



Développement d'outils pour le suivi en ligne des cultures de microalgues utilisant le bicarbonate comme source de carbone

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en Ingénierie
en vue de l'obtention du grade de maître ès Sciences appliquées

PAR

© **PIERRE-OLIVIER MORISSET**

Septembre 2018

Composition du jury:

[Jean-François Méthot], président du jury, [Université du Québec à Rimouski]

**[Jean-Sébastien Deschênes], directeur de recherche, [Université du Québec à
Rimouski]**

[Réjean Tremblay], codirecteur de recherche, [ISMER]

**[Richard St-Louis], examinateur externe au département, [Université du Québec à
Rimouski]**

Dépôt initial le [15 février 2018]

Dépôt final le [18 septembre 2018]

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Je dédie ce mémoire à tous ceux qui me soutiennent depuis le début de mes études et qui, comme moi, rêvent d'une société où le bien être de la planète sera la priorité.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord et avant tout remercier mes parents et ma famille pour leur indéfectible appui tout au long de ma démarche. J'ai dû m'éloigner pour poursuivre mon but, mais je vous garde toujours avec moi.

Je remercie aussi mon amoureuse pour son écoute, sa compréhension et son soutien malgré la distance et les embûches.

Un merci tout spécial à mon directeur de recherche, Jean-Sébastien, pour sa patience d'une part, et pour avoir su me communiquer sa passion.

Merci à Bertrand Genard pour son apport technique et le gracieux partage de ses connaissances précieuses.

Merci aussi à Jonathan Gagnon et Steeven Ouellet pour leur soutien technique et leur patience au laboratoire comme en rédaction.

Finalement, je remercie mes collègues étudiants, plus précisément Jihed Ben Tahar, Gabriel Dugas, David Delaunay, Roxanne Brion-Roby Alexandre Ghibernea et Alexandre Dionne pour les bons moments à l'Université et hors du cadre scolaire. Les projets ont beau être individuels, mais c'est ensemble qu'on y est arrivés.

AVANT-PROPOS

Je ne me suis jamais dirigé vers les sciences par talent ou parce que j'en avais de la facilité, mais plutôt parce que je sentais qu'elles étaient la voie qui menaient au progrès pour le bien de la planète et de l'humanité. J'ai toujours eu le sentiment, qu'aussi infime puisse-t-elle être, la contribution que j'y ferais mènerait dans le bon sens. Mes études en chimie m'ont permis d'acquérir des connaissances critiques pour le développement de technologies plus vertes et cette maîtrise dans le domaine des biotechnologies m'a ouvert les yeux sur l'univers des possibilités et du travail qu'il reste à faire.

Depuis des décennies déjà, les scientifiques du monde tentent de conscientiser la population à la fragilité de la planète et de l'impact des humains sur celle-ci. Force est d'admettre que le message, bien qu'il ait été entendu, n'a pas engendré la réaction escomptée. L'implication individuelle et les mesures à petite échelle sont toujours d'actualité. Par contre, elles ne suffisent plus. Une réelle révolution écologique est nécessaire et elle passera forcément par le remplacement de technologies polluantes par des technologies vertes. Pour ce faire, il faudra démontrer une véritable volonté politique et économique. Les sciences sont vastes et des progrès restent à faire dans tous les domaines. Toutefois, les progrès commencent toujours par la recherche, ce qui nécessite des investissements considérables de ressources financières et de temps. Ces investissements doivent se faire maintenant pour que nous puissions vraiment faire face aux défis de notre siècle.

Je sais bien qu'à l'échelle individuelle, même à l'échelle nationale, on ne peut qu'avoir une influence mineure, mais toute tentative de remplacement de technologie ou pratique polluante est un pas dans la bonne direction. C'est pourquoi je me suis dirigé vers les biotechnologies microalgales et que j'espère y rester le temps qu'il faudra.

RÉSUMÉ

Les bioprocédés à base de microalgues représentent des alternatives prometteuses aux technologies actuelles, notamment dans les domaines énergétiques, pharmaceutiques et nutraceutiques. Toutefois, l'implantation de ces procédés à grande échelle est ralentie par leur difficile rentabilité. Les sels de bicarbonate représentent une avenue prometteuse pour optimiser la productivité des cultures et la consommation du carbone. Contrairement aux autres sources de carbone alternatives envisagées dans la culture de microalgues, les algues consomment le bicarbonate en photosynthèse. De plus, il peut être extrait d'effluents polluants. L'utilisation du bicarbonate de sodium a déjà été étudiée pour favoriser la production de lipides en fin de cycle de culture. De plus, comme le bicarbonate est totalement dissout dans le milieu de culture, contrairement au CO₂ lorsqu'il est acheminé par bullage au système de culture, il est totalement disponible pour les microalgues. Cela permettrait potentiellement une croissance plus rapide chez l'espèce *S. obliquus*.

Les objectifs à long terme dans lesquels s'insèrent ce projet sont l'évaluation du potentiel du bicarbonate comme source de carbone et l'identification des conditions optimales de culture de la microalgue *Scenedesmus obliquus* en utilisant le bicarbonate de sodium comme source de carbone principale.

Dans cette optique, les réalisations du présent projet touchent trois aspects de la culture des microalgues. D'abord, les conditions de culture en présence de bicarbonate sont explorées. Puis, une méthode analytique appropriée au suivi en ligne des conditions favorables à la croissance des microalgues en présence de bicarbonate a été mise au point. Enfin, un modèle mathématique descriptif approprié pour les cultures de microalgues utilisant le bicarbonate comme principale source de carbone a été développé.

Les contraintes de l'emploi du bicarbonate de sodium et les conditions permettant la consommation optimale de carbone ont été identifiées au fil d'expériences de cultures de type «cuvée simple» en flacons agités et en photobioréacteurs. Le pH joue un rôle crucial dans la disponibilité du bicarbonate et la croissance des algues.

Une méthode de dosage des carbonates en solution par spectroscopie ATR-FTIR a été développée. Elle permet le dosage *in situ* et en continu, ce qui permettrait un contrôle optimal du procédé à l'échelle industrielle. Une structure de modèle appropriée à la situation est proposée et l'identification des paramètres nécessitera davantage d'expériences pour obtenir assez de données pour resserrer les intervalles de confiance sur les paramètres. La structure du modèle a été choisie de sorte à ce que les paramètres soient estimables facilement.

Mots clés: Microalgues, *Scenedesmus obliquus*; bicarbonate de sodium; autotrophie; Spectroscopie FT-IR; modélisation; croissance.

ABSTRACT

Microalgae-based bioprocesses are widely viewed as promising alternatives for polluting technologies in such fields as pharmaceuticals, energy and nutraceuticals. However, large scale development is still hindered by process economics. This research project looks at bioprocesses optimization through the use of an alternative carbon source. Bicarbonate salts could help increase microalgae culture productivity as well as carbon mitigation. Unlike other alternative carbon sources, microalgae will absorb bicarbonate through photosynthesis. Also, it can be obtained by industrial flue gas scrubbing. The use of sodium bicarbonate at the end of the growth cycle is known to promote lipid production. Likewise, as bicarbonate is totally dissolved in the culture medium, as opposed to sparged CO₂, it is readily available to algae. It could also improve *S. obliquus*' growth rate compared to autotrophic cultivation with gaseous CO₂.

This project's long term goals are evaluating the potential of bicarbonate as a carbon source and identifying the optimal cultivation conditions for *Scenedesmus obliquus* using bicarbonate as the main source of carbon. To this end, the achievements of this project concern the exploration of growth conditions using bicarbonate, the development of an analytical method suitable for online monitoring of favorable growth conditions in the presence of bicarbonate, and the development of a descriptive mathematical model suitable for microalgae cultures using bicarbonate as their main source of carbon.

Batch type cultures in shake flasks and photobioreactors were used to identify technical constraints surrounding the use of bicarbonate and optimal carbon consumption conditions in microalgae cultures. Acidity plays a crucial role in carbon availability and algae growth. Proper pH control is highly important as bicarbonate uptake by *S. obliquus* leads to increases in pH of the culture medium. Yet, microalgae have a nutritional preference towards CO₂, thus forcing cultivation at higher pH values to prevent CO₂ generation.

A new quantification method for dissolved inorganic carbon using ATR-FTIR spectroscopy was developed. It allows continuous, online, *in situ* quantification which would enable optimal process control at industrial scale. The structure of the model has been determined and more growth experiments are needed to identify the parameters properly. The selected structure should allow the parameters to be easily identifiable.

Keywords: Microalgae; *Scenedesmus obliquus*; sodium bicarbonate; autotrophic mode; FT-IR spectroscopy.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	vi
AVANT-PROPOS	vii
RÉSUMÉ.....	viii
ABSTRACT	x
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 Revue de littérature.....	8
1.1 ÉTAT DE L'ART DES BIOPROCEDES PHOTOSYNTHETIQUES.....	8
1.1.1 Potentiel d'applications des bioprocédés photosynthétiques	8
1.1.2 Limites du développement de bioprocédés à grande échelle	12
1.1.3 Utilisation du bicarbonate en culture de microalgues et défis.....	17
1.2 INTERET DE LA MODELISATION POUR LE CONTROLE	20
1.3 ÉTAT DE L'ART ET INTERET DU DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DU BICARBONATE EN SOLUTION	23
CHAPITRE 2 Expériences réalisées et résultats.....	27
2.1 TRAVAUX PRELIMINAIRES	27
2.2 METHODOLOGIE ET PLAN EXPERIMENTAL	28
2.2.1 Méthodologie.....	28
2.2.2 Plan expérimental	29

2.2.3	Méthodes analytiques.....	30
2.3	DEROULEMENT DES EXPERIENCES.....	34
2.3.1	Croissance des algues à échelle pilote	55
2.4	RETOUR SUR LES RESULTATS ET TRAVAUX FUTURS	63
CHAPITRE 3 Développement et validation d'une méthode de dosage des ions bicarbonates, carbonates et orthophosphates en solutions aqueuses <i>in situ</i> et en temps réel par spectroscopie ATR-FTIR.....		
3.1	RESUME EN FRANÇAIS.....	64
Chapitre 4.....		
EFFORTS DE MODÉLISATION.....		
4.1	INTERET ET EVOLUTION DE LA MODELISATION DES BIOPROCEDES A BASE DE MICROALGUES.....	82
4.2	DETERMINATION DE LA STRUCTURE DU MODELE	86
4.3	IMPLANTATION DU MODELE	89
4.4	RESULTATS DE SIMULATIONS DU MODELE A PH CONSTANT.....	91
Chapitre 5.....		
CONCLUSION GÉNÉRALE.....		
ANNEXES.....		
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Comparaison de techniques de récolte répandues dans l'industrie.....	15
Tableau 2 Composition du BBM modifié.....	29
Tableau 3 Conditions initiales de culture de l'expérience 1.....	34
Tableau 4 Conditions initiales de culture de l'expérience 2.....	36
Tableau 5 Concentrations en carbone inorganique dissous dans les cultures après 24h de croissance et à la fin des expériences 1 et 2.....	38
Tableau 6 Conditions initiales de culture de l'expérience 3.....	40
Tableau 7 Conditions initiales de culture de l'expérience 4.....	44
Tableau 8 Conditions initiales de culture de l'expérience 5.....	50
Tableau 9 Conditions initiales de culture de l'expérience de mise à l'échelle.....	55
Tableau 10 Constantes et paramètres du cas de simulation de base.....	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Coûts d'installation estimés pour une bioraffinerie produisant 38 000m ³ d'huile microalgale en étangs ouverts Image reproduite avec autorisation (Davis et al., 2011)	13
Figure 2 Coûts d'installation estimés pour une bioraffinerie produisant 38 000m ³ d'huile microalgale en étangs ouverts Image reproduite avec autorisation (Davis et al., 2011)	13
Figure 3 Exemple de système permettant la captation de CO ₂ émis par une centrale au charbon sous forme de bicarbonate de sodium Image reproduite avec autorisation (Bonaventura, Chacartegui, Valverde, Becerra, & Verda, 2017)	17
Figure 4 Équilibre des différentes espèces ioniques du système de carbone inorganique dissout dans l'eau douce en fonction du pH. pKa ₁ = 6.35 et pKa ₂ =10.33. Image tirée de John A. Wojtowicz 2001(Wojtowicz, 2001)	18
Figure 5 Spectromètre FT-IR Bruker Matrix MF couplée à une sonde externe ATR.....	24
Figure 6 Spectre d'absorption d'une solution aqueuse de 3,5 gL ⁻¹ HCO ₃ ⁻¹ acquis avec Bruker Matrix MF.....	25
Figure 7 Biomasse de <i>S. obliquus</i> produite dans différentes conditions de culture lors des expériences 1 et 2	37
Figure 8 Biomasse maximale de <i>S. obliquus</i> atteinte lors de l'expérience 3 pour les quatre conditions de culture	42
Figure 9 Taux de croissance moyen lors des 5 premiers jours de l'expérience 3	42
Figure 10 Consommation de nitrate par <i>S. obliquus</i> en fonction des conditions de culture. Dosage réalisé par spectroscopie UV-Visible.	43
Figure 11 Suivi de la masse sèche de cultures de <i>S. obliquus</i> avec la méthode de Zhu et Lee.....	46

Figure 12 Suivi du pH de l'expérience 4	47
Figure 13 Suivi de la consommation du carbone par <i>S. obliquus</i> par la méthode de spectroscopie FT-IR	48
Figure 14 Suivi de la croissance de <i>S. obliquus</i> en flacons agités par la méthode des masses sèches de Zhu et Lee	51
Figure 15 Suivi de la consommation du bicarbonate des cultures de l'expérience 5	52
Figure 16 Suivi du pH des cultures de <i>S. obliquus</i> lors de l'expérience 5	53
Figure 17 Taux de croissance moyen en phase exponentielle lors des expériences 4 et 5	54
Figure 18 Suivi de la croissance des cultures de <i>S. obliquus</i> , en PBR de 27L, par la méthode de masse sèche de Zhu et Lee.....	56
Figure 19 Suivi de la croissance de cultures de <i>S. obliquus</i> , en PBR de 27L, par la méthode des masses sèches de Loyola-Vargas (2006).....	57
Figure 20 Évolution de l'aspect visuel des PBR 1 et 2 entre les jours 8 et 12	58
Figure 21 Suivi du pH dans les photobioréacteurs de l'expérience 4.....	59
Figure 22 Évolution du biofilm entre les jours 15 et 16.....	60
Figure 23 Suivi de la consommation du bicarbonate par la microalgue <i>S. obliquus</i> dans des photobioréacteurs de 27 L	61
Figure 24 ATR FT IR absorption spectra in the 1771-940 cm^{-1} band for bicarbonate (dash-dotted), carbonate (dashed), dihydrogenophosphate (dotted) and hydrogenophosphate (solid line)	73
Figure 25 Univariate calibration curves for all analytes in pure aqueous solutions using ATR FT IR spectroscopy HCO_3^- (■), CO_3^{2-} (▲), H_2PO_4^- (◆) and HPO_4^{2-} (●).	74
Figure 26 Multivariate model cross-validation curve for bicarbonate.....	79
Figure 27 Bicarbonate consumption monitoring in microalgae cultures HCO_3^- - PBR1 (▲), HCO_3^- - PBR2 (●).....	79

Figure 28 Représentation schématique des blocs du modèle	90
Figure 29 Résultats de simulation pour les quatre variables d'état: Concentration en carbone dans le milieu (■), quota d'azote (■), concentration d'azote dans le milieu (■) et biomasse (■).....	90
Figure 26 Comparaison des résultats de simulation pour deux valeurs de K_C pour les quatre variables d'état: Concentration en carbone dans le milieu (■), quota d'azote (■), concentration d'azote dans le milieu (■) et biomasse (■)	94
Figure 26 Comparaison des résultats de simulation pour deux valeurs de K_C pour les quatre variables d'état: Concentration en carbone dans le milieu (■), quota d'azote (■), concentration d'azote dans le milieu (■) et biomasse (■)	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

PBR	Photobioréacteur
ATR	Réflectance totale atténuée
FT	Transformée de Fourier
IR	Infrarouge
BBM	Bold's Basal Medium
pH	Potentiel hydrogène
UV	Ultra-violet
pKa	Constante de dissociation acide
Tris	Tris(hydroxyméthyle)aminométhane
EPS	Exopolysaccharides
PLS	Moindres carrés partiels
gA	Gramme d'algues (microalgues)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La production à grande échelle de biomasse algale présente un fort potentiel d'exploitation, tant pour la production de carburants verts, que pour la production de molécules à grande valeur ajoutée. Toutefois, la production et l'exploitation de cette biomasse restent très coûteuses. Plusieurs voies sont explorées pour remédier à cette situation, notamment l'augmentation de la productivité des procédés et la diminution des coûts de traitement de la biomasse. En ce qui concerne l'augmentation de la productivité des procédés, une des voies étudiées est l'utilisation de sources de carbone alternatives au CO₂ gazeux. Les sources étudiées sont d'origine tant organique, comme les sucres, qu'inorganique, comme le bicarbonate de sodium. L'intérêt principal des bioprocédés étant d'offrir une alternative permettant de réduire l'empreinte écologique des procédés classiques polluants principalement en réduisant les émissions de gaz à effet de serre, voire même en permettant de séquestrer du carbone atmosphérique, l'utilisation de sources de carbone alternatives doit remplir cet objectif. C'est pourquoi le bicarbonate de sodium représente une alternative intéressante.

En effet, avec le développement de différentes techniques et «scrubbers», il est maintenant possible de produire du bicarbonate de sodium à grande échelle à partir de CO₂ atmosphérique ou provenant de gaz d'échappement d'usines avec une efficacité de près de 100% (Bai & Yeh, 1997; Bolland & Mathieu, 1998; J.-C. Chen, Fang, Tang, & Liu, 2005). Selon des résultats obtenus dans les laboratoires de Jean-Sébastien Deschênes (JSD), Bertrand Genard (BG) et d'autres chercheurs, plusieurs espèces de microalgues ont la capacité d'utiliser le bicarbonate de sodium comme source de carbone secondaire, principale ou unique. La microalgue *Scenedesmus obliquus* fait partie de ces espèces (J. B. Girard, 2014). L'hypothèse posée est que le bicarbonate permettrait une croissance plus rapide que le CO₂ gazeux. En effet, les microalgues n'ont pas la capacité de consommer

totalemment le CO₂ qui est injecté dans leur milieu, principalement à cause de la faible vitesse de diffusion de celui-ci dans l'eau. Ainsi, il a été trouvé que pour *S. obliquus*, le taux de captation du CO₂ était de 10-20% (Ho, Kondo, Hasunuma, & Chang, 2013; Razzak, Hossain, Lucky, Bassi, & de Lasa, 2013), ce qui fait qu'en production à grande échelle, un système de recyclage du CO₂ ou un plus grand approvisionnement en gaz carbonique serait nécessaire. Toutefois, comme le bicarbonate est complètement soluble dans l'eau, il serait disponible en totalité pour les microalgues, à condition que le pH soit contrôlé efficacement. Ainsi, il pourrait être totalement consommé par celles-ci, donc, au bilan, le taux de capture du CO₂ reviendrait à près de 100%, plutôt que 15% (Colman & Rotatore, 1995; R. Gardner, Lohman, Cooksey, Gerlach, & Peyton, 2013).

Le métabolisme des microalgues est toutefois différent lorsqu'elles consomment du bicarbonate plutôt que du CO₂. D'abord, l'internalisation du CO₂ peut se faire passivement, par diffusion transmembranaire, lorsque le gradient de concentration le permet (Raven, 1997b). Les microalgues peuvent aussi avoir recours à du transport actif, notamment par l'action de pompes à carbone inorganique (Giordano, Beardall, Raven, & Rev Plant Biol, 2005; Raven, 1997a). L'assimilation du bicarbonate, elle, est toujours active et il en existe deux voies principales. La première est l'action de pompes transmembranaires nécessitant l'apport d'ATP ou de NADPH pour l'énergie. La seconde voie est la production et l'excrétion d'enzymes, les anhydrases carboniques, responsables de scinder le bicarbonate en CO₂ et en hydroxyde (OH⁻) (Badger et al., 1998; Giordano et al., 2005; Raven, 1997a). Chez les algues vertes, ou chlorophycées, le carbone inorganique est ensuite acheminé, par l'action de transporteurs d'anhydrases carboniques, jusqu'à une enzyme appelée Rubisco, responsable de la réduction du carbone. Cette enzyme, chez plusieurs espèces, est concentrée dans un organite appelé pyrénéoïde, contenu dans le thylakoïde des cellules (Meyer & Griffiths, 2013; Moroney et al., 2011; Moroney & Ynalvez, 2007a; Raven, 1997a). Le carbone servira alors à la production d'une multitude de molécules.

La microalgue *S. obliquus*, comme les autres microalgues, est photo-autotrophe. Cela signifie qu'elle a la capacité d'internaliser le carbone inorganique (CO₂ ou HCO₃⁻),

l'azote inorganique (NH_4^+ et NO_3^-) et le phosphore inorganique (H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-}) dans le but de produire les molécules essentielles à sa survie et sa reproduction en utilisant la lumière comme source d'énergie. Par opposition, l'hétérotrophie consiste à utiliser les molécules organiques créées par d'autres organismes pour en créer de nouvelles ou produire de l'énergie. Certains êtres photo-autotrophes dont *S. obliquus* ont la capacité d'assimiler et utiliser des molécules organiques exogènes et ainsi alterner entre les modes auto et hétérotrophes. Lorsque les deux voies métaboliques sont employées en parallèle, le mode trophique est appelé mixotrophie (Adesanya, Davey, Scott, & Smith, 2014; Deschênes, Boudreau, & Tremblay, 2015; Liang, Sarkany, & Cui, 2009). Le choix du mode trophique sera généralement dicté par les conditions de culture, principalement les sources de carbone disponibles.

Les conditions de culture, en plus de la souche et du stade de croissance, ont un grand impact sur la composition cellulaire des microalgues. De manière générale, on considère le ratio de Redfield ($\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$) comme composition de base (Arbib et al., 2013; Redfield, 1958). En ce qui a trait aux conditions de culture, les facteurs ayant le plus gros impact sur la composition cellulaire sont les concentrations relatives de carbone, d'azote et de phosphore. La teneur en carbone chez les microalgues reste relativement constante plafonnant à 50% de la masse des cellules en conditions d'excès de carbone ou de faible rapport N:P (Grobbelaar, 2007; Whitton et al., 2016). Dans le cas *S. obliquus*, la concentration cellulaire de carbone reste constante autour de 45% (Arbib et al., 2013; Deschênes & Vande Wouwer, 2016). Ces conditions favorisent l'accumulation de lipides, alors qu'un ratio N:P >13, chez *S. obliquus*, favorise l'accumulation de protéines. La teneur en azote fluctue habituellement entre 1 et 10% de la masse (Arbib et al., 2013; Cai, Park, & Li, 2013; Grobbelaar, 2007; Whitton et al., 2016). Les conditions seront habituellement choisies en fonction du type de produit désiré, de la productivité ou du type de substrat à retirer du milieu.

L'optimisation des procédés à base de microalgues nécessite l'apport d'outils de suivi approprié au suivi des variables ayant le plus d'impact sur l'aspect visé de leur

production comme la disponibilité des nutriments (C, N, P). En ce qui a trait à la productivité en biomasse totale, la variable nutritionnelle la plus sensible serait la disponibilité du carbone, qu'il soit de sous forme organique ou inorganique. Dans le cas du suivi de la disponibilité du carbone inorganique, plusieurs méthodes analytiques sont disponibles. Toutefois, la plupart des méthodes de dosage du carbone inorganique en solution comme le titrage (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2014; Pratt & Yuan, 2009), la spectrométrie de masse couplée à l'induction de plasma (ICP) ou non (Maestre, Mora, Hernandis, & Todoli, 2003; Tsikas & Chobanyan-Jürgens, 2010), et la chromatographie à échange d'ions (IEX) couplée à une cellule à gaz (Hall & Aller, 1992; Monser, Adhoum, & Sadok, 2004; Pencharee et al., 2012) ne sont pas adéquates pour permettre le contrôle et l'optimisation du procédé en temps réel, puisqu'elles nécessitent l'extraction du CO₂ de la matrice aqueuse par ajout d'acide. Les spectroscopies Raman et infrarouge (FTIR), quant à elles, ne nécessitent aucune préparation d'échantillon et sont déjà utilisées en milieu aqueux comme en phase solide pour le dosage de bicarbonate (Baldassarre & Barth, 2014; Garand et al., 2010a; Joshi, Kalyanasundaram, & Balasubramanian, 2013; Oliver & Davis, 1973), sans toutefois être adaptées à des matrices aussi complexes que des cultures de microalgues. Ainsi, la spectroscopie infrarouge par réflexion totale atténuée (ATR) présente un bon potentiel pour le développement d'une méthode de suivi du carbone inorganique dissous qui soit réellement applicable en temps réel.

Objectifs

L'objectif premier du projet complet de maîtrise est de déterminer les meilleures approches pour optimiser la production de biomasse de *Scenedesmus obliquus* en utilisant du bicarbonate de sodium comme seule source de carbone. Pour ce faire, plusieurs objectifs secondaires doivent être atteints. D'abord, les limites et contraintes de l'utilisation du bicarbonate de sodium doivent être identifiées. Ceci permettra d'établir les conditions expérimentales nécessaires à l'optimisation du taux de consommation de bicarbonate par les microalgues, de développer les boucles de contrôle appropriées et de déterminer les

variables d'importance à mesurer (en temps réel) pour en permettre l'implémentation. Concernant ces variables à mesurer, l'une des plus importantes (tel que discuté au paragraphe précédent) est la concentration en bicarbonate dans le milieu de culture. Puisque les méthodes classiques sont soit destructives ou laborieuses (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2016; Hall & Aller, 1992), il a fallu développer une nouvelle méthode de dosage du bicarbonate qui soit rapide, simple et non-destructive, parallèlement aux expériences de culture des microalgues.

Méthodologie

Pour permettre une optimisation des paramètres de culture de *Scenedesmus obliquus* avec le bicarbonate de sodium, il faut d'abord bien comprendre (et modéliser) les cinétiques de croissance et de consommation des nutriments, et, pour minimiser le nombre d'expériences à réaliser, développer un simulateur. Ce dernier peut être programmé en schéma-bloc avec le logiciel Simulink, pour des raisons de simplicité et de clarté de représentation (visuelle).

La construction d'un modèle commence par l'établissement de sa structure. La structure de ce modèle découlera de deux sources: les observations des données expérimentales et une approche phénoménologique des processus en jeu. Cette dernière implique une bonne connaissance des processus biologiques, biochimiques et des lois qui les gouvernent. Ainsi, la modélisation des procédés biologiques débute par l'identification des variables et phénomènes qui les régissent. Cette approche mène à la construction de modèles dits fondamentaux qui peuvent servir à l'extrapolation. Ces modèles fondamentaux, souvent assez simples, servent de blocs pour la construction du modèle spécifique. Puis, en fonction de la simplicité recherchée et des observations empiriques, le nombre de variables et de phénomènes pris en compte varie. Une fois la structure du modèle établie, les données expérimentales sont utilisées pour identifier les paramètres du modèle. Il faut, pour ce faire, habituellement plusieurs itérations du cycle simulations-expériences avant d'arriver avec un modèle convenable. Dans le cas de ce projet, la

structure du modèle a été établie, mais les données expérimentales n'ont pas permis d'identifier les paramètres du modèle.

Au-delà des efforts de modélisation, les expériences de culture de *S. obliquus* ont pour but d'identifier les contraintes et le potentiel de l'utilisation du bicarbonate de sodium comme source de carbone alternative. Pour ce faire, il aura fallu développer et assembler un système assurant la culture de microalgues avec le bicarbonate comme seule source de carbone, donc exempt de toute trace de CO₂, gazeux ou dissout, en flacon agité. Ce système aura permis de comparer la productivité de cultures autotrophes (CO₂ ou HCO₃⁻ seulement), mixotrophes (HCO₃⁻ avec glucose) et hétérotrophes (glucose seulement). Pour assurer un suivi plus serré de la croissance des microalgues en flacons agités, il aura aussi fallu adapter une méthode de mesure de biomasse par poids sec développée par Zhu et Lee. En effet, le prélèvement quotidien des 10 mL nécessaires à la méthode aurait un trop grand impact sur les volumes de culture et la croissance des microalgues en fin d'expérience (C. J. Zhu & Lee, 1997). Les techniques de poids secs utilisées auparavant dans ce laboratoire limitaient la fréquence de prélèvement à deux jours. Finalement, une méthode de dosage des ions carbonates, en milieu de culture, a été développée pour permettre le suivi journalier de la consommation du carbone par les algues. Étant donné le choix de la technique et des apprentissages réalisés au fil du développement de la méthode, cette dernière permet aussi le dosage des ions phosphates en solution.

Structure du mémoire

Ce mémoire est composé d'une introduction générale suivie de quatre chapitres développant la démarche du projet, les défis surmontés et les apprentissages réalisés et se termine par une conclusion générale.

Le CHAPITRE 1 présente une revue de l'état de l'art et de l'intérêt des bioprocédés à base de microalgues. Il traite aussi de l'intérêt de la modélisation des bioprocédés, des modèles existants comme celui de Droop et de leur évolution. Enfin, l'état de l'art dans le

dosage du carbone inorganique dissout et la nécessité du développement d'une nouvelle technique sont abordés.

Le CHAPITRE 2 présente la démarche expérimentale et les résultats des cultures de *Scenedesmus obliquus* avec bicarbonate de sodium en fonction du temps et leur comparaison avec différentes approches trophiques (auto-, mixo-, et hétérotrophique) de production.

Le CHAPITRE 3 présente l'article scientifique publié dans la revue *Analyst* à propos de la méthode de dosage du bicarbonate en milieu de culture développée parallèlement aux expériences de production de biomasse.

Le CHAPITRE 4 présente les efforts de modélisation réalisés pour le cas de la croissance de *Scenedesmus obliquus* avec HCO_3^- comme seule source de carbone: la structure du modèle proposé et une ouverture vers des travaux futurs.

Le CHAPITRE 5 résume les principales conclusions des travaux et suggère des orientations pour des travaux futurs.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTERATURE

1.1 ÉTAT DE L'ART DES BIOPROCEDES PHOTOSYNTHETIQUES

1.1.1 Potentiel d'applications des bioprocédés photosynthétiques

Les biotechnologies sont un vaste domaine de recherche et d'applications. Elles regroupent toutes les technologies employant des organismes vivants, procaryotes comme eucaryotes, ou des procédés biochimiques dans le but de produire des connaissances, des biens et des services (Organisation de coopération et de développement économiques, 2017). Elles sont étudiées et utilisées depuis très longtemps pour le bien de l'humanité, le procédé plus connu et répandu étant la fermentation éthylique de sucres par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, utilisée dans la production de tous les alcools et le pain (Feldmann & Branduardi, 2012). Plusieurs autres organismes sont aussi employés, comme les bactéries pour la biométhanisation et le compostage (Mata-Alvarez, Macé, & Llabrés, 2000; Weiland, 2010) ou les œufs de poules pour la production de vaccins (D'Aoust et al., 2010; Roldão, Mellado, Castilho, Carrondo, & Alves, 2010). Les bioprocédés connaissent un grand engouement à travers le monde principalement parce qu'ils sont perçus comme plus respectueux de l'environnement et qu'ils peuvent remplacer, pour la plupart, des procédés chimiques industriels polluants. Cependant, les procédés présentés, bien que de nature biologique, emploient des organismes hétérotrophes, donc contribuent à la production de gaz à effet de serre au même titre que les industries chimiques minérales et dérivant de l'exploitation de sources de carbone fossile (Czyrnek-Delêtre, Smyth, & Murphy, 2017).

Dans le contexte des changements climatiques auxquels fait face l'humanité, il devient impératif de trouver des alternatives plus durables aux procédés actuels, notamment à travers l'exploitation de biomasse photosynthétique comme les plantes, les algues et les cyanobactéries. L'avantage principal des biotechnologies photosynthétiques est la possibilité de contribuer au recyclage du carbone par la capture de CO₂ atmosphérique ou provenant d'usines alimentées en énergies fossiles (Ranjan & Herzog, 2011). Les plantes sont déjà exploitées à grande échelle de diverses façons. D'abord, elles produisent une grande variété de composés à haute valeur ajoutée, comme des polyphénols (King & Young, 1999) et d'autres pigments (Cunningham & Gantt, 1998) très utilisés en nutraceutique. Elles produisent aussi des macromolécules, comme des glucides et des lipides. Ces derniers ont une valeur commerciale beaucoup moins grande, mais sont utilisés pour la production de carburants comme l'éthanol, par la fermentation de maïs ou de soya, et de biodiésel, par l'estérification de l'huile de palme, afin de remplacer une partie des carburants fossiles actuels dans les transports (Farrell, 2006; Hill, Nelson, Tilman, Polasky, & Tiffany, 2006). La machinerie cellulaire des plantes peut aussi être mise à profit dans le cadre de procédés plus complexes comme la production de vaccins. En effet, une technique développée et exploitée par Médicago Inc., une biopharmaceutique de Québec, permet l'expression de particules pseudo-virales à partir de *Nicotiniana benthamiana*, une plante proche du tabac (Young et al., 2015).

La productivité des plantes reste leur plus gros talon d'Achille. En effet, la plupart des plantes poussent lentement, leur culture nécessite l'accapitation de grandes parcelles de terre et de grandes ressources en eau et les molécules d'intérêt qu'elles produisent représentent souvent un faible pourcentage de leur masse totale. En effet, pour les plantes vasculaires, une très grande partie du carbone qu'elles absorbent va dans la production de molécules structurelles comme la cellulose et la lignine (Wertz, Bédoué, & Mercier, 2010). Il est à noter que des technologies prometteuses sont en développement pour la valorisation de la biomasse ligneuse (Chaouch, Diouf, Laghdir, & Yin, 2014; Qureshi et al., 2010; Wertz, Richel, & Gérin, 2015), leur déploiement à grande échelle ne réduirait pas l'utilisation de terres arables et favoriserait potentiellement les stress déjà importants sur les

ressources forestières du monde. De plus, l'utilisation de plantes en monocultures pour la seule production de carburants, appelés biocarburants de deuxième génération, présente un bilan carbone négatif (Searchinger et al., 2008). Les biocarburants de deuxième génération augmentent donc l'impact environnemental des carburants auxquels ils sont ajoutés (Brennan & Owende, 2010; Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010; Sims, Mabee, Saddler, & Taylor, 2010). Aussi, l'utilisation de plantes comestibles pour la production de carburants à grande échelle contribue à la hausse des prix des denrées alimentaires de par la hausse de la demande provenant de l'industrie énergétique (Zilberman, Hochman, Rajagopal, Sexton, & Timilsina, 2013).

Les microalgues et les cyanobactéries sont souvent perçues comme les meilleures candidates pour pallier aux lacunes de bioprocédés à base de plantes. En effet, la culture de microalgues est beaucoup plus productive que celle de plantes supérieures, nécessitant une moins grande surface dédiée à leur production (Koller, Muhr, & Braunegg, 2014). Comme elles poussent dans l'eau, leur culture ne nécessite pas de terre arable et n'entre pas en compétition avec des ressources alimentaires essentielles comme les grandes cultures de maïs ou de soya. De plus, certaines des espèces les plus prometteuses sont marines, donc leur culture réduirait grandement le stress sur les sources d'eau potable. Des microalgues sont aussi déjà utilisées dans le traitement d'eaux usées (Mata, Melo, Simões, & Caetano, 2012; Nayak, Karemore, & Sen, 2016). En effet, la croissance des microalgues nécessite l'apport de substrats tels le carbone, l'azote, le phosphore, le soufre et d'autres oligoéléments qui composent souvent les rejets domestiques et industriels de faible valeur (Cai et al., 2013). Il est d'ailleurs envisagé de valoriser la biomasse microalgale produite lors du traitement d'eaux usées de villes ou de rejets liquides industriels (Richardson, Johnson, & Outlaw, 2012; Wahlen, Willis, & Seefeldt, 2011).

Les microalgues présentent un fort potentiel pour remplacer les procédés chimiques polluants. Elles peuvent servir à produire une grande gamme de molécules à haute valeur ajoutée dans des domaines de pointe comme la pharmaceutique, nutraceutique et cosméceutique entre autres. En effet, la production de pigments microalgaux, notamment

les caroténoïdes et les xanthophylles, est bien documentée et se développe à travers le monde (Bharathiraja et al., 2015; Cuellar-Bermudez et al., 2015; Koller et al., 2014; Milledge, 2011). La production d'astaxanthine en est un bon exemple. C'est un pigment rouge aux propriétés antioxydantes qui est produit à l'échelle commerciale par plusieurs entreprises à travers le monde, dont au Canada ("Algaecan Biotech Ltd.," 2017), en Chine ("Natural Astaxanthin," 2017) et en Israël ("Algatech," 2017). La chlorophyte, *Haematococcus pluvialis*, est la plus grande productrice d'astaxanthine, en proportions qui peut représenter jusqu'à 5% de sa masse totale (Shah, Liang, Cheng, & Daroch, 2016). En 2013, le prix estimé d'un kilo d'astaxanthine était de 5113€ (Pacheco et al., 2015).

D'autres pigments, les phycobilines, sont exclusivement produits par des algues et sont employés dans une foule d'applications générales comme dans la nourriture et les cosmétiques, mais aussi dans des domaines de niche comme marqueurs fluorescents pour des études biochimiques (Borowitzka, 2013). Des algues sont aussi utilisées pour la production de protéines et autres molécules bioactives, comme des antibiotiques ou des antiviraux (Borowitzka, 1995; Hayashi, Hayashi, Maeda, & Kojima, 1996; Ohta et al., 1995; Pina-Pérez, Rivas, Martínez, & Rodrigo, 2017).

Pendant plusieurs années, cependant, l'application la plus prometteuse des microalgues était la production de carburants verts comme le biodiésel, le biopétrole ou le biohydrogène. En effet, certaines espèces ont une forte propension à produire et accumuler des grandes quantités de lipides (F. B. Ahmad, Zhang, Doherty, & O'Hara, 2015; Barros, Gonçalves, Simões, & Pires, 2015; Vigeolas et al., 2012). Ces lipides peuvent alors être estérifiés pour donner du diésel (Razzak et al., 2013; Wahlen et al., 2011; Willis et al., 2014). La biomasse produite pourrait aussi être traitée thermiquement pour donner du pétrole brut qui aurait non seulement le potentiel de combustible, mais aussi, comme le pétrole fossile, fournir les éléments de base de la chimie organique et des industries qui en découlent (J. Kim et al., 2013; López Barreiro, Prins, Ronsse, & Brilman, 2013; Soh et al., 2014). La production de bio-hydrogène, elle, serait plutôt le fruit de la production de biomasse microalgale qui servirait de substrat pour la culture d'une bactérie productrice

d'hydrogène (Hallenbeck & Ghosh, 2009; Sambusiti, Bellucci, Zabaniotou, Beneduce, & Monlau, 2015). La raréfaction des combustibles fossiles, l'engouement pour des énergies moins polluantes et la hausse des cours du pétrole à l'échelle mondiale, de 2006 à 2015 (Al-Maamary, Kazem, & Chaichan, 2017), ont donné un contexte favorable au développement de technologies de remplacement comme les biocarburants (A. L. Ahmad, Yasin, Derek, & Lim, 2011; Amaro, Guedes, & Malcata, 2011; Behera et al., 2014; Mata, Martins, & Caetano, 2010). Des bioraffineries d'échelle industrielle ont vu le jour en Europe, en Asie, mais surtout aux États-Unis (Quadrelli, Centi, Duplan, & Perathoner, 2011). Les géants de l'énergie emboîtent d'ailleurs le pas comme ExxonMobil (É-U) qui a investi près d'un milliard de dollars (US) en recherche et développement ("Advanced biofuels research and development," 2017).

1.1.2 Limites du développement de bioprocédés à grande échelle

Les capitaux faramineux nécessaires au démarrage d'une bio-raffinerie d'échelle industrielle limitent grandement l'implantation et le développement des bioprocédés à base de microalgues. En effet, la construction d'une telle usine peut représenter un investissement allant de 250M\$ à 1,25G\$ canadiens (Abdo et al., 2016; Davis, Aden, & Pienkos, 2011; Richardson et al., 2012). La répartition des coûts de construction varie en fonction des espèces exploitées, des produits commercialisés et des techniques envisagées. Toutefois, les unités de production représentent une part très importante de tous les scénarios, tel qu'illustré dans les figures 1 et 2. Plusieurs systèmes de cultures ont été développés au fil des années, mais ils peuvent tous être classés en deux catégories: les systèmes ouverts et fermés.

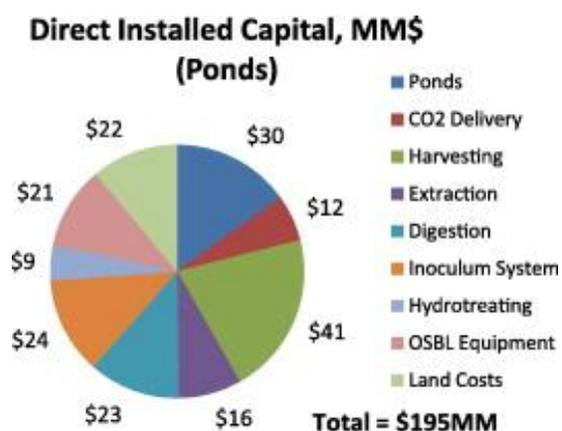


Figure 1 Coûts d'installation estimés pour une bioraffinerie produisant 38 000m³ d'huile microalgale en étangs ouverts Image reproduite avec autorisation (Davis et al., 2011)

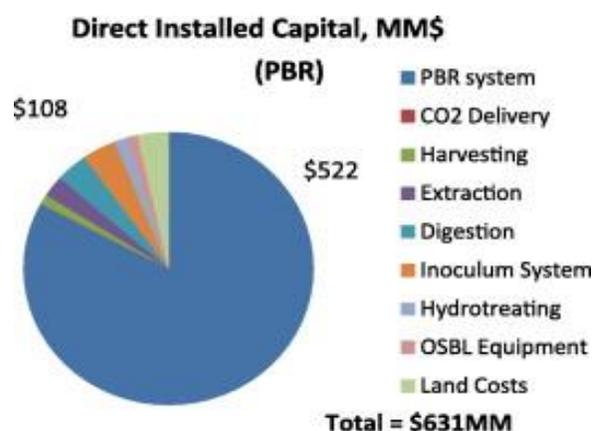


Figure 2 Coûts d'installation estimés pour une bioraffinerie produisant 38 000m³ d'huile microalgale en étangs ouverts Image reproduite avec autorisation (Davis et al., 2011)

Les systèmes ouverts, que l'on appelle souvent étangs, regroupent aussi bien les réservoirs et les étangs peu profonds où la biomasse circule peu, que les étangs de type «piste de course» et circulaires avec brassage, où les algues sont mises en mouvement de façon mécanique (Borowitzka, 1999). Ces systèmes sont beaucoup plus simples et moins coûteux à l'installation. Ils sont aussi moins coûteux à exploiter et à entretenir que les systèmes fermés (Richardson et al., 2014). Cependant, comme ils sont ouverts, les cultures sont beaucoup plus vulnérables aux contaminations et la robustesse du procédé s'en trouve affectée. La productivité des cultures est aussi très dépendante des conditions météorologiques et le contrôle des procédés ne peut être aussi précis qu'en cultures fermées, notamment à cause des énormes quantités d'eau perdue par évaporation. (González-Fernández, Molinuevo-Salces, & García-González, 2010; L. Zhu et al., 2017). Dans le cas de production de commodités à faible valeur ajoutée comme les biocarburants ou le traitement d'eaux usées, les faibles coûts en capitaux peuvent compenser les aléas de la culture en systèmes ouverts. Par contre, toutes les algues ne sont pas aussi résistantes aux envahisseurs, donc ne se prêtent pas aussi bien à l'exercice (Chinnasamy, Bhatnagar, Claxton, & Das, 2010).

Les systèmes fermés, appelés photobioréacteurs (PBR), peuvent coûter jusqu'à 30X plus cher à l'installation pour un même volume de production. Il en existe plusieurs types allant de sacs de plastique transparents souples à des tubes de verre verticaux ou horizontaux (Huang, Jiang, Wang, & Yang, 2017; Singh & Sharma, 2012). Les PBR permettent le maintien de cultures axéniques, c'est-à-dire d'une seule espèce à la fois, et un meilleur contrôle des procédés. Ils sont utilisables dans une plus grande variété de climats et peuvent être éclairés artificiellement pour des cultures toute l'année. Bien que le développement de nouvelles techniques et de nouveaux matériaux entrant dans la fabrication de photobioréacteurs permettent de réduire de plus de 4X les coûts d'implantation de tels réacteurs (Cocker, 2012; Tredici, Rodolfi, Biondi, Bassi, & Sampietro, 2016), ces systèmes restent très coûteux. Ils sont donc plus adaptés à la production de molécules à haute valeur ajoutée comme les pigments ou autres composés bio-actifs (Thomassen, Egiguren Vila, Van Dael, Lemmens, & Van Passel, 2016).

Le reste des coûts d'installation provient principalement de l'équipement servant à la récolte et au traitement de la biomasse dont le prix varie grandement en fonction des techniques employées et des espèces cultivées (J. Kim et al., 2013; Lam, Lee, & Mohamed, 2012).

Au-delà de la construction, l'exploitation de telles usines reste très onéreuse. En effet, bien que la production de molécules à haute valeur ajoutée soit rentable, dans certains cas, la production de biocarburants de troisième génération ne peut toujours pas concurrencer l'exploitation de combustibles fossiles (Gerardo, Van Den Hende, Vervaeren, Coward, & Skill, 2015), d'autant plus que les cours de l'énergie, notamment le pétrole, ont chuté drastiquement ces dernières années (Ghoddusi, 2017). Malgré tous les efforts mis à ce jour dans l'amélioration des techniques, les coûts de production, de récolte et de traitement de la biomasse sont encore trop élevés (Amaro, Macedo, & Malcata, 2012; Bilanovic, Holland, & Armon, 2012; Davis et al., 2011; Richardson et al., 2012). La récolte de la biomasse et le traitement de celle-ci, c'est-à-dire le séchage de la biomasse, l'extraction des composés d'intérêt et la valorisation de la biomasse résiduelle, le cas échéant, représentent chacun 20-

30% des coûts d'opération. En effet, les techniques disponibles à l'échelle industrielle sont souvent très énergivores et lentes.

La nature des microalgues joue pour beaucoup. En effet, les algues sont dotées de deux parois cellulaires: la membrane phospholipidique et une enveloppe cellulaire composée de cellulose, hémicellulose, mannanes et autres polymères biologiques (Domozych et al., 2012). Cette dernière pose le plus problème parce qu'elle est chargée négativement limitant la capacité des algues de s'agglutiner ce qui les rend plus difficile à récolter (Salim, Kosterink, Tchetkoua Wacka, Vermuë, & Wijffels, 2014). De plus, sa polarité réduit grandement la perméabilité aux solvants nécessaires à l'extraction d'une majorité de composés d'intérêt qui sont apolaires. L'extraction des acides gras et des pigments nécessite souvent le bris mécanique de la paroi résistante aux déformations (Guldhe, Singh, Rawat, Ramluckan, & Bux, 2014). L'avènement de techniques comme l'extraction par solvants super critiques (CO₂, éthanol, méthanol) permet de récupérer des molécules non-polaires de façon très sélective sans rupture de la paroi cellulaire (del Valle, 2014; Taher et al., 2014; Yen, Yang, Chen, Jesisca, & Chang, 2014). Les coûts d'opération de cette méthode varient beaucoup, mais l'équipement d'échelle industrielle est très dispendieux (Paudel, Jessop, Stubbins, Champagne, & Jessop, 2015).

Tableau 1 Comparaison de techniques de récolte répandues dans l'industrie

Technique	Description/ Avantages	Efficacité	Durée	Demande énergétique	Estimation des coûts
Centrifugation	Aucune contamination chimique ou biologique Bonne récupération du milieu de culture	+++	-	+++	Cap: +++ Opé: +++
Filtration	Habituellement combinée à une coagulation ou sédimentation Permet la séparation d'espèces sensibles au cisaillement	++	+	+	Cap: + Opé: +++
Coagulation/ Floculation chimique	Ajout de minéraux ou de polymère polycationiques pour réduire la charge de l'enveloppe cellulaire Contamination chimique nuit au recyclage du milieu	++	-	++/+++	Cap: +++ Opé: ++/ +++
Auto/ Biofloculation	Coagulation induite par changement de composition des cellules (stress) Risques environnementaux limités Permet une bonne récupération du milieu	-/++	++/+++	-	Cap: + Opé: -
Sédimentation	Simple	-	+++	-	Cap: +

	Faibles densités du gâteau d'algues				Opé: -
	Limité à certaines espèces				
Flottage	Récupération par bullage	+/++	+	+	Cap: ++/+++
	Ajout de cations souvent nécessaire				Opé: +/+++
	Espèces d'eau douce seulement				Cap: +++
Procédés électro-chimiques	Aggrégation autour de cations relargués par des anodes sacrificielles	+++	-	+++	Opé: +++
	Fonctionne bien pour une vaste majorité d'espèces				

Sources: Barros et al., 2015; Kim et al., 2013; Pragma, Pandey, & Sahoo, 2013

La production de la biomasse elle-même est aussi beaucoup trop chère, par rapport aux demandes en énergie et en nutriments. On estime, toutefois, que la productivité des cultures a le plus grand impact sur le coût des produits, donc le plus fort potentiel d'amélioration (Davis et al., 2011; Richardson et al., 2012). Plusieurs voies sont présentement étudiées dans ce domaine notamment à travers la sélection et l'amélioration génétique de candidats déjà prometteurs (Spalding, 2007; Vigeolas et al., 2012). L'augmentation de la productivité devra aussi s'accompagner de réductions de coûts de culture. Dans cette optique, plusieurs options sont explorées, dont l'utilisation de sources de carbone alternatives permettant une croissance plus rapide des algues ou favorisant la production de substances d'intérêt. En effet, l'utilisation de CO₂ comme source de carbone peut représenter jusqu'à 50% des coûts de production (Silva De Farias, Gris, Sforza, La Rocca, & Bertuco, 2016). En ceci, le bicarbonate est vu comme une alternative intéressante. Il peut être consommé par une variété d'espèces et favorise la production et l'accumulation d'acides gras, chez certaines, ce qui est très avantageux pour la production de biodiésel notamment (R. D. Gardner et al., 2012; R. D. Gardner, Lohman, Gerlach, Cooksey, & Peyton, 2013b). L'utilisation de bicarbonate comme seule source de carbone favorise aussi la croissance chez d'autres espèces par rapport au CO₂ gazeux (Mokashi, Shetty, George, & Sibi, 2016; Silva De Farias et al., 2016). Ceci serait dû, principalement, à la plus grande disponibilité des ions bicarbonates par rapport au CO₂ gazeux. En effet, la captation du CO₂ par les algues est limitée par la cinétique de diffusion du gaz dans le milieu de culture (Radmer & Ollinger, 1980). Typiquement, les algues ne captent que 10-20% du CO₂ fourni (Doucha, Straka, & Lívanský, 2005; Spalding, 2007). Par contre, comme le bicarbonate est totalement dissout dans le milieu de culture, il est totalement disponible pour les algues. Il

serait donc envisageable d'atteindre des taux de captation de carbone avoisinant les 100%. En culture en continue, un taux de captation de 64% a d'ailleurs été rapporté (Guangmin, Lina, Hong, Shumei, & Dan, 2014).

1.1.3 Utilisation du bicarbonate en culture de microalgues et défis

Ce qui rend le bicarbonate d'autant plus prometteur est la façon dont il peut être obtenu. Il est possible de produire du bicarbonate par captation (scrubbing) du CO_2 de gaz d'échappement d'usine (Bai & Yeh, 1997; Bolland & Mathieu, 1998; Ströhle, Galloy, & Epple, 2009; S. Wang, Liu, Chen, & Xu, 2007). En effet, le développement de technologies de captation de CO_2 à l'échelle industrielle et de scrubbers plus performants permet maintenant d'atteindre des taux de captation approchant les 100% (Asif, Bak, Saleem, & Kim, 2015; Javed, Mahmud, & Purba, 2010; Liu, Luo, Rongwong, Idem, & Liang, 2016; Shakerian, Kim, Szulejko, & Park, 2015). Aussi, des techniques permettant la capture de CO_2 directement de l'air ambiant et la transformation en bicarbonate sont étudiées, mais n'ont pas encore été mises à l'échelle (K. S. Lackner et al., 2012; Klaus S. Lackner, 2013; Shi, Li, Wang, & Lackner, 2017; Wilcox, Psarras, & Liguori, 2017).

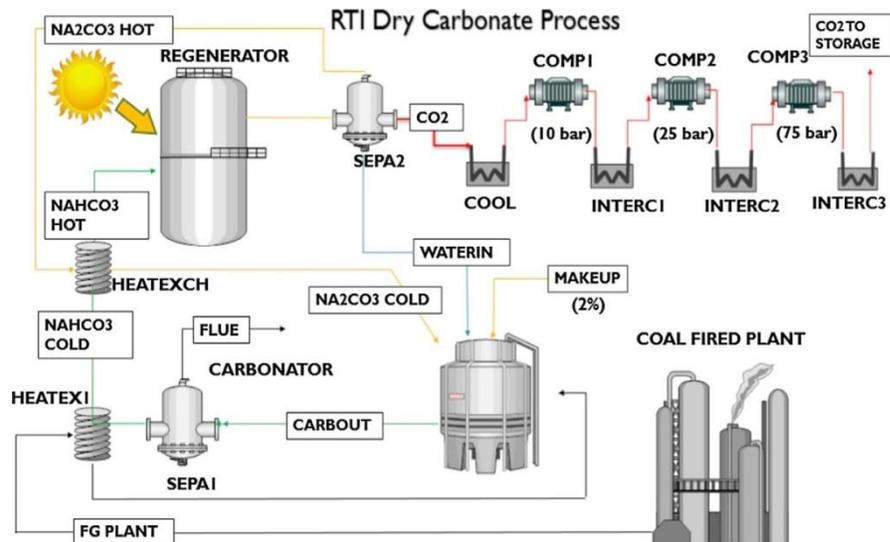


Figure 3 Exemple de système permettant la captation de CO_2 émis par une centrale au charbon sous forme de bicarbonate de sodium Image reproduite avec autorisation (Bonaventura, Chacartegui, Valverde, Becerra, & Verda, 2017)

L'utilisation de bicarbonate de sodium produit à partir de CO₂ gazeux plutôt que d'origine minérale permettrait de respecter le but premier des bioprocédés photosynthétiques, soit la réduction des émissions de gaz à effet de serre. En effet, de cette façon, on récupère le carbone qui a déjà été brûlé pour le fournir aux algues plutôt que de faire entrer en circulation du carbone minéral inerte. La récupération de CO₂ sous forme de sels de bicarbonate permet aussi de le stocker plus efficacement lors des périodes moins productives, c'est-à-dire de plus faibles luminosité et température, en prévision des périodes plus chaudes, dans le cas de bio-raffineries extérieures.

L'utilisation de bicarbonate de sodium comme seule source de carbone présente, tout de même, quelques défis. D'abord, l'ion bicarbonate fait partie du système d'équilibre acide-base de l'acide carbonique qui peut être représenté comme ceci.

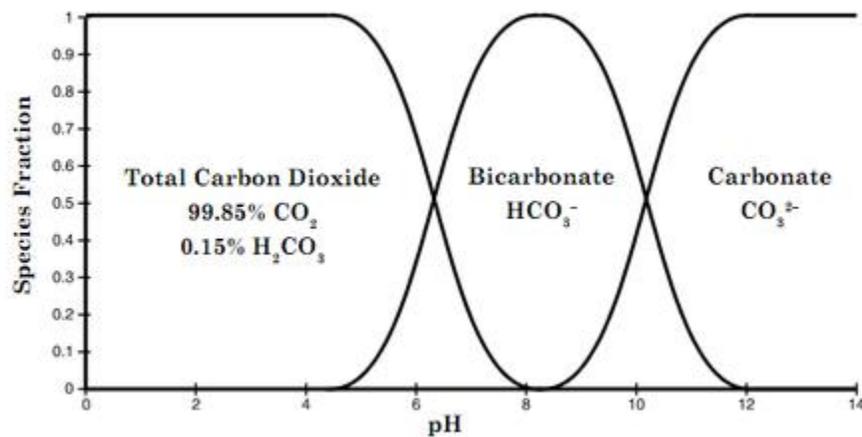
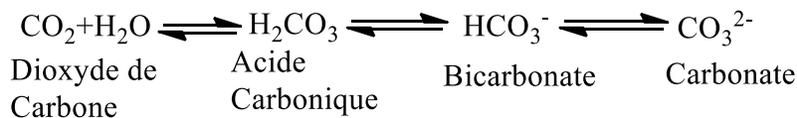


Figure 4 Équilibre des différentes espèces ioniques du système de carbone inorganique dissout dans l'eau douce en fonction du pH. pK_{a1}= 6.35 et pK_{a2}=10.33. Image tirée de John A. Wojtowicz 2001(Wojtowicz, 2001)

Cela signifie qu'un pH < 8 du milieu de culture mènerait à la formation de dioxyde de carbone et un dégazage, donc une perte de carbone dans le système. Un pH se rapprochant

de 10, quant à lui, mènerait à la formation d'ions carbonate qui ne peuvent être assimilés par la majorité des espèces. Qui plus est, la consommation de bicarbonate par les algues mène à la basification de son milieu par l'action des anhydrases carboniques (CA). En effet, le bicarbonate, pour être utilisé par les cellules est scindé en CO_2 et en hydroxyde (OH^-). L'homéostasie du pH cellulaire doit alors être maintenue par l'action de pompes à protons. (Meyer & Griffiths, 2013; Moroney et al., 2011; Moroney & Ynalvez, 2007b; Rolland et al., 1997; Y. Wang, Duanmu, & Spalding, 2011a) Un pH basique est aussi nocif pour la plupart des microalgues, limitant leur croissance, voire empêchant leur reproduction en rendant leur paroi cellulaire trop souple pour la division (Guckert & Cooksey, 1990). Le pH optimal de croissance est spécifique à chaque espèce, mais, généralement, pour les algues d'eau douce, le pH se situe entre 6 et 8, et pour les algues marines, autour de 8 (Zhao & Su, 2014). Il est aussi à noter que la plupart des algues s'acclimatent plus facilement aux pH plus acides que basiques. Le contrôle du pH des cultures devient donc primordial pour une performance optimale des systèmes.

Le métabolisme des microalgues influence aussi naturellement le pH de leur milieu en système fermé en fonction de leur source d'azote et de carbone. D'abord, l'assimilation d'ammonium (NH_4^+), par les microalgues entraîne l'acidification du milieu de culture contrairement à la consommation de nitrate (NO_3^-) qui mène à sa basification (Ale, Pinelo, & Meyer, 2014; S. Kim, Lee, & Hwang, 2013; Scherholz & Curtis, 2013; Schlee & Komor, 1986).

Dans le cas du carbone, la consommation de bicarbonate par les microalgues nécessite l'action d'anhydrases carboniques dans le pyrenoïde afin de dissocier le bicarbonate en CO_2 et en OH^- , puisque l'enzyme Rubisco, nécessaire à la photosynthèse, réagit seulement au CO_2 dissout et non au bicarbonate ou au carbonate (Baba & Shiraiwa, 2007; Moroney & Ynalvez, 2007a; Y. Wang, Duanmu, & Spalding, 2011b). L'hydroxyde généré est ensuite relargué au niveau du stroma où des pompes à proton permettront le maintien de l'homéostasie du pH de la cellule (Meyer & Griffiths, 2013; Moroney et al., 2011; Williams & Colman, 1995), ce qui mène à la basification du milieu de culture. la

consommation d' HCO_3^- nécessite la production d'une plus grande quantité d'anhydrases carboniques, en plus de l'action de pompes à proton ce qui requiert de l'énergie (Sultemeyer, Schmidt, & Fock, 1993; R. Wang et al., 2017; Williams & Colman, 1995). De ce fait, les microalgues préfèrent consommer du CO_2 plutôt que du bicarbonate. Ainsi, la présence de faibles concentrations de CO_2 gazeux ou dissout nuit à la consommation de bicarbonate par les algues, les algues préférant achever les réserves de CO_2 avant de consommer le bicarbonate disponible. La meilleure façon d'empêcher l'entrée ou la production de dioxyde de carbone dans le système, serait de cultiver les algues dans des systèmes étanches avec un bullage efficace de gaz inerte comme l'azote plutôt que l'air et un contrôle du pH adéquat.

1.2 INTERET DE LA MODELISATION POUR LE CONTROLE

La rentabilité des bioprocédés à base de microalgues étant toujours le facteur limitant leur essor, il est nécessaire d'en optimiser le potentiel, particulièrement à grande échelle. L'optimisation des bioprocédés devra donc, inévitablement, passer par l'augmentation de leur productivité et la diminution de leurs coûts. Un meilleur contrôle des procédés, du moins l'étape de production de biomasse, pourrait répondre à ces deux prérogatives. En effet, le contrôle automatique réduirait la demande en travail humain tout en maintenant la production d'algues dans les conditions optimales. Pour en permettre la conception appropriée, il suffit de modéliser adéquatement le procédé étudié. Ceci dit, les bioprocédés sont des systèmes assez complexes. Bien que certains modèles soient assez simples, la modélisation exhaustive des bioprocédés microalgaux nécessite une connaissance profonde des phénomènes qui les composent, du métabolisme des algues aux équilibres chimiques du milieu de culture. Il faut donc pouvoir évaluer l'importance des différentes interactions au cœur des procédés, c'est-à-dire, identifier les facteurs limitant et les variables à surveiller.

Historiquement, la principale variable utilisée pour évaluer la productivité de procédés biologiques est la croissance des organismes, la mesure de la biomasse. Au fil du temps, plusieurs chercheurs en ont proposé des modèles, mais les deux modèles les plus

utilisés encore de nos jours sont ceux de Jacques Monod (1949) et de MR Droop (1973). Les deux modèles sont souvent comparés, entre autre, parce qu'ils ont été bâtis avec une approche similaire, soit d'exprimer la croissance en fonction d'une limitation nutritionnelle (Sommer, 1991). Monod a bâti son modèle en étudiant le comportement de bactéries hétérotrophes, alors que Droop a bâti le sien en étudiant des microalgues autotrophes. Les deux modèles sont des modèles d'état comportant des équations différentielles ordinaires.

Le modèle de Monod fait référence à la relation entre le taux de croissance et la quantité disponible du substrat limitant:

$$\mu = K \frac{S}{K_S + S} \quad (1.1)$$

Où K est une constante. K_S est aussi une constante et représente la concentration nécessaire de substrat pour atteindre la moitié du taux de réaction maximal. Dans le cas d'une croissance ne comportant qu'un substrat limitant, la relation de Monod mènerait donc à la construction d'un modèle à deux équations différentielles.

$$\dot{x} = \mu x \quad (1.2)$$

$$\dot{S} = -\rho_S x \quad (1.3)$$

Dans ce modèle, x représente la masse de microorganismes (gM), μ , le taux de croissance (d^{-1}), S la concentration du substrat limitant dans le milieu ($gS \cdot L^{-1}$) et ρ_S , le taux d'internalisation du substrat ($gS \cdot gM^{-1} \cdot d^{-1}$).

Le taux d'internalisation du substrat est aussi dynamique.

$$\rho_S = \rho_{S_{max}} \frac{S}{S + K_S} \quad (1.4)$$

Où $\rho_{S_{max}}$ est le taux d'internalisation maximal du substrat spécifique à l'espèce ($gS \cdot gM^{-1} \cdot d^{-1}$).

La différence principale, toutefois, entre les deux modèles réside dans la nature de la variable régissant le taux de croissance. Pour Monod, il s'agit de la concentration disponible du nutriment limitant (S). Droop, quant à lui, considère, plutôt, que le quota interne (q_S) du substrat limitant (quantité internalisée par les cellules) est la variable régissant le taux de croissance. C'est pourquoi, chez Droop, une troisième équation différentielle s'ajoute représentant l'évolution du quota interne en fonction du taux de croissance.

$$\dot{x} = \mu x \quad (1.5)$$

$$\dot{S} = -\rho_S x \quad (1.6)$$

$$\dot{q}_S = \rho_S - \mu q_S \quad (1.7)$$

Ainsi, le taux de croissance ne s'exprime plus en fonction de S , mais plutôt en fonction de q_S ($\text{gS} \cdot \text{gM}^{-1}$).

$$\mu = K \left(1 - \frac{Q_0}{q_S} \right) \quad (1.8)$$

Ici, Q_0 est le quota interne minimal du nutriment ($\text{gS} \cdot \text{gM}^{-1}$), constant et dépendant de l'espèce. Le modèle de Monod, pour s'appliquer, nécessite la supposition d'état quasi stationnaire. Le modèle de Droop, lui, y est moins sensible. Aussi, pour certains substrats comme l'azote, les algues ont tendance à faire des provisions en vue d'une croissance future (Adesanya et al., 2014; Mulders, Lamers, Wijffels, & Martens, 2015). Pour ces raisons, le modèle de Droop est plus adéquat que celui de Monod dans le cas de procédés à base de microalgues. Toutefois, le modèle de Monod est plus simple d'utilisation puisqu'il nécessite simplement le dosage du nutriment limitant dans le milieu, mesure beaucoup plus simple que celle de la concentration à l'intérieur des cellules. Il colle aussi très bien à la dynamique de croissance de microorganismes hétérotrophes. C'est pourquoi, il est toujours utilisé.

1.3 ÉTAT DE L'ART ET INTERET DU DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DU BICARBONATE EN SOLUTION

Pour assurer le contrôle d'un procédé biologique, il faut pouvoir suivre l'évolution des différentes variables d'état du modèle. Une de ces variables majeures est le taux de consommation du carbone. En effet, comme la biomasse algale est en générale composée de 45 à 80% de carbone (Liang et al., 2009; Tran, Seymour, Siboni, Evenhuis, & Tamburic, 2017), le taux d'internalisation du carbone est souvent un bon indicateur de la croissance des microalgues. Le suivi de l'internalisation du carbone peut se faire de deux façons: par la mesure de la concentration du carbone dans les algues ou par le dosage du carbone dissout dans le milieu de culture.

La quantification du taux de carbone dans les cellules se fait indirectement par la mesure de la biomasse, par exemple, en prenant le poids sec d'un échantillon de culture et l'analyse élémentaire d'un second échantillon de la même culture. Cette méthode est plutôt ardue et trop laborieuse pour permettre un suivi journalier, en direct, de la consommation du carbone. Le dosage du carbone dissout reste alors la meilleure façon de suivre l'internalisation du carbone. Cependant, dans le cas du carbone sous forme gazeuse, il devient difficile d'utiliser cette méthode. En effet, étant donné la dynamique défavorable à la diffusion des gaz dans le milieu et la consommation assez rapide du CO₂ disponible, les concentrations de carbone dissout varient peu et restent basses.

Pour le dosage de carbone organique dissout, il existe plusieurs méthodes directes et indirectes, comme différentes méthodes chromatographiques, oxydatives ou par combustion (Bisutti, Hilke, & Raessler, 2004; Dafner & Wangersky, 2002; Filella & Rodríguez-Murillo, 2014; Thiébaud, Vial, Michel, Hennion, & Greibrokk, 2006; Vakh et al., 2016). La plupart de ces méthodes sont destructives et laborieuses, donc, pour le suivi journalier des concentrations de carbones, les méthodes spectroscopiques (FT-IR, fluorescence, Raman) sont priorisées (Galant, Kaufman, & Wilson, 2015; J. Girard, Deschênes, Tremblay, & Gagnon, 2013; Jones & Willett, 2006). Dans le cas de sources de carbone inorganique comme le bicarbonate de sodium, les méthodes de dosage en solution

disponibles ne s'appliquent pas bien au suivi quotidien. En effet, que le dosage se fasse par spectroscopie FT-IR (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2016), spectrométrie de masse (Tsikas & Chobanyan-Jürgens, 2010), injection de flux (Hall & Aller, 1992) ou titrage (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2014; Nayak et al., 2016; Pratt & Yuan, 2009), les méthodes développées passent par le dosage de CO₂ gazeux extrait de la matrice aqueuse. Elles sont donc généralement destructives, prennent du temps et nécessitent la préparation d'échantillons. Elles ne permettent pas, non plus, le dosage *in situ* en temps réel, ce qui serait un atout majeur pour le suivi quotidien. Toutefois, la spectroscopie Raman permet le dosage *in situ* du bicarbonate sans altérer le milieu de culture (Beuvier et al., 2014a; Rudolph, Fischer, & Irmer, 2006a). Cette technique nécessite toutefois un montage analytique complexe et dispendieux. La méthode idéale de dosage du carbone inorganique en solution serait donc simple, rapide, non-destructive et offrirait la possibilité de se faire en ligne, en temps réel.

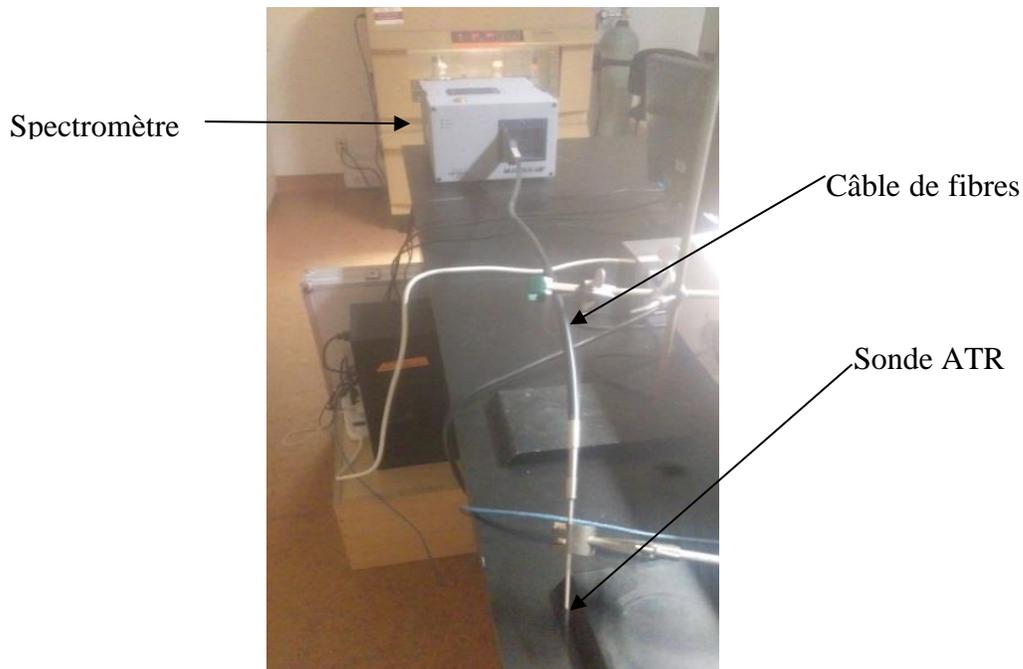


Figure 5 Spectromètre FT-IR Bruker Matrix MF couplée à une sonde externe ATR

La spectroscopie FT-IR couplée à la réflectance totale atténuée (ATR) offrirait toutes ces possibilités. Elle est d'ailleurs déjà utilisée pour le dosage de sels de bicarbonates dans des matrices solides complexes (Garand et al., 2010b; Joshi et al., 2013). La spectroscopie FT-IR est aussi très utilisée en caractérisation et dosage de molécules organiques et inorganiques en solution aqueuse (Falk, Gil, & Iza, 1990; Hua et al., 2012). L'avènement de nouvelles sondes de fibre optique ATR externes combinables à des spectromètres infrarouges, comme le Bruker MF, permet l'acquisition de spectres en continue, donc du dosage d'une multitude de substrats en ligne et *in situ*. Aucune méthode pour le dosage du bicarbonate en solution n'avait été développée jusqu'ici avec cette technique.

La nature du bicarbonate le rend difficile à doser en solution. En effet, sa concentration varie en fonction du pH, ce qui fait que l'ajout d'acide ou de base peut avoir un grand impact sur celle-ci. À pH acide (<7), le bicarbonate devient CO_2 et, selon la concentration de carbone inorganique dissout, aura tendance à s'échapper. Le dosage en direct par spectroscopie FT-IR est donc imprécis. À pH basique (>9.5), une fraction importante du carbone inorganique dissout se retrouve sous forme de carbonate (CO_3^{2-}). En spectroscopie FT-IR, les bandes d'absorption du bicarbonate propices au dosage en solution se situent à 1634 cm^{-1} (ν_2), 1359 cm^{-1} (ν_3), 1320 cm^{-1} (ν_4) et 1014 cm^{-1} (ν_5) (Garand et al., 2010b). La bande à (ν_5) est toutefois trop faible pour servir au dosage sur une large

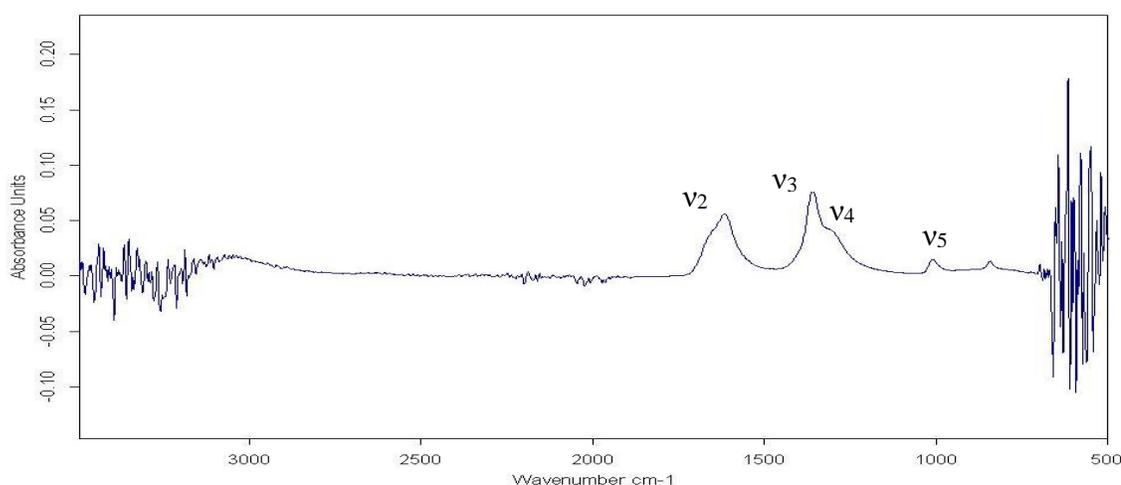


Figure 6 Spectre d'absorption d'une solution aqueuse de $3,5\text{ gL}^{-1}\text{ HCO}_3^{-1}$ acquis avec Bruker Matrix MF

gamme de concentrations (Figure 6). Ces bandes correspondent à la déformation des liens C=O.

Cette revue de littérature, sans être tout à fait exhaustive, offre un aperçu des enjeux entourant les bioprocédés basés sur la culture de microalgues. Ceux-ci présentent un fort potentiel d'implantation et d'exploitation à grande échelle, sont étudiés depuis de nombreuses années et de mieux en mieux compris. Toutefois, le développement de techniques et d'outils facilitant leur optimisation est toujours nécessaire. Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans cette lignée.

CHAPITRE 2

EXPERIENCES REALISEES ET RESULTATS

2.1 TRAVAUX PRELIMINAIRES

Ce projet a été initié par les travaux de Bertrand Genard (BG) et d'une stagiaire de JSD au baccalauréat, Marie-France Leclerc (MFL). Les travaux de MFL portaient sur la dynamique de croissance de microalgues avec le bicarbonate de sodium comme seule source de carbone. Pour ces travaux, le choix de l'espèce de microalgue s'est arrêté sur la chlorophyte *Scenedesmus obliquus*. Cette algue d'eau douce a été largement étudiée, notamment pour sa capacité à produire des grandes quantités de lutéine (Yen et al., 2014), de lipides (Vigeolas et al., 2012), de protéines (Koller et al., 2014) et de polysaccharides (Ho et al., 2013) dépendamment des conditions de culture. Elle présente aussi un fort potentiel industriel parce qu'elle est fortement adaptable. Elle peut croître en utilisant une multitude de substrats carbonés, du CO₂ gazeux aux glucides comme le lactose (Girard et al., 2014), en passant par le cyanure (Gurbuz, Ciftci, & Akcil, 2009). Elle est donc une bonne candidate pour le traitement d'effluents industriels. *S. obliquus* produit aussi une carbonatase lui permettant de croître en milieu plus basique en consommant le bicarbonate plutôt que le CO₂ (Radmer & Ollinger, 1980). Sa grande tolérance au sel lui permet même de pousser dans l'eau de mer (Jung et al., 2015).

Les résultats (non publiés) des deux expériences menées par MFL montraient que l'utilisation de faibles quantités (10 mM) de tampon phosphate avait un impact significatif sur le maintien du pH, favorisant une meilleure croissance des algues. Les concentrations employées étaient toutefois trop faibles pour assurer le contrôle total. L'hypothèse qui en découlait était que le contrôle du pH jouerait un rôle majeur dans l'optimisation de la croissance de *S. obliquus*. Donc, en augmentant suffisamment la concentration de

phosphate, il allait être possible de garder le pH entre 7 et 9 et d'optimiser la production de biomasse. Les résultats de ces expériences n'étaient toutefois pas assez complets pour étudier les détails de la dynamique et identifier les paramètres du modèle que nous tentions de bâtir, puisque les prélèvements et les analyses étaient faits aux 2-3 jours.

2.2 METHODOLOGIE ET PLAN EXPERIMENTAL

2.2.1 Méthodologie

Toutes les expériences de cultures réalisées au cours de ce projet ont suivi la même structure. Les cultures de *S. obliquus* provenaient toujours de la même souche dont une culture dite mère était maintenue dans un incubateur, sans agitation, GC-300 (MBI, Kirkland, Qc, Can). L'origine exacte d'où a été isolée la souche n'est pas connue, mais a été acquise auprès de la bibliothèque du Centre canadien de culture phycologique à Waterloo, Ontario, Canada (CCPC5). Cette culture mère servait ensuite à inoculer la culture d'ensemencement des systèmes qui était acclimatée aux conditions (source de carbone, éclairage, agitation) étudiées dans l'expérience à venir. La culture d'ensemencement, ou pré-culture (PC), croissait dans la chambre d'incubation Multitron II (Infors-HT, Bottmingen, Suisse), dans laquelle toutes les expériences en flacons agités ont été réalisées, jusqu'à l'atteinte d'une biomasse suffisante au démarrage de l'expérience soit environ 1×10^6 cellules/mL. *Scenedesmus* était cultivée dans un milieu synthétique, le «Bold's Basal Medium» modifié (tableau 2), très commun pour la culture d'algues d'eau douce (Stein, 1973). Toutes les expériences ont été réalisées en éclairage continu d'une intensité d'environ $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pour les cultures en flacons agités. Toutes les expériences en flacons agités ont été réalisées en triplicata dans des erlenmeyers d'un litre avec un bouchon. Les cultures croissant sur du bicarbonate étaient dotées d'un système de bullage pour éliminer toute trace de CO_2 gazeux et limiter l'accumulation d' O_2 dans le milieu.

Tableau 2 Composition du BBM modifié

Composé	Concentration solution mère (g·L ⁻¹)	Volume solution mère (mL·L ⁻¹)	Concentration BBM (g·L ⁻¹)
1. KH ₂ PO ₄	17.5	10 mL	0.175
2. CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.5	10 mL	0.025
3. MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5	10 mL	0.075
4. NaNO ₃	25	10 mL	0.250
5. K ₂ HPO ₄	7.5	10 mL	0.075
6. NaCl	2.5	10 mL	0.025
7. Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10	1 mL	0.001
KOH	6.2		
8. FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98	1 mL	0.005
H ₂ SO ₄ (concentré)	1 mL·L ⁻¹		
9. Solution métaux traces ^a		1 mL	
10. H ₃ BO ₃	11.5	0.7 mL	0.008

^a Solution de métaux traces

Composé	Concentration g·L ⁻¹
1. H ₃ BO ₃	2.86
2. MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
3. ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222
4. Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.390
5. CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
6. Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494

Source: Stein 1973

2.2.2 Plan expérimental

D'après les résultats de la littérature et des expériences de MFL, il restait plusieurs questions auxquelles répondre pour atteindre l'objectif principal de ce travail qui était de déterminer les conditions optimales de culture pour la production de biomasse de la microalgue *S.obliquus* en utilisant le bicarbonate de sodium comme source de carbone.

1. Quel était le potentiel réel du bicarbonate comme source de carbone unique en mode autotrophe par rapport à d'autres sources de carbone et autres modes trophiques?
2. Le bicarbonate peut-il permettre une croissance de *S. obliquus* plus rapide, en mode autotrophe ou mixotrophe, que le CO₂ gazeux?
3. Le contrôle du pH a-t-il un impact déterminant sur la productivité de *S. obliquus*?
4. Quelle stratégie de contrôle du pH de cultures favoriserait le plus la croissance en mode «cuvée simple» (*batch*, en anglais)?
5. Serait-il possible d'appliquer les observations et les ajustements des expériences en flacons agités en PBR de classe préindustrielle?

2.2.3 Méthodes analytiques

Afin de répondre à ces questions, les variables à suivre allaient être la croissance des algues, leur consommation de nitrate et de bicarbonate et l'évolution du pH.

Suivi de la croissance

Lors des expériences en flacons agités, la croissance des microalgues était suivie au quotidien en utilisant trois méthodes de mesure: le compte cellulaire, la densité optique et le poids sec. Le compte cellulaire, comme son nom l'indique, consiste à dénombrer les cellules contenues dans 0.25 nL à l'aide d'un hémacymètre de Neubauer. Le résultat est une estimation de la concentration de cellules et est rapporté en Mcell/mL. Cette mesure tend à plafonner avant que la croissance réelle ne le fasse puisqu'en fin d'expérience, les algues ont plutôt tendance à grossir qu'à se reproduire.

La densité optique est en fait la mesure de la concentration de chlorophylle a, à 680 nm de laquelle on soustrait l'absorbance du milieu mesurée à 550 nm (Kotzabasis & Dörnemann, 1998). Durant la phase de croissance, après photoacclimatation, la production

de chlorophylle est proportionnelle à la biomasse produite. Cependant, le changement de source de carbone semble avoir un impact sur la composition des pigments, comme observé avec le bicarbonate de sodium. Ceci pourrait fausser la lecture à 680 nm. Aussi, durant la phase d'accumulation de lipides, la couleur des cultures tend vers le jaune.

En ce qui concerne les poids secs, deux méthodes ont été employées pour ce projet. La première a été adaptée d'une publication de Zhu et Lee (1997). Cette méthode consiste à récolter, par filtration sous vide, la biomasse d'un aliquote de 10 mL de culture sur un filtre de type Whatman (microfibres de verre, GF/C, 1.2 μm) pré-pesé et séché. La biomasse est ensuite rincée avec 20 mL de formiate d'ammonium ($\text{HCO}_2^- \text{NH}_4^+$) 0,5 M pour éliminer tous les sédiments et la matière organique dissoute qui pourraient adhérer à la surface des cellules (C. J. Zhu & Lee, 1997). Le filtre contenant la biomasse est ensuite séché, pour 24h, à l'étuve, à 90°C. Durant les premières expériences, des aliquotes de 5 mL étaient utilisés plutôt que 10 mL. Le volume des cultures était trop faible pour permettre le prélèvement de 10 mL pour le suivi de la biomasse, quotidiennement, en plus des échantillons nécessaires pour le suivi des autres variables. La même quantité de formiate était tout de même utilisée. Un seul échantillon par système était prélevé pour cette méthode chaque jour.

La deuxième méthode employée pour les poids secs a seulement servi lors de l'expérience en PBR. Il s'agit d'une méthode qui consiste à peser les algues séchées par lyophilisation. Des échantillons de 45 mL sont récupérés dans des tubes Falcons de 50 mL pré-pesés. L'échantillon est alors centrifugé (3400G, 6min) et le milieu est récupéré (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006). La biomasse est alors remise en suspension dans 45 mL d'eau déionisée pour la rincer. L'échantillon est, à nouveau, centrifugé. L'eau est évacuée et les étapes du rinçage sont répétées. L'échantillon est ensuite congelé à -20°C, puis -80°C avant d'être lyophilisé (-40°C, max. 130 mbar) durant 48h. Deux échantillons de 45 mL sont prélevés, par système, chaque jour pour des fins d'analyse statistique et en guise de filet de sureté

Mesure du pH

Le pH des cultures en flacons et en PBR était mesuré avec le pH-mètre FiveEasy Plus (Mettler Toledo) équipé d'une sonde Orion 9102DJWP (Thermo Scientific). Le pH-mètre était calibré avant chaque série de mesures.

Durant l'expérience en PBR, les réacteurs étaient équipés d'une sonde à pH InPro 3253 (Mettler Toledo) pour les mesures en continu.

Consommation de nitrate

Le suivi de la consommation de nitrates pouvait aussi se faire avec deux techniques. La première est une technique spectroscopique en UV-visible développée par Benavides (2015). Elle était utilisée pour toutes les expériences. Le nitrate absorbe, dans l'UV, à 220 nm. Il suffit donc de soustraire l'absorbance du milieu mesurée à 275 nm de celle mesurée à 220 nm. La différence est ensuite rapportée sur une courbe de calibration pour obtenir la concentration de nitrate. L'absorbance du milieu (BBM) est considérée constante dans la plage de 220 nm à 275 nm (Benavides, Hantson, Van Impe, & Vande Wouwer, 2015). Elle est toutefois influencée par les ions qui le composent. Pour chaque tampon ajouté au milieu de culture, une courbe de calibration à 220 nm a été tracée. Cette courbe de calibration a servi de modèle prédictif pour estimer l'impact des tampons sur l'absorbance mesurée à 220 nm. Ainsi, la contribution du tampon était aussi soustraite à l'absorbance mesurée à 220 nm.

La deuxième méthode du dosage du nitrate en solution était la chromatographie ionique. Employée en complément de la méthode par spectroscopie UV-Visible, elle était menée sur un chromatographe ICS-1000 (Dionex). Un échantillon du milieu de chaque culture était conservé tous les jours à -20°C, jusqu'à la fin de l'expérience de croissance. Les échantillons étaient alors décongelés pour l'analyse des ions nitrate, phosphates, sulfate et chlorure.

Consommation de carbone

Le suivi de la consommation de carbone ne pouvait se faire que dans les échantillons contenant du bicarbonate. Encore une fois, le suivi devait se faire en utilisant deux méthodes. D'abord, la concentration de bicarbonate était mesurée par injection en flux. Dans cette technique, le bicarbonate est dosé par le détecteur à conductivité du chromatographe ionique (Dionex ICS-1000) sans passer par la colonne. La séparation du carbone inorganique dissout des autres ions est basée sur sa gazéification en milieu acide (Hall & Aller, 1992). Le dispositif d'extraction du carbone inorganique est appelé cellule à gaz. La cellule comporte deux canaux séparés par une membrane hydrophobe, perméable seulement aux molécules de petite taille. De chaque côté de cette membrane, une solution aqueuse acide et basique circule de façon tangentielle. L'échantillon est acheminé dans la cellule à gaz par l'éluent contenant 10 mM d'acide chlorhydrique (HCl). Le carbone inorganique dissout se retrouve alors sous la forme de CO_2 et diffuse à travers la membrane pour être récupéré par l'éluent contenant 10 mM d'hydroxyde de sodium (NaOH). C'est cette phase qui est ensuite acheminée vers le détecteur pour le dosage. Comme pour la chromatographie ionique, la méthode nécessite le traçage d'une nouvelle courbe de calibration à chaque utilisation. Les échantillons de milieu étaient donc accumulés et congelés jusqu'à la fin de l'expérience. La plage de linéarité de cette méthode s'étendait de 0,75 mM à 20 mM HCO_3^- .

La seconde méthode utilisée est le dosage par spectroscopie FT-IR dont le fonctionnement, le développement et la validation sont rapportés au Chapitre 3. Cette méthode permet le dosage de quatre ions (HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2PO_4^- et HPO_4^{2-}) avec l'acquisition d'un seul spectre. La méthode est assez rapide pour effectuer le dosage quotidiennement. Toutefois, la limite de quantification des différents ions avoisine les 15 mM. Il était donc nécessaire d'effectuer des ajouts dosés pour mesurer la concentration de bicarbonate dans les cultures en flacons agités. Des ajouts dosés ont aussi été effectués lorsque la concentration des échantillons en PBR est descendue à 30 mM.

La performance de captation de carbone a été calculée par le bilan carbone (équation 2.1) qui met en relation la quantité de carbone consommé et la croissance qui en résulte.

$$\Delta_C = \frac{(x_f - x_i) \cdot n_C}{M_C} \times 100\% \quad (2.1)$$

Ici, x_f et x_i représentent respectivement la biomasse finale et la biomasse initiale, en $gA \cdot L^{-1}$. La variable n_C représente la fraction massique (w/w) du carbone dans les algues. Des travaux antérieurs dans le laboratoire ont révélé qu'elle fluctuait peu et se situait habituellement autour de 50%. Le paramètre M_C est la masse molaire du carbone alors que $[C]_i$ est la concentration initiale de carbone, dans le milieu de culture, en $mol \cdot L^{-1}$.

2.3 DEROULEMENT DES EXPERIENCES

La première série d'expériences (Expériences 1 et 2) avait pour but de répondre aux questions 1 et 3. Pour l'expérience 1, les conditions de cultures sont présentées dans le tableau 3. Le volume initial des cultures était de 350 mL et les cultures ont étéensemencées à 0,9 Mcell/mL. Les cultures contenant du bicarbonate de soude sont les seules auxquelles a été ajouté un tampon phosphate avec 12, 5mM de pouvoir tampon.

Tableau 3 Conditions initiales de culture de l'expérience 1

Test	Essai	$[NO_3^-]$ (mmol·L ⁻¹)	$[HCO_3^-]$ (mmol·L ⁻¹)	[Glucose] (mmol·L ⁻¹)	$[C]_{tot}$ (mmol·L ⁻¹)	[P] (mmol·L ⁻¹)	pH
Contrôle autotrophe	A	2,94	0	0	0	0,858	6,6
	B	2,94	0	0	0	0,858	6,6
	C	2,94	0	0	0	0,858	6,6
Test autotrophe	A	2,94	23,4	0	23,4	25,0	7,5
	B	2,94	23,5	0	23,5	25,0	7,5
	C	2,94	23,4	0	23,4	25,0	7,5
Test	A	2,94	0	2,73	16,4	0,858	6,6

mixotrophe	B	2,94	0	2,73	16,4	0,858	6,6
	C	2,94	0	2,73	16,4	0,858	6,6
	A	2,94	0	2,73	16,4	0,858	6,6
Contrôle hétérotrophe	B	2,94	0	2,73	16,4	0,858	6,6
	C	2,94	0	2,73	16,4	0,858	6,6

L'expérience s'est déroulée sur neuf jours, seulement, parce qu'aucune croissance n'a été observée pour les cultures contrôles et que le pH des cultures mixotrophes et avec bicarbonate avait atteint 11. Aucune croissance n'était donc possible pour ces cultures à partir de ce point. Il était attendu que le pH des cultures contenant du bicarbonate augmente, étant donné la stœchiométrie de l'internalisation du bicarbonate par les algues et le pouvoir du tampon initial (12,5 mM). De plus, dans le BBM la source d'azote est du nitrate qui mène aussi à une basification du milieu de culture lorsque consommé par les microalgues (Ale et al., 2014; Nayak et al., 2016; Urrutia, Serra, & Llama, 1995). La consommation de nitrate pourrait aussi expliquer l'augmentation du pH dans les cultures mixotrophes qui ne contenaient que le faible tampon du BBM. Les cultures avec bicarbonate étaient aussi productives, en termes de biomasse, que les cultures mixotrophes (figure 7). Comme les cultures contrôle n'ont pas cru, il était difficile d'évaluer s'il y avait bien un gain avec l'utilisation de bicarbonate en autotrophie.

Pour élucider cette question, l'expérience a été reprise (expérience 2) en modifiant quelques paramètres expérimentaux. Le tampon, lors de l'expérience 1, étant insuffisant, il a été modifié pour limiter les variations de pH entre 7,5 et 8. Considérant 16,4 mM de protons nécessaires à la neutralisation de l'hydroxyde provenant du HCO_3^- , en plus du NO_3^- , les nouvelles concentrations pour le tampon phosphate ont été fixées à 27,78 mM H_2PO_4^- et 55,43 mM HPO_4^{2-} . Pour isoler la source de carbone comme variable dépendante et mieux contrôler le pH des cultures mixotrophes, le nouveau tampon pH a été ajouté à toutes les cultures. Pour des fins de comparaison, les biomasses maximales des expériences 1 et 2 se

retrouvent dans la figure 7. Les cultures hétérotrophes n'y sont pas représentées parce que leur croissance a été marginale lors des deux expériences.

Tableau 4 Conditions initiales de culture de l'expérience 2

Test	Essai	[NO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	[HCO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	[Glucose] (mmol·L ⁻¹)	[C] _{tot} (mmol·L ⁻¹)	[P] (mmol·L ⁻¹)	pH
Contrôle autotrophe	A	2,94	0	0	0	73,2	7,0
	B	2,94	0	0	0	73,2	7,0
	C	2,94	0	0	0	73,2	7,0
Test autotrophe	A	2,94	46,8	0	46,8	73,2	7,5
	B	2,94	46,8	0	46,8	73,2	7,5
	C	2,94	46,8	0	46,8	73,2	7,5
Test mixotrophe	A	2,94	0	2,73	16,4	73,2	7,0
	B	2,94	0	2,73	16,4	73,2	7,0
	C	2,94	0	2,73	16,4	73,2	7,0
Contrôle hétérotrophe	A	2,94	0	2,73	16,4	73,2	7,0
	B	2,94	0	2,73	16,4	73,2	7,0
	C	2,94	0	2,73	16,4	73,2	7,0

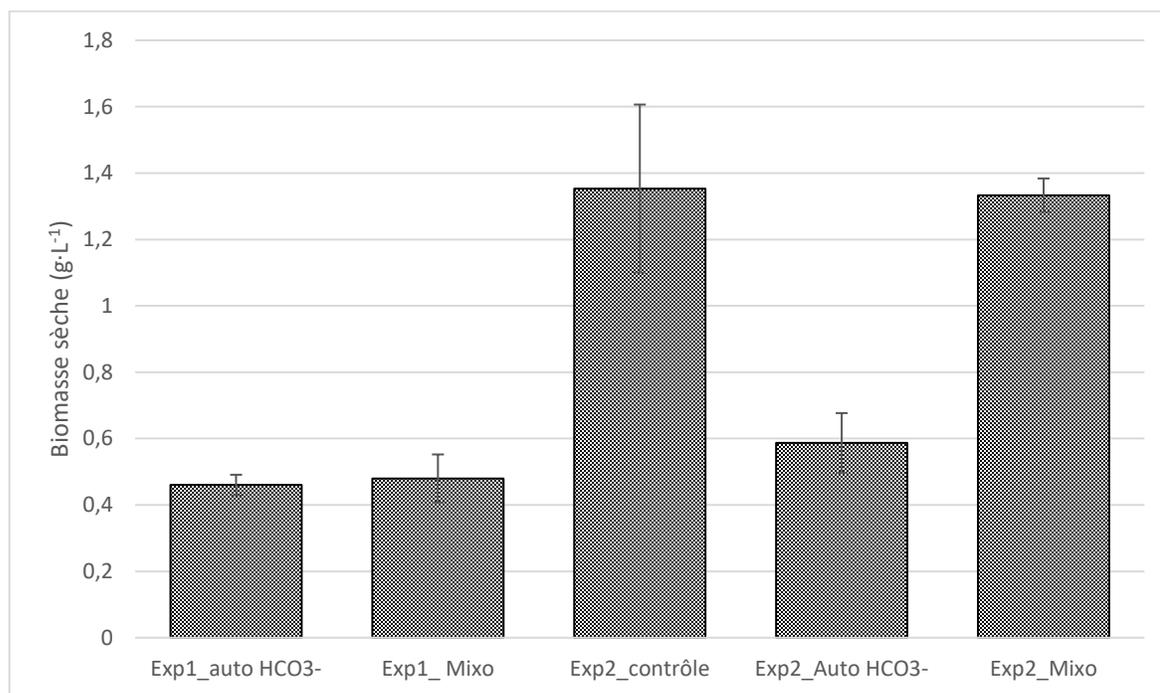


Figure 7 Biomasse de *S. obliquus* produite dans différentes conditions de culture lors des expériences 1 et 2

La croissance a été supérieure pour les trois conditions de culture illustrées à la figure 7, lors de l'expérience 2. En effet, l'ajout de tampon phosphate dans les cultures mixotrophes semble avoir un impact positif sur leur performance. Avec la même quantité de glucose, la biomasse atteinte est 2,8X supérieure lors de la reprise. De plus, cette fois, les cultures contrôles ont cru selon les attentes. Elles ont d'ailleurs cru sensiblement au même rythme et atteint la même biomasse maximale que les cultures mixotrophes. L'ajout de glucose aurait toutefois dû permettre une croissance supérieure en mixotrophie. L'écart-type entre les cultures contrôle est cependant très grand montrant une grande variabilité entre les trois flacons. Il est difficile d'expliquer cette grande variabilité entre les différents systèmes.

Les cultures contenant du bicarbonate de soude ont cru davantage lors de l'expérience 2. Toutefois, la biomasse maximale atteinte était de 0,58 g·L⁻¹ avec une quantité 2X supérieure de carbone et un pH mieux contrôlé, (pH maximal atteint 8,61). Une production

de biomasse bien supérieure était attendue. Le bilan carbone de cette culture est seulement de 48,8%, alors que celui de l'expérience 1 était de 73,0%. Une explication viendrait du fait que la croissance maximale, lors de l'expérience 2, a été atteinte au jour 5 et s'est mise à chuter, jusqu'à $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, au jour 12. Les cultures ont pu être contaminées, mais aucune observation lors des comptes cellulaires n'a pu confirmer cette hypothèse. Les bilans carbone des cultures avec bicarbonate sont bien en-dessous des 100% espérés au début du projet. La quantité d'azote présente dans le BBM (2,94 mM) n'était pas un facteur limitant, puisque le ratio critique moyen C:N pour les microalgues est environ 20:1 (F. Chen & Johns, 1991). Alors, deux voies d'explications sont possibles. D'abord, le pH auquel les cultures ont été démarrées était trop faible. À pH 7,5, environ 7% du carbone inorganique dissout se retrouve sous forme d'acide carbonique qui peut se dissocier et se dégazer sous forme de CO_2 . Cet impact est majeur considérant le principe de Le Châtelier qui stipule qu'une réaction favorisera toujours la formation du produit permettant le maintien de l'équilibre initial (Atkins & de Paula, 2009). Ainsi, le dégazage du CO_2 favorisera la formation d'acide carbonique pour maintenir la fraction à 3-7% tant que le pH ne dépassera pas 8. Cette hypothèse est appuyée par les concentrations de bicarbonate mesurées après 24h (Tableau 3) qui sont beaucoup plus faibles que les quantités ajoutées.

Tableau 5 Concentrations en carbone inorganique dissous dans les cultures après 24h de croissance et à la fin des expériences 1 et 2

Expérience	Échantillon	$[\text{HCO}_3^-]_{\text{J1}}$ (mmol/L)	$[\text{C}]_{\text{finale}}^3$ (mmol/L)	$[\text{HCO}_3^-]_{\text{init}}$ calculée (mmol/L)
1.1	A	9,59 ¹	1,97 ¹	23.4
	B	7,83 ¹	1,74 ¹	23,5
	C	10,3 ¹	2,64 ¹	23,4
1.2	A	26.7 ²	14.4 ²	46,8
	B	30.7 ²	13.6 ²	46,8

C	28.0 ²	14.5 ²	46,8
---	-------------------	-------------------	------

¹Concentrations mesurées par la méthode d'injection en flux (Hall & Aller, 1992)

²Concentrations mesurées par la méthode de spectroscopie FT-IR

³Le carbone inorganique dissout de l'expérience 1 se retrouve sous forme de carbonate.

Aussi, il est resté des quantités appréciables de bicarbonate en solution à la fin des expériences. Dans le cas de l'expérience 1, le pH des cultures a dû croître plus rapidement que le taux d'internalisation du carbone des algues. Ainsi, lorsque le pH est passé au-dessus de 10, la plupart du carbone se trouvait sous forme de carbonate et n'était pas assimilable. Pour ce qui est des cultures de l'expérience 2, la mort des cellules à partir de la moitié de l'expérience serait l'explication la plus logique. Pour appuyer cette idée, la concentration en bicarbonate semble constante du jour 4 à la fin. Le pH des cultures, qui est un bon indicateur de la consommation de bicarbonate, bien qu'il continue de croître tout au long de l'expérience, semble aussi aller dans ce sens. Le pouvoir tampon des cultures n'était pas suffisant pour contrer toute variation du pH si tout le bicarbonate avait été consommé. Il est cependant resté en-dessous de 9.

La première série d'expériences n'a donc pas permis de confirmer le potentiel du bicarbonate de sodium comme source de carbone unique pour la production d'algues. Elle a toutefois permis de mettre en lumière l'importance d'un bon contrôle du pH. Non seulement est-il important de limiter l'escalade du pH, mais il faut aussi s'assurer qu'il soit suffisamment élevé dès le départ pour limiter les pertes par dégazage.

Suite à cette série d'expériences, l'expérience 3 a été démarrée avec comme visée la confirmation du potentiel du bicarbonate de sodium comme source de carbone, unique ou combinée. Les conditions de cultures sont présentées au tableau 6.

Tableau 6 Conditions initiales de culture de l'expérience 3

Test	Essai	[NO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	[HCO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	[Glucose] (mmol·L ⁻¹)	[C] _{tot} (mmol·L ⁻¹)	[P] (mmol·L ⁻¹)	pH
Contrôle autotrophe	A	2,94	0	0	0	73,2	7,0
	B	2,94	0	0	0	73,2	7,0
	C	2,94	0	0	0	73,2	7,0
Test autotrophe	A	2,94	16,4	0	16,4	73,2	7,3
	B	2,94	16,4	0	16,4	73,2	7,3
	C	2,94	16,4	0	16,4	73,2	7,3
Test mixotrophe	A	2,94	8,20	1,37	16,4	73,2	7,2
	B	2,94	8,20	1,37	16,4	73,2	7,2
	C	2,94	8,20	1,37	16,4	73,2	7,0
Test contrôle pH actif	A	2,94	32,8	0	16,4	73,2	7,5
	B	2,94	32,8	0	16,4	73,2	7,5
	C	2,94	32,8	0	16,4	73,2	7,7

Pour des raisons de contrôle du procédé et comparaison de la productivité des cultures contrôles avec les résultats de la littérature, le taux de CO₂, dans la chambre de croissance, était maintenu à 1-1,5%. Le tampon pH employé était le même pour toutes les cultures, soit celui utilisé lors de l'expérience 2. Le pouvoir du tampon allait être assez grand pour maintenir le pH des cultures contrôle, tests autotrophes et mixotrophes et ralentir significativement la croissance du pH des cultures «Test contrôle pH actif». Le pH de ces cultures test devait être maintenu entre 7,5 et 8,5 par ajouts un ajout d'HCl lorsqu'il dépasserait 8,5. Pour limiter la dilution que le contrôle du pH allait engendrer, la concentration de l'acide ajouté était 0,25M.

Aucune différence significative n'a pu être observée, en termes de croissance totale, entre les trois conditions de culture avec bicarbonate (Figure 8). Étant donné que le carbone

était le substrat limitant, dans cette expérience, et non l'azote, il était attendu que les cultures 2 et 3 connaissent une production semblable. Logiquement, les cultures avec contrôle actif du pH auraient dû atteindre une biomasse de près de deux fois celle des autres cultures contenant du bicarbonate. Cependant, au jour 6, leur pH a dépassé 8,5. Un volume de 20 mL d'HCl 0,25 M a été ajouté pour ramener le pH à 7,5. Le pH a toutefois chuté à 7. Cet ajout d'acide a grandement stressé les algues en faisant chuter le pH de plus d'1,5 unité et favorisé le dégazage du carbone. L'effet de l'ajout d'acide s'est fait ressentir instantanément sur la croissance des algues qui est passée d'un taux quotidien moyen de 0,084 g/d durant les 5 premiers jours (Figure 9), à un taux presque nul pour les 7 suivants. Pour les systèmes contenant du bicarbonate, la croissance maximale atteinte avoisine $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les bilans carbone ont été calculés pour chacun et ceux des cultures autotrophes sans contrôle actif de pH et mixotrophes sont 110,7% et 115,7%. Ces valeurs sont surprenantes, surtout considérant que le pH initial moyen de ces cultures était de 7,3 et 7,1, ce qui fait que du carbone a été perdu par dégazage. Ces bilans carbone supérieurs à 100% sont le fruit des approximations du calcul. D'abord, la fraction de carbone dans la biomasse a été fixée à 50% d'après plusieurs analyses élémentaires réalisées précédemment avec cette espèce. Cependant, ces expériences précédentes étaient toujours réalisées avec une limitation en azote plutôt qu'en carbone. Il se pourrait que les ratios élémentaires changent légèrement lorsque les algues sont limitées en carbone. Le ratio C:N varie effectivement moins que le ratio C:P ou N:P chez les algues, mais il a une certaine plasticité (Adesanya et al., 2014; Geider & La Roche, 2002)

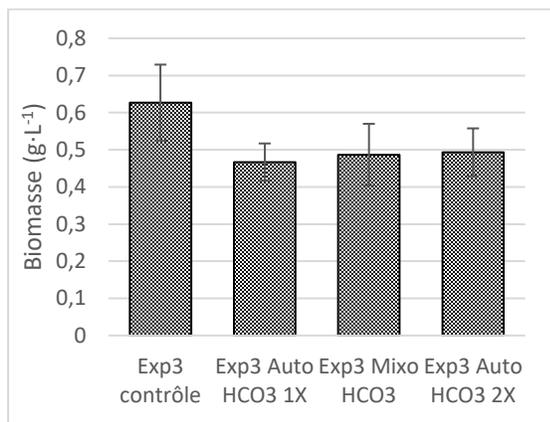


Figure 8 Biomasse maximale de *S. obliquus* atteinte lors de l'expérience 3 pour les quatre conditions de culture

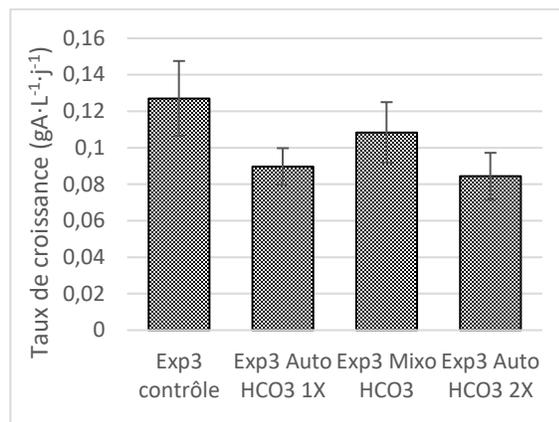


Figure 9 Taux de croissance moyen lors des 5 premiers jours de l'expérience 3

La plus grande source d'erreur toutefois provient de la mesure des poids secs. En effet, les échantillons utilisés sont de 5 mL plutôt que 10 mL, comme prévu dans l'article détaillant la méthode. Cette mesure avait été prise afin de limiter la baisse du volume des cultures causée par les prélèvements quotidiens. La masse contenue dans 5 mL de culture est toutefois très faible par rapport à la masse du filtre sec (env. 0,5% en fin d'expérience). Ainsi, l'incertitude sur les mesures due à l'erreur de la balance analytique ($\pm 0,0001$ g) est de l'ordre de 5-15%, sans compter la variabilité entre les cultures et les manipulations. C'est pourquoi, à partir de la prochaine expérience, le volume utilisé pour les masses sèches est passé à 10 mL et celui des cultures, à 500 mL. Le bilan carbone de la culture 4 est de 58.7%. Les raisons de sa faiblesse sont les mêmes que pour la faible croissance. Comme le montre la figure 8, les cultures les plus productives étaient les contrôles avec CO₂ gazeux. Il était attendu qu'elles atteignent une biomasse supérieure en fin d'expérience puisqu'elles n'étaient pas limitées en carbone. Elles ont donc pu consommer un peu plus de nitrate que les autres cultures jusqu'à la fin (Figure 10). La figure 10 montre toutefois, une très grande variabilité dans les taux de captation d'azote en fonction des différentes conditions de culture, ce qui pourrait montrer que les stratégies d'accumulation de l'azote sont influencées par la disponibilité et la forme du carbone.

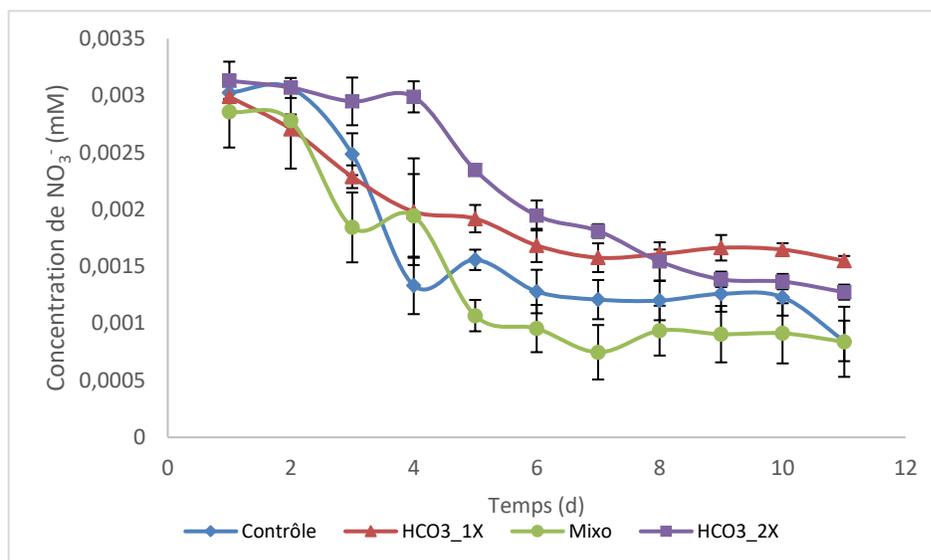


Figure 10 Consommation de nitrate par *S. obliquus* en fonction des conditions de culture. Dosage réalisé par spectroscopie UV-Visible.

Sachant que les cultures contrôles avaient un plus fort potentiel de croissance absolue, la variable de comparaison la plus importante allait être le taux de croissance en début d'expérience (Figure 9). Aucun des taux de croissance n'est significativement supérieur à tous les autres. Par contre, les taux des deux cultures autotrophes avec bicarbonate semblent les plus faibles et sont très proches l'un de l'autre ($0,090$ et $0,084$ $\text{gA L}^{-1} \text{d}^{-1}$). Bien qu'ils semblent plus bas que les deux autres, ils se situent dans le haut des taux d'accroissement en autotrophie rapportés pour *S. obliquus* ($0,070$ - $0,094$ $\text{gA L}^{-1} \text{d}^{-1}$) (H. H. Chen & Jiang, 2017). Ceci veut dire que le taux rapporté pour les cultures contrôle est beaucoup plus élevé ($0,127$ $\text{gA L}^{-1} \text{d}^{-1}$) que les valeurs de la littérature. De même, pour les cultures mixotrophes. Dans leur cas, par contre, l'apport du carbone organique pourrait contribuer au gain de productivité.

Cette expérience aura permis de confirmer le potentiel du bicarbonate comme source de carbone pour la production de biomasse microalgale, sans, toutefois, montrer clairement le gain de performance attendu par rapport au CO_2 gazeux. Comme pour la première série d'expériences, le dégazage, en raison du pH trop faible en est fort probablement la cause. C'est pourquoi lors des expériences suivantes le pH initial des cultures contenant du

bicarbonate sera fixé à 8 ou plus. L'expérience n'a pas, non plus, permis d'identifier le meilleur mode de culture avec le bicarbonate de sodium, mais a permis de mettre en lumière les lacunes de la méthode de masse sèche.

La série d'expériences (Expériences 4 et 5) visait à étudier la productivité de *S. obliquus* avec HCO_3^- à $\text{pH} > 8$ et les meilleures stratégies de contrôle du pH entre 8-9. Pour l'expérience 4, les deux objectifs principaux étaient d'étudier la productivité de *S. obliquus* à pH basique en utilisant seulement un tampon phosphate pour assurer le contrôle du pH et l'effet de la quantité de tampon, donc de l'efficacité du contrôle du pH, sur la croissance des algues. Bien que les expériences précédentes et celles menées par MFL semblent confirmer l'importance d'un contrôle accru du pH, elles ont toutes été réalisées à des pH permettant le dégazage du carbone inorganique dissous. Ainsi, il semblait logique de commencer par étudier l'impact de différents tampons phosphates sur la croissance en milieu basique. De plus, le pKa du dihydrogénophosphate est de 7,2. Les quantités de phosphate nécessaires pour le contrôle total du pH de cultures contenant 16,4 mM de bicarbonate entre 8 et 8,5 seraient beaucoup trop grandes (25,2 mM H_2PO_4^- /158,9 mM HPO_4^{2-}). De telles quantités de phosphates risquent d'être délétères pour les microalgues (Aslam, Thomas-Hall, Mughal, & Schenk, 2017) en plus de faire augmenter substantiellement les coûts de production à grande échelle par rapport à l'utilisation d'un contrôle actif par ajout d'acide, par exemple.

Pour l'expérience 4, en plus du contrôle autotrophe, les trois conditions testées étaient autotrophes utilisant le bicarbonate de sodium comme seule source de carbone. Les conditions sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 Conditions initiales de culture de l'expérience 4

Test	Essai	$[\text{NO}_3^-]$ (mmol·L ⁻¹)	$[\text{HCO}_3^-]$ (mmol·L ⁻¹)	[P] (mmol·L ⁻¹)	Pouvoir tampon (mmol·L ⁻¹)	pH
Contrôle autotrophe	A	2,94	0	26,0	3,49	7,5
	B	2,94	0	26,0	3,49	7,5

	C	2,94	0	26,0	3,49	7,5
	A	2,94	11,9	26,0	3,49	8,0
C1P25	B	2,94	11,9	26,0	3,49	8,0
	C	2,94	11,9	26,0	3,49	8,0
	A	2,94	11,9	51,1	6,98	7,9
C1P50	B	2,94	11,9	51,1	6,98	7,9
	C	2,94	11,9	51,1	6,98	7,9
	A	2,94	23,8	51,1	6,98	8,0
C2P50	B	2,94	23,8	51,1	6,98	8,0
	C	2,94	23,8	51,1	6,98	8,0

Les quatre conditions étudiées lors de cette expérience étaient donc les contrôles autotrophes (CO₂ atmosphérique) (Cultures 1) et les premières cultures autotrophes (Cultures 2) contenaient 1g·L⁻¹ NaHCO₃ (11,9 mM HCO₃⁻) et leur tampon était limité à 25 mM de phosphate total, soit 3.49mM H₂PO₄⁻ pour fournir les protons nécessaires à l'homéostasie du pH intracellulaire. Ce tampon a aussi été employé dans les cultures contrôles. Les cultures 3 croissaient aussi avec 11,9 mM HCO₃⁻, mais le tampon phosphate était doublé, donc 50 mM P_{tot} et 6,98 mM de pouvoir tampon. Ce même tampon a été utilisé pour les cultures 4 qui contenaient 2 g·L⁻¹ de NaHCO₃. Ce dernier test visait à comparer le taux de croissance de *S. obliquus* en fonction de la concentration de carbone inorganique dissous.

La figure 11 montre la croissance des quatre cultures au cours de l'expérience 1.3. Comme les cultures contrôle n'ont pas poussé, l'analyse des résultats se résume aux cultures contenant du bicarbonate. D'après cette figure, la quantité de carbone dissout ne semble pas affecter le taux de croissance de *S. obliquus* lors de la phase exponentielle. La quantité de carbone ne semble donc affecter que la croissance absolue, puisque les cultures contenant 11,9 mM NaHCO_3 ont produit près de la moitié moins de biomasse que les cultures contenant 23,8 mM. Le tampon ne semble pas avoir, non plus, d'impact sur le taux de croissance. En effet, au jour 4, la biomasse des trois systèmes contenant du bicarbonate est sensiblement la même. La croissance s'arrête d'ailleurs à ce moment pour les deux systèmes contenant 11,9 mM NaHCO_3 .

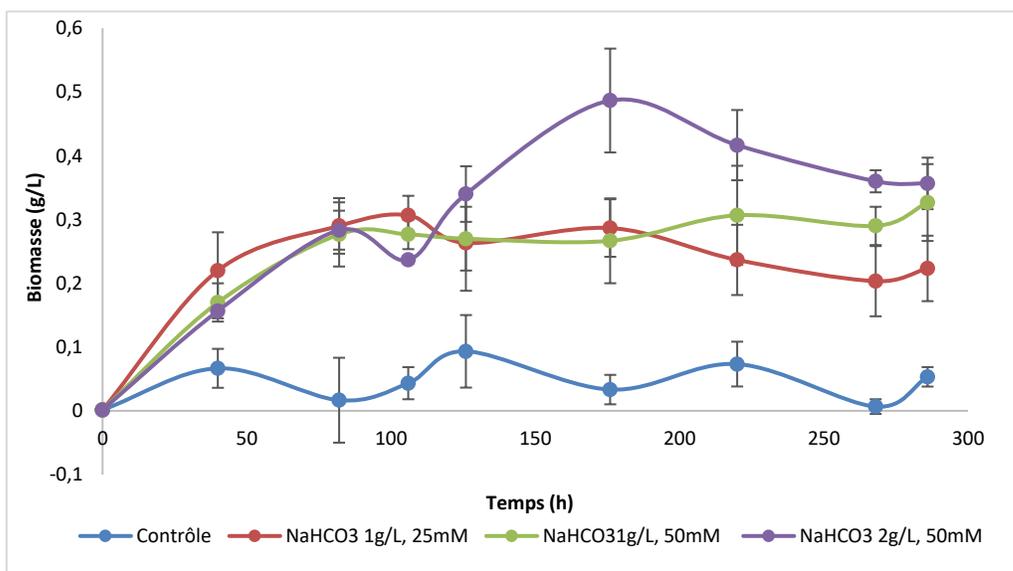


Figure 11 Suivi de la masse sèche de cultures de *S. obliquus* avec la méthode de Zhu et Lee

Les cultures contenant 11,9 mM de NaHCO_3 ont cessé de croître au jour 4, correspondant au moment où les réserves de carbone en solution se sont épuisées (Figure 13). Dans le cas des cultures 1C1P, le pH a cru très rapidement atteignant 11 au jour 4 (Figure 12). Pour les cultures 1C2P, le tampon additionnel semble avoir permis de maintenir le contrôle du pH pour une plus longue période avant d'être brisé comme prévu. Cependant, ces observations ne concordent pas tout à fait avec les attentes. En effet, la

hausse du pH était associée à la consommation de bicarbonate. Pourtant, avec des quantités de tampon nettement insuffisantes pour fournir les protons nécessaires à contrer le relargage d'hydroxyde dans le stroma causé par la consommation de 11,9 mM de HCO_3^- , les algues ont pu consommer tout le bicarbonate présent avant qu'il ne devienne carbonate. De plus, dans le cas des cultures 1C2P, le pH a continué de grimper sans qu'il n'y ait de croissance, ni de consommation de bicarbonate. Cela indiquerait que les algues accumulent le carbone lorsqu'il ne se retrouve que sous forme de bicarbonate et qu'elles ne le transforment en CO_2 , nécessitant l'apport de H^+ du milieu, uniquement au moment de l'utiliser. Les bilans carbone calculés pour les deux ensembles de cultures contenant 11,9 mM avoisinent les 100%, ce qui concorde avec les mesures de consommation de HCO_3^- .

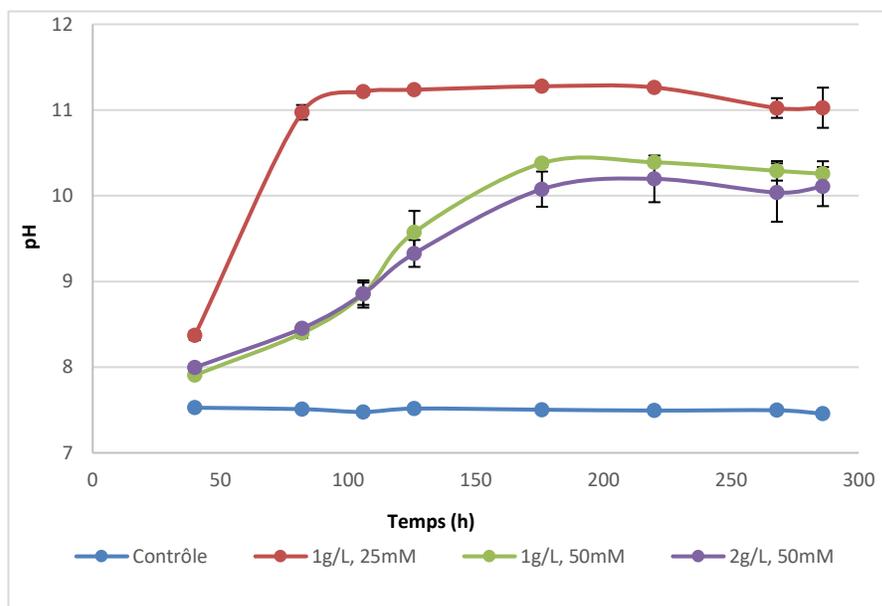


Figure 12 Suivi du pH de l'expérience 4

En ce qui concerne les cultures contenant 23,8 mM de NaHCO_3 , elles semblent avoir produit une plus grande biomasse que les autres ($0,487 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ vs $\sim 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Elles n'ont, cependant, pas consommé tout le bicarbonate disponible. Cela expliquerait pourquoi la biomasse produite n'est pas le double de celle des autres cultures. Leur consommation de

bicarbonate semble s'arrêter lorsque le pH atteint 10, soit au jour 8. C'est aussi à ce moment que les cultures atteignent leur pic de biomasse. Donc, contrairement aux cultures contenant 11,9 mM de HCO_3^- , la consommation du bicarbonate semble causer la hausse du pH qui régit, par la suite la disponibilité du carbone et, du même coup, la croissance. Le plus gros de l'internalisation de carbone a tout de même eu lieu entre l'inoculation et le quatrième jour de croissance. Comme pour les cultures 1C1P, les algues des cultures 4 sont entrées en phase de mortalité plutôt qu'en phase plateau durant la deuxième moitié de l'expérience. Il est fort possible qu'une contamination soit responsable, puisqu'au jour 6, les bouchons de certains systèmes de bullage ont sauté après que l'entrée d'air eut accroché les tubes fluorescents de la chambre de croissance lors de l'agitation.

À la lumière de l'expérience 4, quelques questions n'ont pas trouvé de réponse. Par exemple, la relation entre l'évolution du pH et la consommation de bicarbonate observée dans les cultures avec de faibles quantités de bicarbonate ouvre la porte à l'idée d'une consommation de luxe ou une accumulation de carbone. Le concept de consommation de luxe qui consiste à accumuler des nutriments en prévision d'une croissance sans besoin

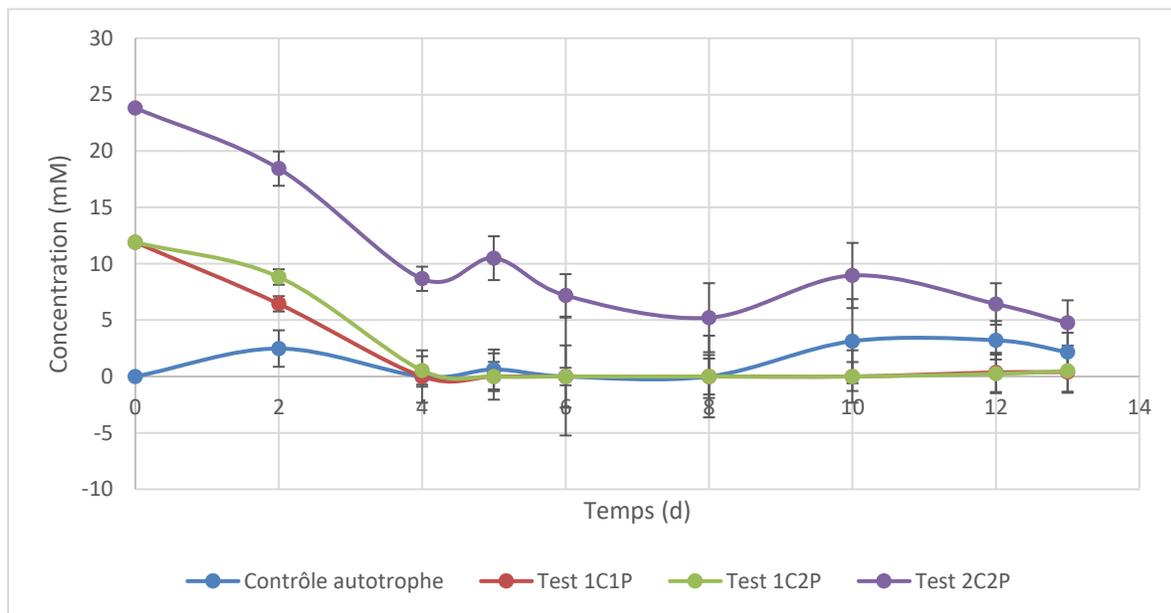


Figure 13 Suivi de la consommation du carbone par *S. obliquus* par la méthode de spectroscopie FT-IR

immédiat (Adesanya et al., 2014), ce qui concorde avec la littérature scientifique concernant les mécanismes de concentration du carbone chez les chlorophytes. En effet, la plupart des microalgues, dont les *Scenedesmaceae*, possèdent un mécanisme de concentration du carbone inorganique autour de l'enzyme Rubisco contenue dans le pyrenoïde (Buono et al., 2016; Cardon, Peredo, Dohnalkova, Gershon, & Bezanilla, 2018; Meyer & Griffiths, 2013; Scherbakov et al., 2017). Il en ressort quelques certitudes, cependant. D'abord, *S. obliquus* peut pousser dans une fourchette de pH 8-10 en consommant du bicarbonate. Il reste à identifier le pH optimal permettant de maximiser la croissance et l'internalisation du carbone dissout. Aussi, à plus grande échelle, l'utilisation du phosphate comme tampon pour des cultures à pH>8 n'est pas une option viable. Il faut donc trouver une nouvelle stratégie, potentiellement un nouveau tampon, permettant un contrôle accru du pH, en réduisant les quantités nécessaires.

C'est dans cette optique qu'a été planifiée l'expérience 5. L'objectif principal était d'évaluer le potentiel d'un autre tampon très utilisé en cultures microbiennes, le tampon de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tampon Tris), pour la culture de *S. obliquus* avec bicarbonate. Le pKa du Tris-HCl est 8,07 (Bernhard, 1956), ce qui en fait un tampon efficace entre pH 8 et 9. Le Tris était déjà utilisé comme tampon dans la culture de microalgues (Arnold et al., 2015; Nguyen, Bui, Pham, Guo, & Ngo, 2016; Solana, Rizza, & Bertucco, 2014). Par contre, comme le phosphate est essentiel à la croissance des algues, il est possible que l'utilisation de phosphate comme tampon favorise la croissance des algues. Il fallait donc évaluer si le changement de tampon allait avoir un impact sur le taux de croissance des algues.

Pour l'expérience 5, à nouveau, quatre conditions ont été comparées. Comme pour les autres expériences, les cultures contrôles étaient autotrophes avec CO₂, la concentration de CO₂ maintenue à 1% dans la chambre de croissance. Les autres conditions initiales de cultures sont détaillées dans le tableau 8.

Tableau 8 Conditions initiales de culture de l'expérience 5

Test	Essai	[NO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	[HCO ₃ ⁻] (mmol·L ⁻¹)	[P] (mmol·L ⁻¹)	[Tris] (mmol·L ⁻¹)	Pouvoir tampon (mmol·L ⁻¹)	pH
Contrôle autotrophe	A	2,94	0	26,0	0	3,49	7,5
	B	2,94	0	26,0	0	3,49	7,6
	C	2,94	0	26,0	0	3,49	7,5
C1P50	A	2,94	11,9	51,1	0	6,98	7,8
	B	2,94	11,9	51,1	0	6,98	7,8
	C	2,94	11,9	51,1	0	6,98	7,8
C1T30	A	2,94	11,9	0,858	30,0	15,0	8,1
	B	2,94	11,9	0,858	30,0	15,0	8,1
	C	2,94	11,9	0,858	30,0	15,0	8,1
C2T30	A	2,94	23,8	0,858	30,0	15,0	8,2
	B	2,94	23,8	0,858	30,0	15,0	8,2
	C	2,94	23,8	0,858	30,0	15,0	8,2

La concentration de tampon a été limitée à 30 mM parce que 15 mM de pouvoir tampon suffisent à contrôler le pH de cultures contenant 11,9 mM de bicarbonate, mais aussi parce que le tampon Tris a un certain niveau de toxicité cellulaire, notamment à cause de sa tendance à perméabiliser les membranes (Weaver et al., 2014). Toutes les cultures ont été inoculées avec 0,004 g·L⁻¹ d'algues en phase exponentielle de croissance.

La figure 14 montre la croissance des différentes cultures au cours de cette expérience. Les cultures contenant le tampon phosphate (C1P50) n'ont pas poussé. Il n'est donc pas possible de comparer les performances de cultures avec les deux tampons dans cette expérience. Pour des fins de comparaison, les taux de croissance des cultures avec tampon phosphate de l'expérience 4 sont illustrés dans la figure 15. Il est toutefois possible d'analyser les résultats des cultures avec Tris et ceux des cultures contrôles. Comme le

montre la figure 14, les cultures avec bicarbonate et CO₂ semblent croître au même rythme en début d'expérience, jusqu'au jour 7. À ce moment, les cultures contenant 11,9 mM de NaHCO₃ ont déjà épuisé leurs ressources en carbone. En effet, selon le dosage du bicarbonate dans les milieux de culture (Figure 15) les cultures ont totalement internalisé le bicarbonate au jour 4. En fait, avec une biomasse de $0,367 \pm 0,036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, au jour 7, ces cultures auraient un bilan carbone de $127,1 \pm 12,5\%$. Il est donc peu probable que leur croissance se soit poursuivie au-delà de $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Les grandes barres d'erreur, aux jours 7 et 10, témoignent de la grande variabilité entre les cultures d'une même condition et des limites de la précision de la méthode de Zhu et Lee pour les masses sèches. La grande variation de masse sèche mesurée entre le jour 7 et le jour 14 montre que la biomasse réelle des cultures C1T30 devait se rapprocher de $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, correspondant à un bilan carbone de 100%.

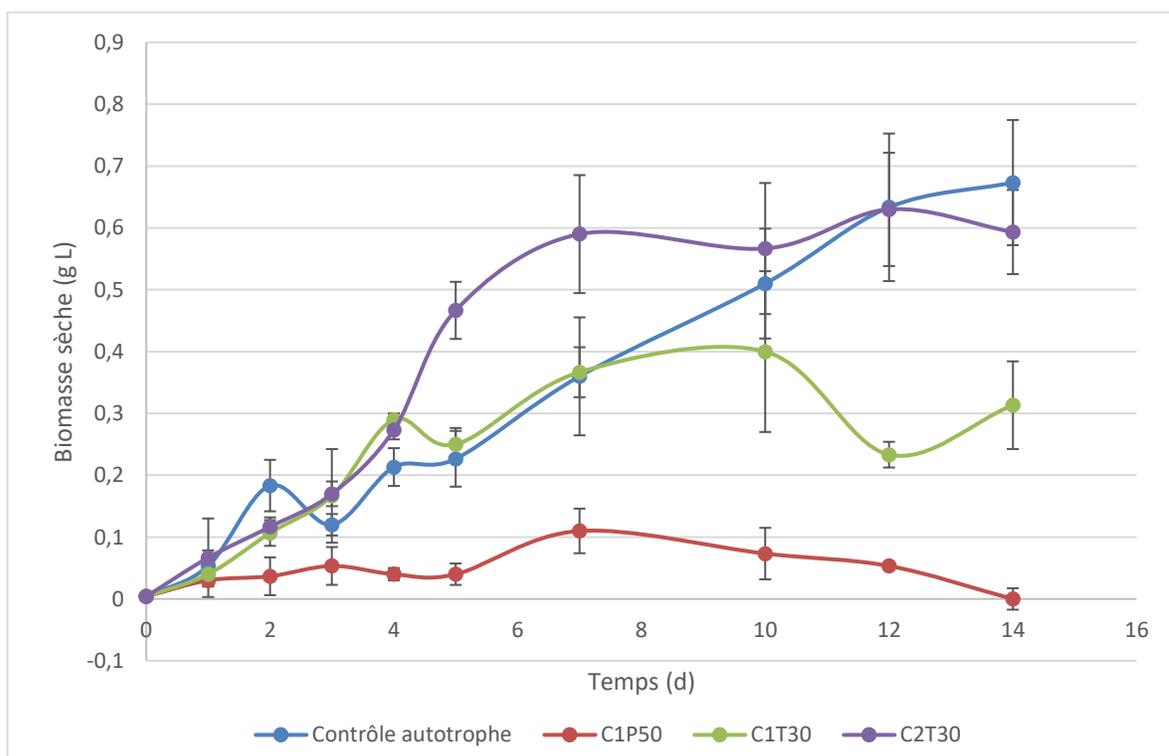


Figure 14 Suivi de la croissance de *S. obliquus* en flacons agités par la méthode des masses sèches de Zhu et Lee

Pour la première fois durant ce projet, des cultures contenant 23,8 mM de NaHCO_3 ont aussi obtenu un bilan carbone de 100%. En effet, la biomasse produite, au jour 7, était de $0,590 \pm 0,095 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et est restée constante jusqu'à la fin de l'expérience. Cela signifie que le tampon Tris a permis la consommation totale du bicarbonate, contrairement au tampon phosphate dans les expériences précédentes. Le suivi du pH montre d'ailleurs que le tampon Tris a permis de contrôler le pH des cultures pour toute la durée de l'expérience. Dans le cas des cultures C1T30, c'était attendu. Par contre, pour les cultures C2T30, un potentiel de 23,8 mM de H^+ serait nécessaire, ce qui aurait dépassé le pouvoir tampon de 30,0 mM de Tris. Avec cette observation, il est difficile de confirmer l'hypothèse du relargage systématique d'une mole d'hydroxyde par mole de bicarbonate consommé. Au jour 2, le pH des cultures contenant du tampon Tris a cru très rapidement parce que le mauvais volume de tampon avait été déposé au départ, à cause d'une erreur de transcription. L'erreur a été corrigée dans la journée, sans affecter le volume final des cultures, pour ne pas fausser les calculs de rendement et biaiser la comparaison avec les autres conditions de culture.

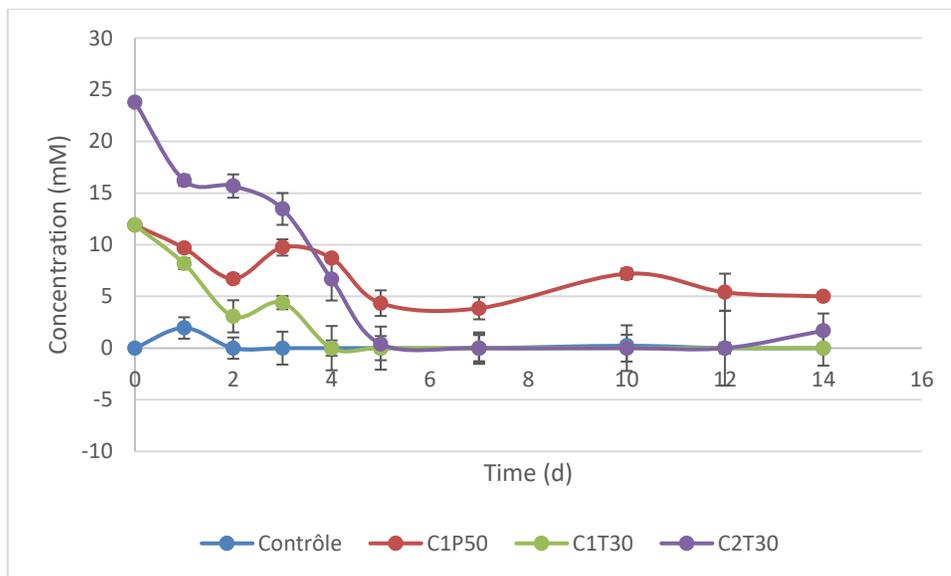


Figure 15 Suivi de la consommation du bicarbonate des cultures de l'expérience 5

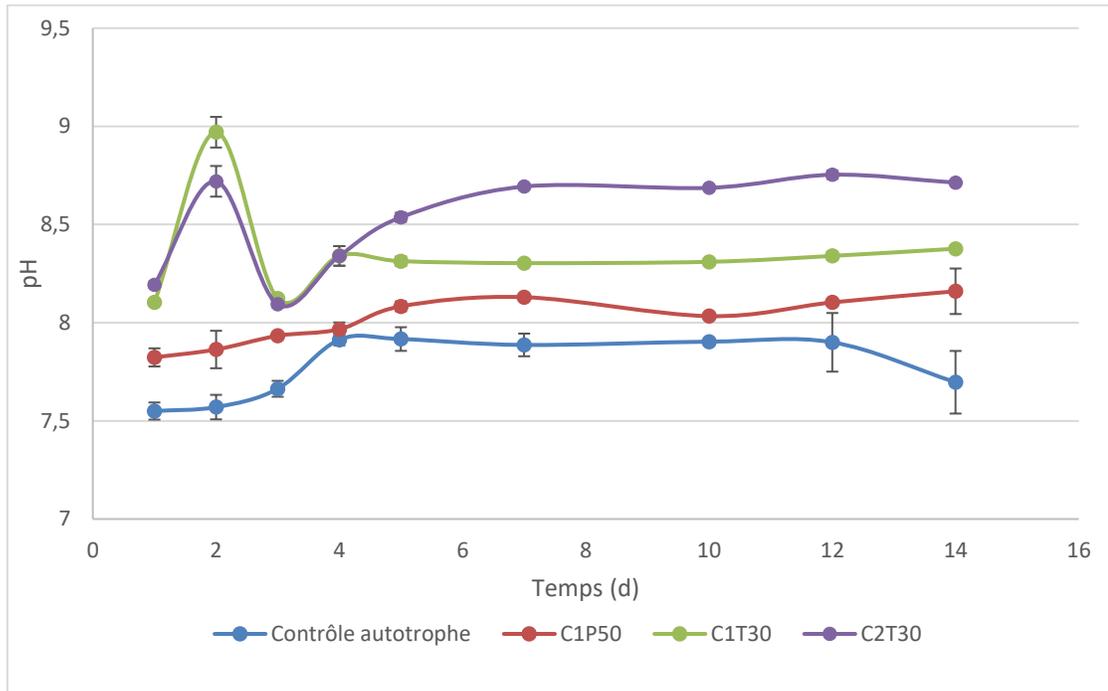


Figure 16 Suivi du pH des cultures de *S. obliquus* lors de l'expérience 5

Pour la première fois aussi au cours de ce projet, les cultures avec bicarbonate ont cru plus rapidement que celles nourries au CO_2 . Il est difficile de dire si le taux de croissance avec $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ est bel et bien plus rapide que celui des cultures avec CO_2 . Par contre, les cultures contenant $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonate de sodium ont atteint leur biomasse maximale en sept jours, pour un taux de croissance moyen de $0,086 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, alors que les cultures contrôle ont pris 12 jours pour atteindre cette valeur. Toutefois, lorsque comparé aux valeurs rapportées, dans la littérature, ce taux de croissance se situe dans les valeurs attendues. Aussi, lorsqu'on compare les taux de croissance de cultures avec bicarbonate de sodium obtenus lors des expériences 1.3 et 3, on remarque que les cultures 4 de l'expérience 3 présentent le taux de croissance le plus grand. Toutefois, il est difficile de dire si cette différence est significative puisque la variance de chacun des systèmes est assez grande (Figure 16). Le type de tampon et la quantité employée ne semblent donc pas avoir d'impact sur le taux de croissance. Bien que le phosphate soit un élément essentiel à la croissance des algues, il n'est pas limitant dans le BBM 1X. C'est pourquoi, le

remplacement du phosphate par le Tris, n'a pas occasionné de baisse de productivité. Le tampon ne sert donc qu'à permettre l'internalisation totale du bicarbonate.

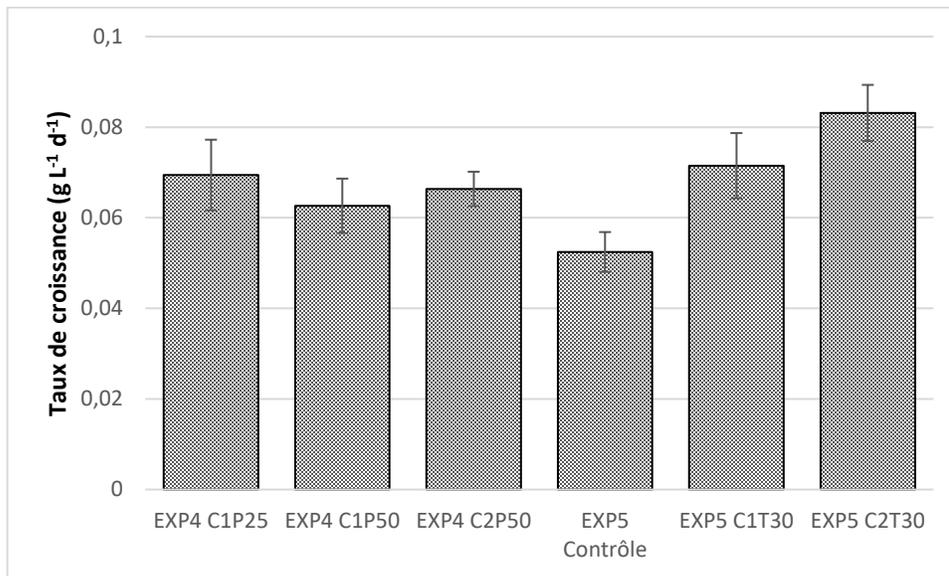


Figure 17 Taux de croissance moyen en phase exponentielle lors des expériences 4 et 5

À la lumière de cette deuxième série d'expériences, il apparaît que de fixer le pH initial des cultures à 8 était primordial pour réaliser une captation totale du carbone dissout. Pour ce faire, le Tris représente la meilleure option en comparaison du phosphate. Il est aussi un tampon adéquat pour la culture de *S. obliquus* avec du bicarbonate puisqu'il permet de bien contrôler le pH des cultures contenant jusqu'à 23,8 mM NaHCO₃ avec des concentrations raisonnables. Toutefois, le Tris, comme le phosphate, ne pourrait représenter une option viable pour contrôler le pH de cultures à grande échelle. D'abord, les concentrations nécessaires pour des cultures à plus de 119 mM NaHCO₃ seraient néfastes pour les algues. De plus, le Tris coûte environ 100\$/kg, ce qui augmenterait substantiellement les coûts de production de microalgues. Par contre, le Tris pourrait servir à établir le pH de départ dans les cultures de microalgues contenant du bicarbonate de sodium plus efficacement que le phosphate, en fournissant un petit tampon qui serait régénéré par des ajouts d'acide en continu.

2.3.1 Croissance des algues à échelle pilote

La dernière expérience de culture a été réalisée dans quatre photobioréacteurs de 27L, dans le laboratoire de mise à l'échelle de la Station aquicole de Pointe-au-Père. Le but était d'appliquer les connaissances acquises lors des premières expériences en flacons pour étudier la croissance de *S. obliquus* avec le bicarbonate, son taux de captation du carbone et, si possible, confirmer la stœchiométrie de l'internalisation de HCO_3^- . Pour ce faire, deux systèmes ont été utilisés comme contrôles, dans lesquels des algues étaient cultivées avec un bullage d'air et de CO_2 . L'apport de CO_2 gazeux était régi par une boucle de contrôle développée lors d'expériences précédentes. Le CO_2 agit comme acide pour réguler le pH de ces systèmes. La demande en CO_2 est donc régulée par l'augmentation du pH causée par la consommation de nitrate. Les deux systèmes contenant les algues croissant avec le bicarbonate, quant à eux, ne devaient avoir aucun apport de CO_2 . Ainsi, le maintien des algues en suspension se faisait par bullage d'azote pur. Pour le maintien du pH, la boucle de contrôle de l'apport de CO_2 a été modifiée pour plutôt permettre des ajouts d'acide chlorhydrique (HCl) 1M. L'acide était acheminé aux photobioréacteurs par une pompe péristaltique activée lorsque le pH des systèmes dépassait 8,3. Le pH initial des systèmes au bicarbonate a été fixé à 8,1 avec un tampon Tris 30 mM. L'étude de la consommation de carbone s'est faite à l'aide de la méthode de dosage par spectroscopie FT-IR dont le développement et la validation sont relatés au Chapitre 3. L'éclairage des cultures était constant ($123,0\text{-}136,7\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et le milieu de culture était du BBM 2X (4X NO_3^-).

Tableau 9 Conditions initiales de culture de l'expérience de mise à l'échelle

Test	$[\text{NO}_3^-]$ (mmol·L ⁻¹)	$[\text{HCO}_3^-]$ (mmol·L ⁻¹)	[P] (mmol·L ⁻¹)	[Tris] (mmol·L ⁻¹)	Pouvoir tampon (mmol·L ⁻¹)	pH	Éclairage ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
PBR1	11,76	178,6	1,72	30,0	15,0	8,1	133,3
PBR2	11,76	178,6	1,72	30,0	15,0	8,1	126,5
PBR3	11,76	0	1,72	0	0,858	7,0	130,0
PBR4	11,76	0	1,72	0	0,858	6,8	130,7

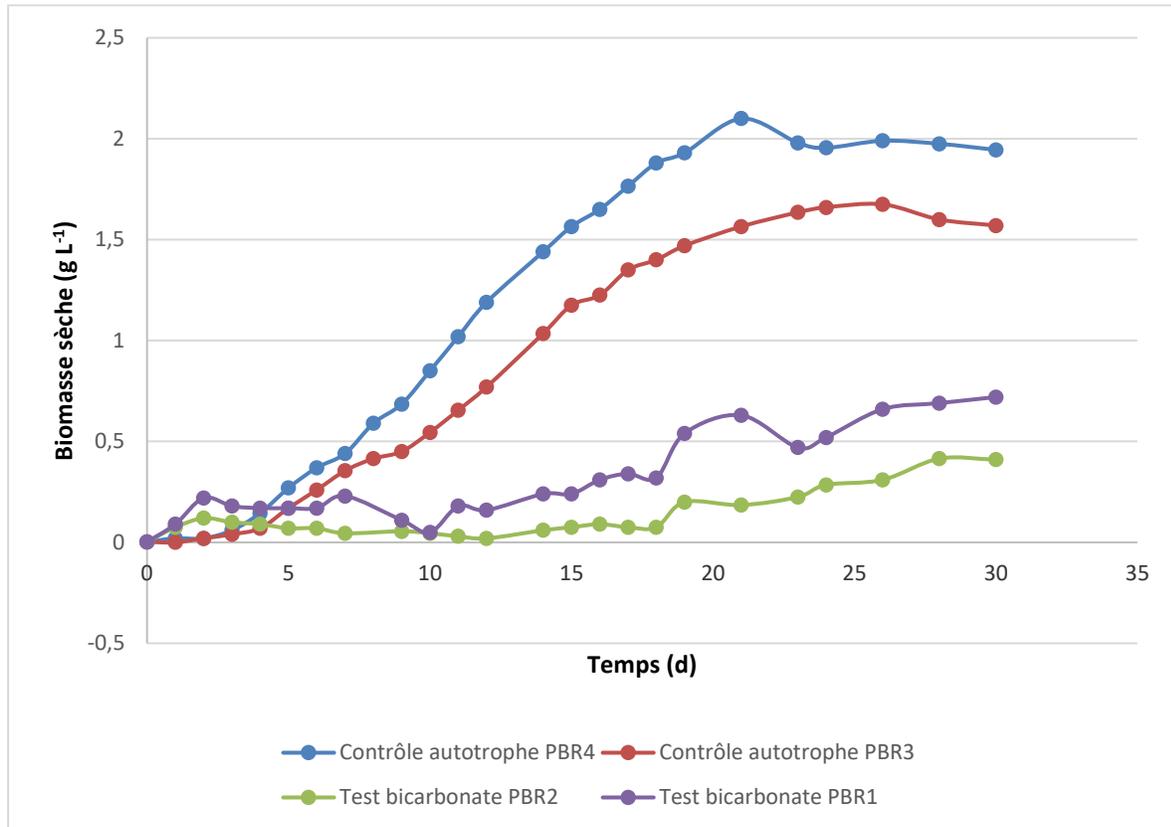


Figure 18 Suivi de la croissance des cultures de *S. obliquus*, en PBR de 27L, par la méthode de masse sèche de Zhu et Lee

L'expérience a été réalisée en duplicata et des différences assez importantes ont été notées au cours de la phase de croissance entre les systèmes de mêmes conditions. En effet, la croissance dans les photobioréacteurs 2 et 3 par rapport à celle dans les photobioréacteurs 1 et 4, respectivement, a été retardée en début de croissance (Figures 18-19). Ces disparités peuvent être attribuables à l'intensité lumineuse légèrement différente d'un photobioréacteur à l'autre (tableau 9) et aux fluctuations dans les conditions de culture engendrée par l'équipement. En effet, certaines sondes à pH semblaient avoir un biais de lecture qu'il a fallu rectifier après quelques jours de culture. Aussi, la sonde à pH du photobioréacteur 1 semblait réagir plus lentement que celle du photobioréacteur 2, ce qui augmentait la demande en acide, au point d'en manquer vers la fin de l'expérience (Figure 21).

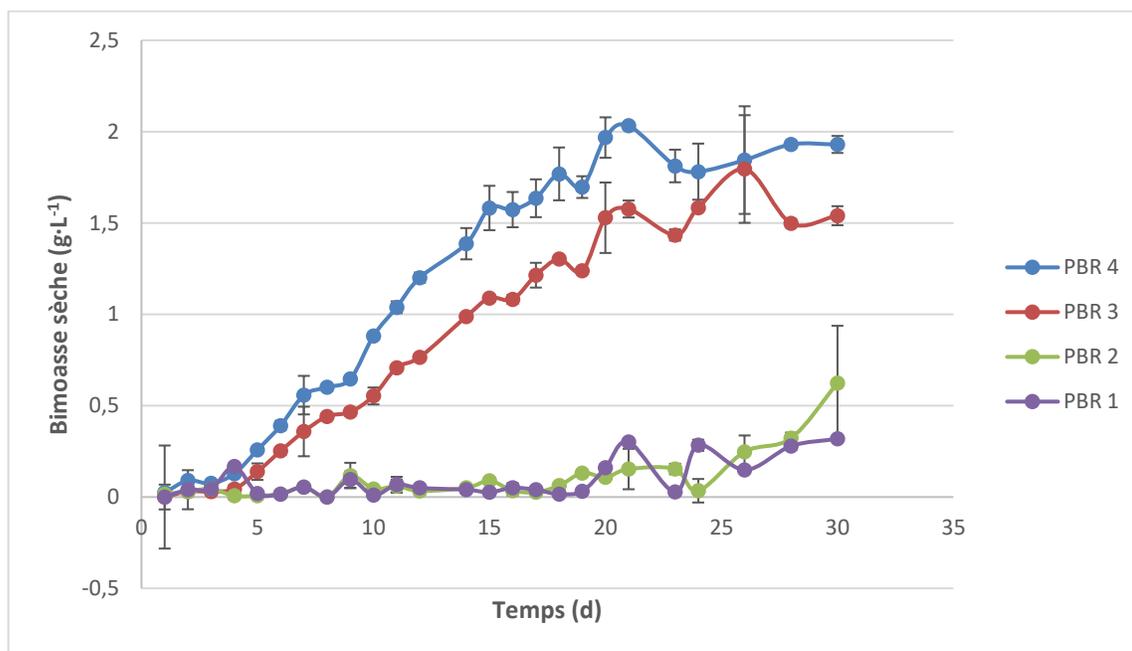


Figure 19 Suivi de la croissance de cultures de *S. obliquus*, en PBR de 27L, par la méthode des masses sèches de Loyola-Vargas (2006)

Cependant, les disparités les plus importantes apparaissent à la comparaison des résultats de culture avec HCO_3^- et les cultures contrôles. La figure 19 montre la très grande différence de croissance entre les systèmes au bicarbonate et au CO_2 . Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces résultats. D'abord, la période croissance des algues avec HCO_3^- n'a duré que 22 jours contre 30 avec le CO_2 . En effet, les premières cultures n'ont pas survécu et il a fallu réensemencer les photobioréacteurs après une semaine. Au départ, le pH dans les photobioréacteurs 1 et 2 était contrôlé par l'ajout d'acide sulfurique et il se pourrait que *S. obliquus* ne tolère pas les trop grandes concentrations de sulfate. Toutefois, étant donnée la faible productivité, en termes de biomasse, des cultures, il serait surprenant que la durée de l'expérience ait joué un rôle aussi majeur. En effet, la figure 23 montre que la majorité du carbone disponible avait déjà été consommé avant la récolte. L'impact du réensemencement pourrait être autre toutefois. La deuxième inoculation a été réalisée avec des algues provenant du PBR 4, donc adaptées à la consommation de CO_2 gazeux contrairement aux algues d'origines qui avaient été cultivées en flacons agités avec

11,9 mM HCO_3^- . L'acclimatation des algues pourrait être à l'origine de la lente croissance, voire le déclin, observée durant quelques jours. Cette hypothèse est appuyée par une diminution de la couleur des photobioréacteurs 1 et 2 entre les jours 8 et 12 (Figure 20).



Figure 20 Évolution de l'aspect visuel des PBR 1 et 2 entre les jours 8 et 12

La nature du contrôle actif du pH dans le cas du bicarbonate a aussi une influence. Le contrôle se fait par l'ajout d'acide et, dans le cas de cultures de 27 L, cela peut représenter une dilution importante à la fin de l'expérience. Effectivement, l'ajout d'acide trop concentré en un point ferait chuter le pH trop drastiquement, endommageant les cellules localement et favorisant le dégazage du bicarbonate. Alors, considérant l'hypothèse du ratio molaire 1:1 hydroxyde généré dans les cellules: bicarbonate internalisé, il fallait près de 5 L de HCl 1M par système. Cette concentration reste plus élevée que l'idéal. En effet, étant donné que l'entrée d'acide se faisait toujours au même point et que le brassage n'était assuré que par le bullage, l'uniformisation des cultures était plutôt lente, créant des zones de pH plus bas, stressant les algues et favorisant le dégazage local ponctuel du carbone dissout.

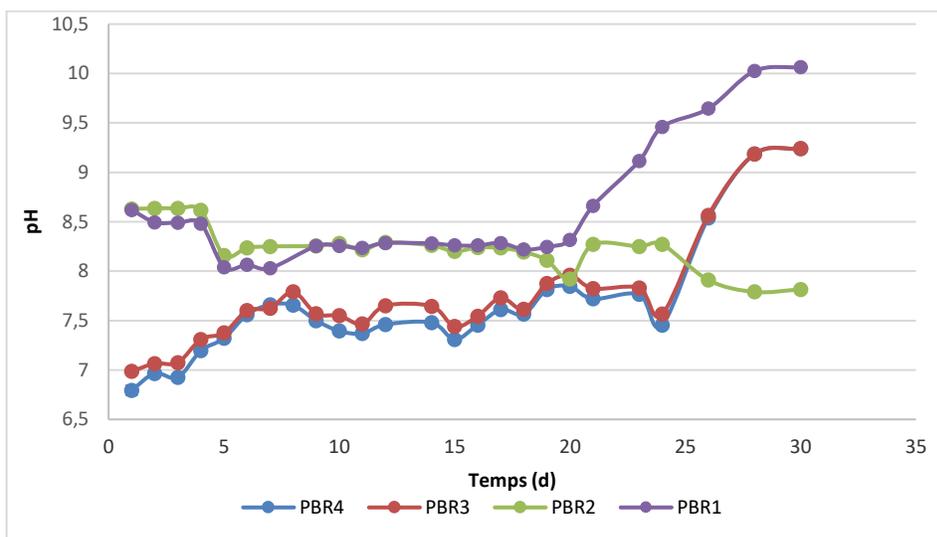


Figure 21 Suivi du pH dans les photobioréacteurs

Les algues poussant avec le bicarbonate s'agglutinaient, durant la phase de croissance, formant des amas trop denses qui précipitaient et des biofilms sur la paroi des photobioréacteurs contrairement aux algues contrôles qui restaient en suspension homogène. Cette floculation est la cause majeure de la faible croissance mesurée dans les photobioréacteurs tests. En effet, lors de l'échantillonnage, seule la biomasse en suspension était récoltée, omettant ainsi toute la biomasse produite dans les biofilms et celle qui avait précipité. De plus, comme la plupart de la croissance avait lieu dans les biofilms, leur expansion réduisait significativement l'apport de lumière aux algues en suspension. Bien que la figure 22 ne rende pas tout à fait justice à la réalité, les images montrent, tout de même, l'évolution du biofilm du PBR 2 du jour 15 au jour 16. On peut y voir que le biofilm est plus dense sur le pourtour faisant face à la lumière, captant la plupart de l'éclairage direct. De cette façon, la seule lumière pénétrant au cœur du photobioréacteur provenait de la réflexion. L'intensité lumineuse n'avait été mesurée que face à la lumière. Ainsi, il n'est possible que d'estimer l'intensité réelle reçue par les algues, mais il est clair qu'elle était beaucoup plus faible.

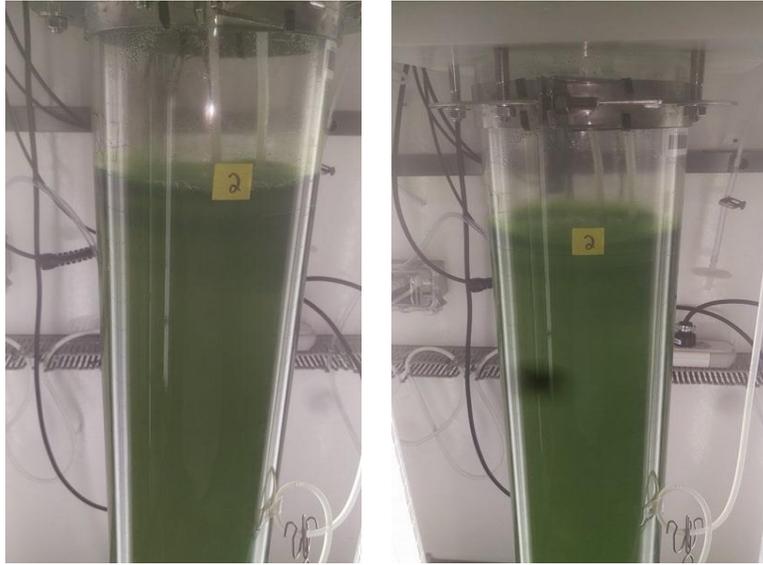


Figure 22 Évolution du biofilm entre les jours 15 et 16

L'auto-floculation est généralement induite, chez *S. obliquus*, par un stress environnemental comme la privation d'azote, les changements de pH et les variations d'oxygène dissout et de certains ions métalliques (Ummalya, Mathew, Pandey, & Sukumaran, 2016). La privation d'azote, le pH et les ions métalliques ont été rejetés comme explications, puisqu'il restait suffisamment de nitrate, lors de la floculation, et que le pH et la concentration des différents ions métalliques étaient les mêmes que durant les expériences en flacons agités. Aucune floculation majeure n'avait été observée alors.

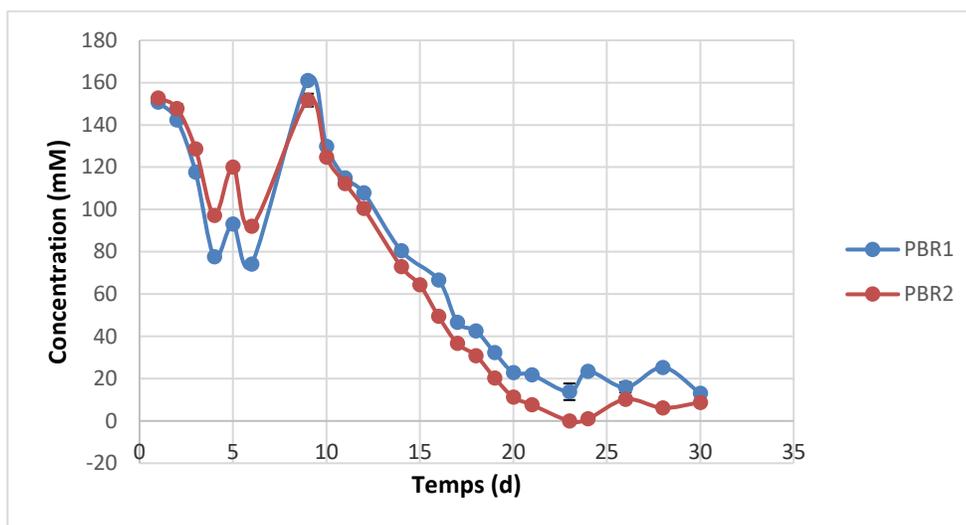


Figure 23 Suivi de la consommation du bicarbonate par la microalgue *S. obliquus* dans des photobioréacteurs de 27 L

Deux hypothèses sont donc envisagées pour expliquer cette coagulation inattendue des algues. D'abord, le bullage à l'azote force l'évacuation de tous les gaz dissous dans le milieu. Lors d'expériences corolaires, il a été observé qu'un bullage de $3 \text{ mL N}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ éliminait tout l'oxygène dissout d'un photobioréacteur de 5 L en quelques heures, la production photosynthétique d'oxygène n'étant pas suffisante pour compenser le dégazage. Il n'est pas possible d'affirmer que ça ait été le cas dans cette expérience puisque les sondes à oxygène ne fonctionnaient pas. Cependant, le débit du bullage utilisé pour le maintien des algues en suspension était de $10\text{-}12 \text{ mL N}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ce qui laisse supposer que le même phénomène ait pu se reproduire ici. La fluctuation de concentration en oxygène n'affecte pas seulement l'agglutination des algues. Il est essentiel au fonctionnement de l'enzyme Rubisco qui joue un rôle clé dans la métabolisation du carbone et la croissance des algues (Badger et al., 1998; Raso, van Genugten, Vermuë, & Wijffels, 2012). Dans les expériences en flacons agités, l'oxygène accumulé et le CO_2 dissout était évacués par bullage une seule fois par jour, ce qui laissait le temps à l'oxygène photosynthétique de rétablir l'équilibre. C'est probablement pourquoi, le bullage à l'azote n'a pas causé problème lors des expériences en flacons.

Il est aussi envisageable que l'utilisation de bicarbonate comme seule source de carbone engendre la production excessive d'exopolysaccharides (EPS) qui sont responsables de l'adhérence de la surface des cellules (Guo et al., 2013). En effet, la stimulation de l'accumulation intracellulaire de lipides et d'amidon chez certaines microalgues par l'ajout de bicarbonate est bien documentée (R. D. Gardner, Lohman, Gerlach, Cooksey, & Peyton, 2013a; Lohman et al., 2013), mais aucune étude n'a été publiée mettant en relation l'impact de la source de carbone sur la production (extracellulaire) d'EPS. Toutefois, des facteurs comme la luminosité, le brassage et la composition du milieu de culture ont un impact sur la production d'EPS chez les algues (Barranguet et al., 2005; Dayananda, Sarada, Usha Rani, Shamala, & Ravishankar, 2007). Il est aussi rapporté que la source de carbone et le ratio C/N influent sur la production d'EPS dans des cultures anaérobiques contenant un consortium de microorganismes (Miqueleto, Dolosic, Pozzi, Foresti, & Zaiat, 2010).

Cette expérience n'a pas permis de montrer de gain de croissance pour *S. obliquus*, avec le bicarbonate de sodium comme seule source de carbone, à plus grande échelle. Il s'agissait d'une première tentative d'utilisation de NaHCO_3 dans les systèmes de la Station aquicole et plusieurs ajustements devront être faits avant de retenter l'expérience. En effet, ces systèmes, dans leur configuration originale, ne sont pas assez flexibles pour permettre une bonne culture avec une source de carbone inorganique autre que le CO_2 . D'abord, le brassage du milieu par simple bullage ne suffit pas à garder les algues en suspension pour une culture en cuvée simple. Il faudrait ajouter un agitateur rotatif ou, du moins, plusieurs sorties d'air à la base des photobioréacteurs. Un meilleur brassage permettrait de garder les algues en suspension et favoriserait l'homogénéisation du milieu, limitant le dégazage et la mortalité au point d'entrée de l'acide. De plus, le bullage à l'azote pur nuit à la croissance et devrait être remplacé par un mélange gazeux spécifique, contenant seulement de l'azote et de l'oxygène.

2.4 RETOUR SUR LES RESULTATS ET TRAVAUX FUTURS

Ces expériences ont permis d'identifier de meilleures stratégies quant à la culture de *Scenedesmus obliquus* sur bicarbonate de sodium. En effet, l'utilisation du tampon Tris a permis d'optimiser la capture du bicarbonate tout en limitant les grandes variations de pH. Lors de l'utilisation de concentrations importantes de bicarbonate, toutefois, l'utilisation d'un tampon ne représente pas une stratégie viable. Il servira à fixer le pH initial des cultures pour limiter le dégazage, mais devra être régénéré par des ajouts d'acide périodiques ou en continu.

À la lumière de ces expériences, il est possible de conclure que le bicarbonate de sodium peut être utilisé comme source de carbone, unique ou combinée, pour cultiver la microalgue *S. obliquus*. Les résultats ne sont, cependant, pas suffisamment clairs quant au gain de productivité escompté découlant de son utilisation à petite, comme à plus grande échelle. Le potentiel du bicarbonate comme source de carbone pour des productions à grande échelle reste toujours incertain. Pour espérer tirer des conclusions solides, de plus amples expérimentations seraient nécessaires en apportant plusieurs ajustements au montage expérimental, notamment en utilisant des systèmes de culture plus adéquats et un mélange de gaz contenant un peu d'oxygène.

Aussi, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'utilisation du bicarbonate comme source de carbone unique sur la composition de *S. obliquus*. En effet, la couleur, la grosseur et l'agrégation des cellules croissant avec du bicarbonate étaient différentes de celles croissant avec du CO₂. Des travaux ont déjà porté sur la fraction lipidique et l'amidon, mais il serait intéressant de voir si la production d'exopolymères ou de pigments d'intérêt industriel est stimulée par l'utilisation de sels de bicarbonate.

CHAPITRE 3
DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DES IONS
BICARBONATES, CARBONATES ET ORTHOPHOSPHATES EN SOLUTIONS
AQUEUSES *IN SITU* ET EN TEMPS REEL PAR SPECTROSCOPIE ATR-FTIR

3.1 RESUME EN FRANÇAIS

Les sels de bicarbonate sont utilisés dans divers procédés industriels et pourraient servir de source de carbone alternative dans les bioprocédés photosynthétiques. Les procédés industriels requièrent un suivi et un contrôle efficaces pour optimiser leur productivité. À cette fin, une méthode de dosage simple, rapide et *in situ* a été développée pour le bicarbonate, le carbonate et les ions phosphate en spectroscopie ATR FT-IR combinée à une analyse des moindres carrés partiels (PLS). Le modèle multivarié en résultant permet le dosage simultané du carbone inorganique dissout et des ions orthophosphates en solution aqueuses. Les courbes de calibration sont linéaires sur une gamme de concentrations de 150mM ($R^2 > 0.9990$). Les limites de quantification pour ces ions se situent entre 6.9 et 17.2 mM. Le modèle multivarié a été utilisé dans le cadre d'une expérience de culture d'une microalgue, *Scenedesmus obliquus*, utilisant le bicarbonate de sodium comme source de carbone.

Development and validation of an *in situ* and real-time quantification method for bicarbonate, carbonate and orthophosphate ions by ATR FT-IR spectroscopy in aqueous solutions

Pierre-Olivier Morisset¹, Jonathan Gagnon², Réjean Tremblay³, Jean-Sébastien Deschênes^{1*}

1. Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

(Tel: +1-418-723-1986 Ext. 1997; e-mail: jean-sebastien_deschenes@uqar.ca)

2. Département de Biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski, 300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

3. Institut des sciences de la mer, Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

Abstract

Bicarbonate salts are used in various industrial processes and could even serve as an alternative source of carbon in bioprocesses involving photosynthetic organisms. Industrial productions require efficient monitoring and control to ensure that their output will meet target specifications. To this end, a simple and rapid *in situ* quantification method was developed for bicarbonate, carbonate and phosphate ions using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR FT-IR) spectroscopy combined with partial least squares (PLS). The resulting multivariate approach allows the simultaneous determination of inorganic carbon and orthophosphate ions concentrations in aqueous solutions ($R^2 > 0.98$, root-mean-square-errors of the cross validation RMSECV $< 3.3\%$). Validation of the method was achieved through replicability and repeatability tests. Univariate calibration graphs are linear over a concentration range of 150 mM ($R^2 > 0.9990$). Quantification limits for those ions were in the 6.9-17.2 mM range, as determined from univariate models. The multivariate model was successfully applied to a microalgal culture of *Scenedesmus obliquus* using bicarbonate as the carbon source and a phosphate buffer to maintain the pH. This analytical technique did not require extraction or chemical treatment and no sample preparation is needed. The results demonstrate the potential of ATR FT-IR method to study inorganic carbon and phosphate species during a bioprocess.

Keywords

In situ quantification method; inorganic carbon ions; orthophosphate ions; ATR FT-IR spectroscopy; microalgae; *Scenedesmus obliquus*

1. INTRODUCTION

Bicarbonate ions are useful in numerous fields and are now seen as a promising source of carbon as an alternative to CO₂ for bioprocesses involving photosynthetic organisms.(Chi, O'Fallon, & Chen, 2011)⁻⁵ To maintain an efficient usage of bicarbonate as a raw material in industrial processes, continuous monitoring of its concentration is needed using a fast, online and *in situ* quantification method. As carbonate and bicarbonate ions coexist in varying proportions as influenced by pH (which may vary during process operation), and carbon bioavailability depends on its form, the analytical method should tolerate important pH variations. However, most available quantification techniques for inorganic carbon in solution such as titration,(Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2014; Pratt & Yuan, 2009) mass spectrometry,(Tsikas & Chobanyan-Jürgens, 2010) induced coupled plasma (ICP)(Maestre et al., 2003) and ion exchange chromatography (IEX) coupled to a gas cell,(Hall & Aller, 1992; Monser et al., 2004; Pancharee et al., 2012) are not suitable for the real-time control and optimization of bioprocesses, as those methods involve the extraction of CO₂ from the aqueous matrix by addition of acids. On their part, infrared spectroscopic methods have also been reported to determine inorganic carbon concentrations in solid matrices and in aqueous solutions.(Baldassarre & Barth, 2014; Garand et al., 2010b; Joshi et al., 2013) In the latter case, bicarbonate quantification is usually quite sensitive to pH variations due to deprotonation occurring at pH>9.

Phosphate ions are also very important nutrients for photosynthetic organisms playing a key role in many metabolic functions. IEX, ICP and ³¹P NMR techniques are currently used as analytical methods of phosphorus atoms. For instance, the major drawbacks of these techniques are the sample preparation that is time consuming and the lack of differentiation in phosphorus environments due to the rapid equilibrium between the phosphate species. Raman spectroscopy has been successfully applied for *in situ*

quantification, but necessitates a complex and expensive analytical set-up.(Beuvier et al., 2014b; Rudolph, Irmer, & Königsberger, 2008; Sauer, Zunic, Durig, & Wuthier, 1994)

Photoautotrophic bacteria and microalgae are becoming a promising option for reducing industrial CO₂ emissions and atmospheric concentration as they have the ability to use most inorganic carbon species and transform them into valuable compounds.(Bastidas-Oyanedel, Bonk, Thomsen, & Schmidt, 2015; Bharathiraja et al., 2015; Cuellar-Bermudez et al., 2015; Viêgas et al., 2015) Carbonate salts can even be obtained from CO₂-rich industrial effluents, facilitating their transport, storage and delivery compared to gaseous CO₂. Their use in certain bioprocesses (e.g. microalgal cultures) often results in an increased carbon consumption,(R. D. Gardner et al., 2013a; Radmer & Ollinger, 1980) due to their higher solubility and bioavailability. The *in situ* quantification of nutrient availability in bioprocesses is often necessary to maintain the process efficiency.

From an analytical point of view, *in situ* analyses do not require sample preparation and are non-destructive, more time efficient and cost-effective. Spectroscopic methods can be used to identify several species with a single acquisition and distinguish between those species even if they are in equilibrium. However, their absorption bands can overlap with each other (as is the case with phosphate, bicarbonate and carbonate ions in this study) or even with the solvent which may limit the use of vibrational spectroscopy in quantification. Moreover, IR spectroscopy even allows the rapid detection of IR-inactive ions from their impact on water vibrations in the solvation shell (Rauh & Mizaikoff, 2016). Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR FT-IR) spectroscopy can be combined with mathematical and analytical methods like partial least squares (PLS) to separate unwanted interferences in the data. ATR FT-IR spectroscopy can be applied to solutions and solids to quantify inorganic and organic compounds in complex media (Bhardwaj, Dang, & Nguyen, 2006; J. Girard et al., 2013; Khoshmanesh, Cook, & Wood, 2012). Moreover, our previous work on saccharide analyses demonstrated that the presence of living microalgae in the samples does not interfere with ATR FT-IR spectroscopy (J.

Girard et al., 2013). Therefore, such a method could be used to monitor accurately the bioavailability of bicarbonate throughout the microalgal growth process.

This study presents the development of an ATR FT-IR spectroscopic method for the simultaneous quantification of carbonate (bicarbonate and carbonate forms) and phosphate (dihydrogenophosphate and hydrogenophosphate forms) ions in a complex aqueous media that is applied to a microalgal culture for the first time. Our aim in this work is to be able to monitor and control the composition of major nutrients in a microalgal growth medium over a wide concentration range in order to influence and optimize the biological production.

2. Experimental section

2.1. Materials

All chemicals (ACS grade) were bought from Sigma-Aldrich and were used as received. Deionized water was obtained using a Nanopure Diamond system (model D11931) from Barnstead. Carbon dioxide and nitrogen were purchased from Air Liquide. *Scenedesmus obliquus* was obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Canada (CPCC 5). The pH of the cultures was measured *in situ* using pH probes (InPro 3253) from Mettler Toledo and confirmed with benchtop pH-meter (Five Easy Plus, Mettler Toledo).

2.2. FT-IR measurements

FT-IR absorption spectra were acquired with a Bruker Matrix MF spectrometer equipped with an attenuated total reflectance (ATR) diamond probe and a 1.5 m AgX optic fiber. All spectra were measured at room temperature between 4000 and 600 cm^{-1} using a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans. Deionized water was used as background and to clean the diamond probe between samples. The data were treated with the OPUS 6.5 software which includes a quantification mode using a PLS algorithm.

2.2.1. Univariate calibration models

A calibration curve was realized for each analyte using 7 standard aqueous solutions of pure NaHCO_3 , Na_2CO_3 , KH_2PO_4 and K_2HPO_4 (25, 30, 40, 50, 75, 100 and 150 mM). A second calibration curve was done for each analyte to assess linearity using 11 standard solutions from 25 mM to 500 mM. All measurements were achieved in triplicate of independent samples. Detection and quantification limits of the method were calculated using a reported procedure (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2014) on 10 measurements of 30 mM aqueous solutions of each analyte. Repeatability and replicability tests were also done separately for each analyte in standards containing microalgae that were centrifuged ($3400 \times g$, 6 min) and stirred to determine the impact of microalgae on the readings. Repeatability was calculated using ten replicates of standard solutions that were mixed with artificial microalgae suspensions and replicability was assessed by doing ten replicates of the same spiked artificial samples 24 h later. Artificial microalgae suspension consisted of a *Scenedesmus obliquus* culture (0.5 g L^{-1} , 4 mL) that was washed twice to remove any dissolved compounds and brought back to 4 mL with deionized water.

Spiking recovery was also measured on four analytes. Artificial microalgae samples (6 mL) were spiked with a 500 mM standard solution (0.5 mL). Ten measurements were done on those samples and 5 mL of those samples were spiked with a 300 mM standard solution (0.5 mL). All univariate measurements for bicarbonate and carbonate were taken from the integration of absorption bands between 1751 and 1115 cm^{-1} and 1771 - 1026 cm^{-1} , respectively, corresponding to the C-O stretching (Garand et al., 2010a; Rudolph, Fischer, & Irmer, 2006b; Rudolph et al., 2008). The integration range for H_2PO_4^- was 1116 - 1001 cm^{-1} , corresponding to the ν_3 mode of vibration of the P-O bonds. The integration range (1194 - 940 cm^{-1}) for HPO_4^- included both ν_1 and ν_3 bands (Gadaleta, Paschalis, Betts, Mendelsohn, & Boskey, 1996).

2.2.2. Multivariate calibration model

Triplicate spectra of 222 aqueous independent standard solutions with concentrations varying from 0 to 250 mM for each analyte were made from pure mother solutions of 500 mM concentrations for the four anions. Theoretical concentrations of standard solutions were calculated from the pH value and using the Henderson-Hasselbalch equation (Bernhard, 1956; Pratt & Yuan, 2009). The partial least square (PLS-1) regression model was built with the IR spectra of standard solutions.

Repeatability and replicability tests were realized on an artificial microalgae culture containing 1×10^6 cells mL^{-1} , 89.05 mM HCO_3^- , 10.955 mM CO_3^{2-} , 0.6 mM H_2PO_4^- and 100.97 mM HPO_4^{2-} in Bold's Basal Medium (BBM). Both statistical tests were calculated using ten replicates of this artificial sample. And, as for univariate models, the replicability test was done 24 h after repeatability analyses.

2.3. Quantification in microalgae cultures

The multivariate method was applied to the microalgae cultures over a cycle of 21 days to assess nutrient consumption throughout the growth phases. For this experiment, two 27 L cylindrical photobioreactors (PBRs) were inoculated with an axenic culture of *Scenedesmus obliquus* at a starting microalgae concentration (day 0) of 0.02 g L^{-1} . Prior to inoculation, the cultures were kept in heat-sterilized ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) BBM at an adjusted pH of 6.8, and maintained in exponential growth phase in Erlenmeyer flasks ($22.5 \text{ }^\circ\text{C}$, continuous orbital agitation of 120 rpm, and continuous illumination of $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) in a Multitron II incubator (Infors-HT, Switzerland). The initial culture medium was BBM with addition of $182 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Microalgae grew on sodium bicarbonate as their sole source of carbon. The initial concentration of bicarbonate was 15 g L^{-1} and a Tris buffer (15 mM Tris-HCl, 15 mM Tris-Base) was added to maintain pH between 8.0 and 8.5 at the beginning of the culture. The pH was then kept within this interval by automated additions of 1 M HCl during the culture growth. PBRs were kept at 21°C under a constant illumination (24 hours a day, 7 days a week) with a light intensity of $123.0\text{-}136.7 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, as measured at the external surface of the PBRs. The systems were sampled daily from day 1 to 14, excepted for day 5.

Dry weights and dissolved solids content were analysed by sampling 130 mL of culture. A volume of 110 mL was used for dry weight measurements by two different methods. Two 45 mL samples were freeze dried before weighing and a 20 mL aliquot was determined according to Zhu and Lee (C. J. Zhu & Lee, 1997). The other 20 mL were destined for ion analyses. ATR FT-IR spectra were acquired in triplicate samples (2 mL) before and after centrifugation. Starting from day 10, as concentrations were nearing the quantification limit, aliquots were spiked with a 500 mM HCO_3^- standard solution to reach a bicarbonate concentration over 45 mM. Nitrate concentration was measured using the colorimetric method described by Benavides *et al* (Benavides et al., 2015).

3. Results and discussion

3.1. Univariate models for individual monitoring of carbonates and phosphates

IR absorption bands of HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} are overlapped (Figure 24) and, according to our knowledge, no quantification method has been reported for these analytes using ATR FT-IR in aqueous solutions. Therefore, a univariate quantification method must be first developed and validated for all four species separately. As shown in Figure 24, the strong IR-active carbonate absorption band around 1380-1390 cm^{-1} , attributable to asymmetric in-plane stretch, was overlapped with the asymmetric stretching of bicarbonate at 1362 cm^{-1} (Nickolov, Ozcan, & Miller, 2003). Those two bands are also slightly overlapped by a band at 1156 cm^{-1} and a broad shoulder at 1213 cm^{-1} attributable to the stretching of the P-O and P-O-H bonds of dihydrogenophosphate ions, respectively. (Klahn et al., 2004; Vandevondele, Tröster, Tavan, & Mathias, 2012) Figure 25 displays the calibration curves of the four analytes realized in water with concentrations up to 150 mM showing an excellent linearity ($R^2 > 0.9990$). The method was then validated by measuring the limit of linearity with a second calibration curve using a higher concentration limit of 500 mM. However, the linearity limit should approach the solubility limit of each ion since FT-IR spectroscopy has been used to quantify carbonates in solid mixtures. (Joshi et al., 2013) The highest limit of quantification was obtained for

bicarbonate (17.2 mM), whereas the lowest limit was for hydrogenophosphate (6.9 mM) (Table 1). The fidelity was also determined through replicability and repeatability tests (Table 2). These tests also revealed that microalgae cells do not affect measurements as there was no significant difference between stirred and centrifuged samples, as confirmed from *t*-tests. The highest *t*₀ value (3.56) was obtained for the carbonate ion repeatability test where the fixed significance level was 3.81 for a 95% confidence interval. No interference from the matrix was also proven by spiking recovery tests that resulted in values between 97.1% and 104.2% (Table 3).

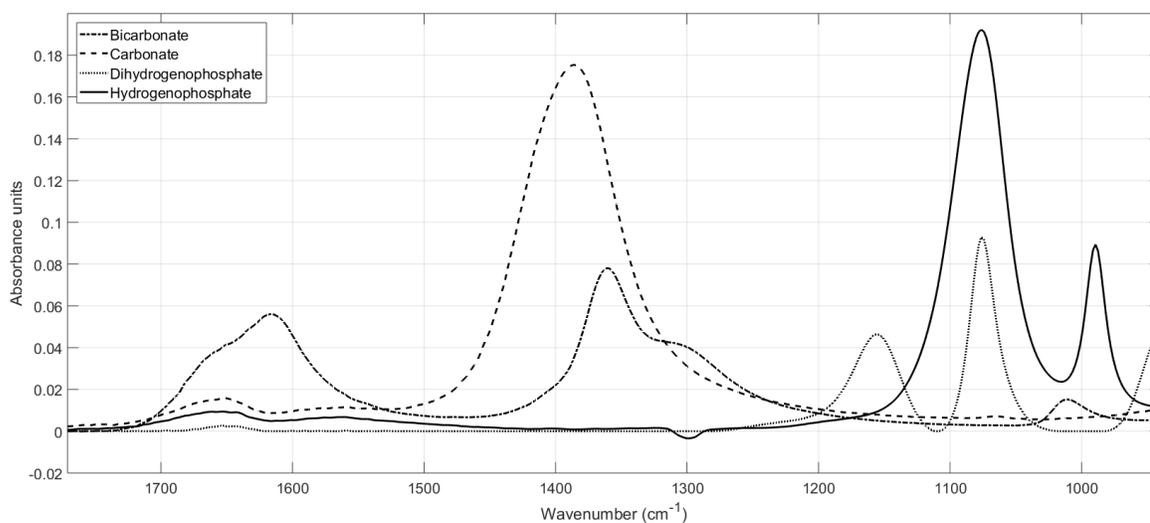


Figure 24 ATR FT IR absorption spectra in the 1771-940 cm^{-1} band for bicarbonate (dash-dotted), carbonate (dashed), dihydrogenophosphate (dotted) and hydrogenophosphate (solid line)

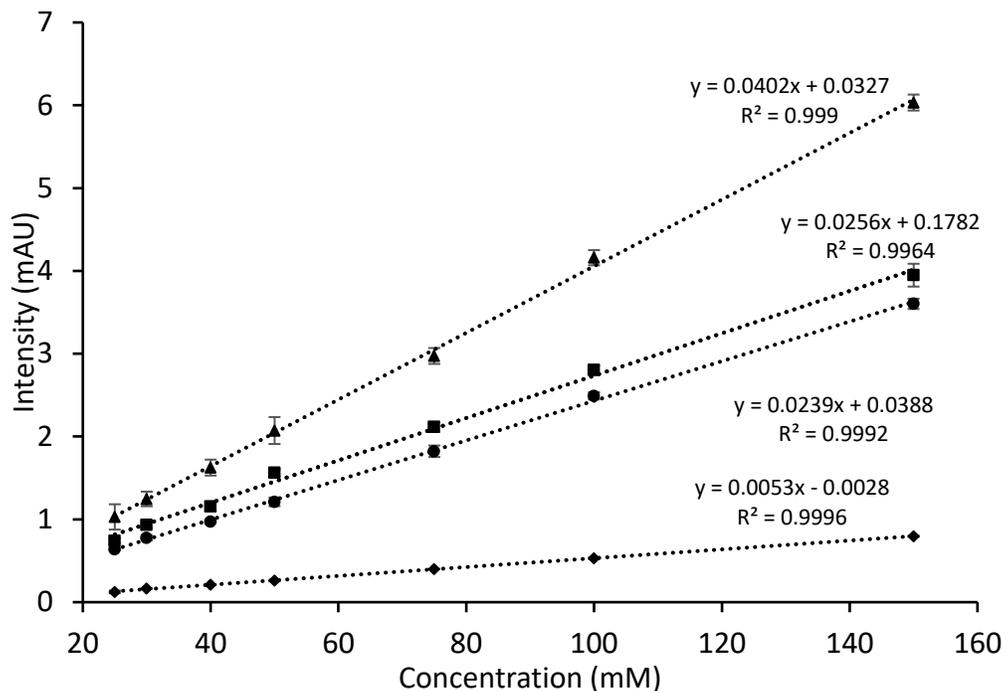


Figure 25 Univariate calibration curves for all analytes in pure aqueous solutions using ATR FT IR spectroscopy HCO_3^- (■), CO_3^{2-} (▲), H_2PO_4^- (◆) and HPO_4^{2-} (●).

Table 1 Detection and quantification limits of the ATR FT-IR method

Analyte	Mean Concentration (mM)	Standard deviation (mM)	Detection limit (mM)	Quantification limit (mM)	Conformity ratio (R)
HCO_3^-	28.1	1.7	5.2	17.2	5.4
CO_3^{2-}	34.7	1.7	5.1	17.1	6.8
H_2PO_4^-	30.3	1.3	3.9	13.0	7.7
HPO_4^{2-}	28.8	0.7	2.1	6.9	13.9

Table 2 Univariate fidelity results of the ATR FT-IR method

Analyte	Replicability stirred (mM)	Replicability centrifuged (mM)	Repeatability stirred (mM)	Repeatability centrifuged (mM)
HCO ₃ ⁻	24.9 ± 3.0	27.9 ± 1.7	26.6 ± 2.0	27.6 ± 2.1
CO ₃ ²⁻	27.6 ± 2.6	31.7 ± 0.9	29.9 ± 2.3	34.0 ± 1.1
H ₂ PO ₄ ⁻	30.5 ± 1.1	33.2 ± 1.8	30.4 ± 1.4	30.6 ± 1.6
HPO ₄ ²⁻	29.8 ± 1.6	29.2 ± 2.2	29.5 ± 2.4	29.7 ± 2.0

Table 3 Spiking recovery assessment using univariate calibration curves

Analyte	Mean concentration (mM)	Standard deviation (mM)	Recovery (%)
HCO ₃ ⁻	47.9	2.7	98.5
CO ₃ ²⁻	49.6	2.1	97.1
H ₂ PO ₄ ⁻	78.4	2.2	102.3
HPO ₄ ²⁻	79.5	1.6	104.2

3.2. Multivariate model for simultaneous determination of ions concentrations

The multivariate model was obtained using the PLS algorithm to allow the simultaneous quantification of carbonate and phosphate ion concentrations in water. From

the simultaneous and mutually dependent factorization of both quantitative and spectral information contained in the matrices of the calibration data set, the PLS algorithm integrates the information in the IR spectra (Haaland & Thomas, 1988). In our case, the multivariate model was built using 222 independent solutions containing HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} ions. Table 4 shows important calibration and prediction parameters from PLS regressions for each analyte.

The rank represents the number of factors to be included in the PLS model. Choosing the right rank was important as too few factors could lead to underfitting, while too many would translate to the inclusion of spectral noise ("overfitting"). The selection of the rank was achieved in order to both minimize the root-mean-square-errors of the cross validation (RMSECV) and maximize the coefficient of determination (R^2). The frequency range selected was $1771\text{-}1001\text{ cm}^{-1}$ corresponding to IR bands of analytes that included all crucial spectral information for the PLS model. The incorporation of spectral noise was also minimized as RMSECVs were negatively affected by a wider frequency range.

The first step of the model validation was cross-validation on an independent set of ion solutions (e.g. different than those used to obtain the model) using the OPUS software. Cross-validation of the model showed good statistical values. First, all four coefficients of determination (R^2) were over 98% with the highest values (99.32% and 99.44%) being those of HCO_3^- and CO_3^{2-} , respectively. The lower multivariate R^2 values compared to correlation coefficients of most univariate methods could be explained by the fact that the limits of detection and quantification could not be set manually. Therefore, a lot of noise was considered for lower concentration standards as shown in Figure 26 representing the cross-validation curve of HCO_3^- . The precision of the model is represented by the RMSECV values which were under 2% for carbonate and up to 3.26% for phosphate ions. The difference could be explained by the lower signal-to-noise ratio of phosphates. Besides, the ratio of performance to deviation (RPD) values for phosphate ions were between 7 and 8, as those of HCO_3^- and CO_3^{2-} are 12.1 and 13.3, respectively. According to Conzen, these values mean that the model is good for quality control purposes in the case

of phosphates and excellent for all analytical tasks concerning carbonate ions (Conzen, 2006).

The model was also validated through replicability and repeatability assessments done on an artificial sample. The results of the tests are presented in Table 5. They tend to confirm the cross-validation, in the sense that the model was able to predict the concentration of both bicarbonate and hydrogenophosphate ions with good precision. In fact, for both analytes, the theoretical concentrations were within the confidence interval (95%) calculated for both replicability and repeatability. Since the CO_3^{2-} (10.95 mM) and the $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ (0.62 mM) concentrations of the artificial sample were below the calculated univariate quantification limits, the multivariate model could not therefore quantify them with good accuracy.

Table 4 Validation parameters of the multivariate model

Analyte	Rank	R ² (%)	RMSECV (mM)	RMSECV (%)	RPD
HCO_3^-	10	99.32	4.67	1.95	12.1
CO_3^{2-}	10	99.44	3.80	1.52	13.3
H_2PO_4^-	10	98.01	8.16	3.26	7.09
HPO_4^{2-}	10	98.28	7.53	3.00	7.62

Table 5 Multivariate fidelity results

Analyte	Theoretical concentration (mM)	Replicability (mM)	Repeatability (mM)
HCO ₃ ⁻	89.1 ± 0.1	87.7 ± 3.6	91.8 ± 3.1
CO ₃ ²⁻	10.95 ± 0.02	16.7 ± 2.5	14.4 ± 1.7
H ₂ PO ₄ ⁻	0.62 ± 0.01	-0.8 ± 8.2	0.4 ± 7.4
HPO ₄ ²⁻	101.0 ± 0.1	104.9 ± 5.3	100.1 ± 4.7

3.3. Quantification of carbonate ions in complex culture media using the multivariate model

In order to apply the multivariate model in an experimental context, a growing culture of the microalgae *Scenedesmus obliquus* was followed using bicarbonate ions as carbon nutrient. For clarity purposes, Figure 27 shows the bicarbonate concentrations for the two PBR systems. Results tend to prove the efficiency of the model in predicting the concentration of these ions. The initial bicarbonate concentration was 15 g L⁻¹ (178.42 mM) and 24 h after inoculation the concentration became lower (161.06 mM and 151.71 mM). As expected, no carbonate could be quantified using the model since the pH was kept below 9 throughout the growth experiment, preventing bicarbonate deprotonation. Bicarbonate concentration followed the expected trend as it decreased during microalgae growth, reaching a minimum as *S. obliquus* stopped growing. In PBR 1, microalgae growth slowed down, thus their carbon consumption, because of a lack of light due to biofilm accumulation on the photobioreactor walls, which could explain the difference in concentration in both PBRs at the end of the experiment. In this experiment, phosphorus concentrations were below the detection limits of the method.

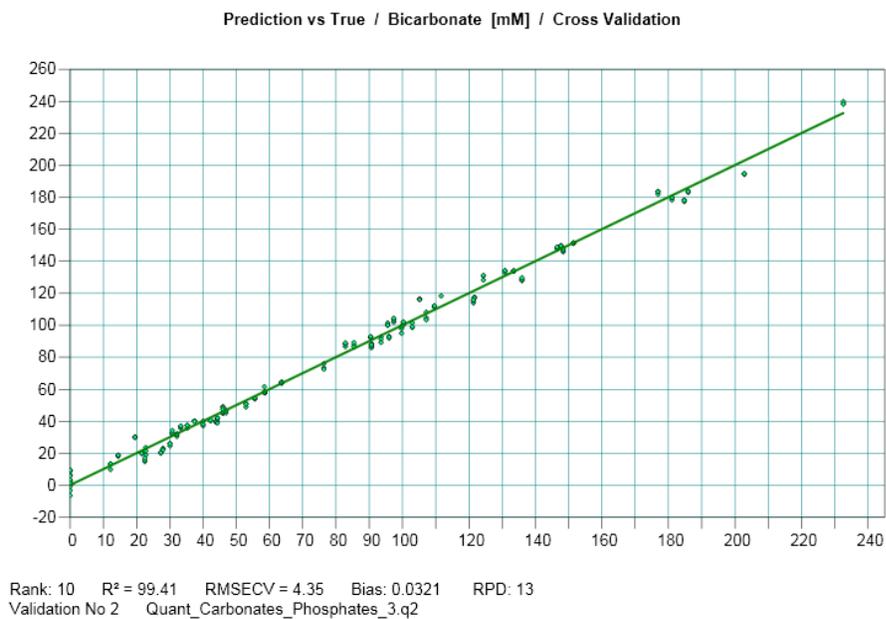


Figure 26 Multivariate model cross-validation curve for bicarbonate.

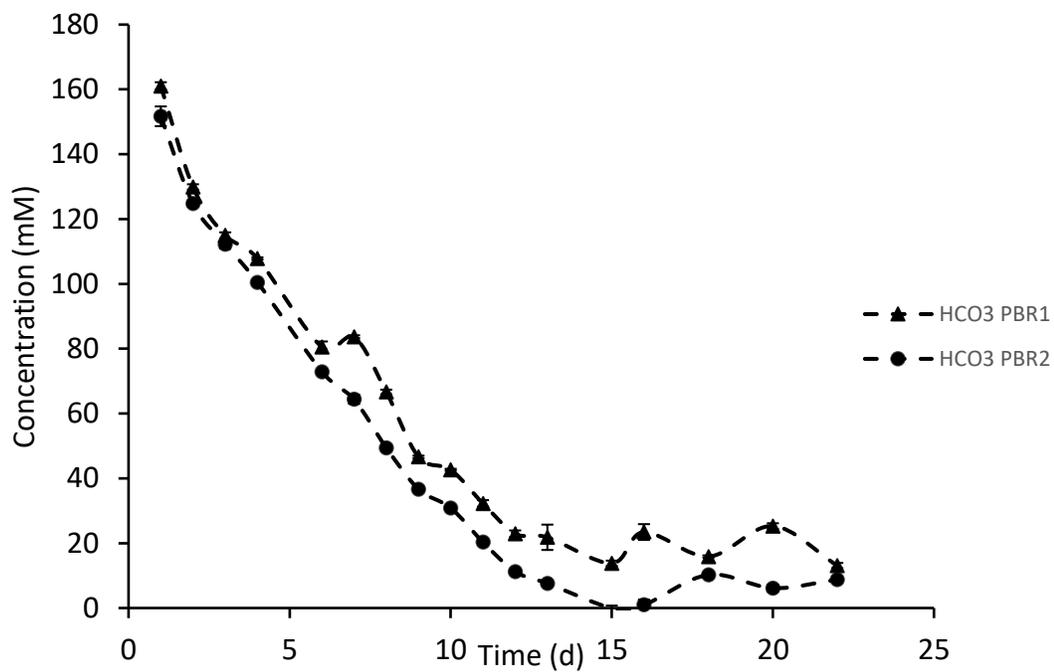


Figure 27 Bicarbonate consumption monitoring in microalgae cultures HCO₃- PBR1 (▲), HCO₃- PBR2 (●).

4. Conclusions

A multivariate PLS model using ATR FT-IR spectroscopic data was developed for the rapid *in situ* and real-time simultaneous quantification of bicarbonates, carbonates and orthophosphates ions in water and was applied to the daily monitoring of nutrients in a microalgal culture. The limits of detection and the limits of quantification were in the range of 2-5 and 7-17 mM, respectively. This non-destructive analytical method was successfully used to the study of consumption of these ions by *Scenedesmus obliquus*. This multivariate model could be a useful technique to study the consumption of inorganic ions during many processes notably those involving microorganisms. The ATR FT-IR spectroscopy combined to the multivariate PLS model could certainly be applied to various other inorganic and organic compounds to follow chemical processes by a simple and green methodology.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and Ressources Aquatiques Québec (RAQ) for their financial support. We also thank Mr. Steeven Ouellet (UQAR) for his technical assistance.

CHAPITRE 4

EFFORTS DE MODÉLISATION

4.1 INTERET ET EVOLUTION DE LA MODELISATION DES BIOPROCEDES A BASE DE MICROALGUES

La modélisation cinétique des procédés biologiques est très importante dans un contexte industriel. En effet, l'utilisation de modèles est très avantageux économiquement, mais facilite aussi l'implantation et l'exploitation des bioprocédés. Les modèles cinétiques permettent un suivi de l'état du procédé beaucoup plus simple en réduisant la complexité du procédé à quelques équations d'état. Ainsi, on peut minimiser le nombre de variables à suivre, donc aussi l'équipement nécessaire au suivi et au bon fonctionnement. Aussi, la modélisation adéquate d'un procédé permet l'implantation de boucles de contrôle plus efficaces et l'automatisation de procédés, diminuant potentiellement les besoins en main-d'œuvre. Dans le cas de bioprocédés industriels cela permettrait des économies d'échelle intéressantes considérant les coûts de production inhérents à la culture de microalgues (Pawlowski et al., 2014). Un contrôle plus efficace assurerait aussi la stabilité et la fidélité du procédé qui sont primordiales dans les domaines de pointe comme la pharmaceutique et la nutraceutique.

La complexité de la modélisation réside dans l'objectif même de celle-ci. Le but est de représenter mathématiquement, le plus fidèlement possible, des phénomènes physico-bio-chimiques. Cependant, le modèle doit rester simple à simuler et à implémenter. Pour réussir cela, il faut d'abord identifier les phénomènes et les variables qui régissent le procédé. Ensuite, grâce aux lois qui gouvernent les différents phénomènes et leurs interactions, des données expérimentales et de la complexité du modèle tolérée, il importe

de sélectionner le nombre de variables qu'il comportera. Dans le cas de ce projet, la variable de sortie allait être la production de biomasse microalgale.

Les deux relations les plus utilisées pour modéliser la croissance de microorganismes sont les équations de Monod et de Droop présentées au Chapitre 1 (Éq. 1.1 et 1.8). Ces modèles visent tous deux à mettre en relation le taux de croissance avec la disponibilité métabolique d'un substrat limitant. Dans le cas de Monod, la concentration de ce substrat dans le milieu de culture est la variable clé. Alors que pour Droop, la disponibilité métabolique s'exprime sous forme d'un quota interne. Ces deux relations ont servi de point de départ à la construction de la plupart des modèles prédictifs dans le domaine des bioprocédés. Le modèle le plus simple bâti à partir de ces relations ne prendrait donc en compte qu'un substrat limitant la croissance des algues, ce qui donnerait deux variables d'état dans le cas de Monod et trois variables dans le cas de Droop.

Monod

$$\dot{x} = \mu x \quad (4.1)$$

$$\dot{S} = -\rho_S x \quad (4.2)$$

Droop

$$\dot{x} = \mu x \quad (4.1)$$

$$\dot{S} = -\rho_S x \quad (4.2)$$

$$\dot{q}_S = \rho_S - \mu q_S \quad (4.3)$$

Dans les deux modèles, la dynamique du taux d'internalisation du substrat correspond à une dynamique de Monod.

$$\rho_S = \rho_{S_{max}} \frac{S}{S + K_S} \quad (4.4)$$

Où $\rho_{S_{max}}$ est le taux d'internalisation maximal du substrat spécifique à l'espèce étudiée.

La définition des paramètres, des variables et la valeur des constantes évoluent au gré des découvertes. Au départ, Monod a établi que la constante K qui se retrouve dans l'équation du taux de croissance μ , était appelée μ_{max} : elle en représentait une valeur maximale inatteignable (i.e. mathématiquement asymptotique) en conditions réelles, même optimales. En effet, le taux de croissance maximum était fixé en le supposant indépendant

de la capacité de stockage des cellules. Cette même hypothèse était utilisée dans les modèles basés sur celui de Droop. Or, le taux de croissance maximal en conditions réelles est régi par la machinerie cellulaire qui inclut la capacité de chaque espèce à produire les enzymes et autres molécules nécessaires à l'absorption de nutriments (Adesanya et al., 2014; Cherif & Loreau, 2010). Ainsi, la définition du taux de croissance maximal a été modifiée pour mieux répondre aux réalités scientifiques. Le taux réel maximal relié à un substrat limitant est maintenant défini comme suit:

$$\mu_{max} = \bar{\mu} \left(1 - \frac{Q_0}{q_{max}} \right) \quad (4.5)$$

Ici, $\bar{\mu}$ représente le taux de croissance maximal théorique et q_{max} , le quota maximal atteint pour ce substrat qui est limité par l'efficacité de chaque espèce à l'absorber et le stocker. Les modèles de base peuvent aussi être agencés, c'est-à-dire utiliser une dynamique de Monod pour représenter la relation entre la croissance et la disponibilité d'un substrat à l'intérieur d'une dynamique de Droop illustrant la relation de la croissance avec un autre substrat. C'est souvent le cas dans les modèles un peu plus complexes incluant plusieurs variables. L'ajout d'une variable à un modèle implique, habituellement, l'ajout d'une nouvelle équation d'état et la redéfinition du taux de croissance et de la cinétique des autres paramètres. Les modèles peuvent rapidement devenir très complexes à implémenter et très lourds lors de la simulation.

Un troisième type de modèle est aussi utilisé fréquemment pour décrire la relation entre le taux de croissance des microorganismes et la disponibilité d'un substrat donné. Il s'agit du modèle de Contois qui est en fait une modification de la dynamique de Monod. Pour Contois, le taux de croissance est aussi fonction de la population (CONTOIS, 1959).

$$\mu_S = \mu_{S_{max}} \frac{S}{S + K_S x} \quad (4.6)$$

L'ajout de la population à la dynamique de Monod permet de représenter plus fidèlement l'impact d'une population croissante sur la disponibilité relative des substrats.

En effet, au cours de la croissance des microorganismes (surtout à de fortes densités cellulaires) il devient parfois de plus en plus difficile pour chaque individu d'avoir accès au substrat limitant.

Les facteurs limitant la croissance des algues ne sont pas seulement d'ordre nutritionnel. Naturellement, la lumière est considérée comme le facteur le plus important dans la croissance des algues. La modulation de l'accès à la lumière est souvent utilisée pour optimiser la croissance des algues et les coûts énergétiques reliés à l'éclairage des cultures (Gris, Morosinotto, Giacometti, Bertucco, & Sforza, 2014; Jacob-Lopes, Scoparo, Lacerda, & Franco, 2009; Radmer & Ollinger, 1980; Shifrin & Chisholm, 1981). Olivier Bernard a d'ailleurs proposé l'ajout d'une équation au modèle de Droop pour exprimer la dépendance du taux de croissance à la lumière (Bernard, Masci, & Sciandra, 2009).

$$\mu_{max} = \bar{\mu} \frac{I}{I + K_{sl} + \frac{I^2}{K_{il}}} \left(1 - \frac{Q_0}{q_{max}} \right) \quad (4.7)$$

Où I représente l'intensité lumineuse de l'éclairage et les paramètres K sont des constantes. L'ajout de la lumière au modèle de Droop vise à modéliser la diminution de l'intensité lumineuse reçue par les algues en fonction de l'augmentation de la densité optique de la culture. Selon cette idée, la quantité de lumière reçue est dynamique et exige l'ajout d'une autre variable d'état, I^* , soit l'intensité lumineuse à laquelle les algues sont adaptées.

$$I^* = \mu_{max}(\bar{I} - I^*) \quad (4.8)$$

Dans ce cas, \bar{I} représente l'intensité lumineuse moyenne perçue qui est notamment fonction de x , I_{in} (l'intensité lumineuse entrant dans le réacteur) et la géométrie du PBR. L'équation 4.6 représente la photo-inhibition. À haute intensité lumineuse, le taux de croissance des microalgues diminue. L'augmentation de la densité des cultures, de son côté, réduit l'accessibilité à la lumière, affectant le taux de croissance. Ainsi, ce modèle pourrait servir à optimiser la productivité des cultures et la consommation d'énergie de l'éclairage

artificiel par la photo-adaptation. Il peut aussi être utilisé pour étudier l'ajout de phases de nuit qui peuvent avoir un impact sur la croissance des algues tout en réduisant d'avantage les besoins en éclairage (de Winter, Cabanelas, Martens, Wijffels, & Barbosa, 2017; Jacob-Lopes et al., 2009).

4.2 DETERMINATION DE LA STRUCTURE DU MODELE

Dans le cadre de ce projet, le modèle à bâtir devait servir à représenter adéquatement les mécanismes régissant la croissance de *Scenedesmus obliquus*, en mode «cuvée simple», avec comme seule source de carbone le bicarbonate de sodium. Le mode «cuvée simple» signifie que les algues et le milieu ne sont récoltés qu'à la fin de la période de croissance et que les seuls ajouts de milieu ou de substrat ont lieu lors de l'inoculation. Contrairement au mode semi-continu, la cuvette simple ne dure qu'un cycle de croissance. À partir de résultats de la littérature et des connaissances acquises, il a été déterminé que la base du modèle allait être celle que Droop avait utilisée pour représenter le lien entre la croissance et la limitation en azote.

$$\dot{x} = \mu x \quad (4.9)$$

$$\dot{n} = -\rho_N x \quad (4.10)$$

$$\dot{q}_N = \rho_N - \mu q_N \quad (4.11)$$

Ici, x représente la biomasse algale en grammes d'algues par mètre cube (gA/m^3), n , la quantité de nitrate disponible dans le milieu (gN/m^3) et q_N le quota d'azote, soit la proportion d'azote internalisée (dans la biomasse) par les algues (gN/gA). Les autres paramètres dynamiques du système sont le taux de croissance des algues (μ) et le taux d'internalisation du nitrate (ρ_N). Ces deux paramètres sont respectivement exprimés en d^{-1} et $\text{gN}/\text{gA} \cdot \text{d}^{-1}$ et leur dynamique est la suivante:

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_0}{q_N} \right) \quad (4.12)$$

$$\rho_N = \rho_{N_{max}} \frac{n}{n + K_N} \left(1 - \frac{q_N}{q_{max}}\right) \quad (4.13)$$

Les taux de croissance et d'internalisation d'azote sont régis par le quota d'azote qui fluctue entre une valeur minimale (Q_0) et une valeur maximale (q_{max}). Dans le cas de ce modèle, une quatrième équation s'applique.

$$\dot{c}_T = -\rho_C x \quad (4.14)$$

Ici, c_T représente la concentration totale de carbone inorganique soit la somme du CO_2 , du bicarbonate et du carbonate dissous et ρ_C , le taux de consommation du carbone. La dépendance du taux de croissance de la biomasse à la concentration de carbone inorganique disponible s'exprime par une modification du taux de croissance classique μ :

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_0}{q_N}\right) \frac{c}{c + K_C x} \quad (4.15)$$

Cette équation est une combinaison de celle de Droop et de Contois, puisqu'elle utilise la concentration externe de carbone comme variable. Comme les expériences antérieures de l'équipe de recherche montrent que le quota de carbone interne variait peu durant la culture des algues (J. M. Girard et al., 2014), il est possible de poser l'hypothèse qu'il reste constant, donc que la dépendance de la croissance par rapport au carbone proviendrait de la concentration en milieu de culture. De plus, les microalgues n'ont pas tendance à faire de réserves de carbone, en termes de ratio massique, en prévision d'une croissance future contrairement à l'azote et au phosphore (Procházková, Brányiková, Zachleder, & Brányik, 2014). Pour des raisons de simplification, le taux d'internalisation du carbone n'apparaît pas dans l'équation 4.15, bien qu'il influence en réalité le taux de croissance des algues. En effet, dans ce cas, l'impact de l'internalisation du carbone se reflétera dans la valeur de μ_{max} . Le taux de croissance maximum pour *S. obliquus* sera donc différent des valeurs de la littérature et devra être déterminé empiriquement. Il est toutefois possible qu'il soit très proche des valeurs du cas de Droop de base, puisque le taux de

croissance maximal théorique est régi par la machinerie nécessaire à la consommation du nutriment le plus limitant (Cherif & Loreau, 2010).

Le taux de consommation du carbone s'exprime par la dynamique de Contois, contrairement à celui d'azote. Ce choix permet d'exprimer une certaine dépendance de la croissance et de la consommation du carbone à la lumière perçue par les algues qui diminue en fonction de leur croissance. Ainsi, il est possible que la croissance et la consommation de carbone ralentissent avant l'épuisement des ressources. De plus, le quota de carbone n'est pas représenté, puisqu'il fluctue peu au cours de la croissance.

$$\rho_C = \rho_{C_{max}} \frac{c}{c + K_C \chi} \quad (4.16)$$

Ici, le paramètre c est dynamique, alors que K_C est constant. Il reste cependant à identifier K_C expérimentalement et lier la dynamique de c aux fluctuations possibles du pH. Dans les conditions prévues d'utilisation de ce modèle, la seule source de carbone considérée consommable est le bicarbonate de sodium. Puisque les microalgues ont une forte préférence nutritionnelle envers le CO_2 dissous, si l'on force l'opération des systèmes à des pH élevés où les seules espèces de carbone dissout sont le bicarbonate et le carbonate, celles-ci consommeront alors le bicarbonate. Ainsi, il est possible d'exprimer la relation entre c (la concentration de HCO_3^- en g/m^3) et c_T par la relation suivante.

$$c_T = \frac{M_{\text{HCO}_3^-}}{M_C} \cdot \frac{1000L}{1m^3} \cdot \frac{K_a + [H^+]}{[H^+]} \cdot c \quad (4.17)$$

Cette relation est obtenue par la combinaison de la relation d'équilibre chimique acide:

$$K_a = \frac{[\text{CO}_3^{2-}][H^+]}{[\text{HCO}_3^-]} \quad (4.18)$$

Et le fait que la concentration totale de carbone correspond à

$$[C]_T = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] \quad (4.19)$$

Il est à noter que ces équations sont des représentations de réactions chimiques à l'équilibre et non dans leur phase dynamique. La relation illustrée entre c_T et c n'est donc pas dépendante du temps, mais plutôt du pH du milieu, représenté, ici, par la concentration en protons $[H^+]$. Toutefois, le pH des systèmes est bel et bien dynamique puisque la consommation de bicarbonate par les algues mène à l'internalisation de H^+ . Le pH des milieux est aussi influencé par la présence, ou non, d'autres tampons tels le phosphate ou le Tris. La représentation de la relation entre le carbone total, le carbone assimilable et l'acidité du milieu de culture passerait donc plutôt par l'utilisation de bilans de masses dynamiques. Ceci complexifie cependant grandement l'implantation du modèle pour la simulation, car l'échelle de temps des équilibres chimiques agissant sur le pH, à leur tour influencés par ce-dernier, est de l'ordre de la nano-seconde alors que celle de la croissance des algues et leur consommation de nutriments est de l'ordre du jour. Cela mènerait à des simulations extrêmement lentes à réaliser.

4.3 IMPLANTATION DU MODELE

Des travaux futurs devront s'attarder à représenter adéquatement les bilans de masse, sans devoir faire les simulations à l'échelle des nanosecondes. Pour l'instant, l'option la plus intéressante semble être d'utiliser deux schémas-blocs distincts, un premier représentant le modèle modifié de Droop et le second, les bilans de masses dynamiques des ions carbonates: on simulera ensuite, en séquences, par courtes intervalles de temps, les deux modèles, en posant l'hypothèse d'un niveau constant du pH pendant la simulation du premier, puis en ajustant ce dernier par la simulation du deuxième modèle suite à la consommation des nutriments dans le milieu. Le schéma-bloc du modèle de Droop n'aurait pas de représentation dynamique du pH, mais la relation entre le pH, c_t et c serait représentée par l'équation 4.16. Ce dernier aurait comme variable d'entrée le pH qui serait obtenu du schéma-bloc des bilans de masse qui servirait à simuler l'impact de la consommation de bicarbonate par les algues sur les équilibres chimiques régissant le pH. Il aurait donc comme variable d'entrée la concentration de bicarbonate dans le milieu en fonction du temps et sa variable de sortie serait le pH atteint une fois les équilibres

chimiques rétablis. Les deux fonctionneraient donc avec la même échelle de temps, mais en déphasage. On obtiendrait donc des courbes en plateaux correspondant aux intervalles de temps utilisés pour la simulation de chaque phénomène, plutôt que des courbes parfaitement continues.

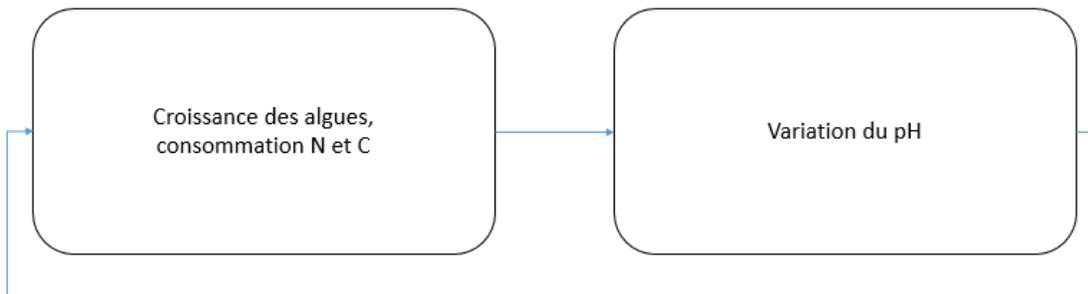


Figure 28 Représentation schématique des blocs du modèle

L'objectif d'utilisation de ce modèle serait de permettre l'étude plus approfondie du comportement de *S. obliquus* lors de la consommation de bicarbonate. En effet, il serait possible de simuler des expériences de croissance en fonction de différentes concentrations de tampon et comprendre l'impact réel de la consommation de bicarbonate sur la variation du pH du milieu causée par l'internalisation de protons. Pour l'instant, il est considéré qu'une mole de protons est consommée par mole de bicarbonate consommé. Il serait aussi possible de vérifier l'hypothèse selon laquelle *S. obliquus* ne peut consommer le carbonate et c'est ce qui limiterait sa croissance au-delà d'un pH de 9.

Ce modèle permettra par la suite d'évaluer différentes stratégies de contrôle du pH (et du système en entier, incluant le choix du mode d'opération) afin d'optimiser la production de biomasse de *S. obliquus*. Pour l'instant, des simulations ont été réalisées en considérant le pH constant pour vérifier si le comportement général du modèle permettrait de représenter la forme des données expérimentales obtenues. Des paramètres devront être obtenus, plus tard, suite à l'acquisition de quantités de données suffisantes permettant

l'évaluation d'intervalles de confiance assez serrés sur ces-derniers. La prochaine section présente les résultats obtenus avec le modèle de Droop en considérant le pH constant.

4.4 RESULTATS DE SIMULATIONS DU MODELE A PH CONSTANT

Le modèle implanté est le suivant:

$$\dot{x} = \mu x \quad (4.9)$$

$$\dot{n} = -\rho_N x \quad (4.10)$$

$$\dot{q}_N = \rho_N - \mu q_N \quad (4.11)$$

$$\dot{c}_T = -\rho_C x \quad (4.14)$$

Où, les taux de croissance et d'internalisation d'azote et de carbone sont sous la forme suivante:

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_0}{q_N}\right) \frac{c}{c + K_C x} \quad (4.15)$$

$$\rho_N = \rho_{Nmax} \frac{n}{n + K_N} \left(1 - \frac{q_N}{q_{max}}\right) \quad (4.12)$$

$$\rho_C = K_i \frac{c}{c + K_C x} \quad (4.17)$$

Ici, le taux d'internalisation maximal a été remplacé par la constante arbitraire K_i en prévision de l'identification fidèle des paramètres du modèle.

Pour simplifier l'implantation, le pH des cultures a été considéré constant, bien que dans aucune des expériences de ce projet, ce n'ait été le cas. Par contre, l'importance d'un contrôle total du pH a été déduite expérimentalement, ce qui fait, qu'à échelle industrielle ou pour des expériences futures, les cultures d'algues avec bicarbonate se feront à pH constant ou presque. À grande échelle l'acidité du milieu de culture sera maintenue de façon active par ajout d'acide. Or, ce modèle ne prend pas en compte la dilution du milieu

de culture résultant d'ajouts d'acide importants pour fournir les protons nécessaires au maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire. Cette modification pourra également être apportée plus tard, lors des travaux futurs.

Ce modèle reste adéquat pour ce projet. En effet, il représente bien les cultures en cuvée simple dont le pH serait contrôlé par la présence de tampon, comme cela a été le cas des expériences en flacons agités. De plus, sa simplicité permet d'illustrer efficacement la dépendance de la productivité de *S. obliquus* à la disponibilité du carbone en solution.

Le modèle a été implanté par schéma-bloc (voir Annexe I) avec l'outil Simulink sur le logiciel Matlab pour la simulation. Les conditions initiales employées pour le cas de base de la simulation étaient celles des expériences en flacons agités, soit $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ ($142 \text{ gC}\cdot\text{m}^{-3}$), $0.182 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ($41.2 \text{ gN}\cdot\text{m}^{-3}$) et $4.0 \text{ gA}\cdot\text{m}^{-3}$. Les paramètres employés pour ces simulations ont été tirés d'un modèle de croissance en autotrophie avec bullage de CO_2 dans des photobioréacteurs (Deschênes & Vande Wouwer, 2016). Dans le cas du modèle de croissance avec bicarbonate, plus de résultats probants seront nécessaires pour permettre une identification adéquate des paramètres réels du modèle.

Tableau 10 Constantes et paramètres du cas de simulation de base

Paramètre	Valeur
μ_{max}	1.47 d^{-1}
q_{min}	$0.011 \text{ gN}\cdot\text{gA}^{-1}$
q_{max}	$0.099 \text{ gN}\cdot\text{gA}^{-1}$
K_N	$0.02 \text{ gN}\cdot\text{m}^{-3}$
ρ_{Nmax}	$0.7 \text{ gN}\cdot\text{gA}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
K_i	$0.5 \text{ gC}\cdot\text{gA}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
K_C	$0.16 \text{ gC}\cdot\text{m}^{-3}$

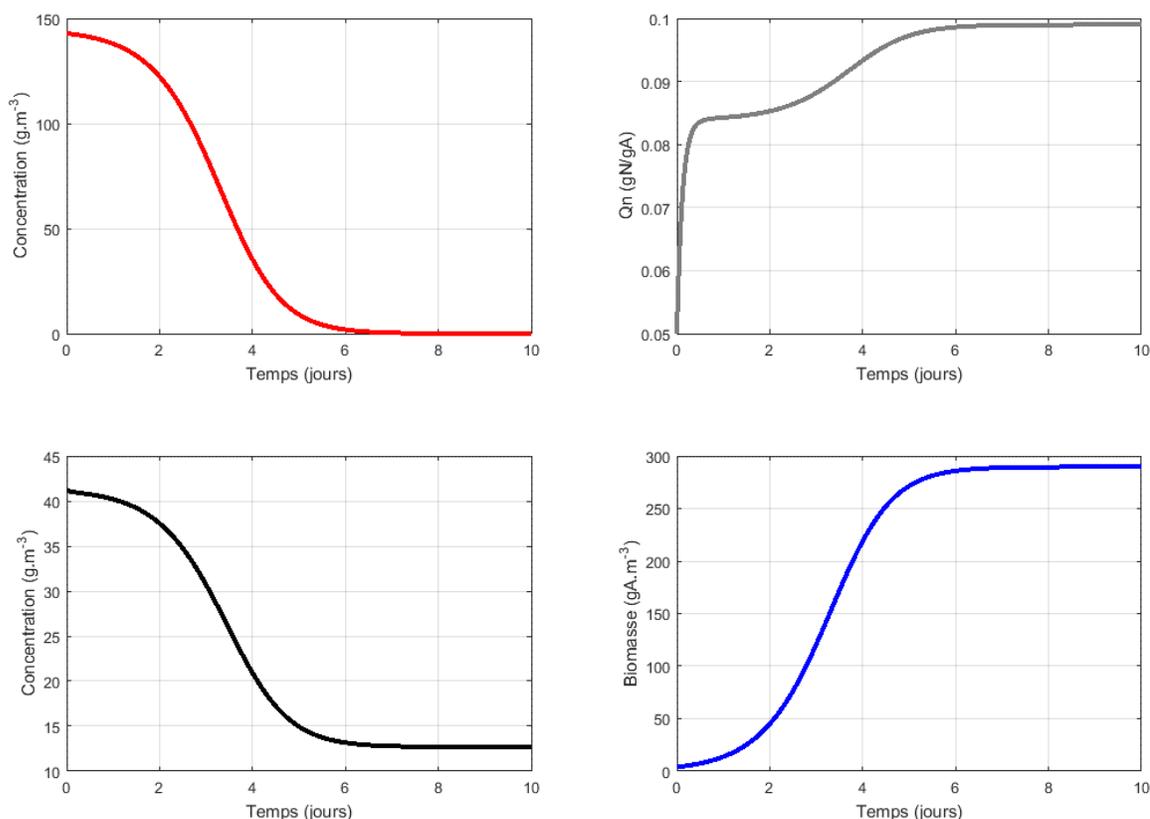


Figure 29 Résultats de simulation pour les quatre variables d'état: Concentration en carbone dans le milieu (■), quota d'azote (■), concentration d'azote dans le milieu (■) et biomasse (■)

Les résultats de simulation obtenus montrent que le modèle représente bien le comportement des algues et la consommation des nutriments lors d'une expérience en flacons agités. Le carbone est totalement consommé par les algues, alors que le nitrate ne l'est pas comme espéré. Le ratio molaire initial C:N, dans le milieu de culture simulé, était de 4:1, alors que le seuil de limitation d'azote est de 20:1. Ainsi, le carbone est bien limitant par rapport à l'azote et le quota interne d'azote simulé le montre bien, alors qu'il augmente rapidement au départ étant donnée la grande quantité disponible. Le quota interne croît ensuite, vers la fin de la phase de croissance et se stabilise à q_{\max} au moment où le carbone est complètement internalisé. Ce moment correspond aussi à celui où la biomasse atteint son maximum, montrant que la croissance dépend bien de la disponibilité du

carbone. Il est à noter qu'au cours des expériences réalisées en laboratoire, aucune donnée sur le contenu en azote des microalgues n'a été recueillie. Il n'est donc pas possible de comparer les résultats de simulation avec des valeurs expérimentales.

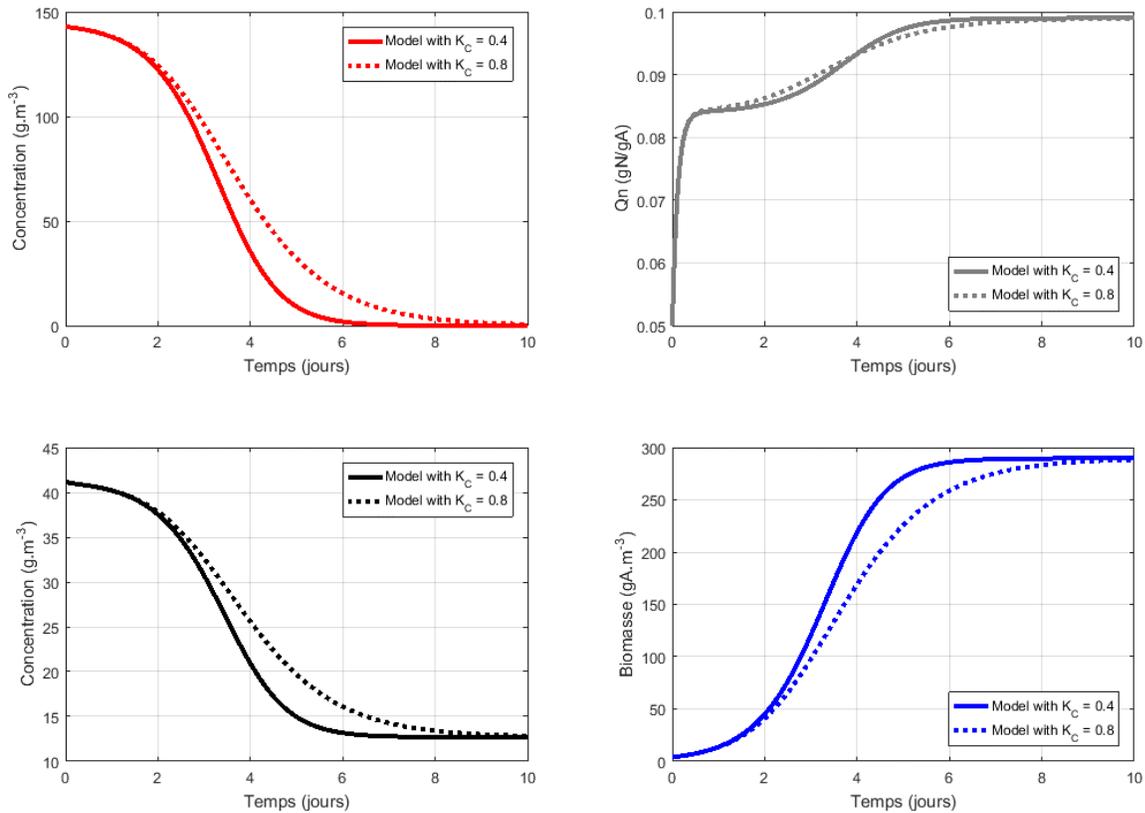


Figure 30 Comparaison des résultats de simulation pour deux valeurs de K_C pour les quatre variables d'état: Concentration en carbone dans le milieu (■), quota d'azote (■), concentration d'azote dans le milieu (■) et biomasse (■)

Le modèle réagit aussi selon les attentes aux modifications de paramètres comme illustré par la figure 26. Dans ce cas, la constante de carbone (K_C) a été doublée par rapport au cas illustré par la figure 25. Cette modification a eu comme impact de ralentir la consommation de carbone et, par le fait même, la croissance. Par contre, l'internalisation plus lente n'a pas eu d'impact sur la croissance maximale des algues montrant qu'elle est plutôt reliée à la quantité de substrat disponible qu'à leur vitesse de consommation. Le modèle mathématique bâti illustre bien la réaction de systèmes de culture de microalgues à

certaines changements de conditions. La poursuite des travaux devrait permettre le développement d'un modèle plus complet qui pourrait être utilisé dans des boucles de contrôle de bioprocédés impliquant des microalgues croissant avec du bicarbonate. Ces travaux futurs devraient notamment inclure une grande part d'expérimentation afin d'identifier avec précision les paramètres spécifiques aux systèmes avec bicarbonate comme seule source de carbone.

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

La rentabilité des bioprocédés à base de microalgues doit être améliorée pour leur implantation à grande échelle et cela passe notamment par l'augmentation de leur productivité. Les sources de carbone alternatives représentent une option de choix pour y arriver, notamment le bicarbonate de sodium parce qu'il peut être employé en autotrophie comme le CO₂, mais à de plus fortes concentrations. Il peut aussi être obtenu par extraction du dioxyde de carbone d'effluents industriels. Le bicarbonate favorise aussi la production de lipides, ce qui est avantageux pour la production de biocarburants comme le biodiésel ou d'autres huiles à plus grande valeur ajoutée.

Ce projet avait pour but d'étudier le potentiel de l'utilisation du bicarbonate comme source de carbone pour la croissance d'une microalgue modèle ayant un potentiel d'exploitation industrielle: *Scenedesmus obliquus*. Dans cette optique, divers essais expérimentaux ont été réalisés pour explorer les conditions de culture afin d'en permettre une assimilation efficace. De ce côté, en contexte d'exploitation industrielle, un suivi régulier voire en temps réel de l'utilisation des matières premières dans les procédés est importante pour assurer une utilisation optimale des ressources. Pour cette raison, une méthode analytique a été développée en spectroscopie infrarouge (FT-IR/ATR) permettant le suivi des ions carbonates et phosphates de manière simple et rapide. Enfin, comme le développement des algorithmes de contrôle et de suivi en ligne des procédés doit être supporté par des modèles mathématiques descriptifs des cinétiques de ces derniers, une structure de modèle a été proposée pour une utilisation dans ce contexte.

Les expériences en flacons agités ont montré que le taux de croissance des cultures avec bicarbonate était parfois très près de celui des cultures utilisant le CO₂ gazeux concentré, ou des cultures mixotrophes. Ces expériences ont aussi montré que la croissance maximale des microalgues était influencée par la quantité totale de carbone disponible.

Toutefois, une relation claire entre la quantité de bicarbonate disponible et le taux de croissance n'a pu être établie. Des travaux futurs devront s'attarder davantage à cet aspect.

Les défis concernant la production de microalgues avec bicarbonate de sodium sont nombreux. D'abord, la préférence nutritionnelle des microalgues envers le CO₂ exige l'évacuation de toute trace de CO₂. Dans le cas de cultures en cuvées simples, l'élimination du CO₂ se fait en deux étapes. D'abord, un bullage à l'azote après l'inoculation suffit à éliminer les traces de CO₂ dissout, mais aussi de la colonne d'air dans le réacteur ou le flacon. Ensuite, le maintien du pH de culture au-dessus de 8, par ajout d'un tampon ou contrôle actif, permet de limiter la formation de CO₂ à partir du bicarbonate en solution.

Un contrôle adéquat du pH des cultures avec bicarbonate de sodium est primordial, non seulement pour éviter la formation de CO₂ et son dégazage, mais aussi parce que différentes espèces de microalgues ont un pH optimal différent pour leur croissance et tolèrent, à des degrés très différents, les fluctuations. Dans le cas de *S. obliquus*, le pH optimal est entre 6 et 7, mais elle tolère des pH beaucoup plus alcalins. Sa productivité semble toutefois diminuer considérablement à pH>9 et la consommation de bicarbonate est accompagnée de l'internalisation de protons, ce qui fait rapidement grimper le pH du milieu de culture. En plus de réduire l'efficacité de la machinerie cellulaire de *S. obliquus*, un pH trop élevé favorise la déprotonation du bicarbonate et la formation de carbonate qui ne peut être assimilé par les microalgues.

Les expériences en flacons agités suggèrent que la production d'hydroxyde intracellulaire est en effet proportionnelle à la quantité de bicarbonate consommé. Ainsi, dans le cas de cultures en cuvées simples, le pouvoir tampon à prévoir au départ devrait être proportionnel à la quantité de bicarbonate disponible pour assurer un contrôle parfait du pH. Le tampon Tris est le plus adéquat des deux tampons étudiés pour la culture de *S. obliquus* avec bicarbonate. Son paramètre pKa de 8.1 permet un contrôle optimal du pH en utilisant de beaucoup plus faibles concentrations que le tampon phosphate, H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻, dont le pKa est de 7.2.

Bien que le tampon Tris offre un bon contrôle du pH, l'utilisation de trop grandes quantités de tampon nuit à la croissance des microalgues. Ainsi, à plus grande échelle l'acidité des cultures de microalgues doit être contrôlée activement, de façon automatisée ou manuelle. Dans le cadre de l'expérience de culture en PBR, une boucle de contrôle permettait de gérer les ajouts d'acide en fonction du pH mesuré en continu. Cependant, le brassage (par bullage) n'était pas optimal pour homogénéiser rapidement le milieu de culture et en favorisait un dégazage trop rapide. La réaction du système était mal anticipée, et a conduit à une trop grande utilisation d'acide.

L'expérience en photobioréacteur a permis de mettre en lumière quelques points critiques. D'abord, le bullage semble avoir un impact majeur sur la croissance des algues. Le flux d'azote pur utilisé pour éliminer le CO₂ dissous et maintenir les algues en suspension était trop élevé, ce qui a mené à une trop grande élimination de l'oxygène dissout. L'oxygène est nécessaire au fonctionnement de l'enzyme Rubisco des microalgues pour assurer la photosynthèse. Ainsi, un bullage d'oxygène est à prévoir pour ces systèmes. Dans cette expérience, il est possible que le manque d'oxygène cause un stress sur les cellules, qui a conduit à la formation de biofilms et à une réduction significative de la croissance. La formation de tels biofilms devra être évaluée dans de futures expériences pour en établir les liens avec les conditions expérimentales et déterminer des façons de la minimiser.

L'automatisation et le contrôle des procédés microbiologiques représentent une voie d'avenir pour leur opération et leur optimisation. Ces techniques nécessitent généralement le développement de modèles mathématiques représentant les cinétiques de croissance, de consommation des différents substrats d'importance et de production des composés d'intérêt par les microorganismes impliqués. Dans le cadre de ce projet, le modèle d'intérêt devait permettre d'exprimer la dépendance entre la croissance de *S. obliquus* (production de biomasse) et la disponibilité du bicarbonate. La structure de ce nouveau modèle mathématique reprend une forme établie par Droop avec l'ajout d'une quatrième équation. Les cinétiques de croissance de la biomasse et de consommation de nitrate et de

bicarbonate sont des combinaisons des dynamiques de type Monod, Droop et Contois. Des simulations montrent que la forme générale du comportement du modèle est fidèle à ce qui est observé en pratique. Toutefois, des expériences supplémentaires seront nécessaires afin d'identifier les paramètres du modèle pour *S. obliquus*.

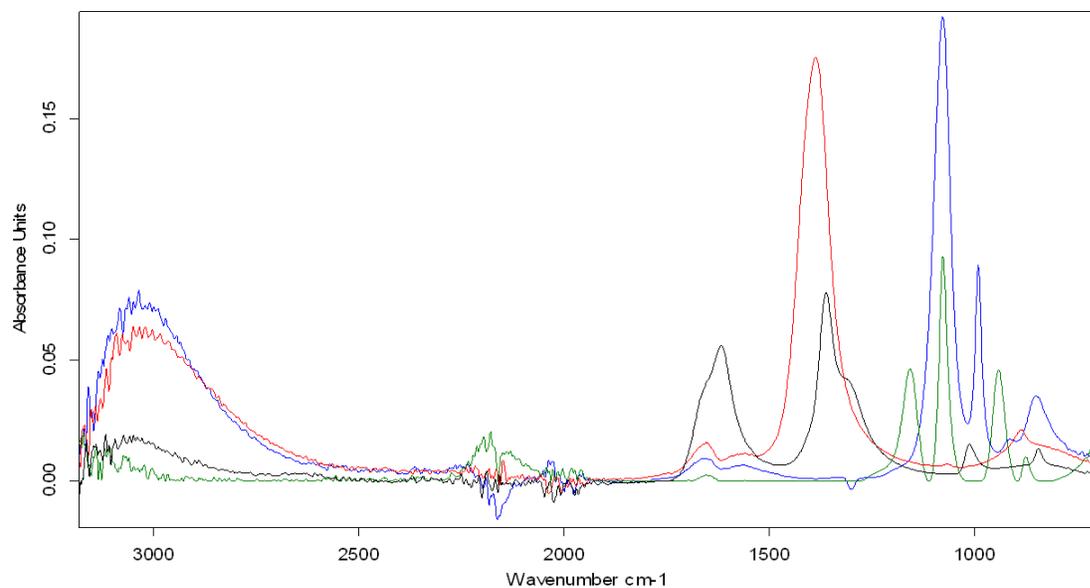
L'optimisation de la production de biomasse microalgale en utilisant le bicarbonate comme source de carbone passe par un suivi adéquat des cultures, notamment de la consommation du carbone. Pour ce faire, un modèle multivarié (PLS-1) a été développé par spectroscopie ATR-FTIR. Ce modèle permet le dosage simultané, *in situ* et en direct des ions bicarbonate, carbonate dihydrogénophosphate et hydrogénophosphate. Cette méthode de dosage répond à un besoin réel, particulièrement pour des exploitations à grande échelle, puisqu'elle permet le suivi des concentrations de bicarbonate en continu, sans besoin de prélèvement. C'est aussi une des seules méthodes non-destructives de dosage de carbone inorganique dissout. La méthode a d'ailleurs été employée pour suivre la consommation du bicarbonate par les microalgues dans plusieurs expériences en flacons agités et durant l'expérience en photobioréacteurs. Cette technique pourrait très bien être étendue au dosage de toute autre molécule inorganique ou organique d'intérêt active en infrarouge.

Travaux futurs

Les travaux réalisés au cours de ce projet représentent une bonne première étape dans le développement de l'utilisation des sels de bicarbonate comme source de carbone. Ce projet était principalement concentré autour de l'utilisation du bicarbonate dans des cultures autotrophes. Il serait aussi pertinent d'évaluer son potentiel en mixotrophie (présence combinée de bicarbonate de substrats organiques), au cours de travaux futurs, notamment dans une optique de valorisation de rejets polluants. L'étude de l'impact de l'utilisation du bicarbonate comme source de carbone sur la composition de *S. obliquus* pourrait aussi intéresser des équipes de chercheurs élargies et des industriels. Déjà, la couleur, la grosseur et l'agrégation des cellules croissant avec du bicarbonate étaient significativement différentes de celles croissant avec du CO₂, ce qui laisse entrevoir des différences significatives également à d'autres niveaux. De tels travaux ont déjà porté sur la fraction

lipidique et l'amidon, mais il serait intéressant d'évaluer d'autres fractions, par exemple la production d'exopolymères ou de pigments d'intérêt industriel stimulée par l'utilisation de sels de bicarbonate.

Annexe II Informations supplémentaires de l'article (Chapitre 4) *Development and validation of an in situ and real-time quantification method for bicarbonate, carbonate and orthophosphate ions by ATR-FTIR spectroscopy in aqueous solutions* publié dans le journal *Analyst*



C:\Program Files\OPUS_65\Meas\Developpement Bicarbonate 2\DEV_Bicarbonate_POM_2016-03-23_190	DEV_Bicarbonate_POM_2016-03-07	19/04/2016
C:\Program Files\OPUS_65\Meas\Developpement Bicarbonate 2\Carbonate univarié\DEV_Carbonate_POM_2016-04-20_127	DEV_Bicarbonate_02/05/2016	
C:\Program Files\OPUS_65\Meas\Developpement Bicarbonate 2\H2PO4- univarié\DEV_H2PO4- POM_2016-05-06_65	DEV_H2PO4- POM_2016-05-06_65	09/05/2016
C:\Program Files\OPUS_65\Meas\Developpement Bicarbonate 2\HPO4 2- univarié\DEV_H2PO4- POM_2016-05-13_40	DEV_HPO4 2- POM_2016-05-13_40	13/05/2016

Page 1/1

Figure S1 ATR FT-IR absorption spectra for bicarbonate (black), carbonate (red), dihydrogenophosphate (green) and hydrogenophosphate (blue line)

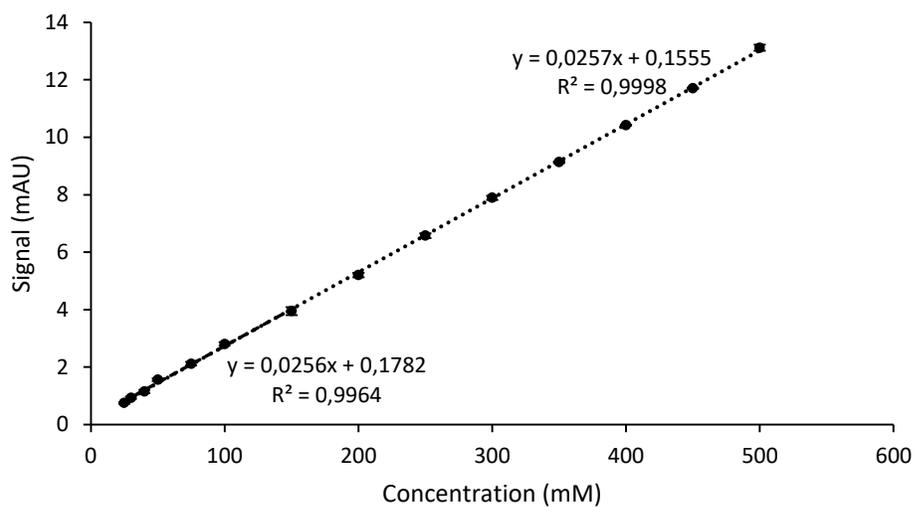


Figure S2 Univariate calibration curve and linearity for bicarbonate

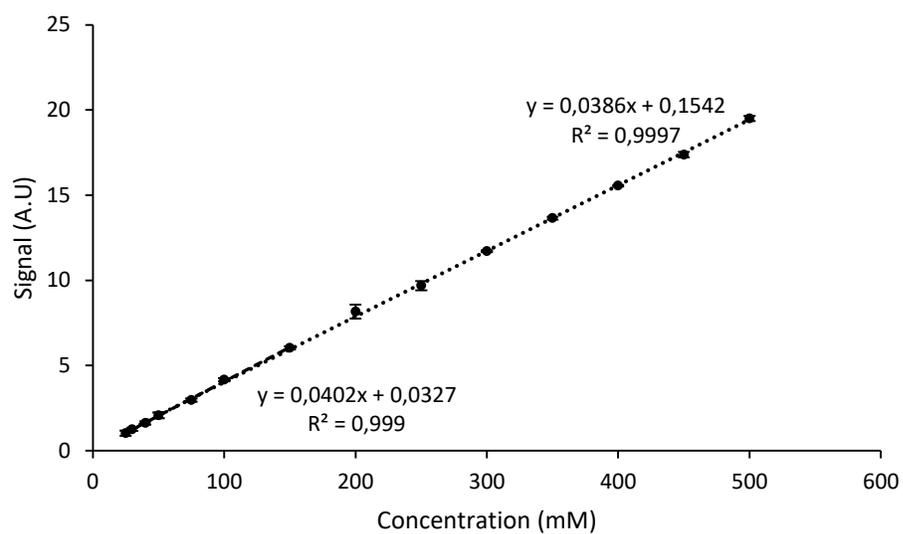


Figure S3 Univariate calibration curve and linearity for carbonate

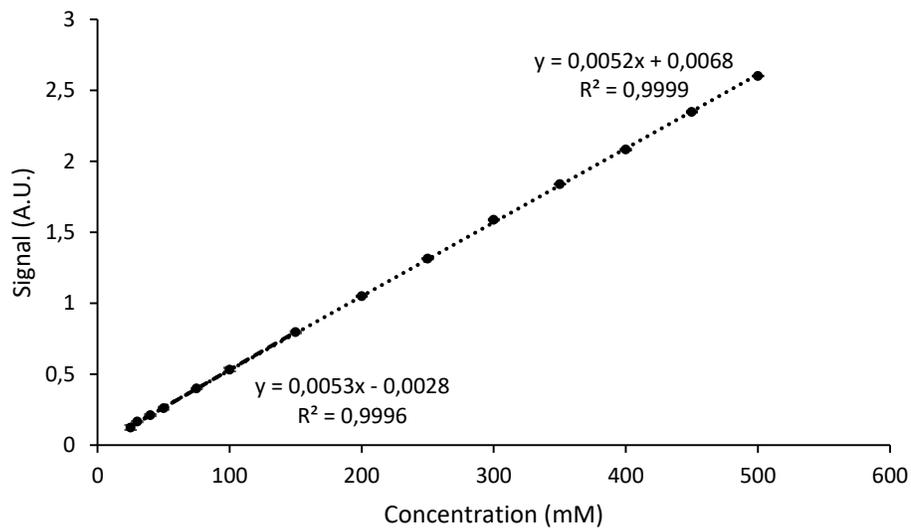


Figure S4 Univariate calibration curve and linearity for dihydrogenophosphate

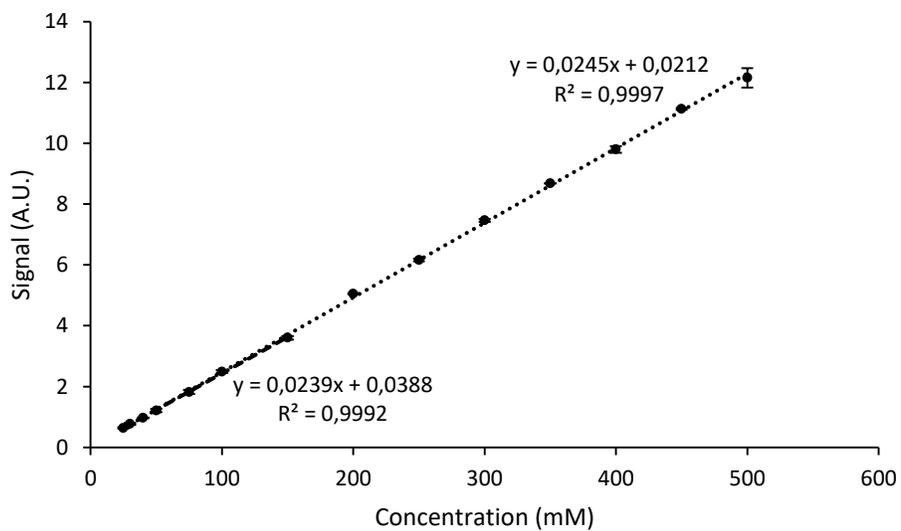


Figure S5 Univariate calibration curve and linearity for hydrogenophosphate

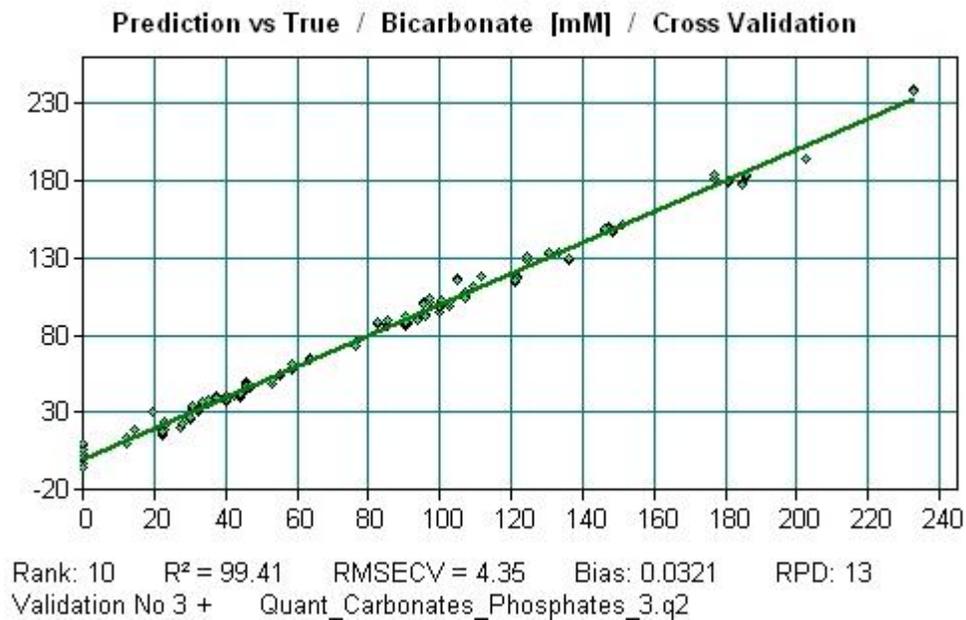


Figure S6 Multivariate model cross-validation curve and data for bicarbonate

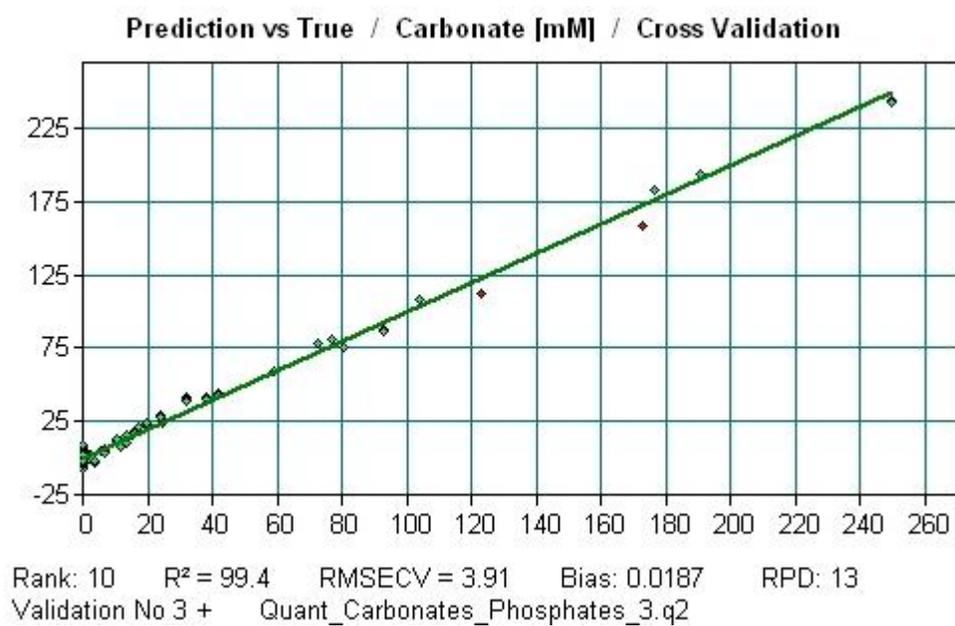


Figure S7 Multivariate model cross-validation curve and data for carbonate

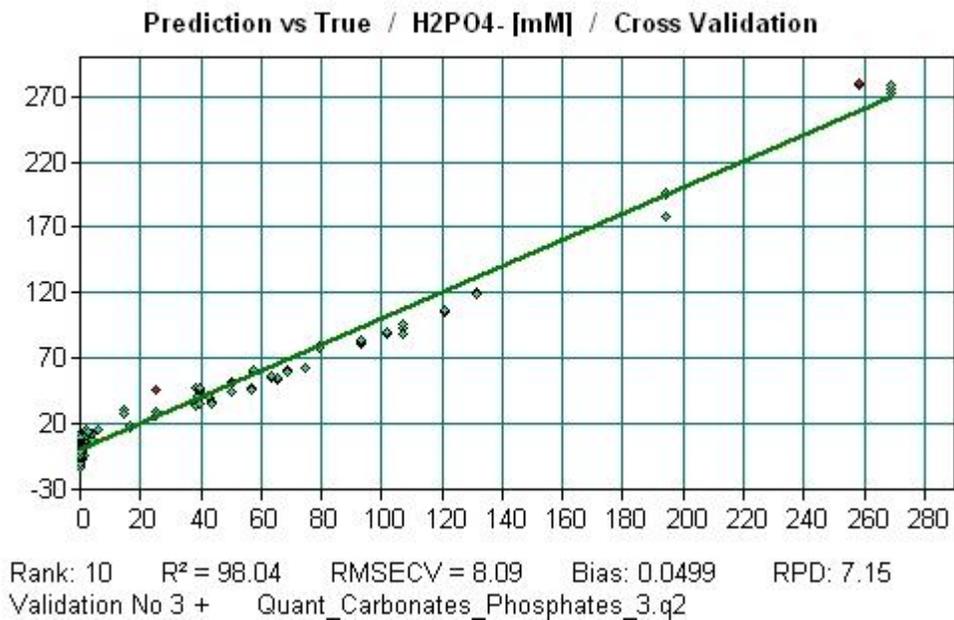


Figure S8 Multivariate model cross-validation curve and data for dihydrogenophosphate

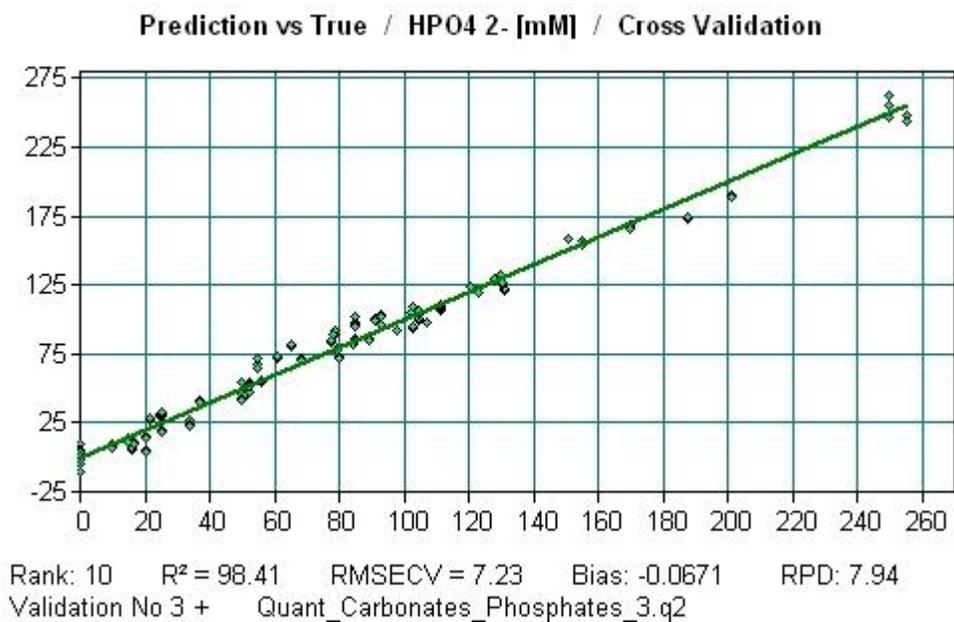


Figure S9 Multivariate model cross-validation curve and data for hydrogenophosphate

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdo, S. M., Abo El-Enin, S. A., El-Khatib, K. M., El-Galad, M. I., Wahba, S. Z., El Diwani, G., & Ali, G. H. (2016). Preliminary economic assessment of biofuel production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.119>
- Adesanya, V. O., Davey, M. P., Scott, S. a., & Smith, A. G. (2014). Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource Technology*, *157*, 293–304. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.032>
- Advanced biofuels research and development. (2017). Retrieved December 8, 2017, from <http://corporate.exxonmobil.com/en/energy/research-and-development/advanced-biofuels/advanced-biofuels-overview>
- Ahmad, A. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 584–593. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
- Ahmad, F. B., Zhang, Z., Doherty, W. O. S., & O'Hara, I. M. (2015). A multi-criteria analysis approach for ranking and selection of microorganisms for the production of oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *190*, 264–273. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.083>
- Al-Maamary, H. M. S., Kazem, H. A., & Chaichan, M. T. (2017). The impact of oil price fluctuations on common renewable energies in GCC countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *75*, 989–1007. <http://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.079>
- Ale, M. T., Pinelo, M., & Meyer, A. S. (2014). Assessing effects and interactions among key variables affecting the growth of mixotrophic microalgae: PH, inoculum volume, and growth medium composition. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *44*(3), 242–256. <http://doi.org/10.1080/10826068.2013.812562>
- Algaecan Biotech Ltd. (2017). Retrieved December 8, 2017, from <http://algaecan.com/>
- Algatech. (2017). Retrieved December 8, 2017, from <https://www.algatech.com/>
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, *88*(10), 3402–3410.

<http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>

- Amaro, H. M., Macedo, Â. C., & Malcata, F. X. (2012). Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? *Energy*, *44*(1), 158–166. <http://doi.org/10.1016/j.energy.2012.05.006>
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2013). Photobiotreatment: Influence of Nitrogen and Phosphorus Ratio in Wastewater on Growth Kinetics of *Scenedesmus Obliquus*. *International Journal of Phytoremediation*, *15*(8), 774–788. <http://doi.org/10.1080/15226514.2012.735291>
- Arnold, A. A., Genard, B., Zito, F., Tremblay, R., Warschawski, D. E., & Marcotte, I. (2015). Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ¹³C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1848*(1), 369–377. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.017>
- Asif, M., Bak, C., Saleem, M. W., & Kim, W.-S. (2015). Performance evaluation of integrated gasification combined cycle (IGCC) utilizing a blended solution of ammonia and 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) for CO₂ capture. *Fuel*, *160*, 513–524. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.08.008>
- Aslam, A., Thomas-Hall, S. R., Mughal, T. A., & Schenk, P. M. (2017). Selection and adaptation of microalgae to growth in 100% unfiltered coal-fired flue gas. *Bioresource Technology*, *233*, 271–283. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.111>
- Atkins, P., & de Paula, J. (2009). *The Elements of Physical Chemistry*. (W. H. Freeman and Company, Ed.) (5th ed.). New York: Oxford University Press. Retrieved from http://www.kinetics.nsc.ru/chichinin/books/Chem_Phys/Atkins09.pdf
- Baba, M., & Shiraiwa, Y. (2007). High-CO₂ Response Mechanisms in Microalgae. *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*, *2*, 299–320. <http://doi.org/10.5772/27737>
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowlees, D. C., Leggat, W., & Price, G. D. (1998). The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Canadian Journal of Botany*, *76*(6), 1052–1071. <http://doi.org/10.1139/b98-074>
- Bai, H., & Yeh, A. C. (1997). Removal of CO₂ Greenhouse Gas by Ammonia Scrubbing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *36*(6), 2490–2493. <http://doi.org/10.1021/ie960748j>
- Baldassarre, M., & Barth, A. (2014). The carbonate/bicarbonate system as a pH indicator for infrared spectroscopy. *The Analyst*, *139*(9), 2167. <http://doi.org/10.1039/c3an02331a>
- Barranguet, C., Veuger, B., Van Beusekom, S. A. M., Marvan, P., Sinke, J. J., & Admiraal,

- W. (2005). Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. *European Journal of Phycology*, 40(1), 1–8. <http://doi.org/10.1080/09670260400009882>
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489–1500. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Bastidas-Oyanedel, J.-R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 473–498. <http://doi.org/10.1007/s11157-015-9369-3>
- Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma, N. K., Shukla, M., & Kumar, S. (2014). Scope of algae as third generation biofuels. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 90. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00090>
- Benavides, M., Hantson, A. L., Van Impe, J., & Vande Wouwer, A. (2015). Parameter identification of Droop model: an experimental case study. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(9), 1783–1793. <http://doi.org/10.1007/s00449-015-1419-2>
- Bernard, O., Masci, P., & Sciandra, A. (2009). A photobioreactor model in nitrogen limited conditions. In *MATHMOD 09 Vienna* (Vol. I, pp. 1521–1530).
- Bernhard, S. A. (1956). Ionization constants and heats of tris (hydroxymethyl) aminomethane and phosphate buffers. *Journal of Biological Chemistry*, 218(2), 961. Retrieved from <http://www.jbc.org/>
- Beuvier, T., Calvignac, B., Bardeau, J.-F., Bulou, A., Boury, F., & Gibaud, A. (2014a). Quantification of the Dissolved Inorganic Carbon Species and of the pH of Alkaline Solutions Exposed to CO₂ under Pressure: A Novel Approach by Raman Scattering.
- Beuvier, T., Calvignac, B., Bardeau, J.-F., Bulou, A., Boury, F., & Gibaud, A. (2014b). Quantification of the Dissolved Inorganic Carbon Species and of the pH of Alkaline Solutions Exposed to CO₂ under Pressure: A Novel Approach by Raman Scattering. *Analytical Chemistry*, 86(19), 9895–9900.
- Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Ranjith Kumar, R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., ... Palani, S. (2015). Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 634–653. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.047>
- Bhardwaj, N. K., Dang, V. Q., & Nguyen, K. L. (2006). Determination of carboxyl content in high-yield kraft pulps using photoacoustic rapid-scan Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 78(19), 6818–6825.

<http://doi.org/10.1021/ac0605952>

- Bilanovic, D., Holland, M., & Armon, R. (2012). Microalgal CO₂ sequestering – Modeling microalgae production costs. *Energy Conversion and Management*, 58, 104–109. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.01.007>
- Bisutti, I., Hilke, I., & Raessler, M. (2004). Determination of total organic carbon - An overview of current methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(10–11), 716–726. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2004.09.003>
- Bolland, O., & Mathieu, P. (1998). Comparison of two CO₂ removal options in combined cycle power plants. *Energy Conversion and Management*, 39(16–18), 1653–1663. [http://doi.org/10.1016/S0196-8904\(98\)00078-8](http://doi.org/10.1016/S0196-8904(98)00078-8)
- Bonaventura, D., Chacartegui, R., Valverde, J. M., Becerra, J. A., & Verda, V. (2017). Carbon capture and utilization for sodium bicarbonate production assisted by solar thermal power. *Energy Conversion and Management*, 149, 860–874. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.03.042>
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 3–15. <http://doi.org/10.1007/BF00003544>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 313–321. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756. <http://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Brennan, L., & Owende, P. (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. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Buono, S., Colucci, A., Angelini, A., Langellotti, A. L., Massa, M., Martello, A., ... Dibenedetto, A. (2016). Productivity and biochemical composition of *Tetradismus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum*: effects of different cultivation approaches. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3179–3192. <http://doi.org/10.1007/s10811-016-0876-6>
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369. <http://doi.org/10.1016/J.RSER.2012.11.030>
- Cardon, Z. G., Peredo, E. L., Dohnalkova, A. C., Gershon, H. L., & Bezanilla, M. (2018).

- A model suite of green algae within the Scenedesmaceae for investigating contrasting desiccation tolerance and morphology. *Journal of Cell Science*, 131(7), jcs212233. <http://doi.org/10.1242/jcs.212233>
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2014). *Détermination de l'alcalinité et de l'acidité : méthode titrimétrique automatisée* (Vol. 15). Retrieved from <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA315AlcAci10.pdf>
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2016). *Détermination du carbone inorganique dissous, du carbone organique dissous et du carbone organique total : méthode par détection infrarouge* (No. Rév. 6). Québec. Retrieved from <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA300C10.pdf>
- Chaouch, M., Diouf, P. N., Laghdir, A., & Yin, S. (2014). Bio-oil from whole-tree feedstock in resol-type phenolic resins. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(6), n/a-n/a. <http://doi.org/10.1002/app.40014>
- Chen, F., & Johns, M. R. (1991). Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 3(3), 203–209. <http://doi.org/10.1007/BF00003578>
- Chen, H. H., & Jiang, J. G. (2017, September 20). Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03495>
- Chen, J.-C., Fang, G.-C., Tang, J.-T., & Liu, L.-P. (2005). Removal of carbon dioxide by a spray dryer. *Chemosphere*, 59(1), 99–105. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.076>
- Cherif, M., & Loreau, M. (2010). Towards a more biologically realistic use of Droop's equations to model growth under multiple nutrient limitation. *Oikos*, 119(6), 897–907. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18397.x>
- Chi, Z., O'Fallon, J. V., & Chen, S. (2011). Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends in Biotechnology*, 29(11), 537–541. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Claxton, R., & Das, K. C. (2010). Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. *Bioresource Technology*, 101(17), 6751–6760. <http://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.03.094>
- Cocker, M. (2012). Tech Facts - Low Cost Photobioreactor for Algae Cultivation.
- Colman, B., & Rotatore, C. (1995). Photosynthetic inorganic carbon uptake and accumulation in two marine diatoms. *Plant, Cell and Environment*, 18(8), 919–924. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00601.x>

- CONTOIS, D. E. (1959). Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. *Journal of General Microbiology*, 21(1), 40–50. <http://doi.org/10.1099/00221287-21-1-40>
- Conzen, J. P. (2006). *Multivariate Calibration. A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry*. Ettlingen: Bruker Optik GmbH. Retrieved from <http://files.nocnt.ru/hardware/science/senterra/opus65-doc-en/quant.pdf>
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190–209. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>
- Cunningham, F. X., & Gantt, E. (1998). Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 557–583. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.557>
- Czyrnek-Delêtre, M. M., Smyth, B. M., & Murphy, J. D. (2017). Beyond carbon and energy: The challenge in setting guidelines for life cycle assessment of biofuel systems. *Renewable Energy*, 105, 436–448. <http://doi.org/10.1016/J.RENENE.2016.11.043>
- D'Aoust, M.-A., Couture, M. M.-J., Charland, N., Trépanier, S., Landry, N., Ors, F., & Vézina, L.-P. (2010). The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 607–619. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x>
- Dafner, E. V., & Wangersky, P. J. (2002). A brief overview of modern directions in marine DOC studies Part IFor Part I see ref. 52.—Recent progress in marine DOC studies. *Journal of Environmental Monitoring*, 4(1), 55–69. <http://doi.org/10.1039/b107279j>
- Davis, R., Aden, A., & Pienkos, P. T. (2011). Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied Energy*, 88(10), 3524–3531. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.04.018>
- Dayananda, C., Sarada, R., Usha Rani, M., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31(1), 87–93. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.05.001>
- de Winter, L., Cabanelas, I. T. D., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2017). The influence of day/night cycles on biomass yield and composition of *Neochloris oleoabundans*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 104. <http://doi.org/10.1186/s13068-017-0762-8>

- del Valle, J. M. (2014). Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: Going from the laboratory to the industrial application. *The Journal of Supercritical Fluids*, *96*, 180–199. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.001>
- Deschênes, J.-S., Boudreau, A., & Tremblay, R. (2015). Mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors: Practicability and process considerations. *Algal Research*, *10*, 80–86. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.015>
- Deschênes, J.-S., & Vande Wouwer, A. (2016). Parameter Identification of a Dynamic Model of Cultures of Microalgae *Scenedesmus obliquus*- An experimental study. *IFAC-PapersOnLine*, *49*(7), 1050–1055. <http://doi.org/10.1016/J.IFACOL.2016.07.341>
- Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P., & Willats, W. G. T. (2012). The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 82. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Doucha, J., Straka, F., & Lívanský, K. (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. <http://doi.org/10.1007/s10811-005-8701-7>
- Droop, M. R. (1973). SOME THOUGHTS ON NUTRIENT LIMITATION IN ALGAE. *Journal of Phycology*, *9*(3), 264–272. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1973.tb04092.x>
- Falk, M., Gil, M., & Iza, N. (1990). Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT-IR study. *Canadian Journal of Chemistry*, *68*(8), 1293–1299. <http://doi.org/10.1139/v90-199>
- Farrell, A. E. (2006). Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. *Science*. American Association for the Advancement of Science. <http://doi.org/10.1126/science.1121416>
- Feldmann, H. (Cytologist), & Branduardi, P. (2012). *Yeast: molecular and cell biology*. Wiley-Blackwell.
- Filella, M., & Rodríguez-Murillo, J. (2014). Long-term Trends of Organic Carbon Concentrations in Freshwaters: Strengths and Weaknesses of Existing Evidence. *Water*, *6*(5), 1360–1418. <http://doi.org/10.3390/w6051360>
- Gadaleta, S. J., Paschalis, E. P., Betts, F., Mendelsohn, R., & Boskey, A. L. (1996). Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Solution-Mediated Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Hydroxyapatite: New Correlations Between X-Ray Diffraction and Infrared Data. *Calcified Tissue International*, *58*, 9–16. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF02509540.pdf>
- Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. (2015). Glucose: Detection and analysis.

Food Chemistry, 188, 149–160. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.071>

- Garand, E., Wende, T., Goebbert, D. J., Bergmann, R., Meijer, G., Neumark, D. M., & Asmis, K. R. (2010a). Infrared spectroscopy of hydrated bicarbonate anion clusters: $\text{HCO}_3^- (\text{H}_2\text{O})_{1-10}$. *Journal of the American Chemical Society*, 132(2), 849–856. <http://doi.org/10.1021/ja9093132>
- Garand, E., Wende, T., Goebbert, D. J., Bergmann, R., Meijer, G., Neumark, D. M., & Asmis, K. R. (2010b). Infrared Spectroscopy of Hydrated Bicarbonate Anion Clusters: $\text{HCO}_3^- (\text{H}_2\text{O})_{1-10}$. *Journal of the American Chemical Society*, 132(2), 849–856. <http://doi.org/10.1021/ja9093132>
- Gardner, R. D., Cooksey, K. E., Mus, F., Macur, R., Moll, K., Eustance, E., ... Peyton, B. M. (2012). Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1311–1320. <http://doi.org/10.1007/s10811-011-9782-0>
- Gardner, R. D., Lohman, E., Gerlach, R., Cooksey, K. E., & Peyton, B. M. (2013a). Comparison of CO_2 and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 87–96. <http://doi.org/10.1002/bit.24592>
- Gardner, R. D., Lohman, E., Gerlach, R., Cooksey, K. E., & Peyton, B. M. (2013b). Comparison of CO_2 and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 87–96. <http://doi.org/10.1002/bit.24592>
- Gardner, R., Lohman, E., Cooksey, K., Gerlach, R., & Peyton, B. (2013). Cellular Cycling, Carbon Utilization, and Photosynthetic Oxygen Production during Bicarbonate-Induced Triacylglycerol Accumulation in a *Scenedesmus* sp. *Energies*, 6(11), 6060–6076. <http://doi.org/10.3390/en6116060>
- Geider, R., & La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1–17. <http://doi.org/10.1017/S0967026201003456>
- Gerardo, M. L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T., & Skill, S. C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, 11, 248–262. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.019>
- Ghoddusi, H. (2017). Price risks for biofuel producers in a deregulated market. *Renewable Energy*, 114(PB), 394–407. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.044>
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. A., & Rev Plant Biol, A. (2005). CO_2 Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution.

<http://doi.org/10.1146/>

- Girard, J. B. (2014). *CULTURE DE MICROALGUES MIXOTROPHES POUR LA*. Université de Sherbrooke.
- Girard, J., Deschênes, J., Tremblay, R., & Gagnon, J. (2013). FT-IR / ATR univariate and multivariate calibration models for in situ monitoring of sugars in complex microalgal culture media. *Bioresource Technology*, *144*, 664–668.
- Girard, J. M., Roy, M. L., Hafsa, M. Ben, Gagnon, J., Fauchoux, N., Heitz, M., ... Deschênes, J. S. (2014). Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, *5*, 241–248. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.002>
- González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., & García-González, M. C. (2010). Open and enclosed photobioreactors comparison in terms of organic matter utilization, biomass chemical profile and photosynthetic efficiency. *Ecological Engineering*, *36*(10), 1497–1501. <http://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2010.07.007>
- Gris, B., Morosinotto, T., Giacometti, G. M., Bertucco, A., & Sforza, E. (2014). Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(5), 2377–89. <http://doi.org/10.1007/s12010-013-0679-z>
- Grobbelaar, J. U. (2007). Algal Nutrition – Mineral Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 95–115). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <http://doi.org/10.1002/9780470995280.ch6>
- Guangmin, L., Lina, Q., Hong, Z., Shumei, X., & Dan, Z. (2014). The Capacity of Bicarbonate Capture of a Continuous Microalgae Photo-bioreactor System. *Energy Procedia*, *61*, 361–364. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.11.1125>
- Guckert, J. B., & Cooksey, K. E. (1990). TRIGLYCERIDE ACCUMULATION AND FATTY ACID PROFILE CHANGES IN CHLORELLA (CHLOROPHYTA) DURING HIGH pH-INDUCED CELL CYCLE INHIBITION1. *Journal of Phycology*, *26*(1), 72–79. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00072.x>
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., & Bux, F. (2014). Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel*, *128*, 46–52. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.059>
- Guo, S.-L., Zhao, X.-Q., Wan, C., Huang, Z.-Y., Yang, Y.-L., Asraful Alam, M., ... Chang, J.-S. (2013). Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest. *Bioresource Technology*, *145*, 285–289. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.120>
- Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents

- by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1), 74–79. <http://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.05.008>
- Haaland, D. M., & Thomas, E. V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*, 60(11), 1193–1202. <http://doi.org/10.1021/ac00162a020>
- Hall, P. O. J., & Aller, R. C. (1992). Rapid, small-volume, flow injection analysis for SCO₂, and NH₄⁺ in marine and freshwaters. *Limnology and Oceanography*, 37(5), 1113–1119. <http://doi.org/10.4319/lo.1992.37.5.1113>
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 287–297. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., & Kojima, I. (1996). Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 83–87. <http://doi.org/10.1021/np960017o>
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences. <http://doi.org/10.1073/pnas.0604600103>
- Ho, S.-H., Kondo, A., Hasunuma, T., & Chang, J.-S. (2013). Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 143, 163–71. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.043>
- Hua, M., Zhang, S., Pan, B., Zhang, W., Lv, L., & Zhang, Q. (2012). Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 211–212, 317–331. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.016>
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329. <http://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306–310. <http://doi.org/10.1016/j.cep.2008.04.007>
- Javed, K. H., Mahmud, T., & Purba, E. (2010). The CO₂ capture performance of a high-intensity vortex spray scrubber. *Chemical Engineering Journal*, 162(2), 448–456. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.038>

- Jones, D. L., & Willett, V. B. (2006). Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 991–999. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.012>
- Joshi, S., Kalyanasundaram, S., & Balasubramanian, V. (2013). Quantitative Analysis of Sodium Carbonate and Sodium Bicarbonate in Solid Mixtures Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). *Applied Spectroscopy*, 67(8), 841–845. <http://doi.org/10.1366/12-06915>
- Jung, J.-Y., Lee, H., Shin, W.-S., Sung, M.-G., Kwon, J.-H., & Yang, J.-W. (2015). Utilization of seawater for cost-effective cultivation and harvesting of *Scenedesmus obliquus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(3), 449–455. <http://doi.org/10.1007/s00449-014-1284-4>
- Khoshmanesh, A., Cook, P. L. M., & Wood, B. R. (2012). Quantitative determination of polyphosphate in sediments using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and partial least squares regression. *The Analyst*, 137(16), 3704. <http://doi.org/10.1039/c2an35289c>
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., ... Yang, J. W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(6), 862–876. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.006>
- Kim, S., Lee, Y., & Hwang, S.-J. (2013). Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 511–516. <http://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2013.05.025>
- King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213–218. [http://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00051-6](http://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6)
- Klahn, M., Mathias, G., Kotting, C., Nonella, M., Schlitter, J., Gerwert, K., & Tavan, P. (2004). IR Spectra of Phosphate Ions in Aqueous Solution: Predictions of a DFT / MM Approach Compared with Observations. *Journal Of Physical Chemistry A*, 108(29), 6186–6194. <http://doi.org/10.1021/jp048617g>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6, 52–63. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Kotzabasis, K., & Dörnemann, D. (1998). Differential Changes in the Photosynthetic Pigments and Polyamine Content during Photoadaptation and Photoinhibition in the Unicellular Green Alga *Scenedesmus obliquus*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 53(6), 833–840. Retrieved from http://zfn.mpg.de/data/Reihe_C/53/ZNC-1998-

- Lackner, K. S. (2013). The thermodynamics of direct air capture of carbon dioxide. *Energy*, *50*, 38–46. <http://doi.org/10.1016/j.energy.2012.09.012>
- Lackner, K. S., Brennan, S., Matter, J. M., Park, A.-H. A., Wright, A., & van der Zwaan, B. (2012). The urgency of the development of CO₂ capture from ambient air. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(33), 13156–13162. <http://doi.org/10.1073/pnas.1108765109>
- Lam, M. K., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2012). Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, *10*, 456–469. <http://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, *31*(7), 1043–1049. <http://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>
- Liu, B., Luo, X., Rongwong, W., Idem, R., & Liang, Z. (2016). CO₂ solubility and liquid phase ion speciation determined by C NMR13 technique in IPAB-CO₂-H₂O system. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, *50*, 190–197. <http://doi.org/10.1016/j.ijggc.2016.04.027>
- Lohman, E. J., Gardner, R. D., Halverson, L., Macur, R. E., Peyton, B. M., & Gerlach, R. (2013). An efficient and scalable extraction and quantification method for algal derived biofuel. *Journal of Microbiological Methods*, *94*(3), 235–44. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.007>
- López Barreiro, D., Prins, W., Ronsse, F., & Brilman, W. (2013). Hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae for biofuel production: State of the art review and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, *53*, 113–127. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.029>
- Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (2006). *Plant cell culture protocols*. Humana Press. Retrieved from [https://books.google.ca/books?id=sZ_2HIWsHQIC&pg=PA55&lpg=PA55&dq=dry+weight+measurement+conical+tube&source=bl&ots=iNwijVS01y&sig=3iP9utVnjayUm_CpLo39q4Chmtw&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjxk5bR6qbZAhUk0IMKHZVWAp4Q6AEINDAB#v=onepage&q=dry weight measurement conical tube&f=false](https://books.google.ca/books?id=sZ_2HIWsHQIC&pg=PA55&lpg=PA55&dq=dry+weight+measurement+conical+tube&source=bl&ots=iNwijVS01y&sig=3iP9utVnjayUm_CpLo39q4Chmtw&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjxk5bR6qbZAhUk0IMKHZVWAp4Q6AEINDAB#v=onepage&q=dry%20weight%20measurement%20conical%20tube&f=false)
- Maestre, S. E., Mora, J., Hernandis, V., & Todoli, J. L. (2003). A system for the direct determination of the nonvolatile organic carbon, dissolved organic carbon, and inorganic carbon in water samples through inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, *75*(1), 111–117. <http://doi.org/10.1021/ac025980f>

- Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, *74*(1), 3–16. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mata, T. M., Melo, A. C., Simões, M., & Caetano, N. S. (2012). Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, *107*, 151–158. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.109>
- Meyer, M., & Griffiths, H. (2013). Origins and diversity of eukaryotic CO₂-concentrating mechanisms: Lessons for the future. *Journal of Experimental Botany*, *64*(3), 769–786. <http://doi.org/10.1093/jxb/ers390>
- Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *10*(1), 31–41. <http://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>
- Miqueleto, A. P., Dolosic, C. C., Pozzi, E., Foresti, E., & Zaiat, M. (2010). Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, *101*(4), 1324–1330. <http://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.09.026>
- Mokashi, K., Shetty, V., George, S. A., & Sibi, G. (2016). Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris*. *Achievements in the Life Sciences*, *10*(1), 111–117. <http://doi.org/10.1016/j.als.2016.05.011>
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, *3*(1), 371–394. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Monser, L., Adhoum, N., & Sadok, S. (2004). Gas diffusion-flow injection determination of total inorganic carbon in water using tungsten oxide electrode. *Talanta*, *62*(2), 389–394. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.08.008>
- Moroney, J. V., Ma, Y., Frey, W. D., Fusilier, K. A., Pham, T. T., Simms, T. A., ... Mukherjee, B. (2011). The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynthesis Research*, *109*(1–3), 133–149. <http://doi.org/10.1007/s11120-011-9635-3>
- Moroney, J. V., & Ynalvez, R. A. (2007a). Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, *6*(8), 1251–1259. <http://doi.org/10.1128/EC.00064-07>
- Moroney, J. V., & Ynalvez, R. A. (2007b). Proposed Carbon Dioxide Concentrating

- Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1251–1259. <http://doi.org/10.1128/EC.00064-07>
- Mulders, K. J. M., Lamers, P. P., Wijffels, R. H., & Martens, D. E. (2015). Dynamics of biomass composition and growth during recovery of nitrogen-starved *Chromochloris zofingiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1873–84. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-6181-x>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Natural Astaxanthin. (2017). Retrieved December 8, 2017, from <http://algix.com/tag/natural-astaxanthin/>
- Nayak, M., Karemore, A., & Sen, R. (2016). Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research*, 16, 216–223. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.020>
- Nguyen, T. T., Bui, X. T., Pham, M. D., Guo, W., & Ngo, H. H. (2016). Effect of Tris-(hydroxymethyl)-amino methane on microalgae biomass growth in a photobioreactor. *Bioresource Technology*, 208, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.043>
- Nickolov, Z. S., Ozcan, O., & Miller, J. D. (2003). FTIR analysis of water structure and its significance in the flotation of sodium carbonate and sodium bicarbonate salts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 224(1–3), 231–239. [http://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00317-0](http://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00317-0)
- Ohta, S., Shiomi, Y., Kawashima, A., Aozasa, O., Nakao, T., Nagate, T., ... Miyata, H. (1995). Antibiotic effect of linolenic acid from *Chlorococcum* strain HS-101 and *Dunaliella primolecta* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Phycology*, 7(2), 121–127. <http://doi.org/10.1007/BF00693057>
- Oliver, B. G., & Davis, A. R. (1973). Vibrational Spectroscopic Studies of Aqueous Alkali Metal Bicarbonate and Carbonate Solutions. *Canadian Journal of Chemistry*, 51(5), 698–702. <http://doi.org/10.1139/v73-106>
- Organisation de coopération et de développement économiques. (2017). Biotechnology Statistics - Belgium - OECD. Retrieved December 8, 2017, from <http://www.oecd.org/sti/biotech/biotechnologystatistics-belgium.htm>
- Pacheco, R., Ferreira, A. F., Pinto, T., Nobre, B. P., Loureiro, D., Moura, P., ... Silva, C. M. (2015). The production of pigments & hydrogen through a *Spirogyra* sp. biorefinery. *Energy Conversion and Management*, 89, 789–797. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.10.040>

- Paudel, A., Jessop, M. J., Stubbins, S. H., Champagne, P., & Jessop, P. G. (2015). Extraction of lipids from microalgae using CO₂-expanded methanol and liquid CO₂. *Bioresource Technology*, *184*, 286–90. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.111>
- Pawlowski, A., Mendoza, J. L., Guzmán, J. L., Berenguel, M., Ación, F. G., & Dormido, S. (2014). Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. *Bioresource Technology*, *170*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.07.088>
- Pencharee, S., Faber, P. A., Ellis, P. S., Cook, P., Intaraprasert, J., Grudpan, K., & McKelvie, I. D. (2012). Underway determination of dissolved inorganic carbon in estuarine waters by gas-diffusion flow analysis with C₄D detection. *Analytical Methods*, *4*(5), 1278. <http://doi.org/10.1039/c2ay25113b>
- Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*, *235*, 34–44. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.033>
- Pragya, N., Pandey, K. K., & Sahoo, P. K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *24*, 159–171. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.034>
- Pratt, S., & Yuan, Z. (2009). Quantification of the effect of CO₂ transfer on titrimetric techniques used for the study of biological wastewater treatment processes. *Water SA*, *33*(1), 117–122. <http://doi.org/10.4314/wsa.v33i1.48785>
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *26*(3), 1359–1377. <http://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>
- Quadrelli, E. A., Centi, G., Duplan, J. L., & Perathoner, S. (2011). Carbon dioxide recycling: Emerging large-scale technologies with industrial potential. *ChemSusChem*, *4*(9), 1194–1215. <http://doi.org/10.1002/cssc.201100473>
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., ... Cotta, M. A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*, *34*(4), 566–571. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.12.023>
- Radmer, R., & Ollinger, O. (1980). Light-driven Uptake of Oxygen, Carbon Dioxide, and Bicarbonate by the Green Alga *Scenedesmus*. *Plant Physiology*, *65*(4), 723–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=440412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ranjan, M., & Herzog, H. J. (2011). Feasibility of air capture. *Energy Procedia*, *4*, 2869–

2876. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.02.193>

- Raso, S., van Genugten, B., Vermuë, M., & Wijffels, R. H. (2012). Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 863–871. <http://doi.org/10.1007/s10811-011-9706-z>
- Rauh, F., & Mizaikoff, B. (2016). Simultaneous quantification of ion pairs in water via infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Analytical Methods*, 8(10), 2164–2169. <http://doi.org/10.1039/c5ay02874d>
- Raven, J. A. (1997a). CO₂-concentrating mechanisms: A direct role for thylakoid lumen acidification? *Plant, Cell and Environment*, 20(2), 147–154. <http://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-67.x>
- Raven, J. A. (1997b). Inorganic Carbon Acquisition by Marine Autotrophs. *Advances in Botanical Research*, 27, 85–209. [http://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60281-5](http://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60281-5)
- Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S., & de Lasa, H. (2013). Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622–653. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>
- Redfield, A. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 11(6), 205–221. <http://doi.org/10.5194/bg-11-1599-2014>
- Richardson, J. W., Johnson, M. D., & Outlaw, J. L. (2012). Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Research*, 1(1), 93–100. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2012.04.001>
- Richardson, J. W., Johnson, M. D., Zhang, X., Zemke, P., Chen, W., & Hu, Q. (2014). A financial assessment of two alternative cultivation systems and their contributions to algae biofuel economic viability. *Algal Research*, 4(1), 96–104. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.003>
- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176. <http://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Rolland, N., Dorne, A. J., Amoroso, G., Sültemeyer, D. F., Joyard, J., & Rochaix, J. D. (1997). Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *The EMBO Journal*, 16(22), 6713–26. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6713>
- Rudolph, W. W., Fischer, D., & Irmer, G. (2006a). Vibrational Spectroscopic Studies and Density Functional Theory Calculations of Speciation in the CO₂-Water System. *Applied Spectroscopy*, 60(2), 130–

144. <http://doi.org/10.1366/000370206776023421>
- Rudolph, W. W., Fischer, D., & Irmer, G. (2006b). Vibrational Spectroscopic Studies and Density Functional Theory Calculations of Speciation in the CO₂—Water System. *Applied Spectroscopy*, *60*(2), 130–144. <http://doi.org/10.1366/000370206776023421>
- Rudolph, W. W., Irmer, G., & Königsberger, E. (2008). Speciation studies in aqueous HCO₃⁻—CO₃²⁻ solutions. A combined Raman spectroscopic and thermodynamic study. *Dalton Trans.*, *0*(7), 900–908. <http://doi.org/10.1039/B713254A>
- Salim, S., Kosterink, N. R., Tchetskoua Wacka, N. D., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2014). Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*. *Journal of Biotechnology*, *174*, 34–38. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.01.026>
- Sambusiti, C., Bellucci, M., Zabaniotou, A., Beneduce, L., & Monlau, F. (2015). Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *44*, 20–36. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.12.013>
- Sauer, G. R., Zunic, W. B., Durig, J. R., & Wuthier, R. E. (1994). Fourier transform raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. *Calcified Tissue International*, *54*(5), 414–420. <http://doi.org/10.1007/BF00305529>
- Scherbakov, P., Ismagulova, T., Chernov, T., Gorelova, O., Selyakh, I., Semenova, L., ... Solovchenko, A. (2017). A new subarctic strain of *Tetrademus obliquus*. Part II: comparative studies of CO₂-stress tolerance. *Journal of Applied Phycology*, 1–11. <http://doi.org/10.1007/s10811-017-1334-9>
- Scherholz, M. L., & Curtis, W. R. (2013). Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnology*, *13*(1), 39. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-13-39>
- Schlee, J., & Komor, E. (1986). Ammonium uptake by *Chlorella*. *Planta*, *168*(2), 232–238. <http://doi.org/10.1007/BF00402968>
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., ... Yu, T.-H. (2008). Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5867), 1238–40. <http://doi.org/10.1126/science.1151861>
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 531. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Shakerian, F., Kim, K.-H., Szulejko, J. E., & Park, J.-W. (2015). A comparative review

- between amines and ammonia as sorptive media for post-combustion CO₂ capture. *Applied Energy*, 148, 10–22. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.03.026>
- Shi, X., Li, Q., Wang, T., & Lackner, K. S. (2017). Kinetic analysis of an anion exchange absorbent for CO₂ capture from ambient air. *PLOS ONE*, 12(6), e0179828. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0179828>
- Shifrin, N. S., & Chisholm, S. W. (1981). PHYTOPLANKTON LIPIDS: INTERSPECIFIC DIFFERENCES AND EFFECTS OF NITRATE, SILICATE AND LIGHT-DARK CYCLES1. *Journal of Phycology*, 17(4), 374–384. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1981.00374.x>
- Silva De Farias, E. C., Gris, B., Sforza, E., La Rocca, N., & Bertuco, A. (2016). Effects of Sodium Bicarbonate on Biomass and Carbohydrate Production in *Synechococcus* PCC 7002. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49(September), 241–246. <http://doi.org/10.3303/CET1649041>
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.*, 101(6), 1570–1580. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>
- Singh, R. N., & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347–2353. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Soh, L., Montazeri, M., Haznedaroglu, B. Z., Kelly, C., Peccia, J., Eckelman, M. J., & Zimmerman, J. B. (2014). Evaluating microalgal integrated biorefinery schemes: Empirical controlled growth studies and life cycle assessment. *Bioresour. Technol.*, 151, 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.012>
- Solana, M., Rizza, C. S., & Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311–318. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013>
- Sommer, U. (1991). A Comparison of the Droop and the Monod Models of Nutrient Limited Growth Applied to Natural Populations of Phytoplankton Published by: British Ecological Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2389636> Your use of the JSTOR archive indicates yo. *Functional Ecology*, 5(4), 535–544.
- Spalding, M. H. (2007). Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: Chlamydomonas inorganic carbon transporters. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), 1463–1473. <http://doi.org/10.1093/jxb/erm128>
- Stein, J. R. (1973). *Handbook of phycological methods*. Cambridge: Cambridge University

Press. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1975.tb02783.x>

- Ströhle, J., Galloy, A., & Epple, B. (2009). Feasibility study on the carbonate looping process for post-combustion CO₂ capture from coal-fired power plants. *Energy Procedia*, *1*(1), 1313–1320. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2009.01.172>
- Sultemeyer, D., Schmidt, C., & Fock, H. P. (1993). Carbonic anhydrases in higher plants and aquatic microorganisms. *Physiologia Plantarum*, *88*(1), 179–190. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01776.x>
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., Farid, M., & Tariq, S. (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. *The Journal of Supercritical Fluids*, *86*, 57–66. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.020>
- Thiébaud, D., Vial, J., Michel, M., Hennion, M. C., & Greibrokk, T. (2006). Evaluation of reversed phase columns designed for polar compounds and porous graphitic carbon in “trapping” and separating neurotransmitters. *Journal of Chromatography A*, *1122*(1–2), 97–104. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.074>
- Thomassen, G., Egiguren Vila, U., Van Dael, M., Lemmens, B., & Van Passel, S. (2016). A techno-economic assessment of an algal-based biorefinery. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *18*(6), 1849–1862. <http://doi.org/10.1007/s10098-016-1159-2>
- Tran, N. A. T., Seymour, J. R., Siboni, N., Evenhuis, C. R., & Tamburic, B. (2017). Photosynthetic carbon uptake induces autoflocculation of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Algal Research*, *26*, 302–311. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.005>
- Tredici, M. R., Rodolfi, L., Biondi, N., Bassi, N., & Sampietro, G. (2016). Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. *Algal Research*, *19*, 253–263. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.005>
- Tsikas, D., & Chobanyan-Jürgens, K. (2010). Quantification of Carbonate by Gas Chromatography - Mass Spectrometry †. *Analytical Chemistry*, *82*(19), 7897–7905. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac1007688>
- Ummalyma, S. B., Mathew, A. K., Pandey, A., & Sukumaran, R. K. (2016). Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. *Bioresource Technology*, *213*, 216–221. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.114>
- Urrutia, I., Serra, J. L., & Llama, M. J. (1995). Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*(3), 200–205. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00008-F](http://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00008-F)
- Vakh, C., Falkova, M., Timofeeva, I., Moskvina, A., Moskvina, L., & Bulatov, A. (2016).

- Flow Analysis: A Novel Approach For Classification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(5), 374–388. <http://doi.org/10.1080/10408347.2015.1087301>
- Vandevondele, J., Tröster, P., Tavan, P., & Mathias, G. (2012). Vibrational spectra of phosphate ions in aqueous solution probed by first-principles molecular dynamics. *Journal of Physical Chemistry A*, 116(10), 2466–2474. <http://doi.org/10.1021/jp211783z>
- Viêgas, C. V., Hachemi, I., Freitas, S. P., Mäki-Arvela, P., Aho, A., Hemming, J., ... Murzin, D. Y. (2015). A route to produce renewable diesel from algae: Synthesis and characterization of biodiesel via in situ transesterification of *Chlorella* alga and its catalytic deoxygenation to renewable diesel. *Fuel*, 155, 144–154. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.03.064>
- Vigeolas, H., Duby, F., Kaymak, E., Niessen, G., Motte, P., Franck, F., & Remacle, C. (2012). Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 3–12. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.017>
- Wahlen, B. D., Willis, R. M., & Seefeldt, L. C. (2011). Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*, 102(3), 2724–30. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.026>
- Wang, R., Wu, Y., Xing, D., Hang, H., Xie, X., Yang, X., ... Rao, S. (2017). Biomass Production of Three Biofuel Energy Plants' Use of a New Carbon Resource by Carbonic Anhydrase in Simulated Karst Soils: Mechanism and Capacity. *Energies*, 10(9), 1370. <http://doi.org/10.3390/en10091370>
- Wang, S., Liu, F., Chen, C., & Xu, X. (2007). Life cycle emissions of greenhouse gas for ammonia scrubbing technology. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(3), 495–498. <http://doi.org/10.1007/s11814-007-0086-7>
- Wang, Y., Duanmu, D., & Spalding, M. H. (2011a). Carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: inorganic carbon transport and CO₂ recapture. *Photosynthesis Research*, 109(1–3), 115–22. <http://doi.org/10.1007/s11120-011-9643-3>
- Wang, Y., Duanmu, D., & Spalding, M. H. (2011b). Carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: inorganic carbon transport and CO₂ recapture. *Photosynthesis Research*, 109(1–3), 115–122. <http://doi.org/10.1007/s11120-011-9643-3>
- Weaver, A. J., Shepard, J. B., Wilkinson, R. A., Watkins, R. L., Walton, S. K., Radke, A. R., ... Teintze, M. (2014). Antibacterial activity of THAM Trisphenylguanide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS One*, 9(5), e97742.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097742>

- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 849–860. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Wertz, J.-L., Bédué, O., & Mercier, J. P. (2010). *Cellulose Science and Technology*. EPFL Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wertz, J.-L., Richel, A., & Gérin, P. (2015). Molécules issues de la valorisation de la lignine. *ValBiom, Mars*(1), 1–37. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2268/182162>
- Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., & Jefferson, B. (2016). Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, 91, 371–378. <http://doi.org/10.1016/J.WATRES.2015.12.054>
- Wilcox, J., Psarras, P. C., & Liguori, S. (2017). Assessment of reasonable opportunities for direct air capture. *Environmental Research Letters*, 12(6), 065001. <http://doi.org/10.1088/1748-9326/aa6de5>
- Williams, T. G., & Colman, B. (1995). Quantification of the Contribution of CO₂, HCO₃⁻, and External Carbonic Anhydrase to Photosynthesis at Low Dissolved Inorganic Carbon in *Chlorella saccharophila*. *Plant Physiology*, 107(1), 245–251. <http://doi.org/10.1104/PP.107.1.245>
- Willis, R. M., McCurdy, A. T., Ogborn, M. K., Wahlen, B. D., Quinn, J. C., Pease, L. F., & Seefeldt, L. C. (2014). Improving energetics of triacylglyceride extraction from wet oleaginous microbes. *Bioresource Technology*, 167, 416–24. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.013>
- Wojtowicz, J. A. (2001). The Effect of Cyanuric Acid and Other Interferences on Carbonate Alkalinity Measurement. *Journal of the Swimming Pool and Spa Industry*, 1(1), 7–13. Retrieved from http://www.poolhelp.com/wp-content/uploads/2017/05/JSPSI_V1N1_pp07-13.pdf
- Yen, H.-W., Yang, S.-C., Chen, C.-H., Jesisca, & Chang, J.-S. (2014). Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 184, 291–296. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.030>
- Young, K. R., Arthus-Cartier, G., Yam, K. K., Lavoie, P.-O., Landry, N., D’Aoust, M.-A., ... Ward, B. J. (2015). Generation and characterization of a trackable plant-made influenza H5 virus-like particle (VLP) containing enhanced green fluorescent protein (eGFP). *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(9), 3817–27. <http://doi.org/10.1096/fj.15-270421>
- Zhao, B., & Su, Y. (2014). Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 121–

132. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.054>

Zhu, C. J., & Lee, Y. K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189–194. <http://doi.org/10.1023/A:1007914806640>

Zhu, L., Nugroho, Y. K., Shakeel, S. R., Li, Z., Martinkauppi, B., & Hiltunen, E. (2017). Using microalgae to produce liquid transportation biodiesel: What is next? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 391–400. <http://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.04.089>

Zilberman, D., Hochman, G., Rajagopal, D., Sexton, S., & Timilsina, G. (2013). The impact of biofuels on commodity food prices: Assessment of findings. *American Journal of Agricultural Economics*, 95(2), 275–281. <http://doi.org/10.1093/ajae/aas037>