i$  ( $mol.L^{-1}$ )

$C_{i+1}$  : concentration de carbone inorganique dissous dans le liquide issu de l'étage  $i+1$  ( $mol.L^{-1}$ )

$q_C$  : quota intracellulaire de carbone ( $mol C.cell^{-1}$ )

$X_i$  : concentration cellulaire dans le liquide issu de l'étage  $i$  ( $cell.L^{-1}$ )

$X_{i+1}$  : concentration cellulaire dans le liquide issu de l'étage  $i+1$  ( $cell.L^{-1}$ )

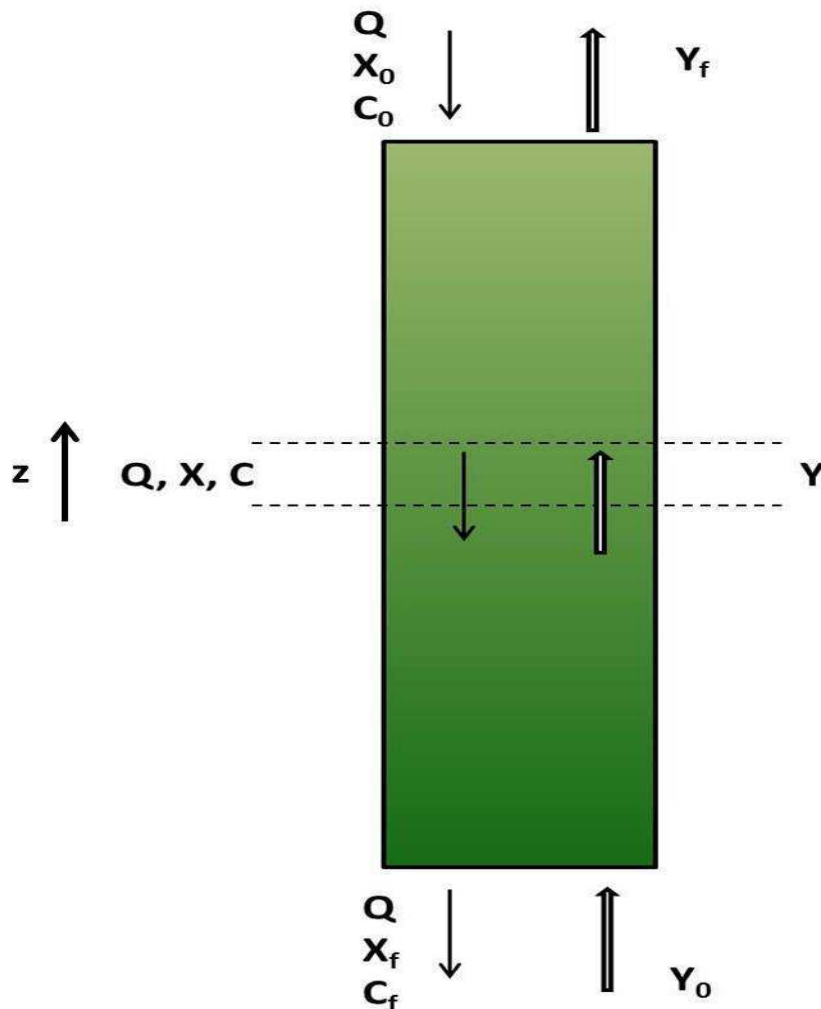
$Y_n$  étant fixé à 2%, on peut calculer  $X_n$  en supposant que  $X_{n+1}$  est très faible (inoculum). Il

vient :  $Q \cdot X_n = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot \left[ \frac{X_n + 2 \cdot 10^9}{X_n + 6 \cdot 10^8} \right] X_n} \cdot X_n$ . On en déduit donc  $X_n$ .

$C_n$  est calculé par l'équilibre avec la phase gazeuse à  $Y_n$  :  $C_n = \alpha \cdot \frac{P \cdot Y_n}{H}$

Le bilan opératoire permet de calculer  $Y_{n-1}$  et ainsi de suite, jusqu'à ce que la fraction molaire  $Y$  soit égale ou supérieure à 13%. On en déduit ainsi le nombre d'étages et le volume total, puisque le volume de chaque étage est fixé.

### c. Réacteur piston



**Figure V.4.** Réacteur à écoulement piston.  $Y$  = fraction de  $\text{CO}_2$  dans le gaz,  $X$  = concentration cellulaire,  $Q$  = débit de liquide,  $C$  = concentration en carbone inorganique,  $z$  = hauteur de la tranche

Bilan total sur le carbone sur la colonne :

$$N_g(Y_0 - Y_f) = Q(C_f - C_0) + Q(X_f - X_0) \cdot q_c \quad (\text{V.5})$$

Avec :

$N_g$  : débit molaire de gaz à traiter ( $\text{mol.h}^{-1}$ )

$Y_0$  : fraction molaire de  $\text{CO}_2$  dans le gaz à l'entrée du réacteur (bas de colonne)

$Y_f$  : fraction molaire de  $\text{CO}_2$  dans le gaz à la sortie du réacteur piston (haut de colonne)

$Q$  : débit de liquide ( $\text{L.h}^{-1}$ )

$C_f$  : carbone inorganique dissous dans le liquide à la sortie du réacteur (bas de colonne) ( $\text{mol.L}^{-1}$ )

$C_0$  : carbone inorganique dissous dans le liquide à l'entrée du réacteur piston (haut de colonne) ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) ( $\sim 0$ )

$q_c$  : quota intracellulaire de carbone ( $\text{mol C/g MS}^{-1}$ )

$X_f$  : concentration cellulaire à la sortie du réacteur (bas de colonne) ( $\text{cell.L}^{-1}$ )

$X_0$  : concentration cellulaire dans le liquide entrant (haut de colonne) ( $\text{cell.L}^{-1}$ )

Bilan sur la biomasse dans une tranche de volume  $dV$  entre  $z$  et  $z+dz$  :

$$-QdX = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \beta \cdot \frac{X + 2 \cdot 10^9}{X + 6 \cdot 10^8}} \cdot X \cdot dV \quad (\text{V.6})$$

En intégrant l'équation (V.5) on obtient

$$\int_0^V dV = -\frac{Q}{\mu_0} \int_{X_f}^{X_0} \left( \frac{1}{X} + \beta + \frac{1,4 \cdot 10^9 \beta}{X + 6 \cdot 10^8} \right) dX \quad (\text{V.7})$$

Le volume de réacteur est donc:

$$V = -\frac{Q}{\mu_0} \cdot \ln \frac{X_0}{X_f} - \frac{Q\beta}{\mu_0} [X_0 - X_f] - 1,4 \cdot 10^9 \beta \cdot \ln \left( \frac{X_0 + 6 \cdot 10^8}{X_f + 6 \cdot 10^8} \right) \cdot \frac{q}{\mu_0} \quad (\text{V.8})$$

Le bilan global permet de calculer  $X_f$  ;  $C_0$  est négligeable et  $C_f$  est supposé en équilibre avec le gaz à 13%.  $C_f = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ .

## **V.B. Résultats**

### *V.B.1 Volume de gaz à traiter de $0.14 \text{ mol.h}^{-1}$ (conditions de culture en laboratoire)*

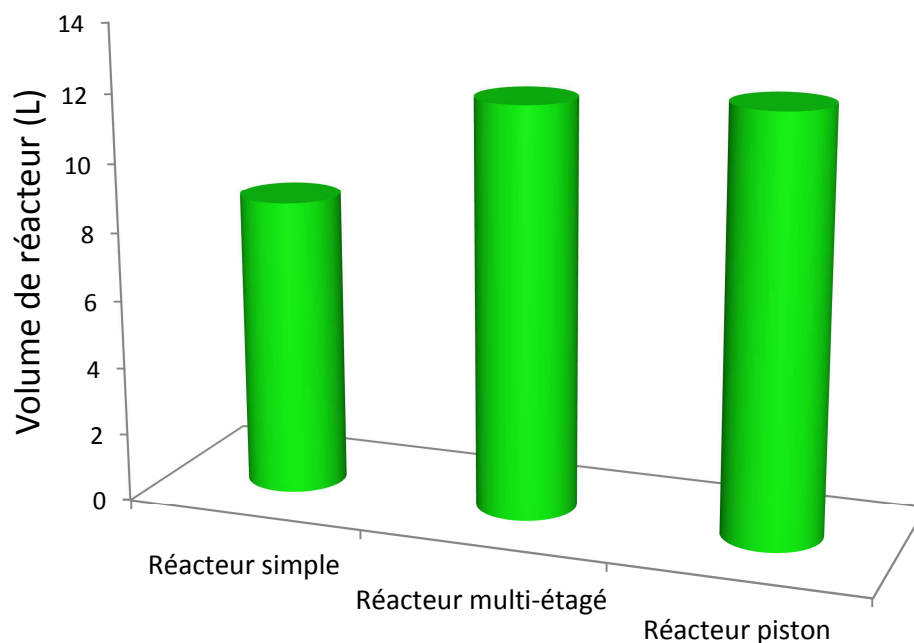
Tout d'abord les calculs sont faits à partir des conditions qui ont été appliquées lors des études précédentes en continu (Chapitre IV). Le Tableau V.2. récapitule les conditions de calcul appliquées. On cherche à déterminer le volume de réacteur nécessaire pour qu'un gaz entrant avec 13% de  $\text{CO}_2$ , ressorte du réacteur avec une concentration de  $\text{CO}_2$  de 2%.

**Tableau V.2.** Conditions de culture appliquées au calcul.  $N_g$  = débit molaire de gaz à traiter ( $\text{mol.h}^{-1}$ ),  $Q_l$  = débit de liquide ( $\text{L.h}^{-1}$ )

|                                                                              |                       |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>% <math>\text{CO}_2</math> en entrée de réacteur</b>                      | 13%                   |
| <b>% <math>\text{CO}_2</math> en sortie de réacteur</b>                      | 2%                    |
| <b>Débit molaire de gaz à traiter (<math>\text{mol.h}^{-1}</math>)</b>       | 0,14                  |
| <b>Débit de liquide (<math>\text{L.h}^{-1}</math>)</b>                       | 0,032                 |
| <b>Intensité lumineuse (<math>\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>)</b> | 200                   |
| <b><math>\mu_0</math> (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>                       | 0,045                 |
| <b><math>K_E</math> (<math>\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}</math>)</b> | $1,5 \times 10^{-10}$ |

La Figure V.5. présente le volume de réacteur et la concentration cellulaire dans le réacteur pour un réacteur simple, un réacteur multi-étagé et un réacteur piston. Le réacteur simple présenterait le volume de réacteur le plus faible, de 8,7 L pour répondre aux conditions fixées. Le réacteur multi-étagé présente une efficacité moins bonne avec un volume de 12 L se répartissant entre 5 étages de 2,4 L chacun. Le réacteur piston se présente comme le procédé

le moins intéressant avec un volume de réacteur de 12,2 L. La concentration cellulaire dans le réacteur simple est de  $4,8 \times 10^{11}$  cell.L<sup>-1</sup> ce qui est proche de ce que nous avons obtenu lors des études précédentes en laboratoire. La concentration cellulaire dans le réacteur multi-étagé est évidemment variable selon les étages ; elle passe de  $7,4 \times 10^{11}$  cell.L<sup>-1</sup> dans le 1<sup>er</sup> étage à  $1 \times 10^{11}$  cell.L<sup>-1</sup> dans le dernier étage. Les premiers étages dans lesquels la concentration est la plus importante sont en contact avec les teneurs les plus fortes en CO<sub>2</sub> dans le gaz, puisqu'il s'agit d'un contre-courant. Enfin, le réacteur piston présenterait une concentration cellulaire de  $4,7 \times 10^{11}$  cell.L<sup>-1</sup> à sa sortie.



**Figure V.5.** Volume de réacteur d'un réacteur simple, d'un réacteur multi-étagé et d'un réacteur piston pour un gaz entrant de 13% et sortant à 2% de CO<sub>2</sub>. Les conditions de culture appliquées aux calculs sont énumérées dans le Tableau V.2.

Les calculs suivants seront faits pour le réacteur simple mono étage, celui-ci présentant les meilleures performances.

En effet dans la mesure où on ne considère que la limitation par la lumière, la vitesse de la réaction de croissance est croissante avec la concentration cellulaire. La meilleure configuration est donc celle où dans tout le volume la concentration cellulaire est maximale, ce qui est le cas du réacteur parfaitement agité. Lorsque l'on multiplie les étages ou que l'on

travaille avec un réacteur piston, une partie du volume se trouve à une concentration cellulaire inférieure, donc la vitesse globale est plus faible et le volume total plus élevé.

Un des problèmes soulevés par ces résultats est la forte concentration cellulaire atteinte par rapport à la concentration de CO<sub>2</sub> de 2% en sortie de réacteur. En effet, si l'on suppose que la phase liquide est en équilibre avec la phase gazeuse en sortie du réacteur, la concentration en carbone inorganique dans la solution est relativement faible ; ainsi des phénomènes de limitation par la source carbonée pourraient survenir si la population algale est trop importante devant cette concentration. Lors des cultures de *C. vulgaris* en batch avec 2% de CO<sub>2</sub>, la concentration cellulaire maximale atteinte pour une limitation par la lumière et par les nitrates était de  $6,9 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup>. Pour les calculs suivants nous allons donc supposer que la concentration cellulaire dans le réacteur ne peut pas dépasser cette valeur afin d'être sûr qu'aucune limitation par le carbone inorganique ne survienne, ce facteur n'étant pas pris en compte par le modèle proposé.

Afin de diminuer la concentration cellulaire en culture continue, il faut augmenter le taux de dilution. En supposant que la lumière est complètement absorbée, il vient :  $X = \left( \frac{\mu_0}{D} - 1 \right) \cdot \frac{1}{\beta}$ .

Le taux de dilution a donc été fixé à trois valeurs différentes, pour une même valeur du débit molaire de gaz de 0,14 mol.h<sup>-1</sup>. Le Tableau V.3 présente les résultats obtenus.

**Tableau V.3.** Variation de la concentration cellulaire en sortie de réacteur ( $X_f$ ), du débit de liquide ( $Q_l$ ) et du volume de réacteur ( $V$ ) pour différents taux de dilution ( $D$ )

| D (h <sup>-1</sup> ) | $X_f$ (cell.L <sup>-1</sup> ) | $C_f$ (mol.L <sup>-1</sup> ) | $Q_l$ (L.h <sup>-1</sup> ) | V (L) |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------|
| <b>0,012</b>         | $9,98 \times 10^{10}$         | $1,68 \times 10^{-3}$        | 0,15                       | 11,2  |
| <b>0,02</b>          | $5,35 \times 10^{10}$         | $1,68 \times 10^{-3}$        | 0,28                       | 14    |
| <b>0,03</b>          | $2,14 \times 10^{10}$         | $1,68 \times 10^{-3}$        | 0,67                       | 22,2  |

A partir d'un taux de dilution ( $D$ ) de 0,02 h<sup>-1</sup>, les résultats sont acceptables. Si on veut obtenir une concentration de  $6,9 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup>, on obtient un débit ( $Q_f$ ) de 0,22 L.h<sup>-1</sup> et un volume de 12,9 L.

#### *V.B.2 Volume de gaz à traiter 1000 mol.s<sup>-1</sup> (condition de culture à l'échelle industrielle)*

Dans un deuxième temps, le débit molaire de gaz à traiter est augmenté de façon à dimensionner une installation traitant un gaz provenant d'une source industrielle. Pour cela

une valeur de débit de gaz provenant d'un incinérateur de taille très importante a été utilisée. Cette valeur est de  $1000 \text{ mol.s}^{-1}$  de gaz. On suppose toujours que le gaz en entrée de réacteur contient 13% de  $\text{CO}_2$ , cette concentration étant typique des rejets en  $\text{CO}_2$  par l'industrie (IPCC, 2005). Le Tableau V.4 reprend les valeurs appliquées au calcul du volume de réacteur nécessaire pour obtenir un gaz contenant 2 %  $\text{CO}_2$ .

**Tableau V.4.** Conditions de culture appliquées au calcul.

|                                                                              |                       |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>% <math>\text{CO}_2</math> en entrée de réacteur</b>                      | 13%                   |
| <b>% <math>\text{CO}_2</math> en sortie de réacteur</b>                      | 2%                    |
| <b>Débit molaire de gaz à traiter (<math>\text{mol.h}^{-1}</math>)</b>       | $3,6 \times 10^6$     |
| <b>Intensité lumineuse (<math>\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>)</b> | 200                   |
| <b><math>\mu_0</math> (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>                       | 0,045                 |
| <b><math>K_E</math> (<math>\mu\text{mol.cell}^{-1}.\text{s}^{-1}</math>)</b> | $1,5 \times 10^{-10}$ |

On adoptera une valeur limite de concentration cellulaire de  $6,9 \times 10^{10} \text{ cell.L}^{-1}$ . La concentration  $C_f$  est la même que précédemment. On trouve un taux de dilution de  $0,4 \text{ j}^{-1}$ , un débit de liquide de  $5,6 \times 10^6 \text{ L.h}^{-1}$  et un volume de  $3,3 \times 10^8 \text{ L}$ . Ces valeurs sont énormes et ne sont pas envisageables industriellement en technologie de photobioréacteur.

Il faut alors trouver le meilleur compromis entre tous les paramètres pour que le volume de réacteur soit acceptable. Tout d'abord le débit molaire de gaz à traiter sera diminué. Il est envisageable pour que cela soit réalisable à l'échelle industrielle, que plusieurs réacteurs simples soient installés en parallèle et que le gaz soit réparti entre les différents réacteurs. Toutefois l'installation restera gigantesque.

Enfin, nous pouvons augmenter l'intensité lumineuse ce qui aura pour but de diminuer  $\beta$  et donc le volume nécessaire. Par exemple pour une intensité lumineuse double ( $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et la valeur limite de concentration cellulaire de  $6,9 \times 10^{10} \text{ cell.L}^{-1}$ , le débit de liquide reste le même, par contre le volume passe à  $2,3 \times 10^8 \text{ L}$ , ce qui ne permet toutefois pas de réduire significativement le volume. Dans un réacteur continu de volume fixé, augmenter l'intensité lumineuse entraînera l'augmentation de la concentration cellulaire. Cependant dans le cas présenté ici, nous avons choisi le point de vue du concepteur, à savoir déterminer le volume

nécessaire pour atteindre une concentration cellulaire donnée (la concentration limite définie plus haut). Lorsque l'intensité lumineuse est augmentée, le débit de liquide ne varie pas et le taux de dilution (D) augmente, ce qui diminue le volume : le réacteur est plus efficace. Afin de diminuer significativement le volume (V), il faut accepter une concentration cellulaire plus forte dans le réacteur. Augmenter deux des paramètres, l'intensité lumineuse et la concentration cellulaire permet de diminuer de façon beaucoup plus efficace le volume de réacteur (Tableau V.5). Lorsque les valeurs de l'intensité lumineuse et de la concentration cellulaire sont doublées le volume de réacteur est alors diminué deux fois.

**Tableau V.5.** Variation du volume de réacteur (V) et du taux de dilution (D) en fonction de l'intensité lumineuse (I) et de la concentration cellulaire (X)

| I ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | X (cell.L <sup>-1</sup> ) | D (h <sup>-1</sup> ) | V (L)             |
|--------------------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------|
| 200                                        | $6,9 \times 10^{10}$      | 0,016                | $3,3 \times 10^8$ |
| 400                                        | $6,9 \times 10^{10}$      | 0,025                | $2,3 \times 10^8$ |
| 200                                        | $1,4 \times 10^{11}$      | 0,008                | $2,7 \times 10^8$ |
| 400                                        | $1,4 \times 10^{11}$      | 0,016                | $1,6 \times 10^8$ |

Examinons maintenant la variation du volume total avec la fraction molaire sortante de CO<sub>2</sub> dans le gaz. Pour une intensité lumineuse de  $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et une concentration cellulaire de  $1 \times 10^{11} \text{ cell.L}^{-1}$ , nous obtenons les résultats regroupés dans le Tableau V.6 ; le volume varie relativement peu avec Y<sub>f</sub>.

**Tableau V.6.** Variation du volume de réacteur (V) en fonction de la fraction molaire de CO<sub>2</sub> sortante (Y<sub>f</sub>). C<sub>f</sub> = concentration de carbone inorganique en sortie de réacteur, Q = débit de liquide, D = taux de dilution.

| Y <sub>f</sub>     | C <sub>f</sub> (mol.L <sup>-1</sup> ) | Q (h <sup>-1</sup> ) | D (h <sup>-1</sup> ) | V (L)             |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| $2 \times 10^{-2}$ | $1,68 \times 10^{-3}$                 | $3,9 \times 10^6$    | 0,012                | $2,9 \times 10^8$ |
| $4 \times 10^{-2}$ | $3,37 \times 10^{-3}$                 | $3,1 \times 10^6$    | 0,012                | $2,3 \times 10^8$ |
| $6 \times 10^{-2}$ | $5,05 \times 10^{-3}$                 | $2,4 \times 10^6$    | 0,012                | $1,8 \times 10^8$ |
| $8 \times 10^{-2}$ | $6,74 \times 10^{-3}$                 | $1,7 \times 10^6$    | 0,012                | $1,3 \times 10^8$ |

Il est important de noter ici que la variation de ces valeurs et leur effet sur les paramètres mesurés ne sont que le reflet de leur impact sur le modèle tel qu'il a été décrit dans ce travail

de thèse. Par définition un modèle est toujours imparfait et s'applique à des conditions particulières. Ces résultats sont donc présentés à titre indicatif afin d'être en mesure de saisir l'impact plus ou moins important de chacune des conditions fixées sur l'efficacité du procédé proposé pour la culture de *C. vulgaris*.

### **V.C. Discussion**

Cette étude a pour but de proposer le dimensionnement de la culture de *C. vulgaris* en photobioréacteur continu afin de traiter un gaz industriel. Les gaz d'origine industrielle contiennent une concentration de CO<sub>2</sub> allant de 10 à 20% (v/v) en fonction du type d'industrie (IPCC, 2005). Dans les études précédentes, la valeur de 13% de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation du réacteur a été retenue car cette concentration représente la teneur d'un gaz provenant de l'industrie cimentière. Les calculs réalisés pour cette étude se basent sur le modèle proposé à partir de l'étude de la croissance de *C. vulgaris* en batch. La culture de microalgue est considérée limitée uniquement par la lumière ; tous les nutriments sont supposés être apporté en excès afin d'éviter toutes autres limitations. Cependant la concentration en carbone inorganique entrant en compte, il est important d'avoir à l'esprit qu'une possible limitation par la source carbonée peut intervenir. Lors des études en batch avec 2% et 13% de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation, il a été démontré que lors de la phase exponentielle de croissance, la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz influençait peu la concentration cellulaire. Mais l'effet de concentrations de CO<sub>2</sub> plus faibles que 2% sur la croissance de *C. vulgaris* n'ayant pas été testé, l'hypothèse de départ pour ce calcul a été d'obtenir un gaz en sortie de réacteur contenant 2% de CO<sub>2</sub>.

Le plus petit volume de réacteur pour obtenir un gaz très épuré en CO<sub>2</sub> dans les conditions appliquées en laboratoire est obtenu pour un réacteur simple. Mais la concentration cellulaire dans le réacteur apparaît déjà comme une première contrainte pour le calcul. En effet, la concentration maximale atteinte lors des cultures batch à 2% de CO<sub>2</sub> était de  $6,9 \times 10^{10}$  cell.L<sup>-1</sup>. Il faut donc se placer dans des conditions similaires de concentrations cellulaires pour le calcul car une plus forte densité de cellule pourrait entraîner une limitation en carbone, le rapport concentration en carbone inorganique dans la solution sur le nombre de cellule diminuant. Afin de rester dans des conditions de culture optimale, le rapport débit molaire de gaz à traiter sur débit de liquide dans le réacteur est diminué. Le débit molaire de gaz étant fixé cela revient à augmenter le débit de liquide et donc à baisser la concentration cellulaire

dans le réacteur. Ceci entraîne une augmentation du volume de réacteur pour atteindre un gaz en sortie de réacteur contenant 2% de CO<sub>2</sub>. Il est donc mis en lumière ici la nécessité de prendre en compte la quantité de carbone inorganique dissous dans l'élaboration de modèles pour la croissance de microalgues dans un procédé de captage de CO<sub>2</sub>. En effet, afin qu'un procédé de culture de microalgue soit économiquement viable il doit être capable de produire une quantité de biomasse importante et donc supporter une concentration cellulaire conséquente (Banerjee *et al.*, 2002). De plus le modèle devrait prendre en compte le carbone organique excrété par les cellules, celui-ci faisant parti du procédé de capture du CO<sub>2</sub>. Lors de la culture de *C. vulgaris* en continu avec 13% de CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation du réacteur, la concentration en carbone organique dissous (DOC) variait entre 14 et 22% du carbone organique total. Il n'a pas été possible d'intégrer ce paramètre dans le modèle proposé dans ce travail de thèse car la variation de l'excrétion des DOC en fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> n'a pas pu être mesurée. Cependant il a été démontré que *C. vulgaris* cultivée avec 4% et 12% de CO<sub>2</sub> en batch excrétaient environ 5% de DOC par rapport au carbone organique total (Hullat et Thomas, 2011). La différence des valeurs trouvées entre l'étude présentée ici et la littérature montre la nécessité d'étudier ce phénomène pour comprendre son implication dans un procédé de captage du CO<sub>2</sub>. Ne pas prendre en compte cette part de carbone organique revient à sous-estimer l'efficacité du procédé et à proposer des dimensionnements plus importants que nécessaire.

Un autre problème est soulevé par l'excrétion de concentration importante de DOC. Le carbone organique dissous se compose entre autre de protéines, exopolysaccharides (EPS) et de lipides (Henderson *et al.*, 2008). Les EPS participent à la formation de biofilms sur les parois du réacteur, limitant ainsi la pénétration de la lumière et diminuant ainsi l'efficacité du procédé. Il a été démontré lors de l'étude batch que la quantité d'EPS excrétée variait avec la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz d'alimentation. Une forte concentration cellulaire comme il est attendu dans un procédé à l'échelle industrielle pourrait donc entraîner la production d'une grande quantité d'EPS. De plus certains produits excrétés peuvent se révéler toxiques pour les cellules (Sciandra et Ramani, 1994). Si le taux de dilution appliqué n'est pas suffisamment important pour permettre leur élimination de la culture, leur présence dans le réacteur pourrait être un facteur supplémentaire pénalisant le procédé.

L'augmentation de l'intensité lumineuse ou de la concentration cellulaire permettrait de diminuer le volume de réacteur. Cependant ces différents paramètres n'ont pas le même impact sur le volume du réacteur et tous ne sont pas manipulables avec la même facilité.

Plus la lumière est augmentée et plus le volume de réacteur diminue, pour une même concentration cellulaire. Cependant une trop forte intensité lumineuse pourrait engendrer des phénomènes de photoinhibition des cellules et donc désavantager le procédé. Des études sont menées pour optimiser la géométrie des photobioréacteurs de façon à ce qu'une forte intensité lumineuse soit utilisée sans créer de phénomènes de photoinhibition ou bien de façon à ce que des cultures à forte densité cellulaire ne souffrent pas d'une prédominance de la respiration dans le réacteur à cause de zones sombres trop prononcées (Moline grima *et al.*, 1998 ; Cornet, 2010). Il est possible de diminuer de façon plus efficace le volume du réacteur nécessaire en augmentant dans les mêmes proportions l'intensité lumineuse et la concentration cellulaire. Cette stratégie pourrait également permettre d'éviter que les cellules soient endommagées par une trop forte quantité de lumière reçue. Cependant comme il a été abordé précédemment, avant de pouvoir envisager une forte concentration cellulaire dans le réacteur, il faut être en mesure de pouvoir prédire une possible limitation par le carbone inorganique dissous.

#### **V.D. Conclusion**

L'étude de dimensionnement présentée ici a pour but d'être en mesure d'appréhender les problèmes soulevés par le passage à grande échelle d'un procédé de culture de *C. vulgaris* pour le captage du CO<sub>2</sub>. Cette étude ne se veut pas quantitative car elle se base sur un modèle de croissance de *C. vulgaris* défini dans des conditions de culture particulières, ne prenant pas en compte tous les facteurs pouvant intervenir lorsque le volume de culture ou la concentration cellulaire sont fortement augmentés. Elle apporte cependant des pistes de réflexion sur de futures recherches au sein du laboratoire. Elle permet également de mettre en lumière l'importance du développement d'un modèle prenant en compte la limitation par le carbone inorganique des cellules lors de cultures avec de fortes concentrations cellulaires ainsi que l'intégration du carbone organique dissous.

Cette étude ne prend pas du tout en compte la réalité économique de la mise en place d'un procédé à grande échelle ni les éventuelles difficultés de réalisation de photobioréacteurs de très grande taille. Avec l'augmentation du volume de culture peuvent survenir un grand nombre de nouveaux paramètres à considérer, tels que la difficulté d'homogénéisation de la solution, l'optimisation de la pénétration de la lumière dans une culture comprenant une forte densité cellulaire, la production de produits toxiques pour les algues, etc. Toutefois, il apparaît

déjà qu'en se plaçant dans des conditions optimales de croissance, de nombreux points restent encore en suspens sur la mise en place d'un procédé de captage du CO<sub>2</sub> à taille industrielle, notamment sur la capacité d'utilisation industrielle d'un tel procédé. Il peut donc sembler logique la démarche de certains développeurs de ne pas utiliser de photobioréacteurs, compte tenu des volumes énormes qui doivent être mis en jeu et du coût d'investissement inhérent, conduisant à l'emploi de lagunes ouvertes, dont l'efficacité est très inférieure, mais le coût beaucoup plus faible.

A ce stade de l'étude, la faisabilité en photobioréacteur n'est pas acquise pour traiter de très gros débits, comme celui que nous avons cité. Par contre pour des débits moyens, environ 100 à 1000 fois plus petits, les photobioréacteurs peuvent être envisageables.



## **Conclusions et Perspectives**

L'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère amène aujourd'hui la communauté scientifique à étudier les possibles solutions pour enrayer ce phénomène. C'est pourquoi ce travail de thèse a eu pour but d'étudier la faisabilité d'un procédé de capture de CO<sub>2</sub> à partir de la culture en photobioréacteur de la microalgue *Chlorella vulgaris*.

### *Etude de la croissance de C. vulgaris en photobioréacteur batch*

Dans un premier temps, des essais de culture de *C. vulgaris* ont été menés en mode batch afin d'étudier l'influence de deux paramètres de culture sur la croissance de l'algue : intensité lumineuse appliquée au réacteur et teneur en CO<sub>2</sub> du gaz. Nous avons également tenu compte du paramètre azote, qui peut dans certaines conditions être limitant. Nous avons constaté que *C. vulgaris* présentait une capacité de production de biomasse et de biofixation de CO<sub>2</sub> importante et donc très intéressante par rapport aux valeurs trouvées dans la littérature.

L'augmentation de l'intensité lumineuse incidente a engendré une augmentation de la biomasse et de la consommation de CO<sub>2</sub>. Nos résultats montrent que l'assimilation du carbone est directement liée à la quantité de lumière disponible. En effet lorsque *C. vulgaris* est cultivée avec une intensité faible de 50  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , le quota de carbone intracellulaire chute au jour 5, ce qui n'est pas observé pour des intensités plus importantes. Cet effet est mis en relation avec l'augmentation de la concentration cellulaire qui entraîne une diminution progressive de la quantité d'énergie lumineuse disponible par cellule jusqu'à un certain point où les cellules ne reçoivent plus suffisamment de lumière pour faire fonctionner correctement leur appareil photosynthétique et être en mesure de métaboliser CO<sub>2</sub>. La division cellulaire se poursuivant, le quota de carbone intracellulaire est dispatché dans les cellules filles et ne pouvant plus être renouvelé, il diminue dans les cellules.

D'autre part, *C. vulgaris* cultivée avec des intensités de lumière plus élevées, 120 et 180  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , est limitée par la lumière et l'azote ; nos résultats le montrent sans équivoque, ils sont en bonne adéquation avec un modèle tenant compte de ces deux limitations, inspiré du modèle de Droop et enrichi d'un terme de limitation de lumière (de forme Michaelis-Menten). Le modèle de Droop découple les deux phénomènes : limitation par les nitrates externes et limitation par l'azote intracellulaire; la croissance cellulaire peut en effet se poursuivre même après la disparition des nitrates dans le milieu de culture, ainsi que nous l'avons observé dans cette étude.

Il semblerait par contre que la culture à  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  soit majoritairement limitée par la lumière bien que son quota en azote intracellulaire diminue comme pour les deux autres cultures. En effet l'application du modèle global ne rend pas compte correctement des résultats expérimentaux. Par contre un modèle simplifié ne tenant compte que de l'effet de la lumière est en bon accord avec les résultats expérimentaux et permet de modéliser de façon satisfaisante les évolutions de la concentration cellulaire, du quota interne en azote et de la concentration en nitrate dans le milieu de culture en fonction du temps. Des études complémentaires seraient nécessaires à cette faible intensité lumineuse pour déterminer le quota intracellulaire d'azote minimal dans ces conditions de culture. Ceci permettrait une meilleure compréhension des mécanismes complexes liant la croissance cellulaire, la variation des quotas internes de nutriments et la variation des concentrations de ces nutriments dans le milieu de culture. Ces études en culture batch ont également montré que la concentration de  $\text{CO}_2$  dans le gaz d'alimentation du réacteur pouvait avoir un impact positif sur la croissance cellulaire et l'excrétion des exopolysaccharides (EPS). En effet les cellules cultivées avec 13% de  $\text{CO}_2$  présentaient (hors phase exponentielle) une croissance cellulaire et une production d'EPS plus importantes que les cellules cultivées avec 2% de  $\text{CO}_2$ . Bien que nous n'ayons pu mesurer la concentration de carbone inorganique dissous dans ces deux cas, les variations de pH dans la solution, assez différentes selon la concentration de  $\text{CO}_2$  dans le gaz mettent en lumière des mécanismes d'assimilation du carbone inorganique certainement différents. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules cultivées avec 2% de  $\text{CO}_2$  consommeraient préférentiellement  $\text{HCO}_3^-$  contrairement aux cellules à 13% de  $\text{CO}_2$  qui utiliseraient plutôt  $\text{CO}_2$  comme source carbonée ; les rapports  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  sont en effet très différents dans les deux cultures par suite des différences de pH. Les cellules consommant  $\text{CO}_2$  sont avantagées car bien que la limitation en nitrate puisse affecter l'activité de la Rubisco, assimiler le carbone inorganique sous la forme  $\text{CO}_2$  est moins coûteux en énergie, ce qui permet à la cellule d'allouer ces molécules énergétiques préférentiellement à d'autres mécanismes cellulaires permettant ainsi le maintien de l'activité cellulaire. La forme sous laquelle le carbone inorganique est assimilé par la cellule est un facteur clé dans la promotion de la croissance cellulaire. L'étude ne permet pas de déterminer si ces effets sont liés directement à la concentration de  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu ou bien indirectement à la valeur du pH résultant de la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous. De futures études sont donc nécessaires pour trancher cette question ; on pourrait par exemple mener une culture de *C. vulgaris* à faible concentration de  $\text{CO}_2$ , mais en maintenant un pH faible constant aux alentours de 6,5. De plus il serait intéressant de mesurer l'activité de l'enzyme anhydrase carbonique entrant en

jeu dans le transport de  $\text{HCO}_3^-$  dans la cellule, ce qui pourrait aider à comprendre le comportement des cellules à de fortes teneurs en  $\text{CO}_2$  dissous. Le fonctionnement de cette enzyme commence à être bien connu pour des concentrations en  $\text{CO}_2$  dissous faibles, comme celles trouvées dans le milieu naturel, mais pas lorsque les cellules sont cultivées à de fortes concentrations de  $\text{CO}_2$ . Or comprendre les mécanismes d'assimilation du carbone inorganique avec une concentration élevée de  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu de culture permettrait une meilleure maîtrise du procédé de captage de  $\text{CO}_2$ . De même la mesure de l'activité de l'enzyme Rubisco pourrait nous renseigner sur ces mécanismes. Enfin il serait intéressant de mesurer et modéliser la production de carbone organique dissous (DOC) et non uniquement des EPS car en ne tenant compte que des EPS la consommation de  $\text{CO}_2$  est sous-estimée. De plus les DOC peuvent avoir de nombreuses applications qui permettraient de les valoriser, ajoutant un intérêt économique au simple procédé de captage de  $\text{CO}_2$ .

#### *Etude de C. vulgaris en photobioréacteur continu*

Pour qu'une grande quantité de  $\text{CO}_2$  soit capté par une culture de cellules algales, il faut produire une quantité de biomasse importante. La technologie de culture en continu est plus favorable à une production importante de biomasse et permet une meilleure maîtrise des paramètres de culture. Les essais en continu avec un gaz à 13% de  $\text{CO}_2$  (proche des concentrations industrielles) ont permis de mesurer les effets du taux de dilution et de la concentration en nitrate dans le milieu de culture sur la concentration cellulaire et la biofixation de  $\text{CO}_2$  par *C. vulgaris*. Le modèle de croissance de *C. vulgaris*, élaboré à partir des résultats obtenus en batch, avec les valeurs des paramètres déterminés à cette occasion, a été utilisé avec plus ou moins de succès selon les cas ; il n'en reste pas moins vrai que ce modèle mixte Droop-lumière est acceptable, moyennant une légère adaptation de certains paramètres. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires pour valider parfaitement le modèle et expliquer physiquement la variation des différents jeux de paramètres trouvés.

Les valeurs de biomasse et de biofixation de  $\text{CO}_2$  mesurées lors de cette étude sont prometteuses quant à l'utilisation de cette espèce pour le captage du  $\text{CO}_2$ . De plus il a été démontré que *C. vulgaris* excrétaient une importante quantité de composés organiques dissous (DOC), entre 14 et 22% du carbone organique total. Cette part de produits excrétés est rarement prise en compte dans les études sur le captage de  $\text{CO}_2$  par une culture de microalgue. Or il est montré dans cette étude qu'elle est conséquente et que la négliger revient à sous-

estimer l'efficacité du procédé. Cependant les DOC se composent entre autres d'EPS et ceux-ci peuvent amener à l'encrassement des parois du réacteur par le dépôt d'une couche de biofilm. Les cellules reçoivent dans ce cas moins de lumière. Or nous avons vu dans l'étude en batch que la quantité de lumière reçue par les cellules joue un rôle prépondérant dans la fixation du  $\text{CO}_2$ . Par conséquent la quantification des DOC est un paramètre supplémentaire nécessaire pour la maîtrise du procédé.

Les essais en continu avec le milieu Bristol ont montré à l'état stationnaire un épuisement quasi-total en nitrate. Cependant un ajout de nitrate supplémentaire dans la culture de *C. vulgaris* n'a entraîné aucune modification de la concentration cellulaire ni d'augmentation de l'absorption des nitrates dans le milieu ; la concentration en nitrate dans le réacteur à l'état stationnaire correspondait en effet parfaitement à la quantité ajoutée. Ce phénomène est mis en relation avec la limitation par la lumière. En effet les cellules ne recevant pas suffisamment de lumière pour la réaction de photosynthèse, la quantité de molécules d'ATP et de NADPH nécessaire au métabolisme de l'azote n'était pas suffisante pour consommer le nitrate supplémentaire ajouté dans le réacteur. De plus la valeur de la constante de demi-saturation des nitrates  $K_N$  estimée dans ces essais dépend de façon surprenante des paramètres opératoires de la culture et a une valeur élevée par rapport à celles trouvées le plus souvent dans la littérature. C'est certainement un point faible du modèle et des essais en batch ou continu en présence de quantités très différentes de nitrates seraient précieux pour comprendre les liens complexes unissant les trois phénomènes : croissance d'algues, consommation de nitrate du milieu et accumulation positive ou négative d'azote intracellulaire. La variation du taux de dilution ( $D$ ) a entraîné une faible diminution de la concentration cellulaire et de la biomasse, ainsi qu'une augmentation de la biofixation du  $\text{CO}_2$ . L'augmentation de  $D$  a également entraîné l'augmentation du quota en azote intracellulaire. Cette augmentation du quota intracellulaire d'azote pourrait permettre à la croissance cellulaire d'être moins influencée par la concentration de nitrate en solution. En effet le modèle prenant en compte les limitations lumière et nitrate est en adéquation avec les valeurs expérimentales lorsque le taux de dilution ( $D$ ) est de  $0,22 \text{ j}^{-1}$ , ce qui n'est plus le cas lorsque  $D$  est augmenté. Le modèle prenant en compte uniquement la limitation en lumière permet alors d'être en accord avec les résultats expérimentaux. De futures études sont nécessaires pour approfondir les mécanismes physiologiques pouvant entrer en jeu lors de l'augmentation de  $D$ , correspondant à une diminution du temps de séjour dans le réacteur, qui semblerait mener à une adaptation des cellules. De plus il serait intéressant de poursuivre le travail mené sur la modélisation de la croissance de *C. vulgaris* afin de pouvoir y intégrer cette éventuelle adaptation. Enfin de

nouvelles études se plaçant dans des conditions moins limitantes en lumière et en nitrate sont nécessaires afin de déterminer la production de biomasse et la biofixation de CO<sub>2</sub> par *C. vulgaris* dans des conditions optimales de culture pour être en mesure d'évaluer la réelle capacité de cette algue pour un procédé de captage de CO<sub>2</sub>.

### *Pré-Dimensionnement*

Une dernière étude a concerné le calcul du volume de réacteur nécessaire pour obtenir un gaz en sortie ne contenant plus que 2% de CO<sub>2</sub>. Cette étude permet de comparer l'efficacité de trois types de réacteurs : simple, multi-étage et piston. Le réacteur simple se présente comme étant le plus efficace car il permet d'obtenir les conditions recherchées avec un volume de réacteur le plus petit. Ce résultat est dû au modèle de croissance que nous avons employé qui donne une vitesse croissante en fonction de la concentration cellulaire et dans lequel nous n'avons tenu compte que de la limitation par la lumière. Différents points à approfondir dans l'étude de la culture de *C. vulgaris* ont émergé à la suite de ces calculs. Tout d'abord la nécessité d'intégrer une possible limitation par la concentration en carbone inorganique dans la culture est apparue. Ensuite les calculs ne prenant pas en compte la part de carbone organique excrété par les cellules, l'efficacité de la captation de CO<sub>2</sub> est sous-estimée et donc il devrait être possible de diminuer le volume de réacteur nécessaire en intégrant ce paramètre dans les calculs. Il faudrait toutefois l'étudier de façon très précise en fonction des différentes conditions de culture et en proposer une modélisation. Cette réflexion sur le passage à grande échelle menée en supposant des conditions de culture optimales soulève déjà de nombreux points d'interrogation qu'il conviendrait d'éclairer en vue d'un développement industriel éventuel.

### *Perspectives*

Ce travail de thèse a permis de montrer que *Chlorella vulgaris* se présente comme une candidate potentielle pour un procédé de capture de CO<sub>2</sub>. Malgré des conditions de culture non optimales, les valeurs de biomasse et de capacité de biofixation de CO<sub>2</sub> sont élevées par rapport à d'autres études, ce qui est très encourageant.

Pour mener de façon rigoureuse un projet de développement industriel, de nombreuses études restent à faire :

- Compréhension fine des interactions entre les différents phénomènes relatifs à la cellule (croissance, métabolisation, excrétion) ainsi que des phénomènes d'adaptation de celle-ci ; compréhension et modélisation de l'excrétion de DOC ; compréhension et modélisation de la limitation en carbone
- Optimisation des conditions de culture en batch grâce à la méthode des plans d'expérience en vue d'une consommation maximale de CO<sub>2</sub>
- Enrichissement du modèle avec un terme de limitation de carbone supplémentaire, une adaptation du modèle de Droop relatif à l'azote, en ajoutant par exemple le quota maximal et la prise en compte de l'excrétion de DOC
- Essais en continu dans des domaines plus larges de taux de dilution, d'apport en azote et d'apport en carbone afin de valider le modèle de croissance, ainsi que le modèle hydrodynamique (parfaitement agité)
- Essais en continu permettant d'estimer  $k_{La}$  en fonction de divers paramètres opératoires (débits de gaz et de liquide, volume de réacteur, taille des bulles de gaz...) afin d'obtenir une corrélation empirique qui sera utilisable à toutes les échelles
- Adaptation du modèle pour tenir compte plus finement de l'effet de la lumière en prenant en compte les phénomènes d'ombrage et les paramètres géométriques du réacteur
- Comparaison des trois types de réacteur (mono étage, multi étages, piston) avec le modèle définitif
- Validation à une échelle intermédiaire de réacteur
- Extrapolation à l'échelle industrielle

Il est évident que compte tenu de l'ampleur des tâches décrites et des compétences requises, ce travail de développement ne pourra se faire qu'en mettant en présence des équipes de compétences très complémentaires (biologie, génie des procédés, modélisation...).

L'intérêt de cette thèse est donc d'avoir ouvert la voie sur un éventuel procédé industriel utilisant une algue bien connue tout en confirmant ses potentialités ; malgré le fait que cette algue ait été largement étudiée auparavant, cette étude a mis en lumière des comportements originaux, confirmé la grande complexité des phénomènes physiologiques mis en jeu et éclairé une partie d'entre eux. Sans une compréhension fine de ces phénomènes, il sera impossible de développer et maîtriser un procédé industriel et ce travail en est la première pierre.



## **Références bibliographiques**

- Allard, B., Templier, J., 2000. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry*.
- Allen, M. M., Smith, A. J., Jun. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archives of Microbiology* 69 (2), 114–120.
- Andersen, R. A., 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press
- Ashley, K. I., Mavinic, D. S., Hall, K. J., 2009. Effect of orifice diameter, depth of air injection, and air flow rate on oxygen transfer in a pilot-scale, full lift, hypolimnetic aerator. *Canadian Journal of Civil Engineering* 36, 137–147.
- Aslan, S., Kapdan, I., Nov. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28 (1), 64–70.
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Aug. 1982. Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Plant physiology* 70 (2), 517–523.
- Bajguz, A., Apr. 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of environmental contamination and toxicology* 60 (3), 406–416.
- Baker, J., Grover, J. P., Brooks, B. W., Urena-Boeck, F., Roelke, D. L., Errera, R., Kiesling, R. L., 2007. Growth and toxicity of *Prymnesium parvum* (haptophyta) as a function of salinity, light, and temperature. *Journal of phycology* 43, 219–227.
- Balkos, K. D., Colman, B., Jun. 2007. Mechanism of CO<sub>2</sub> acquisition in an acid-tolerant chlamydomonas. *Plant, Cell & Environment* 30 (6), 745–752.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (3), 245–279.
- Bartual, A., Gálvez, J. A., 2002. Growth and biochemical composition of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at different pH and inorganic carbon levels under saturating and subsaturating light regimes. *Botanica Marina* 45, 491–501.

- Beardall, Stojkovic, S., Larsen, S., Dec. 2009. Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecology & Diversity* 2 (2), 191–205.
- Beardall, J., Johnston, A., Raven, J., 1998a. Environmental regulation of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms in microalgae. *Revue canadienne de botanique* 76 (6), 1010–1017.
- Beardall, J., Johnston, A., Raven, J., 1998b. Environmental regulation of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms in microalgae - *Canadian journal of botany* 76 (6), 1010–1017.
- Beardall, J., Stojkovic, S., 2006. Microalgae under global environmental change: Implications for growth and productivity, populations and trophic flow , *ScienceAsia*, 1–10.
- Beck, E., Ziegler, P., 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40 (1), 95–117.
- Becker, E. W., 1994. *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press.
- Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S. K., Subburamu, K., Sanniyasi, E., Bux, F., 2011. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111 (3), 377–382.
- Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., Shelef, G., Feb. 2009. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations - Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management* 50 (2), 262–267.
- Bischoff, H.W. and Bold, H.C., 1963: *Phycological studies*. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species, University of Texas Publications 6318: 1-95.
- Birch, D. G., Elrifi, I. R., Turpin, D. H., Nov. 1986. Nitrate and ammonium induced photosynthetic suppression in N-Limited *Selenastrum minutum*: II. effects of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> addition to CO<sub>2</sub> efflux in the light. *Plant physiology* 82 (3), 708–712.
- Boelen, P., Beardall, 2011. Neither elevated nor reduced CO<sub>2</sub> affects the photophysiological performance of the marine antarctic diatom *Chaetoceros brevis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

- Borkenstein, C., Knoblauchner, J., Frühwirth, H., Schagerl, M., Feb. 2011. Cultivation of *Chlorella emersonii* with flue gas derived from a cement plant. *Journal of Applied Phycology* 23 (1), 131–135.
- Borodin, V. B., 2008. Effect of red and blue light on acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to CO<sub>2</sub>-limiting conditions. *Russian Journal of Plant Physiology* 55, 441–448.
- Borowitzka, M. A., Apr. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70 (1-3), 313–321.
- Bougaran, G., Bernard, O., Sciandra, A., 2010. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*.
- Boussiba, S., Resch, C. M., Gibson, J., Aug. 1984. Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 138 (4), 287–292.
- Brennan, L., Owende, P., Feb. 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2), 557–577.
- Burkhardt, S., Amoroso, G., Riebesell, U., Sültemeyer, D., 2001. CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in marine diatoms acclimated to different CO<sub>2</sub> concentrations. *Limnological Oceanography* 46 (6), 1378–1391.
- Canto de Loura, I. C., Dubacq, J. P., Thomas, J. C., Apr. 1987. The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant physiology* 83 (4), 838–843.
- Carvalho, A., Silva, S., Baptista, J., Malcata, F., Mar. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5), 1275–1288.
- Chae, S. R., Hwang, E. J., Shin, H. S., Jan. 2006. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresource technology* 97 (2), 322–329.

- Chen, M., Tanga, H., Maa, H., Hollandb, T. C., Nga, K. Y. S., Salley, S. O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Das, K., Feb. 2009. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (2), 518–532.
- Chisti, Y., May 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25 (3), 294–306.
- Chiu, S.-Y. Y., Kao, C.-Y., Chen, C.-H., Kuan, T.-C., Ong, S.-C., Lin, C.-S., Jun. 2008. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella sp.* in a semi-continuous photobioreactor. *Bioresource Technology* 99 (9), 3389–3396.
- Chiu, S.-Y. Y., Kao, C.-Y. Y., Tsai, M.-T. T., Ong, S.-C. C., Chen, C.-H. H., Lin, C.-S. S., Jan. 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource technology* 100 (2), 833–838.
- Choudhury, N. K., Behera, R. K., Dec. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica* 39 (4), 481–488.
- Collos, Y., Vaquer, A., Souchu, P., Jun. 2005. Acclimation of nitrate uptake by phytoplankton to high substrate levels. *Journal of Phycology* 41 (3), 466–478.
- Colman, B., Balkos, K. D., Jul. 2005. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in two *Euglena* species. *Canadian Journal of Botany* 83 (7), 865–871.
- Contreras, A., García, F., Molina, E., Merchuk, J. C., 1998. Interaction between CO<sub>2</sub>-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 60 (3), 317–325.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Del Borghi, M., Jun. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48 (6), 1146–1151.

- Cornet, J.-F., Jan. 2010. Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chemical Engineering Science* 65 (2), 985–998.
- Cullen, J. J., Yang, X., MacIntyre, H. L., 1992a. Nutrient limitation in marine photosynthesis, 69–88.
- Cullen, J. J., Yang, X., McIntyre, H. L., 1992b. Nutrient limitation of marine photosynthesis. Primary productivity and biogeochemical cycle in the sea.
- Cullimore, J. V., Sims, A. P., 1981. Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20 (4), 597–600.
- Czerny, J., Barcelos, Riebesell, U., Apr. 2009. Influence of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on cell division and nitrogen fixation rates in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Biogeosciences Discussions* 6 (2), 4279–4304.
- Davey, M., LaRoche, J., 2008. Nutrient limitation of picophytoplankton photosynthesis and growth in the tropical north atlantic. *Limnological Oceanography*.
- Davies, A. G., Sleep, J. A., Jan. 1989. The photosynthetic response of nutrient-depleted dilute cultures of *Skeletonema costatum* to pulses of ammonium and nitrate; the importance of phosphate. *Journal of Plankton Research* 11 (1), 141–164.
- De la Hoz Siegler, H., Ben-Zvi, A., Burrell, R. E., McCaffrey, W. C., May 2011. The dynamics of heterotrophic algal cultures. *Bioresource technology* 102 (10), 5764–5774.
- Descolasgros, C., Debilly, G., Jun. 1987. Temperature adaptation of RuBP carboxylase: kinetic properties in marine antarctic diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 108 (2), 147–158.
- Dickman, E. M., Vanni, M. J., Horgan, M. J., 2006. Interactive effects of light and nutrients on phytoplankton stoichiometry. *Oecologia* 149 (4).
- Doucha, J., Straka, F., Lívanský, K., Oct. 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp. in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 17 (5), 403–412.

- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., Machat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., Vitova, M., Feb. 2009. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82 (1), 179–185.
- Dragone, G., Teixeira, J. A., 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy* 88, 3331–3335
- Droop, M. R., 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae<sup>1</sup>. *Journal of Phycology* 9 (3), 264–272.
- Dubinsky, Z., Schofield, O., 2010. From the light to the darkness: thriving at the light extremes in the oceans. *Hydrobiologia* 639, 153–171.
- Dziwulska, U., Bajguz, A., Godlewska-Zylkiewicz, B., Dec. 2004. The use of algae *Chlorella vulgaris* immobilized on Cellex-T support for Separation/Preconcentration of trace amounts of platinum and palladium before GFAAS determination. *Analytical Letters* 37 (10), 2189–2203.
- Edwards, T. J., Maurer, G., Newman, J., Prausnitz, J. M., 1978. Vapor-liquid equilibria in multicomponent aqueous solutions of volatile weak electrolytes. *AIChE J.* 24 (6), 966–976.
- Eisele, R., Ullrich, W. R., Jan. 1977. Effect of glucose and CO<sub>2</sub> on nitrate uptake and coupled OH flux in *Ankistrodesmus braunii*. *Plant physiology* 59 (1), 18–21.
- Engel, A., Jan. 2002. Direct relationship between CO<sub>2</sub> uptake and transparent exopolymer particles production in natural phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24 (1), 49–53.
- Eppley, R. W., Thomas, W. H., 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. *Journal of Phycology* 5 (4), 375–379.
- Estevez, M. S., Malanga, G., Puntarulo, S., 2001. Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science*.

- Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D., Wen, Z., Jan. 2011. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresource technology* 102 (1), 88–93.
- Falkowski, P. G., Raven, J. A., 2007. *Aquatic photosynthesis*. Second Edition. Princeton University Press
- Falkowski, P. G., Sukenik, A., Herzig, R., 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (haptophyceae) relative abundance of chloroplast proteins1. *Journal of Phycology* 25 (3), 471–478.
- Fan, L., Zhang, Y., Zhang, L., Chen, H., Nov. 2008. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science* 325 (1), 336–345.
- Filali, R., Tebbani, S., Dumur, D., Isambert, A., Pareau, D., Lopes, F., 2010. IFAC-PapersOnLine: Identification of the growth model parameters for a culture of *Chlorella vulgaris* in a photobioreactor. *Computer Applications in Biotechnology*
- Findenegg, G. R., 1980a. Inorganic carbon transport in microalgae I: Location of carbonic anhydrase and  $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$  exchange. *Plant Science Letters* 17, 101–108.
- Findenegg, G. R., 1980b. Inorganic carbon transport in microalgae II: uptake of  $\text{HCO}_3^-$  ions during photosynthesis of five microalgal species. *Plant Science Letters* 18, 289–297.
- Fulke, A. B., Mudliar, S. N., Yadav, R., Shekh, A., Srinivasan, N., Ramanan, R., Krishnamurthi, K., Devi, S. S., Chakrabarti, T., Nov. 2010. Bio-mitigation of  $\text{CO}_2$ , calcite formation and simultaneous biodiesel precursors production using *Chlorella sp.* *Bioresource Technology* 101 (21), 8473–8476.
- Gao, K., Li, P., Watanabe, T., Walter Helbling, E., 2008. Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis, and DNA of *Arthrospira* (spirulina) *platensis* (cyanophyta). *Journal of Phycology* 44, 777–786.
- Gauthier, D. A. A., Turpin, D. H. H., Feb. 1994. Inorganic phosphate (Pi) enhancement of dark respiration in the Pi-limited green alga *Selenastrum minutum* (interactions between  $\text{H}^+/\text{Pi}$  cotransport, the plasmalemma  $\text{H}^+-\text{ATPase}$ , and dark respiratory carbon flow). *Plant physiology* 104 (2), 629–637.

- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E., Pröschold, T., 2005. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila negoro*, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant, Cell and Environment* 28, 1218–1229.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. A., 2005. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual review of plant biology* 56, 99–131.
- Giordano, M., Bowes, G., Nov. 1997. Gas exchange and c allocation in *Dunaliella salina* cells in response to the n source and CO<sub>2</sub> concentration used for growth. *Plant physiology* 115 (3), 1049–1056.
- Glass, Wolfe-Simon, Anbar, 2009. Coevolution of metal availability and nitrogen assimilation in cyanobacteria and algae. *Geobiology*.
- Godechot, J., 1962. Chronique. *French Historical Studies* 2 (4).
- Gordillo, F. J. L., Jiménez, C., Figueroa, F. L., Niell, F. X., 2003. Influence of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on the carbon assimilation performance and cell composition of the unicellular alga *Dunaliella viridis*. *Physiologia Plantarum* 119 (4), 513–518.
- Gordon, J. M., Polle, J. E. W., 2007. Ultrahigh bioproductivity from algae. *Applied Microbiology Biotechnology* 76, 969–975.
- Gouveia, L., Batista, L. P., Sousa, I., Raymundo, A., Bandarra, N. M., 2008. microalgae in novel food product.
- Grant, B., Turner, I., Jun. 1969. Light-stimulated nitrate and nitrite assimilation in several species of algae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 29 (3), 995–1004.
- Grant, B. R., Dec. 1968. The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite assimilation by *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of General Microbiology* 54 (3), 327–336.
- Greque de Morais, M., Costa, J., Sep. 2007. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina sp.* cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters* 29 (9), 1349–1352.

- Grossman, A., 2000. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist* 151 (3), 201–224.
- Guy, R. D., Vanlerberghe, G. C., Turpin, D. H., Apr. 1989. Significance of phosphoenolpyruvate carboxylase during ammonium assimilation: Carbon isotope discrimination in photosynthesis and respiration by the N-Limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant physiology* 89 (4), 1150–1157.
- Halle, I., Janczyk, P., Freyer, G., Souffrant, W. B., 2009. Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. *Archiva Zootechnica* 12 (2), 5–13.
- Hanagata, N., Takeuchi, T., Karube, I., 1992. Tolerance of microalgae to high CO<sub>2</sub> and high temperature. *phytochemistry*.
- Harker, M., Tsavalos, A. J., Young, A. J., 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*.
- Hein, M., Pedersen, M. F., Sand-Jensen, K., 1995. Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 118 (1-3), 247–253.
- Henderson, R. K., Baker, A., Parsons, S. A., Jefferson, B., Jul. 2008. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water research* 42 (13), 3435–3445.
- Henley, W. J., Levavasseur, G., Franklin, L. A., Osmond, C. B., Ramus, J., May 1991. Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. *Planta* 184 (2), 235–243.
- Herrig, R., Falkowski, P. G., Sep. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (haptophyceae): photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. *Journal of Phycology* 25 (3), 462–471.
- Hill, K. L., Hassett, R., Kosman, D., Merchant, S., Oct. 1996. Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant physiology* 112 (2), 697–704.
- Hill, W. R., Fanta, S. E., 2008. Phosphorus and light colimit periphyton growth at subsaturating irradiances. *Freshwater Biology* 53, 215–225.

- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Lee, D.-J., Chang, J.-S., Mar. 2011. Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems - a review. *Biotechnology Advances* 29 (2), 189–198.
- Ho, S.-H., Chen, W.-M., Chang, J.-S., Nov. 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-n as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresource Technology* 101 (22), 8725–8730.
- Hofmann, D. J., Butler, J. H., Dlugokencky, E. J., Elkins, J. W., Masarie, K., Montzka, S. A., Tans, P., 2006. The role of carbon dioxide in climate forcing from 1979 to 2004: introduction of the annual greenhouse gas index. *Tellus: Series B* 58, 614–619.
- Hofmann, D. J., Butler, J. H., Tans, P. T., 2008. A new look at atmospheric carbon dioxide. *Atmospheric Environment* 43 (12), 2084–2086.
- Huertas, E., Jun. 2000. Effects of dissolved inorganic carbon availability on growth, nutrient uptake and chlorophyll fluorescence of two species of marine microalgae. *Aquacultural Engineering* 22 (3), 181–197.
- Huisman, J., Matthijs, H. C. P., Visser, P. M., Balke, H., Sigon, C. A. M., Passarge, J., Weissing, F. J., Mur, L. R., 2002. Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 117–133.
- Hulatt, C. J., Thomas, 2011. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*. 102, 5775-5787
- Huner, N. P. A., Öquist, G., Sarhan, F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *trends in plant science* 3 (6), 224–230.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2005. Carbon dioxide capture and storage. (IPCC)
- Iwasaki, I., Hu, Q., Kurano, N., Miyachi, S., Jul. 1998. Effect of extremely high-CO<sub>2</sub> stress on energy distribution between photosystem I and photosystem II in a 'high-CO<sub>2</sub>' tolerant green alga, *Chlorococcum littorale* and the intolerant green alga *Stichococcus bacillaris*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 44 (3), 184–190

- Jacob, J., Lawlor, D. W., 1993. In vivo photosynthetic electron transport does not limit photosynthetic capacity in phosphate-deficient sunflower and maize leaves. *Plant, Cell & Environment* 16 (7), 785–795.
- Jacob-Lopes, E., Revah, S., Hernández, S., Shirai, K., Franco, T. T., Nov. 2009. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemical Engineering Journal* 153 (1-3), 120–126.
- Jeffrey, S. W., Wright, S. W., 2006. Photosynthetic pigments in marine microalgae: insights from cultures and the sea. In *Algal cultures, Analogues of blooms and applications*, volume 1
- Jiang, H., Gao, K., 2004. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 40, 651–654.
- Jong-Yuh, C., Mei-Fen, S., Jul. 2005. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life sciences* 77 (9), 980–990.
- Justo, G. Z., Silva, M. R., Queiroz, M. L. S., Jan. 2001. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 23 (1), 119–132.
- Kang, C. D., Lee, J. S., Park, T. H., Sim, S. J., 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74, 987-994
- Kantarci, N., Borak, F., Ulgen, K. O., 2005. Bubble column reactors. *Process Biochemistry* 40, 2263–2283.
- Kaplan, A., Reinhold, L., 1999. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 (1), 539–570.

- Kaplan, A., Zenvirth, D., Marcus, Y., Omata, T., Ogawa, T., Jun. 1987. Energization and activation of inorganic carbon uptake by light in cyanobacteria. *Plant physiology* 84 (2), 210–213.
- Kaplan, D., Heimer, Y. M., Abeliovicha, A., Goldsbrough, P. B., 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella sp.* *Plant Science* 109 (2), 129–137.
- Katano, 2009. Effect of temperature on inorganic carbon acquisition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal Of Freshwater Ecology*.
- Katsuda, T., Shimahara, K., Shiraishi, H., Yamagami, K., Ranjbar, R., Katoh, S., 2006. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *The Society for Biotechnology, Japan* 102 (5), 442–446.
- Keffer, J. E., Kleinheinz, G. T., Nov. 2002. Use of *Chlorella vulgaris* for CO<sub>2</sub> mitigation in a photobioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29 (5), 275–280.
- Kim, J., Lingaraju, B. P., Rheaume, R., Lee, J.-Y., Siddiqui, K. F., 2010. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science & Technology* 15 (4), 391–396.
- Kolber, Z., Zehr, J., Falkowski, P., Nov. 1988. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant physiology* 88 (3), 923–929.
- Kommareddy, A., Anderson, G., Sep. 2004. Study of light requirements of a photobioreactor. 2004 North Central ASAE/CSAE Conference, Winnipeg. 1-8
- Konishi, F., Tanaka, K., Kumamoto, S., Hasegawa, T., Okuda, M., Yano, I., Yoshikai, Y., Nomoto, K., 1990. Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 32 (1), 1–7.
- Kozłowska-Szerenos, Bialuk, Maleszewski, 2004. Enhancement of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO<sub>2</sub> concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. 42, 403-409

- Küppers, U., Weidner, M., Apr. 1980. Seasonal variation of enzyme activities in *Laminaria hyperborea*. *Planta* 148 (3), 222–230.
- Kurano, N., Ikemoto, H., Miyachi, S., 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy convers mgmt*, 689–692.
- Kurano, N., Miyachi, S., Jan. 2004. Microalgal studies for the 21st century. *Hydrobiologia* 512 (1), 27–32.
- La Fontaine, S., Quinn, J. M., Nakamoto, S. S., Page, M. D., Göhre, V., Moseley, J. L., Kropat, J., Merchant, S., Oct. 2002. Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell* 1 (5), 736–757.
- Leung, S. M., Little, J. C., Holst, T., Love, N. G., 2006. Air/Water oxygen transfer in a biological aerated filter. *Journal of Environmental Engineering*. 132(2), 181-189
- Li, D., Cong, W., Cai, Z., Shi, D., Ouyang1, F., 2004. Effect of iron stress, light stress, and nitrogen source on physiological aspects of marine red tide alga. *Journal of Plant Nutrition*. 27 (1), 29–41.
- Li, W. K. W., Goldman, J. C., Jun. 1981. Problems in estimating growth rates of marine phytoplankton from <sup>14</sup>C assays. *Microbial Ecology* 7 (2), 113–121.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., Lavín, P. L., Marquez, U. M., Aidar, E., 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology* 39 (1), 17–32.
- Ly, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., Chen, H.-L., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 101, 6797-6804
- MacIntyre, Cullen, 2005. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. *Algal Culturing techniques*. Elsevier Inc.
- Mandalam, R. K., Palsson, B., 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 59 (5), 605–611.

- Manuel, L. J., Moroney, J. V., 1988. Inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*: New proteins are made during adaptation to low CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 88 (2), 491–496.
- Masojídek, J., Kopecká, J., Koblízek, M., Torzillo, G., 2004. The xanthophyll cycle in green algae (chlorophyta): Its role in the photosynthetic apparatus. *Plant Biology* 6 (3), 342–349.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N., Jan. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (1), 217–232.
- Mendoza, H., Martel, A., Jiménez del Río, M., García Reina, G., Feb. 1999. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology* 11 (1), 15–19.
- Mercado, J. M., 2004. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany* Volume 78, Issue 3, March 2004, Pages 265-277.
- Michel, K.-P., Pistorius, E. K., Jan. 2004. Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: The function of IdiA and IsiA. *Physiologia Plantarum* 120 (1), 36–50.
- Miyachi, S., Iwasaki, I., Shiraiwa, Y., Aug. 2003. Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high CO<sub>2</sub> conditions. *Photosynthesis Research* 77 (2), 139–153.
- Miyachi, S., Miyachi, S., Mar. 1987. Some biochemical changes related to starch breakdown induced by blue light illumination and by addition of ammonia to *Chlorella cells*. *Plant and Cell Physiology* 28 (2), 309–314.
- Mizoguchi, T., Takehara, I., Masuzawa, T., Saito, T., Naoki, Y., Sep. 2008. Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *Journal of medicinal food* 11 (3), 395–404.
- Molina Grima, E., Fernandez, F. G. A., Garca Camacho, F., Chisti, Y., Apr. 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology* 70 (1-3), 231–247.

- Morel, F. M. M., Reinfelder, J. R., Roberts, S. B., Chamberlain, C. P., Lee, J. G., Yee, D., Jun. 1994. Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton. *Nature* 369 (6483), 740–742.
- Morita, K., Matsueda, T., Iida, T., Hasegawa, T., Sep. 1999. *Chlorella* accelerates dioxin excretion in rats. *The Journal of Nutrition* 129 (9), 1731–1736.
- Moroney, J. V., Ynalvez, R. A., Aug. 2007. Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 6 (8), 1251–1259.
- Moseley, J., Quinn, J., Eriksson, M., Merchant, S., May 2000. The *crd1* gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO journal* 19 (10), 2139–2151.
- Moseley, J. L., Allinger, T., Herzog, S., Hoerth, P., Wehinger, E., Merchant, S., Hippler, M., Dec. 2002. Adaptation to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *The EMBO journal* 21 (24), 6709–6720.
- Moseley, J. L., Chang, C.-W. W., Grossman, A. R., Jan. 2006. Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell* 5 (1), 26–44.
- Mouget, J. L., 2004. Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities - confirmation of 'chromatic adaptation' in diatoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 75 (1-2) 1-11
- Muller-Feuga, A., Oct. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 527–534.
- Murakami, M., Yamada, F., Takimoto, T., 1998. The biological CO<sub>2</sub> fixation using *Chlorella* sp. with high capability in fixing CO<sub>2</sub>. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 114, 315-320
- Necchi, O., Ribeiro Zucchi, M., 2001. Photosynthetic performance of freshwater rhodophyta in response to temperature, irradiance, pH and diurnal rhythm. *Phycological Research* 49, 305–318.
- Neto, I. E., Zhu, D. Z., Rajaratnam, N., 2008. Air injection in water with different nozzles. *Journal of Environmental Engineering* 134 (4), 283–294.

- Nield, J., Redding, K., Hippler, M., Dec. 2004. Remodeling of light-harvesting protein complexes in *Chlamydomonas* in response to environmental changes. *Eukaryotic cell* 3 (6), 1370–1380.
- Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Kamiya, N., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K., Shoyama, Y., 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Medica* 62 (5), 423–426.
- Ogawa, T., Ogren, W. L., 1985. Action spectra for accumulation of inorganic carbon in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Photochemistry and Photobiology* 41 (5), 583–587.
- Ogbonna, J., Tanaka, H., 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 6, 558-564
- Ogbonna, J., Yada, H., Tanaka, H., 1995. Kinetic study on Light-Limited batch cultivation photosynthetic cells. *Journal of fermentation and Bioengineering* 80 (3), 259–264.
- Oh, S. J., 2008. Effects of irradiance of various wavelengths from light-emitting diodes on the growth of the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and the diatom *Skeletonema costatum*. *Fisheries Science* Feb2008, Vol. 74 Issue 1, p137-145, 9p, 6 Graph.
- Okamoto, K., Iizuka, Y., Murakami, T., Miyake, H., Suzuki, T., Jul. 1978. Effects of *Chlorella* alkali extract on blood pressure in SHR. *Japanese heart journal* 19 (4), 622–623.
- Olaizola, M., Dec. 2003. Microalgal removal of CO<sub>2</sub> from flue gases: Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8 (6), 360–367.
- Osborne, B. A., Geider, R. J., 1986. Effect of nitrate-nitrogen limitation on photosynthesis of the diatom *Phaeodactylum tricornutum bohlin* (bacillariophyceae). *Plant, Cell & Environment* 9 (8), 617–625.
- Paz, Y., Shimoni, E., Weiss, M., Pick, U., Jul. 2007. Effects of iron deficiency on iron binding and internalization into acidic vacuoles in *Dunaliella salina*. *Plant physiology* 144 (3), 1407–1415.

- Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., Hippler, M., Niyogi, K. K., 2009. An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *nature* 462.
- Perez-Garcia, O., De-Bashan, L. E., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology* 46 (4), 800–812.
- Person, J., 2011. Algues, filière du futur, Adebiotech.
- Persic, V., Horvatic, J., Has-Schön, E., Bogut, I., Mar. 2009. Changes in N and P limitation induced by water level fluctuations in nature park kopackirit (croatia): nutrient enrichment bioassay. *Aquatic Ecology* 43 (1), 27–36.
- Pesheva, I., Kodama, M., Dionisio-Sese, M. L., Miyachi, S., Jan. 1994. Changes in photosynthetic characteristics induced by transferring Air-Grown cells of *Chlorococcum littorale* to High-CO<sub>2</sub> conditions. *Plant and Cell Physiology* 35 (3), 379–387.
- Phukan, M. M., Chutia, R. S., Konwar, B. K., Kataki, R., 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Applied Energy* 88 (10).
- Plumley, F. G., Schmidt, G. W., Apr. 1989. Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (8), 2678–2682.
- Porra, R., Feb. 1990. The assay of chlorophylls a and b converted to their respective magnesium-rhodochlorin derivatives by extraction from recalcitrant algal cells with aqueous alkaline methanol: Prevention of allomerization with reductants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1015 (3), 493–502.
- Powell, E. E., Mapiour, M. L., Evitts, R. W., Hill, G. A., Jan. 2009. Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half cell. *Bioresource Technology* 100 (1), 269–274.
- Prézelin, B. B., Samuelsson, G., Matlick, H. A., Oct. 1986. Photosystem II photoinhibition and altered kinetics of photosynthesis during nutrient-dependent high-light photoadaptation in *Gonyaulax polyedra*. *Marine Biology* 93 (1), 1–12.

- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J., Dec. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource technology* 100 (23), 5988–5995.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Le Gouic, B., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J., Jan. 2011. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource technology* 102 (1), 150–158.
- Pugh, N., Ross, S. A., ElSohly, H. N., ElSohly, M. A., Pasco, D. S., Nov. 2001. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta medica* 67 (8), 737–742.
- Qiang, H., Richmond, A., 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate phot - oilgae blog. *Journal of Applied Phycology* 8, 139–145.
- Qiang, H., Zarmi, Y., Richmond, A., 1998a. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *European Journal of Phycology* 33 (02), 165–171.
- Qiang, H., Zarmi, Y., Richmond, A., May 1998b. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *European Journal of Phycology* 33 (2), 165–171.
- Quisel, J. D., Wykoff, D. D., Grossman, A. R., Jul. 1996. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 111 (3), 839–848.
- Rao, D. V. S., Pan, Y., Al-Yamani, F., 2005. Growth and photosynthetic rates of *Chlamydomonas plethora* and *Nitzschia frustula* cultures isolated from kuwait bay, arabian gulf, and their potential as live algal food for tropical mariculture. *Marine Ecology* 26, 63–71.
- Raven, 2011. Effects on marine algae of changed seawater chemistry with increasing atmospheric CO<sub>2</sub>. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. 111B, 1-17
- Raven, Geider, 1988. Temperature and algal growth. *New phytologist*. 110(4), 441-461

- Raven, J. A., Beardall, J., 2003. Carbon acquisition mechanisms of algae: Carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms, *Photosynthesis in Algae*. 225–244.
- Rhee, G. Y., Gotham, I. J., 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Light and the interactions of light with nitrate limitation. *Limnology and Oceanography* 26 (4). 649-659
- Rhiel, E., Krupinska, K., Wehrmeyer, W., Nov. 1986. Effects of nitrogen starvation on the function and organization of the photosynthetic membranes in *Cryptomonas maculata* (cryptophyceae). *Planta* 169 (3), 361–369.
- Ribeiro Zucchi, M., Necchi, O., 2011. Effects of temperature, irradiance and photoperiod on growth and pigment content in some freshwater red algae in culture. *Phycological Research* 49, 103–114.
- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L., Wickline, H. E., Aug. 1969. Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Applied microbiology* 18 (2), 245–250.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*.
- Riebesell, U., 2004. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on marine phytoplankton. *Journal of Oceanography*, 719–729.
- Robert, D., 1998. *Biologie végétale*, volume 1: organisation cellulaire.
- Rochaix, J. D., Dec. 2001. Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 127 (4), 1394–1398.
- Rowley, W. M., 2010. Nitrogen and phosphorus biomass-kinetic model for *Chlorella vulgaris* in a biofuel production scheme.
- Sakai, N., Sakamoto, Y., Kishimoto, N., Chihara, M., Karube, I., Jun. 1995. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO<sub>2</sub>. *Energy Conversion and Management* 36 (6-9), 693–696.

- Sánchez, J. F., 2008. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied Microbiology & Biotechnology* 79, 719–729.
- Sanchez Miron, A., Ceron Garcia, M-C., Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 31 (7), 1015–1023.
- Sasaki, T., Pronina, N. A., Maeshima, M., Iwasaki, I., Kurano, N., Miyachi, S., 1999. Development of vacuoles and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity under extremely high CO<sub>2</sub> conditions in *Chlorococcum littorale* cells. *Plant Biology* 1 (1), 68–75.
- Satoh, A., Kurano, N., Senger, H., Miyachi, S., Apr. 2002. Regulation of energy balance in photosystems in response to changes in CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities during growth in Extremely-High-CO<sub>2</sub>-tolerant green microalgae. *Plant and Cell Physiology* 43 (4), 440–451.
- Sciandra, A., Gostan, J., Collos, Y., Descolas-Gros, C., Leboulanger, C., Martin-Jézéquel, V., Denis, M., Lefèvre, D., Copin, C., Avril, B., 1997. Growth compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnology Oceanography* 42 (2), 1325–1339.
- Sciandra, A., Lazzara, L., Claustre, H., Babin, M., 2000. Responses of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas* sp. to light and nitrogen stresses. *Marine Ecology progress series* 201, 107–120.
- Sciandra, A., Ramani, P., May 1994. The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 178 (1), 1–15.
- Scragg, A. H., Morrison, J., Shales, S. W., 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology* 33 (7), 884–889.
- Smith, R. G., Vanlerberghe, G. C., Stitt, M., Turpin, D. H., Oct. 1989. Short-Term metabolite changes during transient ammonium assimilation by the N-Limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant physiology* 91 (2), 749–755.

- Smith, S. I., Yamanaka, Y., Pahlow, M., Oschlies, A., 2009. Optimal uptake kinetics: physiological acclimation explains the pattern of nitrate uptake by phytoplankton in the ocean. *Marine Ecology Progress Series* 384, 1–13.
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., Zilli, M., Converti, A., Apr. 2008. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 39 (2), 369–375.
- Solovchenko, A., Merzlyak, M. N., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S., 2010. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (chlorophyta, trebouxiophyceae) mutant deficient in d5 desaturase by nitrogen starvation and high light. *Journal of phycology* 46, 763–772.
- Sorokin, C., Apr. 1965. Carbon dioxide and cell division. *Nature* 206 (4979), 35–37.
- Spalding, M., Critchley, C., Govindjee, Orgren, W., Jun. 1984. Influence of carbon dioxide concentration during growth on fluorescence induction characteristics of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 5 (2), 169–176.
- Spijkerman, E., Dec. 2007. Phosphorus acquisition by *Chlamydomonas acidophila* under autotrophic and osmo-mixotrophic growth conditions. *Journal of Experimental Botany* 58 (15-16), 4195–4202.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., Feb. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2), 87–96.
- Stevens, S. E., Van Baalen, C., Feb. 1973. Characteristics of nitrate reduction in a mutant of the Blue-Green alga *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant physiology* 51 (2), 350–356.
- Subba, D. V., Pan, Y., Al-Yamani, F., Mar. 2005. Growth and photosynthetic rates of *Chlamydomonas plethora* and *Nitzschia frustula* cultures isolated from kuwait bay, arabian gulf, and their potential as live algal food for tropical mariculture. *Marine Ecology* 26 (1), 63–71.
- Sun, Y., Wang, C., Apr. 2009. The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{CO}_2$ , and light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14 (2), 225–231.

- Sung, K., Jan. 1999. Isolation of a new highly CO<sub>2</sub> tolerant fresh water microalga *Chlorella* sp. KR-1. Renewable Energy 16 (1-4), 1019–1022.
- Sushchik, N. N., Kalacheva, G. S., Zhila, N. O., Gladyshev, M. I., Volova, T. G., May 2003. A temperature dependence of the intra- and extracellular Fatty-Acid composition of green algae and cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiology 50 (3), 374–380.
- Sydney, E. B., Sturm, W., de Carvalho, J. C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C. R., Aug. 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresource Technology 101 (15), 5892–5896.
- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., Orvain, F., 2009. CSIRO Publishing - marine & freshwater research. marine and freshwater research 60 (12), 1201–1210.
- Takeda, H., Sep. 1993. Chemical composition of cell walls as a taxonomical marker. Journal of Plant Research 106 (3), 195–200.
- Tam, N. F. Y., Wong, Y. S., Jul. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. Bioresource Technology 57 (1), 45–50.
- Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K., Shoyama, Y., Kubo, C., Nomoto, K., Oct. 1997. Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. Planta medica 63 (5), 465–466.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., Feb. 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. Bioresource Technology 102 (3), 3071–3076.
- Terauchi, A. M., Peers, G., Kobayashi, M. C., Niyogi, K. K., Merchant, S. S., Jul. 2010. Trophic status of *Chlamydomonas reinhardtii* influences the impact of iron deficiency on photosynthesis. Photosynthesis research 105 (1), 39–49.
- Thacker, A., Syrett, P. J., 1972. The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. New Phytologist 71 (3), 423–433.
- Traviesoa, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., Martín, A., Colmenarejo, M. F., 2006. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. Ecological Engineering 18 (2), 158–162.

- Turpin, D. H., 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology* 27 (1), 14–20.
- Turpin, D. H., Harrison, P. J., 1978. Fluctuations in free amino acid pools of *Gymnodinium simplex* (dinophyceae) in response to ammonia perturbation: Evidence for glutamine synthetase pathway<sup>1,2</sup>. *Journal of Phycology* 14 (4), 461–464.
- Turpin, D. H., Weger, H. G., Sep. 1988. Steady-State chlorophyll a fluorescence transients during ammonium assimilation by the N-Limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant physiology* 88 (1), 97–101.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., Jul. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 99 (10), 4021–4028.
- Valderrama, L. T., Del Campo, C. M., Rodriguez, C. M., de Bashan, L. E., Bashan, Y., 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research* 36 (17), 4185–4192.
- Van den Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. M., 1995. *Algae: An introduction to phycology*.
- Vanlerberghe, G. C., Schuller, K. A., Smith, R. G., Feil, R., Plaxton, W. C., Turpin, D. H., Sep. 1990. Relationship between  $\text{NH}_4^+$  assimilation rate and in vivo phosphoenolpyruvate carboxylase activity : Regulation of anaplerotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 94 (1), 284–290.
- Varela, D. E., Willers, Crawford, D. W., 2011. Effect of zinc availability on growth, morphology, and nutrient incorporation in a coastal and an oceanic diatom. *Journal of Phycology*. 47(2), 302–312
- Vesk, M., Jeffrey, S. W., 1977. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes<sup>1</sup>. *Journal of Phycology* 13 (3), 280–288.
- Voronova, E. N., Konyukhov, I. V., Yu, Pogosyan, S. I., Rubin, A. B., 2008. Changes in the condition of photosynthetic apparatus of a diatom alga *Thalassiosira weissflogii* during photoadaptation and photodamage. *Russian Journal of Plant Physiology* 56 (6), 753–760.

- Wallen, D. G., Geen, G. H., Jul. 1971. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Marine Biology* 10 (1), 34–43.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C. Q., Jul. 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 707–718.
- Wang, B., Liu, C. Q., Wu, Y., Feb. 2005. Effect of heavy metals on the activity of external carbonic anhydrase of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and microalgae from karst lakes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74 (2), 227–233.
- Wang, C., Fu, C., Liu, Y., 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 37 (1), 21–25.
- Weger, H. G., 1996. Interactions between respiration and inorganic phosphate uptake in phosphate-limited cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum* 97 (4), 635–642.
- Weger, H. G., Turpin, D. H., Feb. 1989. Mitochondrial respiration can support NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub> reduction during photosynthesis : Interactions between photosynthesis, respiration, and N assimilation in the N-Limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant physiology* 89 (2), 409–415.
- Westerhoff, P., Hu, Q., Esparza-Soto, M., Vermaas, W., Apr. 2010. Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous-flow photobioreactors. *Environmental technology* 31 (5), 523–532.
- Wild, G., Roustan, M., 2003. Détermination expérimentale des caractéristiques des dispersions gaz-liquide. Edition Tec et Doc
- Wood, Everroad, Wingard, 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. *Algal culturing techniques*. Elsevier Inc
- Wu, H., Zou, D., Gao, K., Dec. 2008. Impacts of increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis and growth of micro- and macro-algae. *Science in China Series C: Life Sciences* 51 (12), 1144–1150.

- Wu, Y., Gao, K., Riebesell, U., Sep. 2010. CO<sub>2</sub>-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biogeosciences* 7 (9), 2915–2923.
- Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A., Grossman, A. R., May 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 117 (1), 129–139.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q., Feb. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied microbiology and biotechnology* 78 (1), 29–36.
- Yanagi, M., Watanabe, Y., Saiki, H., Jun. 1995. CO<sub>2</sub> fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. *Energy Conversion and Management* 36 (6-9), 713–716.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K., 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical engineering*. 6, 87–102.
- Yang, J., Lia, X., Hua, H., Zhangc, X., Yua, Y., Chen, Y., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents. *Applied Energy* 88, 3295–3299.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T., Takido, M., Apr. 1996. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biological & pharmaceutical bulletin* 19 (4), 573–576.
- Yeh, K.-L., Chang, J.-S., Chen, W.-m., 2010. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.* 10 (3), 201–208.
- Young, E. B., Beardall, 2004. Modulation of photosynthesis and inorganic carbon acquisition in a marine microalga by nitrogen, iron, and light availability. *Canadian journal of botanic* 83, 917–928.

- Yun, Y.-S., Park, J., Jul. 1997. Development of gas recycling photobioreactor system for microalgal carbon dioxide fixation. *Korean Journal of Chemical Engineering* 14 (4), 297–300.
- Zehr, J. P., Falkowski, P. G., 1988. Pathway of ammonium assimilation in a marine diatom determined with the radiotracer  $^{13}\text{N}$ . *Journal of Phycology* 24 (4), 588–591.
- Zer, H., Ohad, I., 2003. Light, redox state, thylakoid-protein phosphorylation and signaling gene expression. *Trends Biochemical Sciences*. 28(9), 467-470
- Zijffers, J.-W. W., Schippers, K. J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J., Wijffels, R. H., Nov. 2010. Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.) 12 (6), 708–718.

## Références bibliographiques

---

## **Annexes**

**Annexe I : Milieu Bristol 3N modifié (Bischoff and Bold, 1963)**

Ce milieu comprend trois solutions A, B et microéléments.

Chacune de ces solutions seront préparées séparément et conservées au frais à l'abri de la lumière.

**Composition du milieu de Culture :****Solution A :**

|                                       | Poids/L de milieu | Poids/ 1L de solution A | Poids / 250 mL de solution A | Concentration (mol/L) |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| NaNO <sub>3</sub>                     | 0.75 g/l          | 75 g                    | 18.75 g                      | 0.0088                |
| CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O | 25 mg/l           | 2.5 g                   | 625 mg                       | 1.93 <sup>E</sup> -4  |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O | 75 mg/l           | 7.5 g                   | 1.875 g                      | 3.045 <sup>E</sup> -4 |
| FeEDTA                                | 20 mg/l           | 2.0 g                   | 500 mg                       | 5.75 <sup>E</sup> -5  |

**Solution B :**

|                                 | Poids/L de milieu | Poids/ 1L de solution B | Poids / 250 mL de solution B | Concentration (mol/l) |
|---------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 75 mg/l           | 7.5 g                   | 1.875 g                      | 0.00043               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 175 mg/l          | 17.5 g                  | 4.375 g                      | 0.00128               |
| NaCl                            | 20 mg/l           | 2.0 g                   | 0.5 g                        | 3.41E-4               |

Solution trace ou microéléments :

|                                      | Poids/L de milieu   | Poids/ 1L de solution $\mu\text{E}$ | Poids / 250 mL de solution $\mu\text{E}$ | Concentration (mol/l) |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| $\text{H}_3\text{BO}_3$              | 2.86 mg/l           | 2.86 g                              | 715 mg                                   | $4.61^{\text{E}}-5$   |
| $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.81 mg/l           | 1.81 g                              | 452.5 mg                                 | $1.20^{\text{E}}-5$   |
| $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 220 $\mu\text{g/l}$ | 220 mg                              | 55 mg                                    | $1.149^{\text{E}}-6$  |
| $\text{CuSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 80 $\mu\text{g/l}$  | 80 mg                               | 20 mg                                    | $4.221^{\text{E}}-7$  |
| $\text{MoO}_3$ 85%                   | 36 $\mu\text{g/l}$  | 36 mg                               | 9 mg                                     | $2.5^{\text{E}}-7$    |
| $\text{CoSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 90 $\mu\text{g/l}$  | 90 mg                               | 22.5 mg                                  | $4.86^{\text{E}}-7$   |

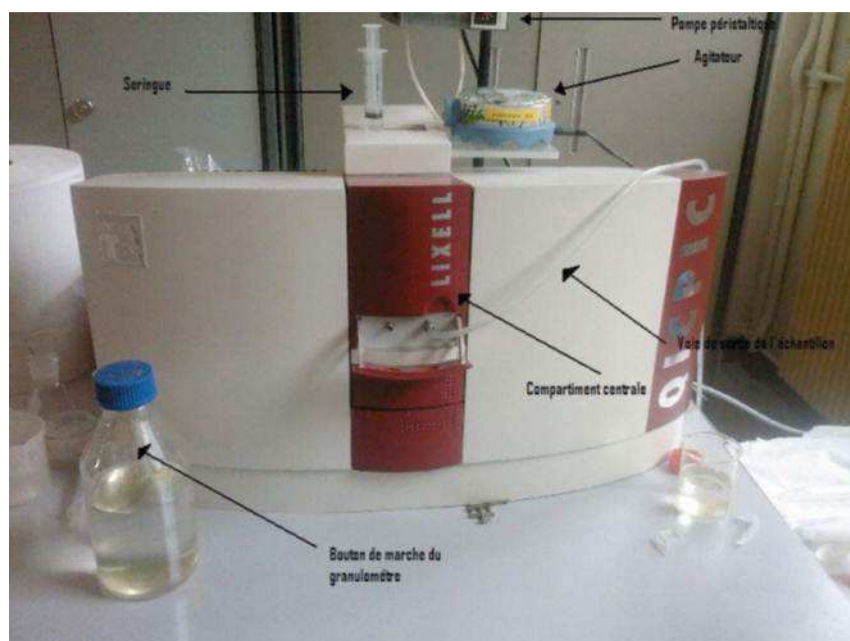
Pour faire 1 litre de milieu :

- 10 ml de solution A
- 10 ml de solution B
- 1 ml de solution microéléments

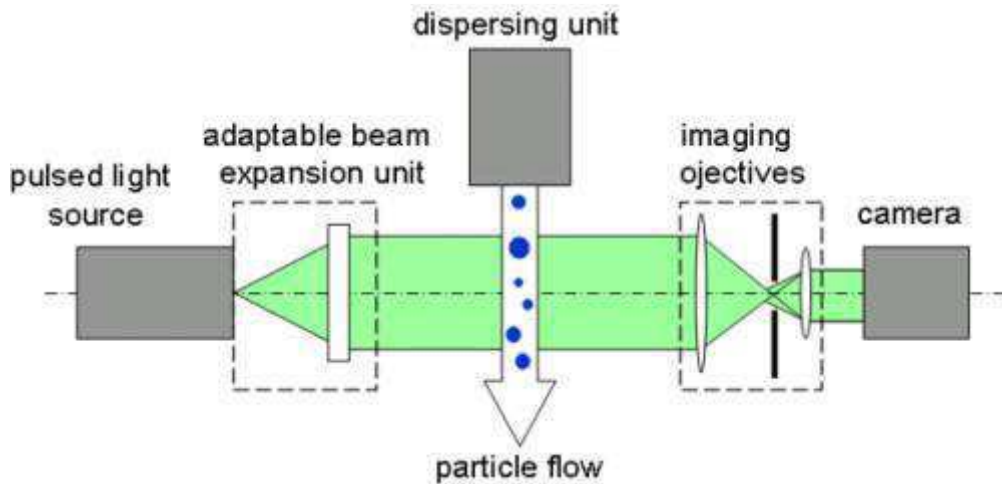
## **Annexe II : Protocoles d'analyses**

### **Annexe.II.1. Principe de la méthode de mesure de la concentration cellulaire au granulomètre laser**

La méthode granulométrique résulte de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident. La mesure se fait par l'analyse de la tache de diffraction du faisceau. En effet, les particules présentes sur le trajet d'un faisceau de rayons laser diffractent les rayons lumineux en fonction du diamètre de ces particules. Une lentille convergente forme l'image du faisceau diffracté en forme d'anneaux sur un détecteur situé dans le plan focal (Figure A.1). Un traitement mathématique donne un diamètre moyen et la distribution en taille des particules selon une distribution en volume.



**Figure A.1.** Granulomètre laser QICPIC (SympaTEC)



**Figure A.2.** Principe du granulomètre laser.

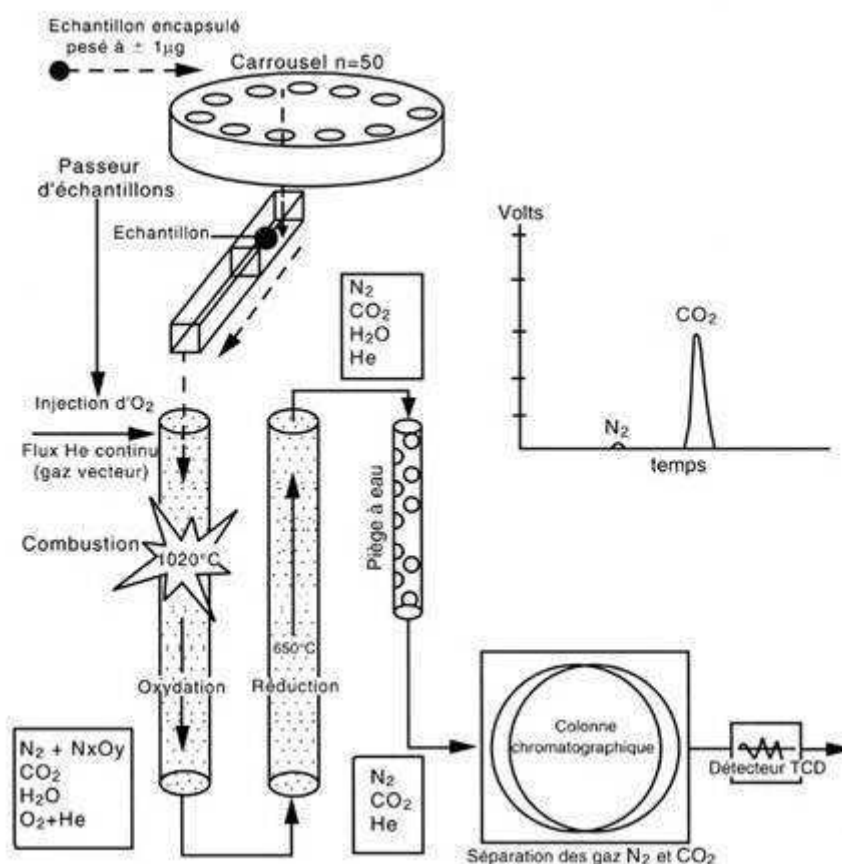
La méthode d'analyse par granulométrie laser repose sur deux théories fondamentales : la théorie de Fraunhofer et la théorie de Mie.

- *théorie de Fraunhofer* suppose que les particules sont opaques, non poreuses, sphériques, suffisamment éloignées les unes des autres, de mouvement aléatoire et que leurs diamètres sont supérieurs à la longueur d'onde utilisée. Ces particules diffractent la lumière avec la même efficacité. Cette théorie ne s'applique pas aux particules de petite taille.
- *théorie de Mie* est appliquée pour les particules de taille inférieure à 100  $\mu\text{m}$ . Elle suppose que le diamètre des particules est inférieur ou égal à la longueur d'onde incidente. On tient compte ici des indices de réfraction et du coefficient d'absorption de l'échantillon et du milieu porteur. En effet, le faisceau laser qui traverse la cellule d'analyse va se propager sans déflexion jusqu'à ce qu'il rencontre une particule dont l'indice de réfraction est différent de l'indice de la phase continue. Ce changement d'indice va créer une réfraction du faisceau laser. Cette partie réfractée de lumière pénétrant dans la particule va ressortir en étant toujours soumise aux phénomènes de réflexion et réfraction dus à la différence des milieux. Le faisceau lumineux va enfin arriver sur le détecteur en ayant subi plusieurs variations de son axe de propagation.

Lors d'une analyse, l'échantillon est dilué avec de l'eau distillée au 10<sup>ème</sup> ou au 5<sup>ème</sup> selon sa concentration cellulaire. 50 mL de solution est préparée. Elle est ensuite introduite dans l'analyseur à l'aide d'un tuyau gouverné par une pompe. Le logiciel WINDOX est programmé pour effectuer 7 mesures successives du même échantillon.

## Annexe.II.2. Analyse de la fraction en azote et en quota intracellulaire de *Chlorella vulgaris*

Les analyses du carbone organique particulaire (POC) et de l'azote organique particulaire (PON) se font à l'aide d'un analyseur élémentaire FLASH 2000 series CHNS/O analyser (Thermo Scientific) (Figure A.3).



**Figure A.3.** Principe de fonctionnement de l'analyseur élémentaire

### *Principe de l'appareil*

L'analyse élémentaire par combustion utilise deux tubes installés en série dans une enceinte calorifugée, chaque tube pouvant être chauffé indépendamment. Le premier tube est le siège de la réaction d'oxydation et le deuxième celui de la réaction de réduction.

Les réactions :

- Dans le tube de gauche (CHNS)



$C \rightarrow CO_2 \rightarrow CO_2$  le catalyseur de réduction est le Cu

$H \rightarrow H_2O \rightarrow H_2O$

$S \rightarrow SO_3 \rightarrow SO_2$

- Dans le tube de droite (CN)

$NO_x \rightarrow N_2$

$CO_2 \rightarrow CO_2$  combustion

$H_2O \rightarrow H_2O$

$SO_2 \rightarrow SO_3 \rightarrow SO_3$

Pour s'affranchir des problèmes de fractionnement isotopique, il faut que la combustion soit totale. Plusieurs précautions sont donc prises en ce sens. Tout d'abord, un excès d'oxygène est apporté lors de la chute de l'échantillon dans le tube de combustion. L'échantillon est conditionné dans des capsules d'étain qui ont la propriété d'augmenter rapidement la température de 300°C (phénomène de la "combustion flash" où un flash plus clair correspondant à la combustion de l'échantillon et de sa capsule sont visibles). Enfin, le tube est conditionné à l'aide de catalyseurs de la réaction d'oxydation (oxydes de cuivre), et de façon à ce que l'échantillon tombe dans la zone la plus chaude du tube.

Les gaz, après réduction à l'aide de paillettes de cuivre réduit, passent par un piège à eau constitué de perchlorate de magnésium -  $Mg(ClO_4)_2$  - couramment dénommé "anhydrone". Ils entrent ensuite dans une colonne chromatographique remplie, qui sépare les différents gaz élémentaires avant leur introduction dans le catharomètre (détecteur).

Le principe de mesure du détecteur est basé sur la conductibilité thermique du gaz (Thermal Conductivity Detector – TCD). Le capteur compare la conductivité du gaz à analyser et celle de la référence grâce à un détecteur filament.

Un catharomètre est un détecteur basé sur la mesure des variations de conductivité thermique d'un flux gazeux. Il possède deux circuits gazeux :

- un circuit de référence où circule le gaz vecteur pur (Hélium).

- un circuit de mesure balayé par un flux gazeux comportant le gaz vecteur (Hélium) ainsi que les gaz dégagés par la combustion de l'échantillon (dioxyde de carbone et azote moléculaire).

Chaque circuit comporte deux résistances (filaments chauffés) et l'ensemble constitue un pont de Wheastone dont la tension est nulle lorsque de l'hélium pur circule dans chacun des deux circuits.

*Protocole de préparation des échantillons*

1. Préparation de l'appareil à filtration : l'appareil de filtration est tout d'abord lavé avec 100 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pour éliminer toute trace de carbone inorganique puis rincer avec 100 mL d'eau ultrapure.
2. Préparation des filtres : des filtres GF/F (Whatman®) sont utilisés pour les analyses. Chaque filtre est rincé avec 50 mL d'eau ultrapure puis passé au four 1h à  $525^\circ\text{C}$  pour éliminer toute trace de matière organique.
3. Les filtres vierges sont pesés à l'aide d'une balance de précision. Ils seront conservés à  $60^\circ\text{C}$  dans une étuve jusqu'à leur utilisation.
4. Préparation des échantillons : Les échantillons sont centrifugés (20 minutes, 1811 g), le surnageant est gardé pour des analyses de carbone organique dissous et le culot est rincé avec de l'eau ultrapure. Cette opération est répétée une fois. Ensuite, un volume connu d'échantillon est filtré. Avant filtration l'échantillon est homogénéisé à l'aide d'un vortex. Le tube contenant l'échantillon est pesé avant et après filtration pour connaître précisément le volume filtré.
5. Les filtres sont séchés une nuit à  $60^\circ\text{C}$
6. Les filtres contenant les algues sont pesés sur la balance de précision
7. Des pastilles de 9 mm de diamètre sont découpées sur le filtre. Le calcul suivant est fait afin de connaître le rapport entre la pastille et le filtre entier ce qui permettra de rapporter la valeur obtenue pour la pastille à tout l'échantillon :

$$\text{Surface totale} = (\pi \cdot d^2)/4 = 3,14 \cdot (20,9)^2/4 = 342,895 \text{ mm}^2, d \text{ est le diamètre du filtre}$$

$$\text{Surface de la pastille} = 63,585 \text{ mm}^2$$

$$\text{Rapport } S_{\text{tot}}/S_{\text{pastille}} = 0,185$$

8. Les pastilles sont mises à décarbonater une nuit avec du HCl dans un dessiccateur (après décarbonatation les pastilles sont gardées dans le dessiccateur avec des grain de silicate et un peu de KOH pour éviter qu'elles ne reprennent l'humidité et que du carbone inorganique ne se dépose dessus)
9. Les pastilles sont ensuite disposées dans des nacelles en étain et analysées.

Chaque échantillon est analysé en tripliquat (trois pastilles par filtre).

### Annexe.II.3. Analyse du carbone organique dissous (DOC)

L'analyse du carbone organique dissous se fait à l'aide d'un analyseur TOC-V CSH (Shimadzu, Europa GmbH, Duisburg).

#### *Principe de l'appareil*

Pour l'analyse du carbone organique dissous (COD), l'échantillon contenant des composés carbonylés est introduit dans un tube chauffé à 680 °C qui contient un catalyseur agissant comme oxydant. Les composés de combustion et de dégradation sont sous forme de CO<sub>2</sub>, qui est analysé par détection infrarouge et quantifié par comparaison à une courbe d'étalonnage. Le carbone organique dissous (COD) réfère au carbone organique non volatile, qui est mesuré en acidifiant l'échantillon au préalable à l'aide de l'acide chlorhydrique 1 N et en y faisant barboter de l'air de qualité ultrapure.

#### *Protocole de préparation des échantillons*

La concentration en carbone organique dissous est mesurée dans le surnageant des échantillons servants aux analyses POC et PON.

1. Une solution de standard (NaHCO<sub>3</sub>) est préparée afin de réaliser une gamme étalon. L'appareil est programmé pour réaliser une gamme étalon allant de 0 à 50 mg.L<sup>-1</sup> à partir du standard.
2. Si besoin est, les échantillons sont dilués avec de l'eau ultrapure afin de rentrer dans la gamme étalon.
3. Avant de passer les échantillons on analyse d'abord un blanc composé d'eau ultrapure provenant de la salle blanche puis un standard (préparé par pesée). Les échantillons sont disposés sur le passeur automatique. Entre chaque échantillon un blanc est analysé. La série d'analyse est terminée par un standard suivi d'un blanc.

#### Annexe.II.4. Protocole d'extraction et de quantification de la chlorophylle a

##### *Protocole de préparation et d'analyse*

- 1 mL de culture est centrifugée 5 minutes à 6440 g
- 1 mL d'une solution de méthanol 85% contenant 1.5 mmol.L<sup>-1</sup> de sodium dithionite est ajouté sur le culot. Le sodium dithionite permet de couper les ponts disulfures des protéines de la paroi cellulaire, rendant ainsi la paroi plus poreuse au méthanol (Porra, 1990).
- Les échantillons sont placés 32 minutes à 40°C. Ils sont gardés au noir afin d'éviter toute dégradation de la chlorophylle par la lumière (McIntyre and Cullen, 2005).
- Après extraction, les échantillons sont à nouveau centrifugés (5 minutes, 6440 g)
- L'absorbance aux longueurs d'ondes 664 et 650 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

D'après les équations suivantes il est possible de déterminer la concentration en chlorophylle a et b (Porra, 1990) :

$$\text{Chl a (mg.L}^{-1}\text{)} = 16.41 A_{664} - 8.09 A_{650}$$

$$\text{Chl b (mg.L}^{-1}\text{)} = 30.82 A_{650} - 12.57 A_{664}$$

#### Annexe.II.5. Quantification des exopolysaccharides solubles (EPS solubles)

La quantification des exopolysaccharides solubles se fait à l'aide du dosage de Dubois (1956). Le principe de la méthode repose sur la formation de composés furfuraliques par chauffage des oses neutres en milieu sulfurique concentré. En réagissant avec le phénol ces composés donnent une coloration jaune à la solution.

##### *Préparation des échantillons :*

250 µl d'échantillons sont prélevés puis centrifugés (10 minutes, 1811 g). 200 µL de surnageant est récupéré pour le dosage.

##### *Dosage de Dubois :*

A 200 µl d'échantillons sont ajoutés rapidement 200 µl de phénol 5% et 1 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les échantillons sont mélangés. Après 10 minutes d'attente les échantillons sont de nouveau mélangés. Puis ils sont incubés 15 minutes à 30°C au bain-marie.

L'absorbance à 488 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

*Gamme de glucose :*

Une gamme de concentration allant de 50 à 300 mg.L<sup>-1</sup> est préparée. Le glucose est utilisé comme référence dans cette étude.



## Résumé de thèse

Face à la montée de la prise de conscience des enjeux écologiques actuels, la recherche se tourne vers le développement des bioprocédés pour développer de nouvelles solutions aux problèmes environnementaux. Cette thèse porte sur l'étude de la faisabilité d'un procédé de capture de CO<sub>2</sub> à partir de la culture de la microalgue *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur continu. Ce travail a permis d'identifier l'algue *C. vulgaris* comme une candidate prometteuse pour cette application. En effet *C. vulgaris* présente une capacité de production de biomasse et de fixation de CO<sub>2</sub> très intéressante pour cette application. Les études menées lors de ce travail de thèse ont également permis de mettre à jour les interactions complexes entre les cellules algales et le CO<sub>2</sub> présent à de fortes concentrations. De même, elles ont apporté un approfondissement à la compréhension des verrous existants pour le développement d'un procédé de captage du CO<sub>2</sub> et de la nécessité de prendre en compte tous les paramètres de culture (lumière, concentration en nitrate). A partir des études menées, il a été possible de proposer un modèle pour la croissance de *C. vulgaris* en photobioréacteur continu. Bien que de futures études soient encore nécessaires pour être en mesure de parfaitement modéliser le comportement de l'algue lors de cultures en photobioréacteur, ce modèle présente une bonne corrélation avec les expérimentations. Enfin une étude de pré-dimensionnement a été proposée qui a permis de mettre en lumière les nombreux points d'interrogations encore existants avant d'être en mesure d'adapter le procédé de laboratoire à une échelle industrielle.

**Mots-clés :** *Chlorella vulgaris*, bioprocédé, CO<sub>2</sub>, culture batch, culture continu, microalgues, modélisation, photobioréacteur.

## Thesis abstract

Faced with the growing awareness of environmental issues, the research turns to the development of bioprocesses to develop new solutions to environmental problems. This thesis concerns the study of the feasibility of a process for CO<sub>2</sub> capture from the culture of the microalgae *Chlorella vulgaris* in a continuous photobioreactor. This work has identified the algae *C. vulgaris* as a promising candidate for this application. Indeed *C. vulgaris* has a capacity of biomass production and CO<sub>2</sub> biofixation very interesting for this application. Studies in this thesis allowed us to update the complex interactions between the algal cells and high CO<sub>2</sub> concentrations. Also they have provided a deeper understanding of existing locks for the development of a process for CO<sub>2</sub> capture and the need to take into account all the parameters of culture (light, nitrate concentration). A model for the growth of *C. vulgaris* in continuous photobioreactor has been proposed. This model shows good correlation with experiments; although future studies are still needed to be able to fully simulate the behavior of algae in photobioreactor cultures. Finally a study of pre-design has been proposed allowing highlighting the many questions that still exist before being able to adapt the laboratory process to an industrial scale.

**Key-words:** *Chlorella vulgaris*, bioprocess, CO<sub>2</sub>, batch culture, continuous culture, microalgae, model, photobioreactor.